



## **Središnja medicinska knjižnica**

**Milić, Astrid (2007) *Uloga odnosa kalpaina 3 i titina u etiopatogenezi pojasne mišićne distrofije tip 2A (LGMD2A) [The role of Calpain 3 and Titin relationship in the Etiopatogenesis of limb girdle muscular dystrophy type 2A (LGMD2A)].* Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu.**

<http://medlib.mef.hr/542>

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Astrid Milić**

**Uloga odnosa kalpaina 3 i titina u  
etiopatogenezi pojasne mišićne  
distrofije tip 2A (LGMD2A)**

**DISERTACIJA**



**Zagreb, 2007.**

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Astrid Milić**

**Uloga odnosa kalpaina 3 i titina u  
etiopatogenezi pojasne mišićne  
distrofije tip 2A (LGMD2A)**

**DISERTACIJA**

**Zagreb, 2007.**

Doktorska disertacija izrađena je u Laboratoriju za pojasne mišićne distrofije znanstveno-istraživačkog instituta «Généthon» (Evry, Francuska) i u Laboratoriju za kliničku neurogenetiku i mišićne bolesti Hrvatskog instituta za istraživanje mozga, Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Voditelji rada: Prof. dr. sc. Nina Canki-Klain, dr.med.

Dr.sc. Isabelle Richard

# Zahvala

*Zahvaljujem prof.dr.sc. Nini Canki-Klain na podršci i pomoći prilikom pisanja doktorskog rada.*

*Zahvaljujem dr.sc. Isabelle Richard što mi je omogućila izradu disertacije u svom laboratoriju za pojasne mišićne distrofije, znanstveno-istraživačkog instituta «Généthon», kao i na nesebičnoj pomoći i stalnoj podršci prilikom izrade i pisanja doktorskog rada.*

*Zahvaljujem doc.dr.sc. Mariji Žagar, prof.dr.sc. Tibani Žanić-Grubišić i prof.dr.sc. Nives Pećina-Šlaus na korisnim savjetima i komentarima tijekom čitanja ovog rada.*

*Posebnu zahvalu upućujem članovima grupe «Pojasne mišićne distrofije», znanstveno-istraživačkog instituta «Généthon»: Marc Bartoli, Nathalie Danièle, Stéphanie Duguez, Alain Bernot, Gaëlle Blandin, Carinne Roudaut, Sylvie Marchand, Laurence Suel-Petat, Fanny Noulet, Nathalie Bourg-Alibert, Lydie Laure, Karine Charton, Evelyne Gicquel, Laëtitia Barrault, William Lostal, Jérôme Poupiout.*

*Zahvaljujem i Martini Malnar, dipl.ing.mol.biologije, Mariji Vidaković i svim kolegama Hrvatskog instituta za istraživanje mozga, Medicinskog fakulteta u Zagrebu.*

*Najveću zahvalnost, za bezgraničnu potporu i strpljenje, upućujem svojoj obitelji.*

# SADRŽAJ

<b>POPIS KRATICA .....</b>	<b>v</b>
<b>1. UVOD .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Mišićno tkivo .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1.1. Skeletno mišićno tkivo.....</b>	<b>1</b>
1.1.1.1. Građa skeletnog mišića.....	1
1.1.1.2. Građa mišićnog vlakna .....	2
<b>1.2. Mišićne distrofije .....</b>	<b>4</b>
<b>1.3 Pojasne mišićne distrofije .....</b>	<b>8</b>
<b>1.3.1. Autosomno dominantne pojasne mišićne distrofije.....</b>	<b>9</b>
1.3.1.1. Pojasna mišićna distrofija tip 1A.....	9
1.3.1.2. Pojasna mišićna distrofija tip 1B .....	9
1.3.1.3. Pojasna mišićna distrofija tip 1C.....	9
1.3.1.4. Pojasne mišićne distrofije tip 1D-1G.....	9
<b>1.3.2. Autosomno recesivne pojasne mišićne distrofije .....</b>	<b>10</b>
1.3.2.1. Pojasna mišićna distrofija tip 2A.....	10
1.3.2.2. Pojasna mišićna distrofija tip 2B .....	11
1.3.2.3. Pojasne mišićne distrofije tip 2C-2F .....	11
1.3.2.4. Pojasna mišićna distrofija tip 2G.....	12
1.3.2.5. Pojasna mišićna distrofija tip 2H.....	12
1.3.2.6. Pojasna mišićna distrofija tip 2I .....	12
1.3.2.7. Pojasna mišićna distrofija tip 2J .....	13
1.3.2.8. Pojasna mišićna distrofija tip 2K.....	13
<b>1.4. Kalpaini .....</b>	<b>13</b>
<b>1.4.1. Ubikvitarni kalpaini .....</b>	<b>14</b>
1.4.1.1. Strukturne i biokemijske karakteristike ubikvitarnih kalpaina.....	14
1.4.1.2. Funkcija ubikvitarnih kalpaina .....	15
<b>1.4.2. Kalpain 3 .....</b>	<b>16</b>
1.4.2.1. Strukturne i biokemijske karakteristike kalpaina 3 .....	16
1.4.2.2. Funkcija kalpaina 3.....	19

<b>1.5. Titin.....</b>	<b>20</b>
<b>1.5.1. Struktura i funkcija titina.....</b>	<b>20</b>
1.5.1.1. Titin u području Z-crte .....	21
1.5.1.2. Titin u području I-pruge .....	21
1.5.1.3. Titin u području A-pruge.....	22
1.5.1.4. Titin u području M-crte .....	22
<b>1.5.2. Bolesti uzrokovane mutacijama u TTN genu .....</b>	<b>25</b>
1.5.2.1. Kardiomiopatije uzrokovane mutacijama u TTN genu .....	25
1.5.2.2. Bolesti skeletnog mišićnog tkiva uzrokovane mutacijama u TTN genu .....	25
<b>2. HIPOTEZA I CILJ RADA .....</b>	<b>27</b>
2.1. Hipoteza.....	27
2.2. Cilj rada .....	27
<b>3. MATERIJALI I METODE .....</b>	<b>28</b>
<b>3.1. Materijali.....</b>	<b>28</b>
3.1.1. Uzorci mišićnog tkiva.....	28
3.1.2. Kemikalije .....	28
<b>3.2. Metode .....</b>	<b>29</b>
3.2.1. Priprema komplementarne DNA (cDNA).....	29
3.2.2. Lančana reakcija polimerazom (PCR).....	30
3.2.3. Mutageneza.....	31
3.2.4. Elektroforeza DNA u agaroznom gelu .....	33
3.2.5. Ekstrakcija DNA iz agaroznog gela .....	33
3.2.6. Vežanje odsječaka DNA s plazmidom .....	34
3.2.7. Transformacija bakterija .....	34
3.2.8. Izolacija plazmidne DNA iz bakterija .....	35
3.2.9. Transfekcija .....	36
3.2.10. Priprema uzoraka za proteinsku analizu.....	37
3.2.10.1. Priprema proteina staničnog lizata .....	37
3.2.10.2. Priprema ukupnih proteina mišićnog tkiva.....	37
3.2.10.3. Priprema citoskeletnih proteina mišićnog tkiva .....	38
3.2.11. Određivanje koncentracije proteina metodom po Bradfordu .....	38
3.2.12. Denaturirajuća poliakrilamidna gel elektroforeza .....	39

3.2.13. Prijenos proteina na membranu ( <i>engl.</i> western blotting).....	39
3.2.14. Inkubacija membrane sa specifičnim protutijelima.....	41
3.2.15. Imunohistokemija .....	42
3.2.15.1. Analiza fenotipia NIH3T3 stanica .....	42
3.2.15.2. Proučavanje smještaja plazmidneDNAu <i>in vivo</i> uvjetima (unosom u miša).....	42
3.2.16. Enzimska reakcija određivanja aktivnosti kalpaina 3.....	43
3.2.17. Metoda dvostrukog hibrida ( <i>engl.</i> yeast-two-hybrid).....	43
<b>4. REZULTATI.....</b>	<b>45</b>
<b>4.1. Enzimski test za određivanje aktivnosti kalpaina 3 .....</b>	<b>45</b>
4.1.1. Princip enzimskog testa .....	45
4.1.2. Optimizacija enzimskog testa .....	46
4.1.3. Analiza humanih biopsija enzimskim testom.....	48
4.1.4. Analiza različitih mišjih modela enzimskim testom.....	51
<b>4.2. Odnos kalpaina 3 i titina u nastanku pojasne mišićne distrofije tip 2A.....</b>	<b>52</b>
4.2.1. Cijepanje C-terminalnog dijela titina kalpainom 3.....	52
4.2.1.1. Cijepanje C-terminalnog dijela titina kalpainom 3 u <i>in vitro</i> uvjetima.....	52
4.2.1.2. Cijepanje C-terminalnog dijela titina kalpainom 3 u mišjim modelima .....	53
4.2.1.3. Cijepanje C-terminalnog dijela titina kalpainom 3 u humanim biopsijama.....	54
4.2.2. Smještaj p45 proteinskog fragmenta u mišićnoj stanici .....	54
<b>4.3. Odnos kalpaina 3 i titina u nastanku pojasne mišićne distrofije tip 2J.....</b>	<b>56</b>
4.3.1. Utjecaj Mex6 mutacija na interakciju kalpaina 3 i titina.....	56
4.3.2. Utjecaj Mex6 mutacija na izražaj i aktivnost kalpaina 3.....	57
4.3.2.1. Utjecaj Mex6 mutacija na izražaj i aktivnost kalpaina 3 u <i>in vitro</i> uvjetima.....	57
4.3.2.2. Utjecaj Mex6 mutacija na izražaj i aktivnost kalpaina 3 u hum.biopsijama .....	58
4.3.3. Utjecaj Mex6 mutacija na cijepanje C-terminalnog dijela titina kalpainom 3 .....	59
<b>4.4. Ispitivanje supstrata kalpaina 3 u C-terminalnom dijelu titina .....</b>	<b>60</b>
4.4.1. Obitelj MURF proteina.....	60
4.4.1.1. Analiza MURF1 proteina kao mogućeg supstrata kalpaina 3 .....	60
4.4.1.2. Analiza MURF2 i MURF2alt proteina kao mogućih supstrata kalpaina 3 .....	61
4.4.2. Analiza PSMC3 proteina kao mogućeg supstrata kalpaina 3.....	62
4.4.3. KY protein .....	63
4.4.3.1. Analiza KY proteina kao mogućeg supstrata kalpaina 3.....	63
4.4.3.2. Utjecaj KY proteina na aktivnost kalpaina 3.....	63



4.4.3.3. Utjecaj KY proteina na morfologiju stanica sa izraženim kalpainom 3.....	64
4.4.3.4. Interakcija KY proteina sa C-terminalnim dijelom titina.....	64
4.4.4. Analiza teletonina (TCAP) proteina kao mogućeg supstrata kalpaina 3.....	66
4.4.5. Analiza miosprina (CMYA5) proteina kao mogućeg supstrata kalpaina 3.....	66
<b>5. RASPRAVA .....</b>	<b>68</b>
<b>5.1. Enzimski test za određivanje aktivnosti kalpaina 3 .....</b>	<b>68</b>
<b>5.2. Odnos kalpaina 3 i titina u nastanku pojasne mišićne distrofije tip 2A.....</b>	<b>72</b>
5.2.1. Cijepanje C-terminalnog titina kalpainom 3 .....	72
5.2.2. Istraživanje funkcije produkata cijepanja titina kalpainom 3.....	74
<b>5.3. Odnos kalpaina 3 i titina u nastanku pojasne mišićne distrofije tip 2J.....</b>	<b>74</b>
5.3.1. Utjecaj Mex6 mutacija na funkciju kalpaina 3 .....	74
<b>5.4. Ispitivanje supstrata kalpaina 3 u C-terminalnom dijelu titina .....</b>	<b>77</b>
<b>6. ZAKLJUČAK .....</b>	<b>81</b>
<b>7. SAŽETAK .....</b>	<b>83</b>
<b>8. SUMMARY .....</b>	<b>84</b>
<b>9. LITERATURA .....</b>	<b>85</b>
<b>10. ŽIVOTOPIS .....</b>	<b>107</b>

## POPIS KRATICA

APS	amonij persulfat
ASB	aminosulfobetain-14
BBC	B-box C-terminalna regija ( <i>engl.</i> B-box C-terminal domain)
BMD	Beckerova mišićna distrofija
BSA	albumin goveđeg seruma ( <i>engl.</i> bovine serum albumine)
CAPN	kalcijem aktivirana neutralna proteaza
CARP	srčani ankirin ponavljajući protein ( <i>engl.</i> cardiac ankyrin repeat protein)
cDNA	komplementarna deoksiribonukleinska kiselina
CHAPS	3-[(3-kolamidopropil)dimethylamonij]-1-propan-sulfonat
CK	kreatin kinaza ( <i>engl.</i> creatine kinase)
CMV	citomegalovirus
CMYA5	cardiomyopathy associated protein 5
CSM	complete supplement mixture
DARP	dijabetes ankirin ponavljajući protein ( <i>engl.</i> diabetes ankyrin repeat protein)
DM	miotonična distrofija ( <i>dystrophia myotonica</i> )
DMD	Duchenneova mišićna distrofija
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO	dimetilsulfoksid
DNA	deoksiribonukleinska kiselina
DRAL	down-regulated in rhabdomyosarcoma
DOB	dropout base
DTT	ditiotreitol
E64	trans-epoksisukcinil-L-leucilamido-(4-gvanido)butan
EDMD	Emery-Dreifussova mišićna distrofija
EDTA	etilendiamin tetraoctena kiselina
EGTA	etilenglikol-bis ( $\beta$ -aminoetil eter)-N,N,N',N'-tetraoctena kiselina
FKRP	fukutinu srodni protein ( <i>engl.</i> fukutin related protein)
FN3	fibronektin tip III ponavljajuća regija ( <i>engl.</i> fibronectin type III)
FHL2	four and a half LIM domain protein 2

FSHD	facioskapulohumeralna mišićna distrofija
HRP	peroksidaza iz hrena ( <i>engl.</i> horse-raddish peroxidase)
IS	insercijski slijed ( <i>engl.</i> insertion sequence)
LB	Luria Bertani
LGMD	pojasna mišićna distrofija ( <i>engl.</i> limb girdle muscular dystrophy)
LiAc	litijev acetat
MDC	kongenitalna mišićna distrofija
MES	2-(N-morfolino) etan sulfonska kiselina
MEX	egzon u području M-crte ( <i>engl.</i> M-line exon)
MOPS	3- (N-morfolino) propan sulfonska kiselina
mRNA	glasnička ribonukleinska kiselina ( <i>engl.</i> messenger RNA)
MURF	muscle ring finger protein
MyBP-C	miozin vezujući protein C ( <i>engl.</i> myosin binding protein C)
NOS	sintetaza dušičnog oksida ( <i>engl.</i> nitric oxide synthase)
PABP2	poli A vezujući protein 2 ( <i>engl.</i> poly A binding protein 2)
PAGE	poliakrilamidna gel elektroforeza
PBS	phosphate buffered saline
PCR	lančana reakcija polimerazom ( <i>engl.</i> polymerase chain reaction)
PEG	polietilenglikol
PIC	smjesa inhibitora proteaza ( <i>engl.</i> protease inhibitor cocktail)
POMGnT1	protein O-manoza beta-1,2-N-acetil glukozamin transferaza 1
POMT1	protein O-manozil transferaza 1
PVDF	poliviniliden difluorid
RING	really interesting new protein
RNA	ribonukleinska kiselina
SDS	natrij dodecil sulfat ( <i>engl.</i> sodium dodecyl sulphate)
SOC	super optimal catabolite
SRF	serum response factor
TAE	tris-acetat-EDTA
TBS	fiziološka otopina puferirana trisom ( <i>engl.</i> tris buffered saline)
TCAP	titin cap
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletildiamin
TMD	tibijalna mišićna distrofija
TRIM 32	tripartite-motif-containing protein 32

TTN

titin

YPD

kvasac-pepton-dekstroza (*engl.* yeast- peptone- dextrose)

## **1.1. MIŠIĆNO TKIVO**

Mišići predstavljaju 40-50% ukupne mase ljudskog tijela. Interakcija proteina u stanicama mišićnog tkiva omogućava razvijanje sila potrebnih za kontrakciju mišića, što rezultira gibanjem nekih organa, odnosno pokretanjem cijelog tijela.

Poznata su tri tipa mišićnog tkiva: i) skeletno mišićno tkivo, ii) srčano mišićno tkivo, te iii) glatko mišićno tkivo.

Skeletno mišićno tkivo čine snopovi dugih, cilindričnih vlakana (tzv. mišićna vlakna) sa velikim brojem jezgara i optičkom pojavom poprečne ispruganosti citoplazme. Kontrakcija skeletnog mišićnog tkiva nastaje uslijed uzajamnog djelovanja aktinskih i miozinskih filamenata koji klize jedni duž drugih. Kontrakcija je brza i najčešće pod utjecajem naše volje.

Srčano mišićno tkivo građeno je od izduženih stanica sa jednom jezgrom koje također pokazuje poprečnu ispruganost citoplazme. Kontrakcija je snažna, ritmična i nije pod utjecajem naše volje.

Glatko mišićno tkivo čine snopovi vretenastih stanica bez poprečne ispruganosti citoplazme. Kontrakcija glatkog mišićja je polagana i bez utjecaja naše volje.

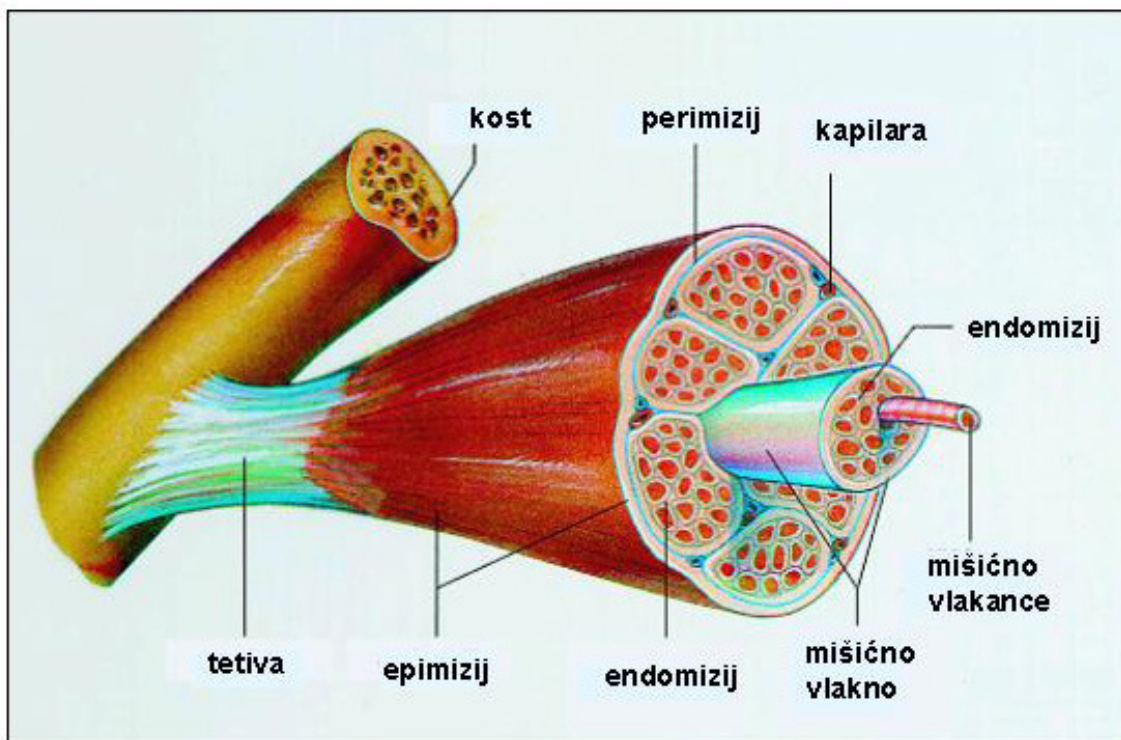
### **1.1.1. Skeletno mišićno tkivo**

#### **1.1.1.1. Građa skeletnog mišića**

Osnovne jedinice skeletnog mišića, mišićna vlakna, naslagana su u pravilne mišićne snopove okružene epimizijem, tj. vanjskom vezivnom ovojnicom koja obavija cijeli mišić, dok je svaki pojedinačni snop obavijen perimizijem. Svako mišićno vlakno okružuje njezin sloj vezivnog tkiva koji se naziva endomizij (slika 1).

Skeletno mišićno tkivo bogato je krvnim žilama i živcima. Krvne žile, tj. mreža kapilara prisutna je oko svakog mišićnog vlakna, dok živci, koji se granaju poput kapilara, ulaze u kontakt sa staničnom membranom, sarkolemom.

Uz mišićna vlakna skeletno mišićno tkivo sadrži i tzv. satelitske stanice koje omogućavaju regeneraciju skeletnog mišića. Satelitske stanice su vretenaste stanice sa jednom jezgrom koje se uslijed podražaja (npr. ozljede) aktiviraju, te stapaju u nova mišićna vlakna.

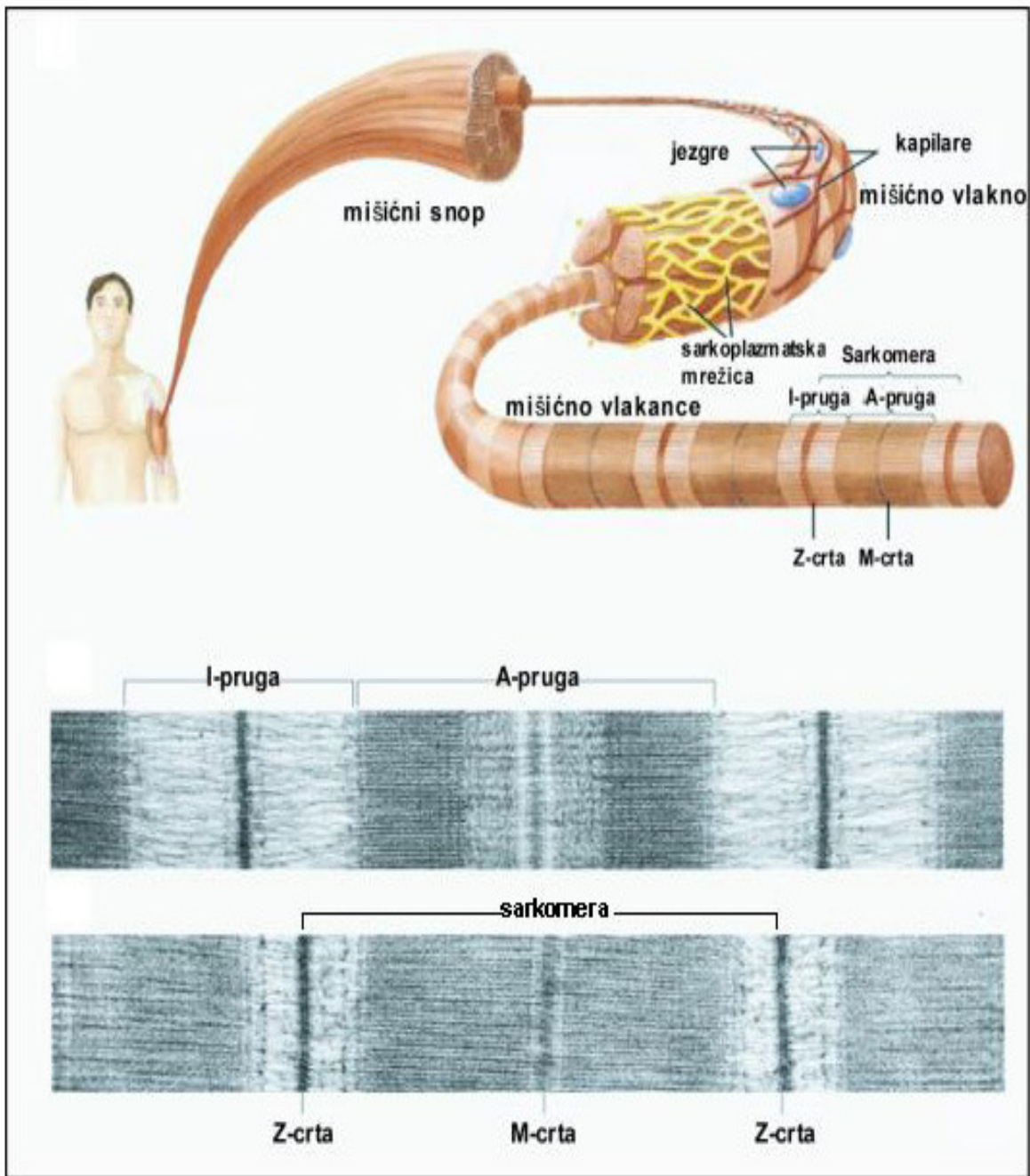


Slika 1. Građa skeletnog mišića. (modificirano prema 1)

### 1.1.1.2. Građa mišićnog vlakna

Mišićno vlakno nastaje stapanjem nezrelih embrionalnih mišićnih stanica u jedinstvenu masu citoplazme (sarkoplazma), dužine oko 30 cm i promjera 10-100 $\mu$ m, s velikim brojem jezgara smještenim na periferiji stanice, ispod stanične membrane (sarkoleme). Na uzdužnom presjeku mišićnog vlakna, svjetlosnim se mikroskopom uočava njihova poprečna ispruganost, tj. izmjena tamnih (A-pruge) i svjetlih (I-pruge) poprečnih pruga. A-pruga, uglavnom građena od miozina, u svojoj sredini ima svjetlo područje (H-pruga), u čijoj se sredini nalazi M-crta. I-pruga, koju uglavnom čini aktin, uzdužno je podijeljena na dva dijela tamnom poprečnom Z-crtom. Područje između dviju Z-crta naziva se sarkomera (slika 2).

Sarkoplazma mišićnog vlakna ispunjena je dugim i cilindričnim snopovima mišićnih vlaknaca (miofibrila), koja se sastoje od lančano nanizanih sarkomera usporednih s uzdužnom osi mišićnog vlakna. U sarkoplazmi se još nalaze i druge, uobičajene stanične organele, među kojima je i sarkoplazmatska mrežica. Njezin karakterističan smještaj, zajedno sa T-tubulima (poprečnim cjevčicama) osigurava normalan prijenos signala i oslobađanje iona kalcija, što je neophodno za normalu kontrakciju mišića (2).



Slika 2. Shematski prikaz grade mišićnog vlakna. (modificirano prema 3)

## 1.2. MIŠIĆNE DISTROFIJE

Mišićne distrofije su skupina tridesetak nasljednih i trenutno neizlječivih neuromuskularnih bolesti. Karakterizirane su progresivnom slabošću i propadanjem skeletnog, a u nekim slučajevima i srčanog mišićnog tkiva, što u konačnici može dovesti do invaliditeta bolesnika i preuranjene smrti. Na razini mišićnog vlakna distrofičan proces karakterizira varijabilnost veličine vlakana, centralno smeštene jezgre, te slabost stanične membrane što rezultira nekrozom i zamjenom mišićnih vlakana vezivnim i masnim tkivom.

Klasičan način klasifikacije mišićnih distrofija temeljio se na kliničkim karakteristikama mišićnih distrofija poput početka, težine i progresije bolesti, skupina mišića koje su zahvaćene distrofičnim procesom, te prema načinu nasljeđivanja. Ovakav pristup klasifikaciji bio je znatno otežan postojanjem intra- i interfamilijarne varijabilnosti kliničke slike. Tek je razvoj metoda molekularne biologije omogućio, otkrićem odgovornih gena i proteina, napredak u klasifikaciji mišićnih distrofija koja se danas temelji više na genskom uzroku nego na kliničkim simptomima pojedine vrste mišićne distrofije. Zahvaljujući spomenutim metodama molekularne biologije, u zadnjih je desetak godina otkriven velik broj novih gena i proteina (slika 3), a time i novih vrsta i podvrsta mišićnih distrofija (Tablica 1). Tako se danas, prema najnovijim podacima iz literature, mišićne distrofije vežu uz 29 različitih genskih lokusa, odnosno oko 35 različitih bolesti (4).

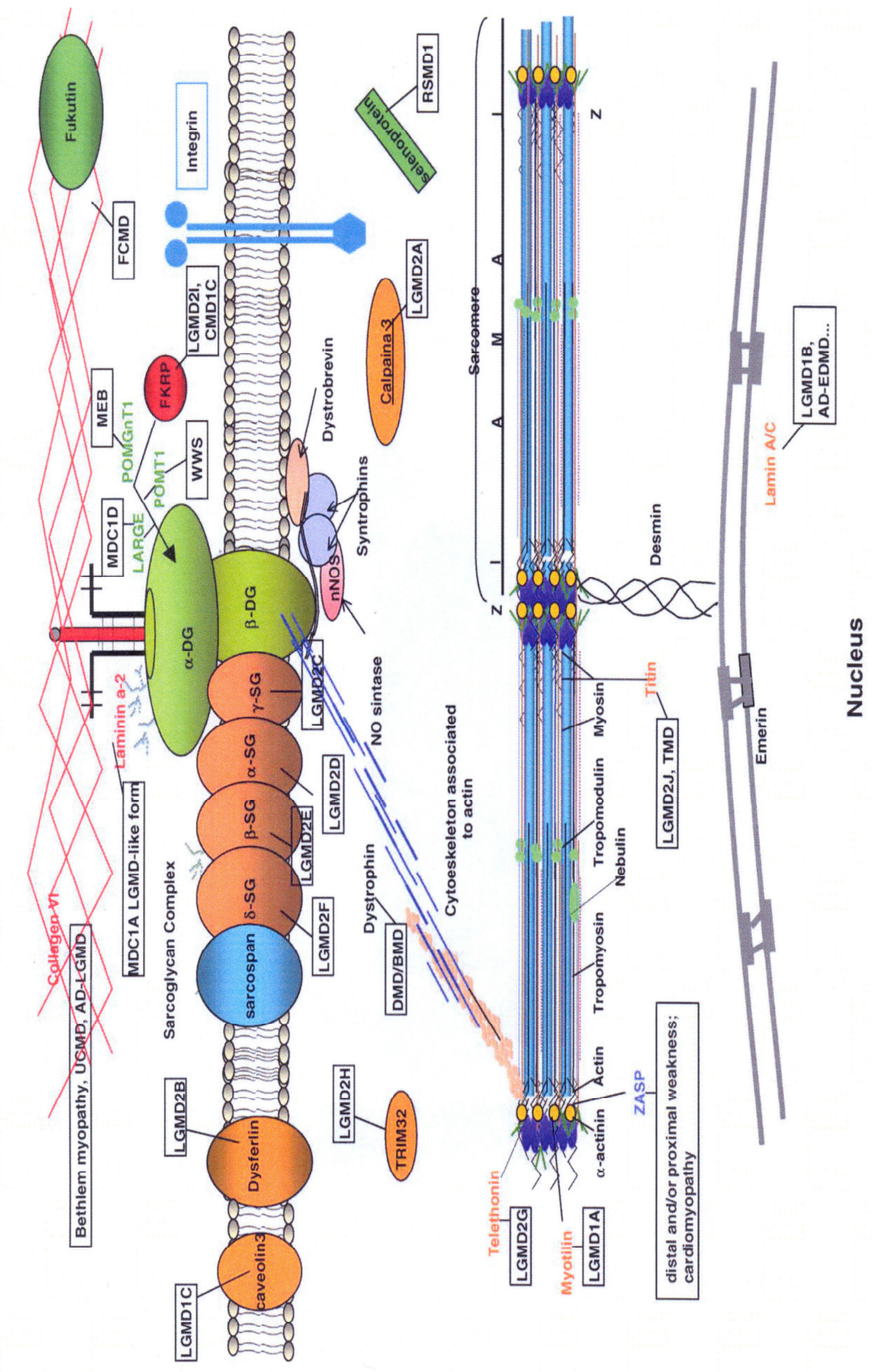
Osim bolje klasifikacije, razvoj metoda molekularne biologije omogućio je i bržu i bolju dijagnostiku mišićnih distrofija, kao i njihovu prevenciju otkrivanjem prenosioca bolesti i mogućnošću prenatalne dijagnostike. Poznavanje odgovornog gena i proteina omogućilo je nastavak istraživanja prema boljem razumijevanju mehanizma bolesti, a u posljednje vrijeme i prvih koraka u smjeru liječenja mišićnih distrofija (4, 5, 6).



Tablica 1. Osnovne karakteristike različitih tipova mišićnih distrofija ( [www.dmd.nl](http://www.dmd.nl) i <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> )

MIŠIĆNA DISTROFIJA	OMIM	NASLJEDIVANJE	GENSKI LOKUS	GEN	PROTEIN	LITERATURA
Duchenneova m.distrofija	310200	X-vezano	Xp21	DMD	distrofin	(7,8)
Beckerova m.distrofija	300376	X-vezano	Xp21	DMD	distrofin	
<b>Pojasne mišićne distrofije (LGMD)</b>						
LGMD 1A	159000	autosomno dominantno	5q31	MYOT	miotilin	(9)
LGMD 1B	159001	autosomno dominantno	1q11-21	LMNA	lamin A/C	(10)
LGMD 1C	607801	autosomno dominantno	3p25	CAV3	kaveolin 3	(11)
LGMD 1D	603511	autosomno dominantno	7q	nepoznat	nepoznat	(12)
LGMD 1E	602067	autosomno dominantno	6q22	nepoznat	nepoznat	(13)
LGMD 1F	/	autosomno dominantno	7q31.1	nepoznat	nepoznat	(14)
LGMD 1G	/	autosomno dominantno	4p21	nepoznat	nepoznat	(15)
LGMD 2A	253600	autosomno recesivno	15q15	CAPN3	kalpain 3	(16)
LGMD 2B	253601	autosomno recesivno	2p13	DYSF	disferlin	(17,18)
LGMD 2C	253700	autosomno recesivno	13q12	SGCG	γ-sarkoglikan	(19)
LGMD 2D	608099	autosomno recesivno	17q21	SGCA	α-sarkoglikan	(20)
LGMD 2E	604286	autosomno recesivno	4q11	SGCB	β-sarkoglikan	(21,22)
LGMD 2F	601287	autosomno recesivno	5q33.3	SGCD	δ-sarkoglikan	(23)
LGMD 2G	601954	autosomno recesivno	17q12	TCAP	teletonin	(24)
LGMD 2H	254110	autosomno recesivno	9q33.1	TRIM32	TRIM32	(25)
LGMD 2I	607155	autosomno recesivno	19q13.22	FKRP	fukutinu srodni protein	(26)
LGMD 2J	608807	autosomno recesivno	2q24.3	TTN	titin	(27)
LGMD 2K	609308	autosomno recesivno	9q34.1	POMT1	O-manozil transferaza 1	(28)
<b>Distalne mišićne distrofije</b>						
Miyoshi miopatija	254130	autosomno recesivno	2p13	DYSF	disferlin	(18)
Tibijalna mišićna distrofija	600334	autosomno dominantno	2q31	TTN	titin	(27)
Welander miopatija	604454	autosomno dominantno	2p13	nepoznat	nepoznat	(29)
Nonaka miopatija	605820	autosomno recesivno	9p12-p11	GENE	acetilglukozamin epimeraza	(30)
“inclusion body” miopatija	600737	autosomno recesivno	9p12-p11	GENE	acetilglukozamin epimeraza	(31)
Dezmin miopatija (miofibrilarna)	601419	autosomno dominantno	2q35	DES	dezmin	(32)
Dezmin miopatija	608810	autosomno dominantno	11q22.3-q23.1	CRYAB	α-B kristalin	(33)
Gowers-Laing miopatija	160500	autosomno dominantno	14q12	nepoznat	nepoznat	(34)

						(Tablica 1- nastavak)
MISIČNA DISTROFIJA	OMIM	NASLJEĐIVANJE	GENSKI LOKUS	GEN	PROTEIN	LITERATURA
<b>Kongenitalne m.distrofije (MDC)</b>						
MDC 1A	607855	autosomno recesivno	6q22-q23	LAMA2	merozin (laminin $\alpha$ -2 lanac)	(35)
MDC 1B	604801	autosomno recesivno	1q42	nepoznat	nepoznat	(36)
MDC 1C	606612	autosomno recesivno	19q13.3	FKRP	fukutinu srodni protein	(26)
MDC 1D	608840	autosomno recesivno	22q12.3-q13.1	LARGE	acetilglukozaminiltransferaza	(37)
kongenitalna miopatija	600536	autosomno recesivno	12q13	ITGA7	integrin $\alpha$ -7	(38)
Fukuyama MDC	253800	autosomno recesivno	9q31	FCMD	fukutin	(39)
Walker-Warburg sindrom	236670	autosomno recesivno	9q34	POMT1	O-manozil transferaza 1	(40)
	236670	autosomno recesivno	9q31	FCMD	Fukutin	(41)
	236670	autosomno recesivno	19q13.3	FKRP	fukutinu srodni protein	(42)
	236670	autosomno recesivno	14q24.3	POMT2	O-manozil transferaza 2	(43)
	253280	autosomno recesivno	1p32-34	POMGnT1	O-manoza beta-1,2-N acetilglukozaminiltransferaza	(44)
“muscle-eye-brain” bolest	253280	autosomno recesivno	19q13.3	FKRP	fukutinu srodni protein	(42)
	602771	autosomno recesivno	1p35-36	SEPN1	selenoprotein N1	(45)
“rigid spine” m.distrofija	254090	autosomno recesivno	21q22.3	COL6A1	kolagen VI $\alpha$ -1	(46)
Ulrich MDC type 1	254090	autosomno recesivno	21q22.3	COL6A2	kolagen VI $\alpha$ -2	(47)
Ulrich MDC type 2	254090	autosomno recesivno	2q37	COL6A3	kolagen VI $\alpha$ -3	(48)
Ulrich MDC type 3	254090	autosomno recesivno				
<b>Emery-Dreifuss m.d. (EDMD)</b>						
EDMD1	310300	X-vezano	Xq28	EMD	emerin	(49)
EDMD2	181350	autosomno dominantno	1q21.2	LMNA	lamin A/C	(50)
EDMD3	604929	autosomno recesivno	1q21.2	LMNA	lamin A/C	(51)
<b>Okulofaringealna m.distrofija</b>	164300	autosomno dominantno	14q11	PABP2	poli A vezujući protein 2	(52)
<b>Epidermolysis bullosa m.distrofija</b>	226670	autosomno recesivno	8q24	PLEC1	plektin 1	(53)
<b>Facioskapulohumeralna m.d.</b>	158900	autosomno dominantno	4q35		delecija 3.3 kb ponavljajućih D4Z4 jedinica	(54)
<b>Miotonična distrofija</b>						
Tip 1 (DM1, Steinertova bolest)	160900	autosomno dominantno	19q13	DMPK	DM protein kinaza	(55)
Tip 2 (DM2)	602668	autosomno dominantno	3q13.3-q24	ZNF9	“zinc finger” protein 9	(56)



Slika 3. Proteini uključeni u nastanak različitih vrsta i podvrsta mišićnih distrofija (preuzeto iz 57)

### 1.3. POJASNE MIŠIĆNE DISTROFIJE

Naziv «pojasne mišićne distrofije» (*engl.* limb girdle muscular dystrophy, LGMD) prvi su upotrijebili Walton i Natrass 1954. godine (58), želeći njime objediniti sve slučajeve mišićnih distrofija koje karakterizira:

- početak u prva tri desetljeća života,
- zahvaćenost proksimalnih mišića ekstremiteta, zdjelice i ramenog obruča, bez zahvaćenosti mišića lica
- umjereno teška progresija bolesti, koja može dovesti do teške onesposobljenosti, pa i smrti
- pojavnost u oba spola, te
- autosomno dominantan ili autosomno recesivan način nasljeđivanja.

Od samog početka bila je uočljiva velika klinička heterogenost među obiteljima bolesnika s pojasnom mišićnom distrofijom. Razlike su se očitovale bilo u načinu nasljeđivanja bilo u različitim mišićnim skupinama koje su prve bile zahvaćene distrofičnim promjenama. Razvoj metoda molekularne biologije omogućio je otkrivanje gena i proteina odgovornih za nastanak pojasnih mišićnih distrofija. Korištenjem spomenutih metoda otkriveno je da se obitelji sa dijagnozom pojasne mišićne distrofije mogu grupirati oko više genskih lokusa, tj. većeg broja gena i proteina. To je ujedno značilo da pojasne mišićne distrofije uz kliničku karakterizira i genetska heterogenost, tj. mogućnost da isti gen pokazuje različitu kliničku sliku, odnosno da iste ili vrlo slične simptome mogu uzrokovati različiti geni. Spomenute karakteristike pojasnih mišićnih distrofija čine njihovo točno razlikovanje samo na temelju kliničke slike nemogućim. Stoga je analiza gena i/ili proteina nužna za postavljanje točne i precizne dijagnoze, te pravilno genetsko savjetovanje (59, 60).

U zadnjih desetak godina locirano je desetak različitih gena, odnosno proteina odgovornih za nastajanje pojasnih mišićnih distrofija (Tablica 1; slika 3) zbog čega se pretpostavilo postojanje više podvrsta pojasnih mišićnih distrofija. U cilju njihovog boljeg razumijevanja i razlikovanja, od 1995. godine primjenjuje se nomenklatura kojom se pojasne mišićne distrofije dijele u dvije velike skupine. Podjela je izvršena prema načinu nasljeđivanja i kronologiji otkrića kromosomskog smještaja odgovornog gena. Prema spomenutoj nomenklaturi, pojasne mišićne distrofije tip 1 nasljeđuju se autosomno dominantno, a tip 2 autosomno recesivno (61).

### **1.3.1. Autosomno dominantne pojasne mišićne distrofije**

Do danas je otkriveno 7 tipova pojasnih mišićnih distrofija sa autosomno dominantnim načinom nasljeđivanja. Kako su opisane u svega nekoliko obitelji njihova se učestalost smatra znatno rjeđom od recesivnih pojasnih mišićnih distrofija.

#### **1.3.1.1. Pojasna mišićna distrofija tip 1A**

Pojasna mišićna distrofija tip 1A (LGMD1A) uzrokovana je mutacijama gena MYOT koji kodira miotilin (9). Miotilin je izražen u skeletnom i srčanom mišićnom tkivu, i to u području Z-crte gdje stupa u interakcije sa filaminom C i  $\alpha$ -aktininom (62).

#### **1.3.1.2. Pojasna mišićna distrofija tip 1B**

Pojasna mišićna distrofija tip 1B (LGMD1B) posljedica je mutacija u LMNA genu koji kodira lamin A i C (10), proteine jezgrine ovojnice koji nastaju alternativnim izrezivanjem istog gena. Mutacije u genu za lamin A i C odgovorne su i za nastajanje mnogih drugih oboljenja, tzv. laminopatija. U tu se grupu ubrajaju Emery-Dreifussova mišićna distrofija sa autosomno dominantnim i vrlo rijetkim autosomno recesivnim načinom nasljeđivanja (50, 51), obiteljska parcijalna lipodistrofija Dunningan tipa (63), kardiomiopatija (64), Charcot-Marie-Tooth tip 2B1 (65), Hutchinson-Gilford progerija (66), te dermatopatija na ograničenim dijelovima kože (67).

#### **1.3.1.3. Pojasna mišićna distrofija tip 1C**

Pojasna mišićna distrofija tip 1C (LGMD1C) uzrokovana je mutacijama CAV3 gena (11). Osim u LGMD1C mutacije u CAV3 genu pronađene su i u bolesnika sa hiperCKemijom, tj. s povišenim vrijednostima kreatin kinaze (CK), ali bez izražene mišićne slabosti (68), kao i u nasljednoj „rippling“ mišićnoj bolesti (69).

Kaveolini su osnovne komponente tzv. «kaveola», tj. invaginacija stanične membrane. Interakcije sa brojnim proteinima uključenim u različite procese u mišićnoj stanici upućuju na važnost kaveolina-3, no njegova točna funkcija još nije razjašnjena. Neki od proteina s kojima kaveolin-3 stupa u interakcije su disferlin (70), NOS (71), te  $\beta$ -dystroglikan (72).

#### **1.3.1.4. Pojasne mišićne distrofije tip 1D-1G**

Za razliku od prva tri tipa dominantnih pojasnih mišićnih distrofija, za preostala 4 tipa (LGMD1D-1G) odgovoran gen, odnosno protein još je uvijek nepoznat (Tablica 1.).

### **1.3.2. Autosomno recesivne pojasne mišićne distrofije**

Pojasne mišićne distrofije sa autosomno recesivnim načinom nasljeđivanja skupina je neuromuskularnih bolesti u kojoj je, u zadnjih desetak godina, otkriven velik broj novih gena i proteina, a time i novih tipova recesivnih pojasnih mišićnih distrofija. Trenutno ih je poznato 11, označenih slovima od A do K (Tablica 1).

#### **1.3.2.1. Pojasna mišićna distrofija tip 2A**

1989. godine opisana je skupina bolesnika sa Réunion otoka (73) koja je po kliničkoj slici, tj. zahvaćenosti mišića, težini i progresiji bolesti odgovarala juvenilnoj progresivnoj mišićnoj distrofiji koju je još 1884. godine opisao Erb (74). Istovremeno način nasljeđivanja, kao i kliničke i histološke karakteristike odgovarale su pojasnim mišićnim distrofijama s autosomno recesivnim načinom nasljeđivanja (75). Prema klasifikaciji pojasnih mišićnih distrofija iz 1995. godine ova pojasna mišićna distrofija označava se kao tip 2A (LGMD2A, OMIM #253600).

Pojasna mišićna distrofija tip 2A uobičajeno započinje tijekom prva tri desetljeća života problemima prilikom uspinjanja i trčanja. U početku su predominantno zahvaćeni mišići zdjelice, a potom i proksimalni mišići donjih i gornjih ekstremiteta. Gubitak sposobnosti hodanja javlja se 10 do 20 godina nakon prvih simptoma bolesti, nakon čega slabošću bivaju obuhvaćeni i distalni mišići. Očni i bulbarni mišići, kao i mišići lica gotovo nikad nisu zahvaćeni distrofičnim procesom. Rad i funkcija srca su normalni, a u bolesnika nisu opisani nikakvi mentalni problemi (75). U LGMD2A bolesnika uobičajno su pronađene višestruko povišene vrijednosti kreatin kinaze (CK). Kao i kod ostalih pojasnih mišićnih distrofija i kod LGMD2A uočena je velika varijabilnost kliničke slike između bolesnika iz različitih obitelji, ali i među bolesnicima iz iste obitelji.

Korištenjem analize genetske povezanosti (*engl.* linkage analysis) u bolesnika sa Réunion otoka i njihovih obitelji, 1991. godine je otkriven smještaj LGMD2A gena na dugom kraku kromosoma 15, u području 15q15.1-15q21.1 (76), odnosno 15q15.1-15q15.3 (77, 78). Isti smještaj na kromosomu 15 kasnije je potvrđen i u obiteljima iz drugih dijelova svijeta (79, 80). Identifikacija gena iz spomenutog područja kromosoma 15 dovela je do otkrića CAPN3 mutacija kao odgovornih za nastanak LGMD2A (16). Do sada je opisano više od 280 različitih CAPN3 mutacija ([www.dmd.nl](http://www.dmd.nl); 81) ravnomjerno raspoređenih uzduž cijelog gena. Iako su opisane CAPN3 mutacije koje se javljaju sa većom učestalošću, većina su tzv. privatne mutacije. Mutacije sa većom učestalošću javljaju se u određenom

geografskom području koje obuhvaća više različitih populacija, što je primjer 550delA mutacije i njezine velike učestalosti u populacijama Mediterana i istočne Evrope (82, 83, 84, 85, 86). Veća učestalost nekih CAPN3 mutacija opisana je i u populacijama sa velikim stupnjem konsangviniteta (16, 75, 87, 88, 89). Prema rezultatima analize CAPN3 gena u različitim populacijama, može se zaključiti da spektar mutacija prisutan u određenoj populaciji ovisi o njezinom geografskom i etničkom porijeklu.

CAPN3 gen (OMIM#114240) kodira kalpain 3, zbog čega se pojasna mišićna distrofija tip 2A još naziva i kalpainopatija. Kalpain 3 je neutralna cisteinska proteaza i mišićno specifični član kalpainske obitelji proteina. Njegova funkcija u stanici još je uvijek nerazjašnjena, a time i mehanizam nastanka pojasne mišićne distrofije tip 2A. Štoviše, LGMD2A je bila prva opisana distrofija uzrokovana mutacijama gena koji kodira enzim, a ne protein čija je funkcija vezana uz strukturu mišićne stanice. Detaljne karakteristike kalpaina 3 biti će opisane u poglavlju o kalpainu 3.

Prema rezultatima dosadašnjih istraživanja smatra se da je pojasna mišićna distrofija tip 2A najčešći tip recesivnih pojasnih mišićnih distrofija (90). Istraživanje pojasne mišićne distrofije tip 2A u Hrvatskoj, a u okviru projekta "Genetsko i epidemiološko israživanje mišićnih distrofija u Hrvatskoj" (MZT 108041/1998; MZT 010805/2002), pokazalo je da je i u Hrvatskoj LGMD2A najučestaliji tip recesivnih pojasnih mišićnih distrofija. Tijekom 6 godina prikupljeno je 29 nesrodnih LGMD2A obitelji u kojih je analiza CAPN3 gena otkrila prisustvo 6 različitih mutacija (85, 91).

#### **1.3.2.2. Pojasna mišićna distrofija tip 2B**

Pojasna mišićna distrofija tip 2B (LGMD2B), kao i Miyoshi miopatija posljedica je mutacija DYSF gena (17, 18). Proteinski produkt DYSF gena, disferlin, transmembranski je protein i homolog fer-1 proteina, uključenog u proces spermatogeneze *C.elegans*. Točna funkcija disferlina i time mehanizam nastanka LGMD2B nije poznat. Ipak, analiza SJL miša, životinjskog LGMD2B modela, pokazala je da u mišićnim stanicama postoji aktivan proces popravka stanične membrane koji je u SJL miša onemogućen, ukazujući na vjerojatnu ulogu disferlina u tom procesu (92).

#### **1.3.2.3. Pojasne mišićne distrofije tip 2C-2F**

Pojasne mišićne distrofije tip 2C, 2D, 2E i 2F (LGMD2C-2F) ili sarkoglikanopatije uzrokovane su mutacijama gena koji kodiraju  $\gamma$ - (19),  $\alpha$ - (20),  $\beta$ - (21, 22) i  $\delta$ -sarkoglikan (23).

Sarkoglikani su skupina membranskih proteina i sastavni dio distrofin-glikoproteinskog kompleksa. Osim sa ostalim članovima kompleksa (distrofin, distroglikani, laminin, itd), sarkoglikani se povezuju i među sobom i to točno određenim redoslijedom (93), pa u slučaju nedostatka ili smanjenog izražaja jednog sarkoglikana dolazi do smanjenja svih ostalih (tzv. sekundarna sarkoglikanopatija). Pretpostavlja se da je upravo nemogućnost normalne lokalizacije sarkoglikana i/ili stvaranja njihovog kompleksa mehanizam nastanka sarkoglikanopatija (94). Osim toga, sarkoglikani stupaju i u interakcije sa integrinima, tj. proteinima uključenim u prijenos signala između izvan- i unutarstaničnog prostora (95).

#### **1.3.2.4. Pojasna mišićna distrofija tip 2G**

Mutacije TCAP gena odgovorne su za nastanak pojasne mišićne distrofije tip 2G (LGMD2G), koja je za sada opisana samo u nekoliko brazilskih obitelji (24). Naknadno su mutacije u istom genu pronađene i u bolesnika sa dilatirajućom kardiomiopatijom tip 1N (CMD1N) (96).

TCAP gen kodira teletonin, protein sarkomere izražen u skeletnom i srčanom mišiću (97), gdje stupa u interakcije sa molekulom titina. Osim što se veže za određena područja titina, pokazano je i da je titin kinazna domena odgovorna za njegovu fosforilaciju (98).

#### **1.3.2.5. Pojasna mišićna distrofija tip 2H**

Pojasna mišićna distrofija tip 2H (LGMD2H) trenutno je opisana samo u populaciji Huterita u Kanadi (25). U svih bolesnika pronađena je ista mutacija, D487N, u TRIM32 genu. Istoimeni proteinski produkt, TRIM32 (TRIpartite-Motif containing protein 32) po svojoj je strukturi E3-ubikvitin ligaza, enzim koji sudjeluje u tzv. «označavanju» proteina predviđenih za razgradnju putem ubikvitina (99). Točan mehanizam nastanka LGMD2H još nije poznat.

#### **1.3.2.6. Pojasna mišićna distrofija tip 2I**

Pojasna mišićna distrofija tip 2I (LGMD2I) uzrokovana je mutacijama FKRP gena koji kodira fukutinu srodni protein (*engl.* fukutin related protein). Mutacije u istom genu odgovorne su i za nastanak kongenitalne mišićne distrofije tip 1C (26), «muscle-eye-brain» bolesti (42) odnosno Walker-Warburg sindroma (42).

FKRP protein uključen je u post-translacijske modifikacije  $\alpha$ - i  $\beta$ -distroglikana, jednih od glavnih komponenti prije spomenutog distrofin-glikoproteinskog kompleksa. Spomenute modifikacije omogućavaju interakciju distroglikana sa drugim proteinima kompleksa poput



agrina i laminina. U LGMD2I bolesnika, a uslijed FKRP mutacija, spomenuti procesi su onemogućeni, što LGMD2I daje drugačiji i novi mehanizam nastanka u odnosu na prethodno opisane recesivne pojasne mišićne distrofije (100).

#### **1.3.2.7. Pojasna mišićna distrofija tip 2J**

Pojasna mišićna distrofija tip 2J (LGMD2J) posljedica je mutacija u zadnjem egzonu (Mex 6) TTN gena koji kodira titin (konektin), najveći humani protein. Trenutno je ovaj tip recesivnih pojasnih mišićnih distrofija pronađen isključivo u finskoj populaciji, a u sva tri opisana LGMD2J bolesnika pronađena je ista mutacija, delecija/insercija 11bp koja zadržava okvir čitanja (27).

Detaljniji opis LGMD2J karakteristika, kao i ostalih bolesti uzrokovanih mutacijama u TTN genu biti će detaljnije opisani u poglavljima o titinu.

#### **1.3.2.8. Pojasna mišićna distrofija tip 2K**

Pojasna mišićna distrofija tip 2K (LGMD2K) zadnje je otkriveni tip recesivnih pojasnih mišićnih distrofija, a osim mišićne slabosti karakterizira je i mentalna retardacija bolesnika (28). LGMD2K je, poput prethodno opisane LGMD2I, uzrokovana mutacijama gena (POMT1) koji kodira enzim uključen u post-translacijske modifikacije drugih proteina. POMT1 gen kodira protein O-manoziltransferazu 1, člana konzervirane obitelji O-manoziltransferaza koje su odgovorne za O-manozilaciju, vrlo važnu post-translacijsku modifikaciju eukariotskih proteina.

### **1.4. KALPAINI**

Kalpaini (EC 3.4.22.17) su stanične, neutralne, cisteinske proteaze čiji naziv potječe od strukturne sličnosti sa papainom, te ovisnosti o kalciju. Otkriveni su još 1964. godine u mozgu štakora (101), no interes za ovu skupinu proteaza javlja se tek nakon 1984. godine kada je određen aminokiselinski slijed kokošnjeg kalpaina (102).

Prema predloženoj klasifikaciji kalpaina iz 2003., a koja zahtjeva najmanje 20-25% homologije u katalitičkoj domeni, poznato je 14 različitih kalpaina u sisavaca, 4 u vinske mušice *D.melanogaster*, 12 kod *C.elegans*, 2 u kvasaca i gljiva, 5 u parazitu *Trypanosoma brucei*, te jedan transmembranski kalpain prisutan u različitim biljnim vrstama. Kalpaini se

nadalje mogu podijeliti na tzv. klasične i atipične kalpaine, gdje druga skupina ne sadrži EF strukture u domeni IV. U sisavaca, od ukupno 14 kalpaina, 8 ih je klasičnih, dok su ostalih 6 atipični. Po svojoj izraženosti kalpainski sisavci su ili ubikvitarni ili tkivno specifični (103). Od ubikvitarnih, ali ujedno i svih kalpaina, najistraženiji su ubikvitarni m- i  $\mu$ -kalpain.

## **1.4.1. UBIKVITARNI KALPAINI**

### **1.4.1.1. Strukturne i biokemijske karakteristike ubikvitarnih m- i $\mu$ -kalpaina**

M- i  $\mu$ -kalpain nazive su dobili prema potrebi za kalcijem, pa tako m-kalpain za svoju aktivaciju ima potrebu za milimolarnim, a  $\mu$ -kalpain za mikromolarnim koncentracijama kalcija.

Ubikvitarni m- i  $\mu$ -kalpain su heterodimeri, građeni od velike i male kalpainske podjedinice. Velike podjedinice m- i  $\mu$ -kalpaina, m-CL i  $\mu$ -CL, veličine su 80 kDa, a kodirane su različitim genima. CAPN1 gen, smješten na kromosomu 11 kodira mCL, dok CAPN2 gen na kromosomu 1 kodira  $\mu$ CL (104). Zajednička karakteristika velikih kalpainskih podjedinica podjela je na 4 domene, označene rimskim brojevima od I-IV (105). Domena I ima slijed aminokiselina koji ne pokazuje homologiju ni sa jednim drugim trenutno poznatim proteinskim slijedom. Sadrži autolitičko mjesto, a točna funkcija joj nije poznata. Domena II je proteolitička domena koja se može podijeliti na dvije subdomene, IIa i IIb. Ova domena sadrži katalitičko mjesto, tzv. katalitičku trijadu koju, kao i kod ostalih cisteinskih proteaza (106), čine cistein, histidin i asparagin. Domena III je, poput domene I, nepoznate funkcije, a ima i slijed aminokiselina koji ne pokazuje sličnost ni sa jednim drugim proteinom. Ipak, njezina sličnost sa domenama C2 tipa čine je srodnom sa drugim kalcij ovisnim proteinima. Štoviše, domena III u svojoj strukturi posjeduje jednu EF strukturu, tj. dio koji može vezati kalcij. Nukleotidni slijed domene IV vrlo je sličan slijedu kalmodulinskog gena. To je kalcij vezujuća domena u kojoj se nalazi i pet EF struktura, koje su bitne za vezanje kalcija, kao i za povezivanje male i velike kalpainske podjedinice (107).

Mala kalpainska podjedinica (30K, *css1*) veličine je 28 kDa, a kodirana je CAPN4 genom (*capns1*), smještenim na kromosomu 19 (104). Građena je od dvije domene, V i VI (IV'). Domena V je N-terminalna hidrofobna regija bogata glicinom. Domena VI pokazuje sličnost sa domenom IV velike podjedinice, pa se još naziva i IV'. Poput domene IV i

domena VI je kalcij vezujuća domena, te sadrži pet EF struktura. Mala kalpainska podjedinica ima regulatornu ulogu, omogućavajući stvaranje pravilne konformacije velike kalpainske podjedinice. Pokazano je i da se nakon aktivacije kalpaina, mala podjedinica odvaja od velike, koja nadalje ima sposobnost proteolitičkog djelovanja (108). 2002. godine opisana je nova mala podjedinica, css2, kodirana capns2 genom. Sličnost između dvije male podjedinice iznosi 85%, a pokazano je da obje imaju istu regulatornu funkciju. Ipak, izraženost css2 podjedinice više je tkivno specifična, nego ubikvitarna (109).

Pretpostavlja se da se aktivacija ubikvitarnih kalpaina odvija u dvije faze. U prvoj fazi između ostalog dolazi do autolize, što rezultira cijepanjem kalpaina na N terminalnom dijelu. U prvoj fazi najvjerojatnije dolazi i do već spomenutog odvajanja male kalpainske podjedinice. U drugoj fazi se aktivacija kalpaina postiže vezanjem kalcija u neposrednoj blizini aktivnog mjesta, što približava tri aminokiselinska ostatka koja čine katalitičku trijadu (110). Aktivnost ubikvitarnih m- i  $\mu$ -kalpaina može biti inhibirana njihovim specifičnim inhibitorom, kalpastatinom, koji je poput njih ubikvitarno izražen. Kalpastatin čini 5 domena: N-terminalna L domena, te 4 inhibicijske domene od kojih svaka sadrži 3 regije (A, B i C). Kalpastatin inhibira kalpaine u prisustvu kalcija vezujući se svojom B regijom u području aktivnog mjesta kalpaina (111). Inhibicija putem B regije potpomognuta je sa regijama A i C, za koje se također otkrilo da mogu i aktivirati ubikvitarne kalpaine (112). S obzirom da može zaustaviti djelovanje ubikvitarnih kalpaina, kalpastatin se u mišjeg modela već pokazao korisnim za smanjenje posljedica nekontroliranog djelovanja kalpaina u mišićnom tkivu (113).

#### **1.4.1.2. Funkcija ubikvitarnih kalpaina**

Prisutnost različitih kalpaina i njihovih homologa u svim živim organizmima govori o važnosti njihove funkcije u stanici. Točna funkcija još uvijek nije poznata, ali se na temelju dokazanih biokemijskih karakteristika pretpostavlja da imaju regulatornu ulogu u nizu staničnih procesa (114). Ubikvitarni kalpaini ulaze u interakcije sa različitim protein kinazama, proteinima citoskeleta i pritom im mijenjaju strukturu, aktivnost ili neko drugo svojstvo. Na taj način kalpaini sudjeluju u kontroli ekspresije gena (115), apoptozi (116, 117), staničnoj diobi (118) i staničnoj pokretljivosti (119), kao i u nizu drugih procesa.

Uslijed određenih promjena u stanici može doći do abnormalne proteolize uzrokovane aktivnošću ubikvitarnih kalpaina koja dovodi do oštećenja tkiva, što je po prvi puta opisano u slučaju Duchenneove mišićne distrofije (120). Ta je distrofija karakterizirana

nedostatkom distrofina, strukturnog proteina i navažnije komponente distrofin-glikoproteinskog kompleksa. Njegov nedostatak izaziva povećanu permeabilnost stanične membrane i time omogućava ulazak kalcija u mišićna vlakna, što aktivira ubikvitarne kalpaine. Njihovo djelovanje prema raznim proteinima-supstratima dovodi do nekontrolirane proteolize i deorganizacije mišićnog vlakna, što u konačnici rezultira nekrozom stanica. Osim mišićne distrofije, pojačana aktivnost ubikvitarnih kalpaina opisana je i u Alzheimerovoj bolesti (121), katarakti (122), multiploj sklerozi (123), moždanom udaru (124), srčanom infarktu (125), te opsesivno-kompulzivnim poremećajima (126).

## **1.4.2. KALPAIN 3**

### **1.4.2.1. Strukturne i biokemijske karakteristike kalpaina 3**

Kalpain 3 otkriven je 1989. godine, kada je određen njegov cDNA slijed i strukturne karakteristike (127). Godinu dana kasnije otkriven je i smještaj kalpaina 3 kodirajućeg gena (CAPN3) na kromosomu 15 (104). CAPN3 gen veličine je oko 35kb, a podijeljen je na 24 kodirajuće regije. Mutacije u CAPN3 genu odgovorne su za nastanak pojase mišićne distrofije tip 2A (16). Molekulska masa kalpaina 3 iznosi 94kDa zbog čega se ovaj protein još naziva i p94. Strukturne karakteristike kalpaina 3 pokazuju veliku sličnost sa velikim kalpainskim podjedinicama ubikvitarnih m- i  $\mu$ -kalpaina, poput kojih se može podijeliti na četiri domene (slika 4).

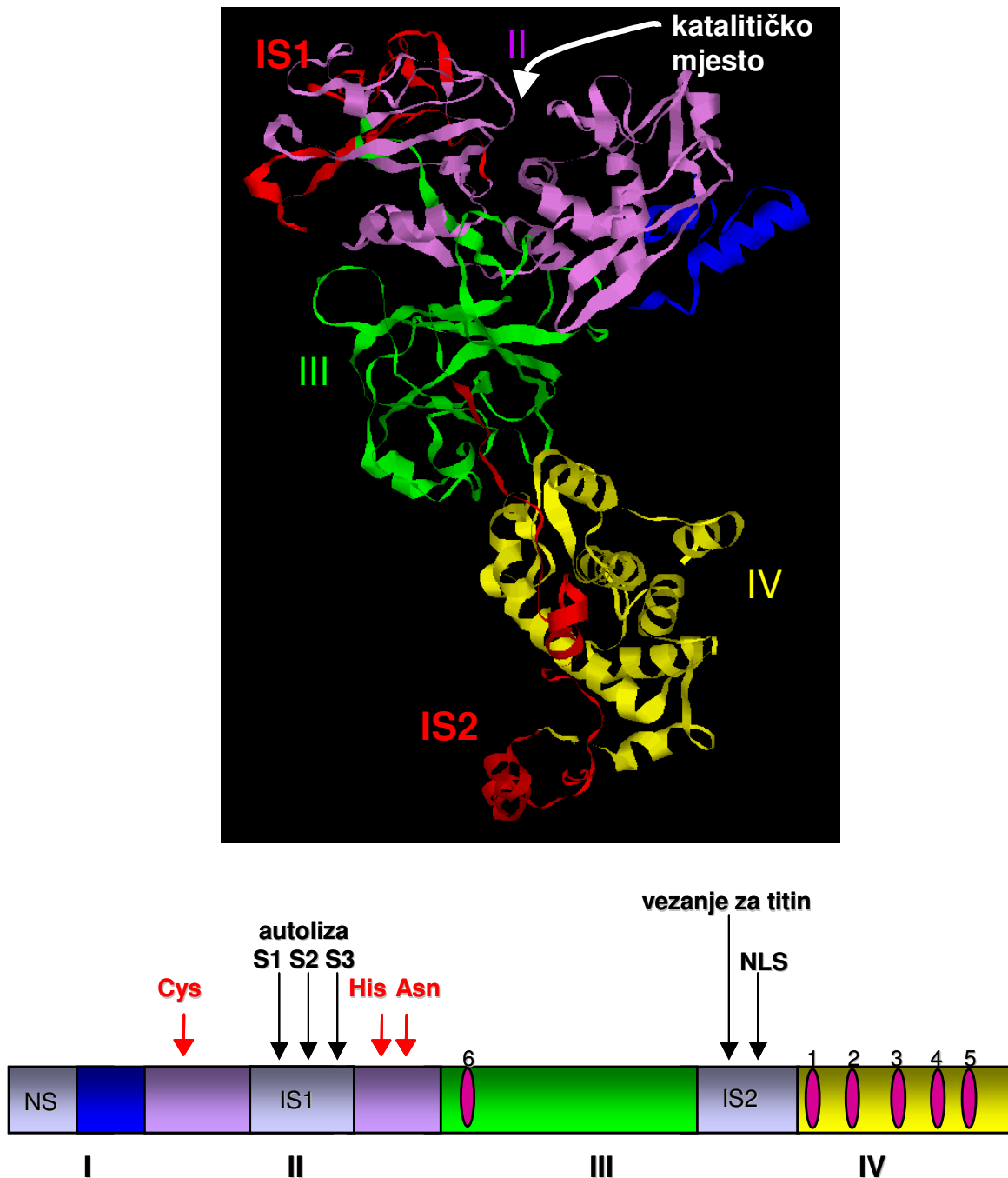
Domena I ima vrlo malu sličnost u aminokiselinskom sastavu sa domenom I ubikvitarnih kalpaina, a i duža je za 20-30 aminokiselinskih ostataka. To je posljedica prisustva specifičnog, NS slijeda, u kalpainu 3 smještenog na N-terminalnom kraju domene I. Domena II ili proteolitička domena ima najveću sličnost sa istoimenom domenom ostalih kalpaina. To se posebno odnosi na područje aktivnog mjesta kojeg čine aminokiselinski ostaci cisteina (Cys), histidina (His) i asparagina (Asn). Između cisteinskog ostatka, te histidina i asparagina nalazi se još jedan za kalpain 3 specifičan slijed, IS1. Kodiran je egzonom 6 CAPN3 gena, te sadrži tri autolitička mjesta (S1, S2, S3). Domena III dijeli gotovo 50% sličnosti sa domenom III ubikvitarnih kalpaina, dok je domena IV, poput one u ubikvitarnih kalpaina kalcij vezujuća domena sa pet EF struktura. Između domene III i IV nalazi se treći specifičan slijed za kalpain 3, IS2. Kodiran je egzonima 14, 15 i 16. U svom slijedu sadrži kratki peptid (*engl.* nuclear translocation signal) koji s obzirom na svoj aminokiselinski slijed (Arg-Pro-Xaa-Lys-Lys-Lys-Lys-x-Lys-Pro) omogućava ulazak

kalpaina 3 u jezgru. Neposredno prije spomenutog peptidnog slijeda nalazi se slijed aminokiselina koji je važan za interakciju kalpaina 3 sa N2-A regijom titina (128). Osim te regije kalpain 3 cijelim svojim aminokiselinskim slijedom stupa u interakcije i sa C terminalnim dijelom titina u području M-crte (129) (slika 5, vidi str. 23).

Kalpain 3 (p94, n-CL3) bio je prvootkriveni tkivno specifični kalpain, izražen u odrasle osobe u skeletnom mišićnom tkivu gdje je njegova mRNA prisutna u deset puta većoj količini od mRNA ubikvitarnih kalpaina (127). Postojanje alternativnog izrezivanja introna CAPN3 gena rezultira velikim brojem izoformi kalpaina 3 koje pokazuju različitu izraženost, kao i pojavnost u različitim fazama života. Istraživanja u *in vitro* i *in vivo* uvjetima, pokazala su da u stadiju mioblasta postoje samo alternativne izoforme kalpaina 3 koje se tijekom diferencijacije zamjenjuju «odraslim» kalpainom 3 (130,131). Tijekom embrionalnog razvoja, izraženost kalpaina 3 postoji u srcu i glatkom mišićju (132). U lećama štakora, miša i zeca pronađena je izoforma kalpaina 3, Lp82, sa promjenjenim egzonom 1, te bez IS1 i IS2 specifičnih slijedova (133), odnosno posebna izoforma u mišjim i štakorskim astrocitima (134).

Pretpostavlja se da se u mišićnom tkivu kalpain 3 nalazi u inaktivnom stanju i to vezan za titin na najmanje tri mjesta, da bi se po potrebi aktivirao pod utjecajem još nepoznatog signala. Aktivacija se odvija u nekoliko faza, a za njezino odvijanje neophodno je potreban kalcij (136). Mišljenja o potrebi kalpaina 3 za kalcijem bila su dugi niz godina podijeljena, a glavni uzrok tome je nemogućnost izolacije inaktivne forme (94kDa) zbog njegove brze autolize (137). Proces aktivacije započinje intramolekularnim cijpanjem na N-terminalnom kraju kalpaina 3. U nastavku se dešava intramolekularno cijepanje u S1 autolitičkom mjestu IS1 slijeda, što slijede cijepanja u dva preostala autolitička mjesta S2 i S3. To rezultira pojavom N-terminalnog fragmenta veličine 34 kDa i tri duža C-terminalna fragmenta veličina 60, 58 i 55kDa (138). Kako su prva dva C-terminalna fragmenta posljedica cijepanja u S1, odnosno S2 mjestu njihova je pojava kratkotrajna, pa je proteinskom analizom potpuno autoliziranog kalpaina 3 vidljiva, uz N-terminalni fragment, samo C-terminalna proteinska vrpca od 55 kDa (136,139). Tako aktiviran kalpain 3 sposoban je intermolekularnim cijepanjem aktivirati druge molekule kalpaina 3, kao i proteolitički djelovati prema drugim proteinima, tj. supstratima. Do sada je otkriveno nekoliko supstrata kalpaina 3 u *in vitro* uvjetima, među kojima su titin, filamin C, talin, vineksin i ezrin (139,140). Nedavno je pokazano da je izražaj miozin lakog lanca 1 (*engl.* myosin light chain 1, MLC1) smanjen u prisustvu kalpaina 3, odnosno u CAPN3 Tg mišu kojeg karakterizira povećan izražaj kalpaina 3. Na temelju tih rezultata zaključeno je da bi

MLC1 mogao biti još jedan supstrat kalpaina 3 (141). Uz spomenute proteine postoje mnogi drugi za koje se trenutno zna samo da stupaju u interakcije sa kalpainom 3 (I. Richard, osobna komunikacija). Tek je potrebno odrediti da li su to ujedno i supstrati kalpaina 3, a u cilju boljeg razumijevanja kalpaina 3 i njegove funkcije u stanici.



Slika 4. Kristalografski i shematski prikaz kalpaina 3 (modificirano prema 135).

### 1.4.2.2. Funkcija kalpaina 3

Interes za kalpain 3 i razotkrivanje njegove funkcije traje od 1995. godine kada je pokazano da su CAPN3 mutacije odgovorne za nastanak pojasne mišićne distrofije tip 2A. Takav interes za kalpain 3 djelomično se može objasniti činjenicom da je LGMD2A bila prva opisana distrofija uzrokovana mutacijama gena koji kodira enzim. To je ujedno pretpostavilo postojanje sasvim drugačijeg mehanizma nastanka u odnosu na do tada poznate distrofije koje su bile uzrokovane mutacijama gena koji kodiraju strukturne proteine. Kako još uvijek nije poznata funkcija kalpaina 3, nije poznat niti mehanizam nastanka pojasne mišićne distrofije tip 2A. Ipak, pretpostavlja se da do distrofičnog procesa dolazi uslijed gubitka proteolitičkog djelovanja kalpaina 3. Do takvog se zaključka došlo istraživanjem kalpaina 3 u prisutnost 9 različitih mutacija koje na razini proteina uzrokuju zamjenu jedne aminokiseline drugom, a karakterizira ih normalan izražaj kalpaina 3. Pokazano je da je ovisno o mutaciji bila izgubljena ili sposobnost autolize ili interakcija sa titinom. Jedino što je bilo zajedničko svim proučavanim mutacijama bio je gubitak proteolitičkog djelovanja kalpaina 3 (142).

Iako je proteolitičko djelovanje kalpaina 3 svojstvo koje nedostaje u LGMD2A bolesnika, u mišjeg modela praćena razina proteolize i sinteze proteina nije pokazala značajnu razliku u odnosu na kontrolne uzorke (143). Pojedinačno gledano, neki proteini su pokazali smanjen izražaj, a po svojoj funkciji su bili uključeni u proces razgradnje proteina (ubikvitin ligaze ili sastavni dijelovi proteasoma), što bi moglo upućivati na uključenost kalpaina 3 i u ovaj proces (144). Tu hipotezu potvrđuju i nedavno objavljeni rezultati koji su pokazali da kalpain 3 i proces razgradnje proteina putem ubikvitina i proteasoma ne djeluju kao dva dovojena procesa, već u seriji. Analiza mišića bez izraženog kalpaina 3 pokazala su nakupljanje starih i oštećenih proteina, što smatra se, može dovesti do poremećaja staničnih funkcija, stanične smrti, te na kraju rezultirati propadanjem mišića (145).

Biopsija mišića oboljelih od pojasne mišićne distrofije tip 2A pokazala je veću učestalost apoptotičkih stanica u usporedbi sa drugim distrofijama. Također je pokazano da u LGMD2A bolesnika postoje promjene u NF- $\kappa$ B putu. NF- $\kappa$ B je važan transkripcijski faktor, koji je građen od dvije podjedinice p65 i p50. U citoplazmi se inaktivira interakcijom sa svojim inhibitorom I $\kappa$ B $\alpha$  koji sprječava premještaj NF $\kappa$ B u jezgru i transkripciju tzv. «survival» gena. Pretpostavlja se da kalpain 3 razgrađuje inhibitor I $\kappa$ B $\alpha$  i omogućava ulazak NF- $\kappa$ B u jezgru i odgađanje apoptoze. U slučaju nedostatka kalpaina 3

ili njegove disfunkcije onemogućen je ulazak NF- $\kappa$ B u jezgru uslijed prisutnog inhibitora, pa dolazi do apoptoze (146). Iste promjene pronađene su i u LGMD2A mišjem modelu (147).

Unatoč nepostojanja bilo kakvih promjena u CAPN3 genu, smanjen izražaj kalpaina 3 uočen je u nekih bolesnika sa pojasnom mišićnom distrofijom tip 2B (148), tibijalnom mišićnom distrofijom, odnosno pojasnom mišićnom distrofijom tip 2J (149). Smanjenje kalpaina 3 u LGMD2B bolesnika moglo bi se objasniti nemogućnošću, nedavno otkrivene, interakcije između kalpaina 3 i disferlina (150). Ipak za konačnu potvrdu ove hipoteze bilo bi potrebno odrediti točno mjesto interakcije u oba proteina. U bolesnika sa TMD odnosno LGMD2J odgovorne TTN mutacije nalaze se u neposrednoj blizini mjesta na koje se veže kalpain 3, u C-terminalnom dijelu titina, pa se pretpostavlja da upravo te mutacije onemogućavaju interakciju kalpaina 3 s titinom, uzrokujući destabilizaciju kalpaina 3 i njegovo pojačano proteolitičko djelovanje (149). Važnost smanjenog izražaja kalpaina 3 u spomenute tri distrofije ukazuje na određenu ulogu kalpaina 3 u nastanku i ovih mišićnih distrofija.

## 1.5. TITIN

### 1.5.1. Struktura i funkcija titina

Titin (OMIM#18840) je kodiran TTN genom smještenim na dugom kraku kromosoma 2, u području 2q31 (151). TTN gen veličine je 294 kb i podijeljen na 363 kodirajuće jedinice (egzona).

Titin je građen od 38 138 aminokiselina što mu daje molekulsku masu od 4200kDa, te ga čini najvećim ljudskim proteinom (152). Proteže se od Z do M-crte, uključujući područje A i I-pruge, što ukupno odgovara polovici dužine sarkomere (slika 5; vidi str. 23). Najvećim dijelom (90%) ga čine imunoglobulinska (Ig) i fibronektin tip III (FNIII) ponavljanja. Preostalih 10% otpada na 17 jedinstvenih slijedova (*engl.* unique sequence) koji ne pokazuju sličnost ni sa jednim drugim poznatim proteinskim slijedom (153). Na svom C-terminalnom dijelu titin sadrži serin/treonin kinaznu domenu koja pokazuje sličnost sa obitelji kinaza miozin lakog lanca. Titin je izražen u različitim tkivima, no najviše u srčanom i skeletnom mišićnom tkivu.

Titin sadrži nekoliko mjesta podložnih alternativnom izrezivanju introna što rezultira postojanjem više različitih izoformi u području Z-crte (154, 155), I-pruge (156), odnosno



M-crte (152,157). U području A-pruge N2 regija u titinu skeletnog mišića sadrži isključivo N2-A domenu, dok je u srčanom titinu prisutna i N2-B domena (153).

Titin je, uz miozin i aktin, osnovna kontraktilna jedinica mišićnih vlakana, te ima mehaničku, razvojnu i regulatornu ulogu u mišićnoj stanici. Titin sudjeluje u organizaciji sarkomere i održavanju njezine strukture, ima utjecaja na kontrakciju mišića, a odgovoran je i za njegovu elastičnost. Interakcije sa brojnim proteinima, posebice u području Z i M-crte, te I-pruge, upućuju na ulogu titina u regulaciji i prijenosu signala u mišićnoj stanici (158).

#### **1.5.1.1. Titin u području Z-crte**

U području Z-crte, N-terminalni kraj titina ulazi u interakcije sa više različitih proteina poput  $\alpha$ -aktinina (159) i teletonina (160,161).  $\alpha$ -aktinin veže se za titin u području domene sastavljene od višestrukih ponavljanja motiva od 45 aminokiselina. To je područje podložno alternativnom izrezivanju koje se različito odvija u različitim tipovima mišića (156, 159). Teletonin je 19 kDa velik protein koji se za titin veže u području prva dva imunoglobulinska ponavljanja. Osim vezanja u području Z-crte, teletonin ulazi u interakcije sa titinom i u području M-crte (I.Richard, osobna komunikacija), a iz literature je poznato da ga fosforilira titin kinazna domena smještena u području M-crte (98). TCAP gen koji kodira teletonin mutiran je u bolesnika sa pojasnom mišićnom distrofijom tip 2G (LGMD2G) (24).

#### **1.5.1.2. Titin u području I-pruge**

Dio titina u području I-pruge sadrži 90 imunoglobulinskih ponavljanja tip I, N2 i PEVK regiju (153). N2-A regija titina stupa u interakcije sa kalpainom 3, odnosno MARP proteinima, tj. mišićnim ankirin-ponavljajućim proteinima smještenim u neposrednoj blizini kalpain 3 vezujućeg mjesta (162). U MARP obitelj proteina koji stupaju u interakcije sa titinom ubrajaju se srčani ankirin ponavljajući protein ili CARP (cardiac ankyrin repeat protein), Ankrd2/Arpp i dijabetes ankirin-ponavljajući protein (DARP). Poznato je da je aktivnost MARP proteina promjenjena u Duchenneovoj mišićnoj distrofiji, kongenitalnoj miopatiji, te spinalnoj mišićnoj atrofiji (163). PEVK regija, tj. regija bogata aminokiselinskim ostacima prolina, glutaminske kiseline, valina i lizina odgovorna je za interakciju titina sa nebulinom i aktinom, te daje elastična svojstva mišićnom vlaknu (164, 165, 166).

### **1.5.1.3. Titin u području A-pruge**

Titin se u području A-pruge sastoji od imunoglobulinskih i fibronektin tip III ponavljajućih slijedova. U ovom području titin stupa u interakcije sa miozinom, miozin vezujućim proteinom C (MyBP-C), te AMP-deaminazom (167, 168).

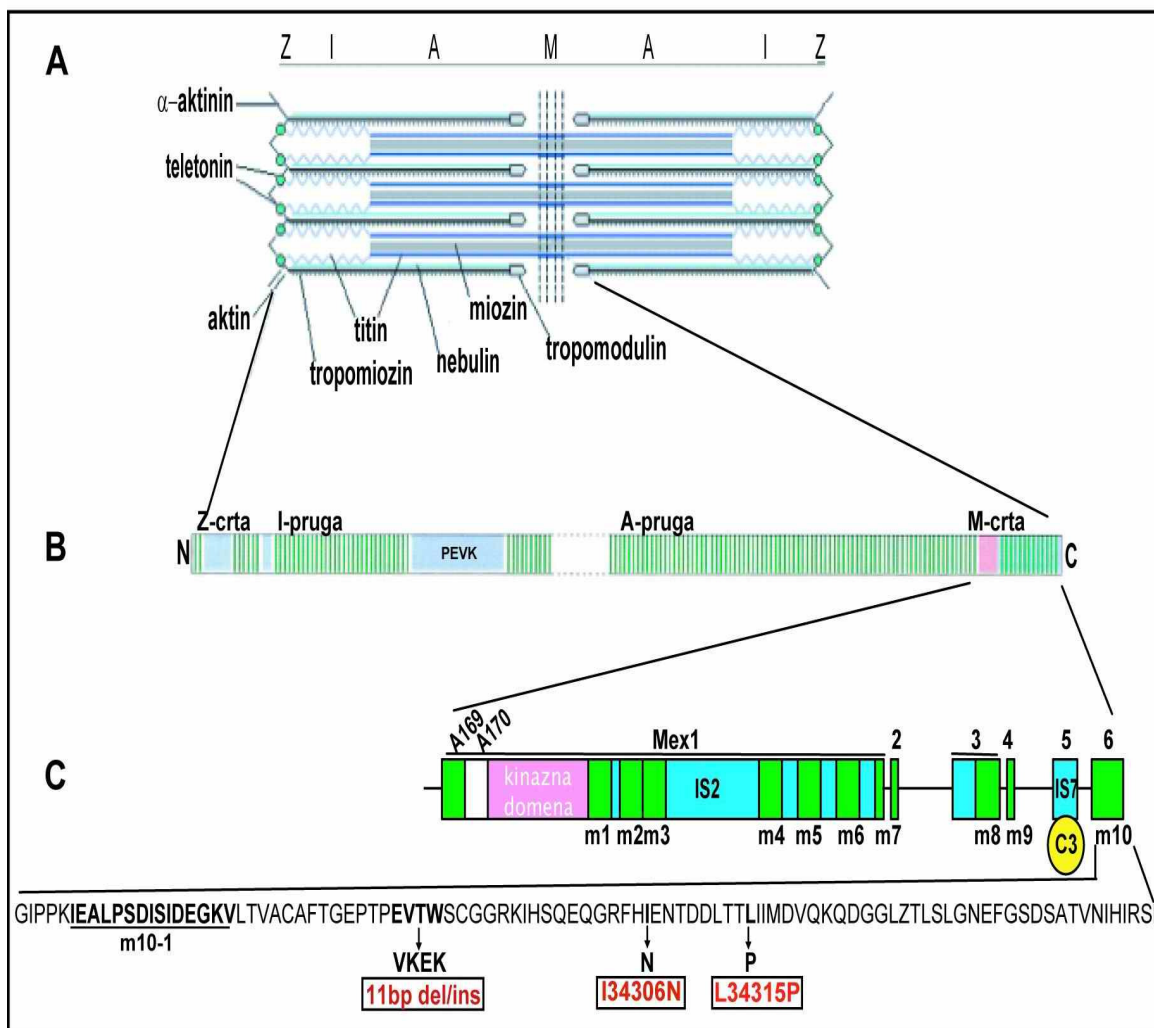
### **1.5.1.4. Titin u području M-crte**

C-terminalni dio titina smješten je u području M-crte. Na razini TTN gena čini ga 6 egzona, Mex1-Mex6. Na razini proteina spomenuti egzoni kodiraju domenu sa kinaznom aktivnošću, te imunoglobulinska ponavljanja (m1-m10) koja su međusobno isprekidana sa 7 jedinstvenih slijedova, IS1-IS7 (slika 5).

U području M-crte titin stupa u interakcije s više različitih proteina (kalpain 3, miomezin, DRAL/FHL2, miosprin, KY protein, proteini MURF obitelji, obskurin, itd), čije će glavne karakteristike biti opisane u slijedećim odlomcima teksta.

MURF proteinska obitelj trenutno broji 3 člana: MURF1, MURF2 i MURF3 (170). Unutar njihove proteinske strukture razlikuje se nekoliko domena kao što su RING domena, MURF visoko konzervirana domena, B-Box domena i tzv. «coiled-coil» domena. Sva tri MURF proteina sadrže spomenute domene, sa vrlo malim razlikama u aminokiselinskom slijedu, dok je C-terminalni kraj različit i podložan alternativnom izrezivanju introna. Posjedovanje spomenutih domena ubraja MURF proteine u obitelj TRIM proteina za koje je poznato da sudjeluju u procesu razgradnje proteina putem ubikvitina. Za sada je poznato da sa titinom u području M-crte u interakcije ulaze MURF1 i MURF2 proteini.

MURF1 protein izražen je u skeletnom mišiću tijekom razvoja, te u odraslom organizmu. Sa titinom se veže u području A168-A169 koje se nalazi s N-terminalne strane kinazne domene titina, kao i u području A-pruge, u regiji A20/21. MURF1 je po svojim svojstvima ubikvitin ligaza, te je do sada pokazano da sudjeluje u «označavanju» titina, nebulina, teletonina, tropomiozina, itd (171). MURF1 sudjeluje u regulaciji izražavanja gena, a važan je i za stabilnost područja M-crte (172), regulator je kontraktilnosti miokarda (173), odnosno pojačano je izražen u atrofičnom mišiću (174).



**Slika 5.** Shematski prikaz (A) titina u području sarkomere (B) titina i njegovih strukturnih dijelova (C) titina u području M-crte. Organizacija titina u području M-crte prikazana je sa odgovarajućim egzonima (Mex1-Mex6), odnosno proteinskim slijedovima (imunoglobulinska ponavljanja m1-m10, te jedinstveni slijedovi IS1-IS7). Prikazano je i mjesto vezanja kalpaina 3 u području IS7 (Mex5). Donji dio slike predstavlja aminokiselinski slijed zadnjeg imunoglobulinskog ponavljanja m10 zajedno sa smještajem Mex6 mutacija i epitopa m10-1 protutijela (modificirano prema 27 i 169).

Neke od navedenih MURF1 funkcija karakteristika su i MURF2 proteina, koji je još uključen i u regulaciju dinamike mikrotubula (175, 176). MURF2 protein javlja se u nekoliko izoformi (MURF2-27kDa, MURF2-50kDa, MURF2-60kDa, MURF2alt-60kDa), koje se međusobno razlikuju po izraženosti u različitim tkivima, kao i u domenama koje sadrže. RING, MFC i Bbox domene prisutne su u svih izoformi, dok se najviše razlika uočava u C-terminalnom dijelu proteina (177). MURF-27kDa je izoforma koja je izražena samo u srčanom mišiću, dok je u skeletnom mišiću najzastupljenija forma MURF2-60kDa, koja ujedno ima i svoju alternativnu izoformu s kojom se razlikuje samo u zadnjih 40-tak aminokiselina. Za MURF2 je metodom dvostrukog hibrida pokazano isto mjesto

interakcije sa C-terminalnim titinom kao i za MURF1 protein (A168-A169) (171). Nedavno je MURF2 otkriven i kao dio puta prijenosa signala koji započinje titinom, a preko nbr1, p62 i MURF2, završava SRF proteinom i njegovim utjecajem na izražaj specifičnih gena (178).

Protein FHL2 (DRAL) član je proteinske obitelji sa tzv. LIM domenama, konzerviranim dvostrukim «zinc-finger» motivima. FHL2 je najviše izražen u srčanom mišiću, a tek u manjoj mjeri u skeletnom mišiću. On se za titin veže u N2B regiji, tipičnoj za srčani titin, ali i u području M-crte i to u IS2 slijedu. U tom dijelu titina FHL2 djeluje kao adaptorski protein koji na sebe veže niz drugih proteina, poput metaboličkih enzima kreatin kinaze, adenilat kinaze i fosfofruktokinaze (179).

Kao što je već spomenuto, kalpain 3 stupa u interakcije sa titinom u području N2A regije, odnosno C-terminalnog dijela titina u području M-crte. U tom dijelu titina kalpain 3 se veže u području IS7 slijeda kodiranog egzonom Mex5 (129) (slika 5). U susjednoj m10 regiji, kodiranoj egzonom Mex6, kalpain 3 cijepa titin, što je pokazano *in vitro* pokusima (139).

KY gen koji kodira istoimeni KY protein u miša se smatra odgovornim genom za nastanak skoliotičnih promjena (180). KY protein je novo identificirani protein, izražen u skeletnom i srčanom mišićnom tkivu. KY protein ima nepoznatu funkciju, ali je poznato da sadrži proteazno/glutaminaznu domenu. Pokazano je da KY protein ulazi u interakcije sa filaminom C, miozin vezujućim proteinom C i C-terminalnim krajem titina (181).

Obskurin je 800kDa velik protein koji stupa u interakcije sa titinom u području Z, ali i M-crte. Sa titinom dijeli strukturnu sličnost, ali sadrži i specifične domene zbog kojih se pretpostavlja da ima ulogu u povezivanju sarkomere sa signalnim putevima koji kontroliraju nastanak novih mišićnih vlaknaca (182).

Miosprin (CMYA5) je nedavno identificiran protein koji stupa u interakcije sa disbindinom koji je pak putem distrobrevina povezan sa distrofin-glikoproteinskim kompleksom. Miosprin je svoj naziv dobio po isključivom izražaju u skeletnom i srčanom mišićnom tkivu, te posjedovanju SPRY domene. Uz spomenutu domenu, C-terminalni dio miosprina sadrži i BBox', BBC i FN3 domene što ga čini vrlo sličnim TRIM proteinima

(183). Točna uloga miosprina nije poznata, ali je za njegov ortolog genetonin-3 pronađena smanjena izraženost u DMD bolesnika (184). Nedavno je pokazano da miosprin ulazi u interakcije sa  $\alpha$ -aktininom-2, pa se pretpostavlja da bi mogao biti uključen u proces nastanka novih mišićnih vlaknaca (185). Korištenjem metode dvostrukog hibrida pokazano je i da miosprin ulazi u interakcije i sa C-terminalnim dijelom titina (I.Richard, osobno komunikacija).

## **1.5.2. Bolesti uzrokovane mutacijama u genu za titin**

Mutacije u TTN genu uzrokom su više različitih bolesti srčanog (kardiomiopatije) i skeletnog mišićnog tkiva (mišićne distrofije i miopatije).

### **1.5.2.1. Kardiomiopatije uzrokovane mutacijama u TTN genu**

Hipertrofična kardiomiopatija tip 9 (CMH9, OMIM#18840) uzrokovana je mutacijama TTN gena, a predstavlja jednu od 9 do sada otkrivenih podvrsta hipertrofičnih kardiomiopatija. U 82 bolesnika sa CHM9 pronađena je ista, Arg740Leu, mutacija smještena u titinu u području Z-crte (186).

Obiteljska dilatacijska kardiomiopatija tip 1G (CMD1G; OMIM#604145) posljedica je nekoliko različitih mutacija u TTN genu, smještenih: u području Z-crte (Val54Met i Ala743Val) gdje onemogućuju normalnu interakciju titina sa teletoninom i  $\alpha$ -aktininom (187); u području prijelaza titina iz Z-crte u I-prugu (Trp930Arg) (188); u N2B području (Ser4465Asn i Glu4053X), prisutnom isključivo u titinu srčanog mišićnog tkiva, pa u bolesnika sa spomenutim mutacijama nema simptoma zahvaćenosti skeletnog mišića (187); te u području A-pruge (43628\_43629insAT) (188).

### **1.5.2.2. Bolesti skeletnih mišića uzrokovane mutacijama u TTN genu**

Edstromova miopatija (HMERF, *engl* hereditary myopathy with early respiratory failure; OMIM#603689) autosomno je dominantna mišićna bolest koju karakterizira proksimalna slabost gornjih i donjih ekstremiteta kao i respiratornih mišića što u ranoj fazi bolesti dovodi do problema sa disanjem i predstavlja učestali uzrok smrti. U dvije švedske obitelji analiza TTN gena otkrila je postojanje mutacije Arg279Trp u Mex1 egzonu, što u slijedu proteina odgovara području titin kinaze. Spomenuta mutacija onemogućava odvijanje normalnog puta prijenosa signala koji započinje molekulom titina, te preko nbr1, p62 i MURF2 proteina završava aktivnošću SRF proteina u jezgri (178).

Tibijalna mišićna distrofija (TMD, OMIM#600334) je autosomno dominantno mišićno oboljenje karakterizirano slabošću i atrofijom mišića potkoljenice. Bolest započinje u kasnim tridesetim godinama života i sporog je napredovanja. Do sada je TMD opisana u finskoj populaciji (27, 149) gdje se čini jednom od najčešćih oblika miopatija, te u jednoj obitelji iz Francuske (27,189), odnosno Belgije (190). U svih opisanih slučajeva tibijalne mišićne distrofije mutacije u TTN genu nalaze se u posljednjem, Mex6, egzonu TTN gena koji kodira imunoglobulinsko ponavljanje m10 (slika 5). U finskoj populaciji opisana je delecija, te istovremena insercija 11 bp, što na razini proteina uzrokuje izmjenu četiri aminokiselinska ostatka, (Glu34286\_Trp34289delinsValLysGluLys), uz zadržan okvir čitanja. U francuskoj obitelji promjena 34315-og kodona CTG u CCG uzrokuje promjenu aminokiseline leucina u prolin, dok u belgijske TMD obitelji promjena 34306-og kodona ATT u AAT uzrokuje zamjenu aminokiseline izoleucina u asparagin (Ile34306Asn). Jedino je mutacija iz finske populacije pronađena u 3 pacijenta i u homozigotnom obliku (27, 149). U tih bolesnika klinička slika odgovara pojasnoj mišićnoj distrofiji koja se po nomenklaturi iz 1995. godine naziva pojasnom mišićnom distrofijom tip 2J (LGMD2J, OMIM#608807). LGMD2J karakterizira puno teža klinička slika u odnosu na tibijalnu mišićnu distrofiju, kao i vrlo rani početak bolesti. Distrofičnim procesom više su zahvaćeni proksimalni mišići zdjelice i ekstremiteta što i odgovara karakteristikama pojasnih mišićnih distrofija. Zanimljivo je da je u bolesnika sa TMD, odnosno LGMD2J pronađen smanjen izražaj kalpaina 3. Kao što je već spomenuto, nije razjašnjeno što uzrokuje to sekundarno smanjenje kalpaina 3 u TMD, odnosno LGMD2J bolesnika. Ipak, s obzirom da se Mex6 mutacije nalaze u blizini veznog mjesta za kalpain 3, smatra se da bi one mogle biti odgovorne za ovu pojavu (149).

## **2.1. Hipoteza**

Unatoč višegodišnjim istraživanjima točna uloga kalpaina 3 još nije poznata, a ni kako nedostatak te proteaze dovodi do pojasne mišićne distrofije tip 2A. Dosadašnja istraživanja sve više povezuju aktivnost kalpaina 3 u stanici sa strukturnim proteinom titinom od kojeg kreće nekoliko važnih puteva prijenosa signala u mišićnoj stanici i koji posjeduje najmanje tri vezna mjesta za kalpain 3.

Uzimajući u obzir do sada poznate činjenice o odnosu kalpaina 3 i titina pretpostavka je disertacije da je jedna od uloga kalpaina 3 u stanici regulacija puteva prijenosa signala koji započinju od molekule titina. Nemogućnost takve regulacije, uslijed nedostatka kalpaina 3 ili njegove promijenjene funkcije, bila bi odgovorna, barem djelomično, za nastanak pojasne mišićne distrofije tip 2A.

## **2.2. Cilj rada**

Cilj rada bio je doprinijeti boljem razumijevanju etiopatogeneze pojasne mišićne distrofije tip 2A, posebice kroz odnos kalpaina 3 i titina. Obzirom na veličinu titina (4200 kDa), istraživanje je bilo ograničeno isključivo na njegov C-terminalni dio u području M-crte.

U svrhu ostvarivanja općeg cilja postavljeni su i slijedeći specifični ciljevi:

- razviti novu metodu analize kalpaina 3, posebno njegove enzimске aktivnosti
- bolje objasniti odnos kalpaina 3 i C-terminalnog dijela titina u nastanku pojasne mišićne distrofije tip 2A i tip 2J
- odrediti proteine koji su supstrati kalpaina 3, a smješteni su u neposrednoj blizini C-terminalnog dijela titina.

## 3.1. MATERIJALI

### 3.1.1. Uzorci mišićnog tkiva

Humane mišićne biopsije dobivene su, nakon pismenog pristanka svakog pacijenta, putem «Eurobiobank» mreže ([www.eurobiobank.org](http://www.eurobiobank.org)). Od ukupno 79 analiziranih biopsija, 42 su potjecale od bolesnika sa pojasnom mišićnom distrofijom tip 2A u kojih je dijagnoza prethodno potvrđena genskom i proteinskom analizom. Preostalih 37 uzoraka pripadali su zdravim pojedincima (9), bolesnicima sa drugim tipovima mišićnih distrofija (9), odnosno bolesnicima bez postavljene dijagnoze (19). Podaci o korištenim biopsijama prikazani su u Tablici 5. u poglavlju "Rezultati". Dvije TMD biopsije, jedna LGMD2J biopsija, te DNA osobe sa LGMD2J dobivena je od prof. B.Udda (Sveučilište Helsinki, Finska).

U radu su korištena dva različita mišja modela za pojasnu mišićnu distrofiju tip 2A (16,147,191), SJL (Charles River Laboratories, Les Oncins, Francuska), te *mdm* miševi (R.E.Bittner, Sveučilište u Beču, Austrija). Kao kontrola, korišteni su miševi linije 129SvPasIco (Charles River Laboratories, Les Oncins, Francuska). Sa miševima se postupalo prema europskim pravilima za brigu i korištenje eksperimentalnih životinja.

### 3.1.2. Kemikalije

Pri izradi disertacije korištene su slijedeće kemikalije:

- Tris, amonij persulfat, TBS, Tween 20, glicin, DNA početnice, MG132, ampicilin, E64, Ponceau S, NaCl, EGTA, EDTA, saharoza, bromfenol plavo, CHAPS, Triton X-100 i DTT («Sigma», St.Louis, SAD);
- SDS, TAE pufer, dNTP, DOB medij, YPD medij, smjesa aminokiselina (complete supplement mixture), urea, tiourea («QBiogene», Morgan Irvine, SAD);
- poliakrilamidni gelovi (4-12% Bis-Tris), MES i MOPS pufer, agaroz, TOP10 kompetentne E.coli stanice, S.O.C medij, PBS, DMEM, gentamicin, pufer za nanošenje uzoraka (4x LDS NuPAGE), agar, monoklonska anti-V5 protutijela, etidij-bromid, Syber safe, («Invitrogen», Carlsbad, SAD);
- filter papiri, Bradford reagens, proteinski standard (Precision Plus prestained Protein Standards) («BioRad», Hercules, SAD);
- Pfu Turbo DNA polimeraza, ukupna humana odrasla mRNA skeletnog mišića (*engl.* total human adult mRNA) («Stratagene», La Jolla, SAD);



- inhibitor proteaza PIC (*engl.* protease inhibitor cocktail), FuGENE6 («Roche», Basel, Švicarska);
- Immobilon-P PVDF membrana («Millipore», Billerica, SAD);
- Etanol i octena kiselina («VWR Prolabo», Fontenay-sous-bois, Francuska)
- IgG-HRP sekundarna protutijela («Amersham Biosciences», Piscataway, SAD)
- kvaščeve kompetentne stanice (Y187 i AH109), «recovery» medij, PEG/LiAc («BD Biosciences», Franklin Lakes, SAD)
- fetalni goveđi serum («Hyclone», Logan, SAD)
- ASB-14 («Calbiochem», Darrnstadt, Njemačka)
- DNA biljeg mol.mase («Eurogentec», Seraing, Belgija)
- monoklonska anti-titin protutijela («US Biological», Swampscott, SAD)
- poliklonska anti-V5 protutijela («Abcam», Cambridge, Velika Britanija)
- poliklonska anti-laminin protutijela («Progen», Heidelberg, Njemačka)
- sekundarna fluorescentna protutijela (Alexa 488, Alexa 546, Alexa 633), Topro3 («Molecular Probes», Eugene, SAD)
- monoklonska anti-MURF1 protutijela (anti-TRIM63) («Abnova», Tapei, Tajvan)
- Fluoromount –G (“Southern Biotech”, Birmingham, SAD)
- monoklonska anti-PSMC3 protutijela (TBP1-19) (“Affiniti Research Products Ltd.”, Devon, Velika Britanija)
- komercijalni plazmid pCMVSPORT6/PSMC3 (“Image Clone”, Cambridge, Velika Britanija)

Komercijalni kompleti korišteni u radu navedeni su prilikom opisa svake pojedine metode.

## 3.2. METODE

### 3.2.1. Priprema komplementarne DNA (cDNA)

Za sintezu cDNA molekule iz komercijalno dostupne mRNA odraslog humanog mišića korišten je SuperScript<sup>TM</sup> First-Strand Synthesis System komplet (Invitrogen, Carlsbad, SAD).

Ukupna RNA mišićnog tkiva (5µg) pomiješana je sa tzv. «nasumičnim» početnicama (*engl.* random hexamers) i 10mM dNTP-om, te denaturirana 5 minuta na 65°C. Smjesa je potom ohlađena na ledu, te su joj dodani svi sastojci SuperScript kompleta: RT pufer, otopina MgCl<sub>2</sub> i DTT. Nakon 2 minute na 25°C smjesi je dodan i SuperScript enzim

(50U). Nakon početne inkubacije na 25°C (10 minuta), sinteza cDNA se odvijala na 42°C tijekom 50 minuta, a potom je uslijedila krajnja reakcija na 70°C (15 minuta). Za uklanjanje preostale RNA smjesa je inkubirana sa RNAazom H na 37°C tijekom 20 minuta. Sintetizirana cDNA molekula se potom razrijedila kako bi joj konačna koncentracija bila 500 ng/μl. Tako pripremljena cDNA se potom koristila za umnažanje lančanom reakcijom polimeraze ili je do analize pohranjena na -20°C.

### 3.2.2. Lančana reakcija polimerazom (PCR)

Lančana reakcija polimerazom (*engl.* polymerase chain reaction, PCR) je brza i specifična metoda *in vitro* sinteze nukleinskih kiselina kojom su se odabrani odsječci DNA (geni ili dijelovi gena) umnažali u velikom broju kopija. Kao kalup za umnažanje korištena je cDNA molekula ili komercijalno dostupni plazmidi koji su sadržavali DNA odsječke od interesa.

Reakcijska smjesa, ukupnog volumena od 50 μl, sadržavala je:

- cDNA (500 ng) ili plazmidnu DNA (100 ng)
- par oligonukleotidnih početnica (100 ng)
- smjesu deoksiribonukleotida (200 μM)
- 10 x PCR pufer
- Pfu Turbo polimerazu (2.5U)

Za amplifikaciju je korištena Pfu turbo DNA polimeraza jer ima manju učestalost pogreške u odnosu na običnu Taq DNA polimerazu, a omogućava i korištenje manjih količina DNA kalupa, kraće vrijeme sinteze DNA, kao i manji ukupni broj PCR ciklusa.

Reakcija umnažanja odvijala se u stroju za lančanu reakciju polimerazom (MyCycler Thermal Cycler, «Bio Rad», Hercules, SAD), a uvjeti pod kojima se reakcija odvijala ovisili su o karakteristikama regije koja se umnažala. U slučaju plazmidne DNA nakon denaturacije od 30 sekundi na 95°C, uslijedilo je lijepljenje početnica (*engl.* annealing) na temperaturi od 55°C (30 sec), te sinteza DNA na 72°C. Trajanje sinteze ovisilo je o veličini PCR produkta (1 minuta za svakih 1000 bp). Pri umnažanju cDNA molekule očekivan je veći broj nespecifičnih produkata, pa je korišten tzv. gradijentni PCR program. On je u potpunosti odgovarao prethodno navedenom programu za umnažanje, ali je u svakom redu stroja za lančanu reakciju polimerazom podešena drugačija temperatura lijepljenja početnica. Obično se koristio raspon temperatura između 55° i 75°C. Na taj način se

odjednom testiralo više različitih temperaturi i uobičajeno na barem jednoj od njih umnožen je željeni PCR produkt.

**Tablica 2.** Slijed oligonukleotidnih početnica korištenih u lančanim reakcijama polimerazom

<b>GEN</b>	<b>NAZIV POČETNICE</b>	<b>SLIJED (5' → 3')</b>	<b>VELIČINA PCR PRODUKTA</b>
<b>titin</b> <b>(Mex1+ Mex6)</b>	Mex1 a.	CACCATGactgaaccaaagctcctg	1760 bp
	Mex6 m.	aatggatcgaatatgtatatt	
<b>titin</b> <b>(Mex5+ Mex6)</b>	Mex5 a.	CACCATGacagcttccttaatggctcctt	620 bp
	Mex6 m.	aatggatcgaatatgtatatt	
<b>MURF 1</b>	murf1 a.	CACCATGgattataagtcgagcctgatcc	1059 bp
	murf1 m.	ttactggtgtccttctcctcct	
<b>MURF 2</b>	murf2 a.	CACCATGagcgcacatctgaattaca	1644 bp
	murf2 m.	ttcatttagggagtcaaccag	
<b>MURF 2alt</b>	murf2 a.	CACCATGagcgcacatctgaattaca	1622 bp
	murf2alt m.	aatccaatccattaaagtaaaaat	
<b>teletonin</b> <b>(TCAP)</b>	tcap a.	CACCATGgctacctcagagctgagctgcga	505 bp
	tcap m.	gcctctctgtgcttctctgggacatg	
<b>PSMC3</b>	psmc3 a.	CACCATGcaggaaatgaatctgctg	1330 bp
	psmc3 m.	ggcatagtattgtaggttggc	
<b>miosprin (C-terminalni dio)</b>	cmya5 a.	CACCATGctgataaaatggtttcta	3491 bp
	cmya5 m.	cttgtgccttacagaatccgggggctc	

### 3.2.3. Mutageneza

Komercijalni komplet za mutagenezu (The QuickChange site-directed mutagenesis kit, Stratagene, La Jolla, SAD) korišten je za promjenu nukleotidnog slijeda DNA odsječka od interesa, a u cilju kreiranja željenih točkastih mutacija.

Mutageneza započinje reakcijom umanažanja koja se sastoji od 12 reakcijskih ciklusa podijeljenih na denaturaciju (95°C, 30 sekundi), lijepljenje početnica (55°C, 1 min), te sintezu DNA lanca (68°C, 1 minuta/1kb).

Reakcijska smjesa (50µl) sadržavala je:

- DNA kalup, tj. plazmidnu DNA kojoj se želi promjeniti nukleotidni slijed (50 ng)
- par oligonukleotidnih početnica (125 ng)
- smjesu deoksiribonukleotida (200 µM)
- 10 x PCR pufer
- betain
- DMSO
- Pfu Turbo polimerazu (2.5U)

Karakteristike oligonukleotidnih početnica koje u svom slijedu sadrže željenu mutaciju (nukleotidni slijed, T<sub>m</sub> i dužina) određene su prema uputama proizvođača.

Produkt dobiven reakcijom umnažanja u nastavku je inkubiran 1 sat na 37°C sa *Dpn I* restriksijskim enzimom (10U). Spomenuti enzim specifičan je za metiliranu DNA, te se koristi za razgradnju početnog DNA kalupa, pri čemu u otopini ostaje samo «mutirana» plazmidna DNA.

Uspješno provedena mutagenaza provjeravala se DNA sekvencioniranjem «mutiranog» plazmida, dobivenog metodama opisanim u daljnjem tekstu (transformacija bakterijskih stanica, izolacija plazmidne DNA).

**Tablica 3.** Slijed oligonukleotidnih početnica korištenih u reakciji mutagenaze

<b>GEN</b>	<b>SLIJED (5' → 3')</b>	<b>VRSTA MUTACIJE</b>
<b>titin</b> <b>(Mex5+ Mex6)</b>	I34306N a. caggggaggttcacaAtgaaaacacagatgacctg	ATT → AAT promjena 34306. aminokiseline
	I34306N m. caggtcatctgtgtttcaTtgtggaacctcccctg	Ile (I) → Asn (N)
<b>titin</b> <b>(Mex5+ Mex6)</b>	L34315P a. gatgacctgacaacccCgatcatcatggacg	CTG → CCG promjena 34315. aminokiseline
	L34315P m. cgtccatgatgatcGgggtgtcaggtcatc	Leu (L) → Pro (P)

### 3.2.4. Elektroforeza DNA u agaroznom gelu

Elektroforeza DNA u agaroznom gelu korištena je za provjeru:

- i) rezultata umnažanja lančanom reakcijom polimeraze, odnosno
- ii) rezultata cijepanja restrikcijskim enzimima.

Agarozna je pomiješana sa 1x TAE puferom (2M Tris-acetat, 0.05M EDTA, pH 8.3), te zagrijavana dok se nije otopila. Količina agaroze, odnosno volumen pufera ovisio je o postotku gela koji se odredio prema veličinama DNA fragmenata. Otopljena i dovoljno ohlađena agarozna izlila se u kadicu za elektroforezu. Prije izlijevanja dodana joj je otopina etidij bromida (1:10 000) ili Syber safe otopina (1:10 000). Obje su kemikalije interkalirajući reagensi koji se ugrađuju između DNA lanca i time omogućavaju vizualizaciju DNA pod UV svjetlom.

Nakon polimerizacije agaroznog gela i uklanjanja češlja, uzorci su nanoseni u jažice agaroznog gela uz prethodno miješanje sa puferom za nanošenje uzoraka (3 volumena 55% saharoze i jedan volumen otopine bromfenol plavo: 0.4% bromfenol plavo, 0.2M Tris pH 7.6, 0.5M EDTA, 10% SDS). Za određivanje veličina razdvojenih DNA fragmenata, na gel se uvijek nanosio i biljeg molekulske mase.

Elektroforeza se odvijala u 1x TAE puferu, pod stalnim naponom od 100V, a trajanje je ovisilo o veličinama DNA fragmenata, koji su nakon završene elektroforeze vizualizirani pomoću UV-transiluminatora.

### 3.2.5. Ekstrakcija DNA iz agaroznog gela

Ekstrakcija specifičnog PCR produkta iz agaroznog gela provodila se u cilju uklanjanja tragova DNA početnica i svih ostalih nespecifičnih produkata koji mogu interferirati u postupku kloniranja. U tu svrhu korišten je komercijalni komplet NucleoSpin® Extract II («Macherey Nagel», Dueren, Njemačka).

Nakon provjere uspješnosti PCR reakcije elektroforezom u agaroznom gelu, pod UV svjetlom je odrezan što manje dio gela koji je sadržavao željeni PCR produkt, te je inkubiran u NT puferu (200µl / 100mg gela) 5 do 10 minuta na 50°C. Otopina je potom nanosena na kolonu sa silika membranom, te centrifugirana 1 minutu na 11 000 g. Dok je DNA vezana za membranu, neželjeni produkti poput soli uklonjeni su uz pomoć NT3 pufera i centrifugiranjem 1-2 minute na 11 000 g. Pročišćena DNA je potom eluirana sa

30µl alkalnog pufera NE (5 mM Tris/HCl, pH 8.5). Uspješnost ekstrakcije provjerena je određivanjem koncentracije DNA, odnosno elektroforezom u agaroznom gelu.

### **3.2.6. Vežanje odsječaka DNA s plazmidom**

Za vežanje odsječaka DNA sa plazmidom (kloniranje) korišten je pcDNA<sup>TM</sup>3.1 Directional TOPO® Expression komplet («Invitrogen», Carlsbad, SAD) koji omogućuje brzo i efikasno kloniranje PCR produkata sa tupim krajevima, ali i transfekciju i izražaj kloniranog gena u staničnim kulturama sisavaca. PCR produkt umnožen je pomoću specifičnih oligonukleotidnih početnica, od kojih je jedna morala započinjati slijedom ACCATG, kao što je prikazano u Tablici 2.

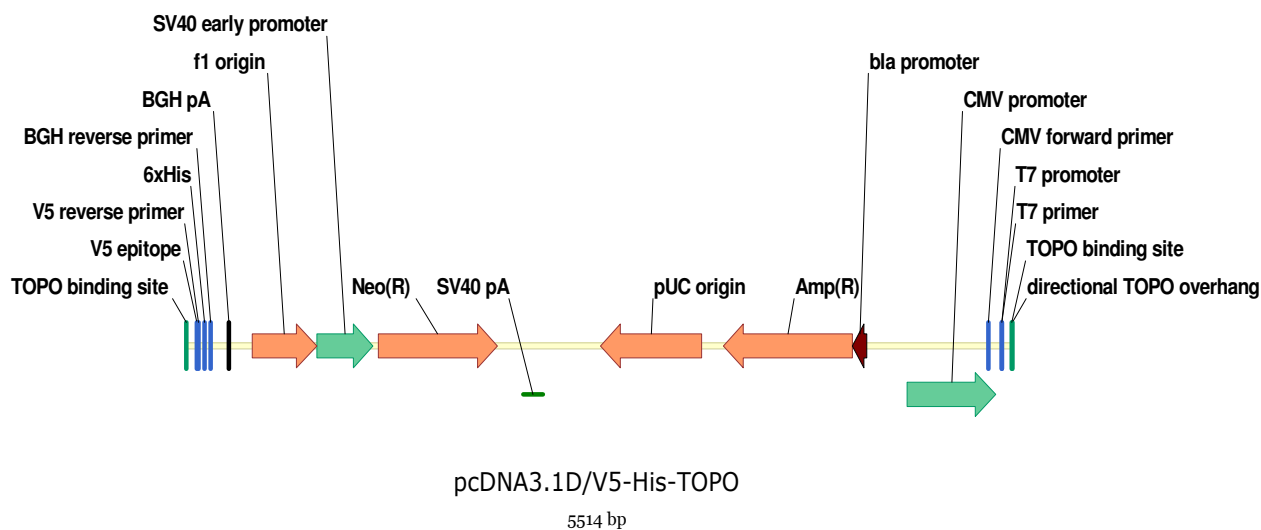
Glavni sastojak kompleta za kloniranje je pcDNA<sup>TM</sup>3.1D/V5-His-TOPO® ekspresijski vektor (slika 6) koji sadrži: 1) CMV promotor koji omogućava izražavanje gena od interesa u stanicama sisavaca; 2) TOPO® klonirajuće mjesto za brzo i efikasno kloniranje PCR produkata sa tupim krajevima; 3) C-terminalni peptid koji sadržava V5 peptid, kao i polihistidinski slijed (6xHis) za detekciju i pročišćavanje izraženog proteina.

Postupak kloniranja sastojao se u miješanju pročišćenog PCR produkta u odnosu 1:1 sa vektorom pcDNA3.1D/V5-His-TOPO uz dodatak otopine soli (*engl.* salt solution) i sterilne destilirane vode do ukupnog volumena od 6 µl. Reakcija se odvijala tijekom 5 minuta na sobnoj temperaturi.

### **3.2.7. Transformacija bakterija**

Kompetentne TOP10 E.coli stanice (50 µl) pomiješane su sa 2 µl produkta vežanja DNA odsječaka sa plazmidom i ostavljene 30 minuta na ledu. U nastavku su bakterije podvrgnute termičkom šoku zagrijavanjem 30 sekundi na 42°C i ponovnim hlađenjem na ledu. U svaku je epruvetu potom dodano 250 µl tekućeg hranjivog medija (S.O.C. medij). Epruvete su inkubirane 1 sat na 37°C.

Smjesa je na kraju zasađena na ploče sa krutom hranjivom podlogom (2.5% LB prah, 1.5% agar, pH 7.5) kojoj je dodano 100 µg/ml ampicilina. Ploče sa bakterijama inkubirane su tijekom noći na 37°C.



Slika 6. pcDNA3.1D/V5-His-TOPO ekspresijski vektor

### 3.2.8. Izolacija plazmidne DNA iz bakterija (mini-, maksiprep)

U radu su korišteni komercijalni kompleti za tzv. mini i maksiprep izolaciju plazmidne DNA iz bakterija (Qia Miniprep, Qia Maxiprep, «Qiagen», Hilden, Njemačka).

Kolonije bakterija koje su izrasle na hranjivoj podlozi tijekom noći, vrhom su čačkalice prenesene u jažice mikrotitarske pločice sa 100 µl tekućeg hranjivog medija (LB+antibiotik). Pločica je inkubirana tijekom dva sata na 37°C.

PCR reakcijom sa specifičnim DNA početnicama provjerilo se koje kolonije na mikrotitarskoj pločici sadrže željeni DNA odsječak. Za kolonije u kojima je dobiven pozitivan rezultat pripremljena je tzv. noćna prekultura: tekući hranjivi medij sa antibiotikom (5 ml) pomiješan je sa 5 µl «pozitivne» kolonije i ostavljen tijekom noći na 37°C.

Slijedeće jutro prekonoćna kultura je centrifugirana na 3000 rpm, 15 minuta na temperaturi od +4°C. Nakon centrifugiranja talog je resuspendiran u 250 µl pufera P1. Otopini je potom dodano 250 µl pufera za lizu P2, te 350 µl pufera za neutralizaciju N3. Sadržaj epruvete potom je centrifugiran 10 minuta na 13 000 rpm. Supernatant je prenesen na kolonu, te ponovno centrifugiran 1 minutu na 13 000 rpm. Uslijedilo je ispiranje kolone sa PB, odnosno PE puferom. Na kraju je plazmidna DNA eluirana u 100 µl pufera za eluciju (EB).

Dobivenom plazmidu spektrofotometrijski je određena apsorbancija (U-2000 spektrofotometar, «Hitachi», Japan) pri valnoj duljini od 260 nm. Očitani rezultat se

koristio za izračunavanje DNA koncentracije, uzimajući u obzir teorijski podatak da je pri  $A_{260}=1$  koncentracija genomske DNA 50  $\mu\text{g/ml}$ .

Za provjeru uspješnosti ugradnje željenog DNA odsječka svaki je plazmid podvrgnut DNA sekvencioniranju, koje nije omogućilo samo provjeru ugradnje DNA odsječka, već i provjeru prisutnosti eventualnih točkastih mutacija nastalih uslijed umnažanja DNA odsječka iz nekog drugog plazmida ili cDNA molekule. Uspješnost ugradnje DNA odsječka mogla se provjeriti i pomoću restrikcijskih enzima odabranih pomoću restrikcijske mape svakog plazmida.

Za plazmide koji su imali pravilno ugrađen odsječak uslijedila je ponovna izolacija iz bakterija ali u većem volumenu, tzv. maks prep.

### **3.2.9. Transfekcija**

Transfekcija je metoda neviralnog prijenosa gena kojim se plazmidna DNA sa genom (ili njegovim dijelom) od interesa unosi u eukariotske stanice. U radu je korišten komercijalni pripravak FuGENE6, tj. smjesa liposoma kojom su se geni od interesa unosili u NIH3T3 stanice.

NIH3T3 su stanice mišjih fibroblasta dobivene iz NIH Swiss mišjeg embrija. 24 sata prije transfekcije stanice su tripsinizirane, te pripremljene u određenoj koncentraciji u Petrijevim zdjelicama od 10 ml, odnosno mikrotitarskoj pločici sa 6 jažica. Uobičajeno je bilo 1-2 x  $10^6$  stanica po jednoj Petrijevoj zdjelici, odnosno 0,5 x  $10^6$  stanica po jažici mikrotitarske pločice.

400  $\mu\text{l}$  hranjivog medija (DMEM, 10% fetalni goveđi serum, 0.02% gentamicin) inkubirano je 5-10 minuta sa 30  $\mu\text{l}$  FuGENE6 u polistirenskim epruветama. U drugom setu epruвета pripremljena je DNA jednog ili više plazmida. Ukupna količina plazmidne DNA iznosila je 5  $\mu\text{g}$ , a odnos količina pojedinih plazmida ovisio je o njihovoj koncentraciji i veličini tj. broju baznih parova. Na taj se način osiguralo da je svaki plazmid prisutan u jednakom broju kopija. Nakon inkubacije, smjesa medija i FuGENE6 oprezno je (kap po kap) prenesena u epruветu sa plazmidima, te ostavljena 30-45 minuta kako bi se stvorio zajednički kompleks plazmida i FuGENE6. Na kraju je smjesa oprezno (kap po kap) nanosena u Petrijeve zdjelice sa pripremljenim stanicama, te ostavljena u inkubatoru 18-24 sati, nakon čega je otprilike 30 % stanica bilo transfecirano, tj. sadržavalo unesene plazmide. Trajanje transfekcije je optimizirano za svaki pojedini plazmid.



U slučaju stanica pripremljenih u jažicama mikrotitarske pločice korišten je isti postupak transfekcije, ali je odnos FuGENE6 i plazmidne DNA bio 3:1 (200  $\mu$ l hranjivog medija DMEM+ 12  $\mu$ l FuGENE6 + 4  $\mu$ l plazmidne DNA).

Neki od korištenih gena rezultirali su izražajem proteina male molekulske mase, koji su u stanici podložni razgradnji od strane proteasoma. U takvim se slučajevima 5 sati prije završetka transfekcije u Petrijeve zdjelice sa stanicama dodavalo 10  $\mu$ l 5mM MG132 (Z-Leu-Leu-Leu-al), reverzibilnog inhibitora proteasoma, koji je omogućio nastavak analize, tj. detekciju spomenutih proteina metodama proteinske analize.

### **3.2.10. Priprema uzoraka za proteinsku analizu**

#### **3.2.10.1. Priprema proteina staničnog lizata**

Nakon završene transfekcije stanice su plastičnom lopaticom sastrugane sa dna Petrijeve zdjelice i zajedno sa hranjivim medijem centrifugirane 5 minuta na 4°C i 1200 rpm. Talog stanica je ispran i resuspendiran u 1x PBS-u (0.9mM CaCl<sub>2</sub>, 0.5 mM MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 2.67mM KCl, 1.47mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 137.93mM NaCl, 8.06mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O), te ponovno centrifugiran pod istim uvjetima. Talog stanica oprezno je odvojen od nadtaloga, te inkubiran 30 minuta na ledu u puferu za lizu (20mM Tris pH 7.5, 150mM NaCl, 2mM EGTA, 0.1% Triton 100) kojem su dodani inhibitori proteaza (PIC i E64). Stanicama je uobičajeno dodano 20  $\mu$ l pufera za lizu po jednoj Petrijevoj zdjelici. Nakon centrifugiranja (10000g, 10 minuta, 4°C), nadtalog sa proteinima je odvojen od taloga, te mu je dodan pufer za nanošenje uzoraka na gel (4x NuPAGE LDS sample buffer pH 8.4 / 400mM DTT), u odnosu 4:1. Tako pripremljen uzorak denaturiran je tijekom 10 minuta na 70°C. Nakon toga uzorak se nanosio na poliakrilamidni gel ili je do nastavka analize pohranjen na -20°C.

#### **3.2.10.2. Priprema ukupnih proteina mišićnog tkiva**

Odmah nakon biopsije mišić je stavljen u epruvetu i uronjen tridesetak sekundi u posudu sa tekućim dušikom. Smrznuti mišić pohranjen je do analize na -80°C.

Prije početka analize mišić je izvagan te mu je dodan isti pufer za lizu (25 $\mu$ l/mg mišića) koji je korišten i za pripremu staničnog lizata. Mišić je potom homogeniziran 2-3 puta po 10 sekundi (Ultra-Turrax T8, Ika, Staufen, Njemačka). Homogenizirana smjesa je centrifugirana 5 minuta na 8000g (+4°C). Po završenom centrifugiranju nadtalog je

odvojen od taloga te mu je dodan pufer za nanošenje uzoraka na gel (4x NuPAGE LDS sample buffer pH 8.4 / 400mM DTT), u odnosu 4:1. Nakon denaturacije na 70°C (10 minuta) uzorak je nanesen na poliakrilamidni gel ili pohranjen na -80°C.

### **3.2.10.3. Priprema citoskeletnih proteina mišićnog tkiva**

Korištenjem komercijalnog kompleta za izolaciju proteina različite subcelularne lokalizacije (ProteoExtract® Subcellular Proteome Extraction Kit, «Calbiochem», Darrnstadt, Njemačka) izolirani su i ukoncentrirani citoskeletni proteini iz uzorka mišićnog tkiva.

Mišićno tkivo je usitnjeno, izvagano, te mu je dodan određeni volumen pufera za ekstrakciju I (50 mg / 200 µl). Nakon kratkog miješanja na vorteksu smjesa je ostavljena 10 minuta na rotoru na 4°C, te potom centrifugirana na 800 g (10 minuta, 4°C). Nadtalog, koji odgovara citosolnoj frakciji prenesen je u novu epruvetu i smrznut na -80°C, dok je talogu dodan pufer za ekstrakciju II (50 mg / 200 µl). Smjesa je pomiješana na vorteksu, te ostavljena 10 minuta na rotoru (4°C). Nakon centrifugiranja (5500g, 10 minuta, 4°C), nadtalog (frakcija membranskih proteina) je smrznut na -80°C, a talogu je dodan pufer za ekstrakciju III (50mg / 100 µl). Nakon miješanja na vorteksu, te inkubacije na rotoru (10 minuta, 4°C), smjesa je centrifugirana na 6800g tijekom 10 minuta na 4°C. Nadtalog (jezgreni proteini) je pohranjen na -80°C, a talogu je dodan pufer sastava: 7M urea, 2M tiourea, 1% Triton X-100, 1x ASB-14, 2%CHAPS. Smjesa je dobro pomiješana na vorteksu, te inkubirana 15 minuta na 60°C. Nakon centrifugiranja na 15 000 g (15 minuta) nadtalog (proteini citoskeleta) je alikvotiran , te mu je dodan pufer za nanošenje uzoraka (4x NuPAGE LDS sample buffer pH 8.4 / 100mM DTT) u odnosu 4:1. Proteini su u nastavku denaturirani 10 minuta na 70°C, te naneseni na poliakrilamidni gel ili pohranjeni na -20°C.

### **3.2.11. Određivanje koncentracije proteina metodom po Bradfordu**

Prije dodavanja pufera za nanošenje uzoraka u uzorcima staničnog lizata ili mišićnog tkiva određena je koncentracija proteina spektrofotometrijskom metodom po Bradfordu. Metoda se temelji na mjerenju absorbancije proteinskog uzorka i reagensa koji sadrži boju Coomassie Brilliant Blue G-250 na valnoj duljini od 595 nm. Za određivanje koncentracije proteina, a na temelju izmjerene absorbancije, koristila se baždarna krivulja koja je

dobivena mjerenjem absorbancija niza različitih, ali poznatih koncentracija albumina goveđeg seruma (50-200 µg/ml).

### **3.2.12. Denaturirajuća poliakrilamidna gel elektroforeza**

Denaturirajuća poliakrilamidna gel elektroforeza korištena je za razdvajanje proteina iz uzoraka staničnog lizata ili mišićnog tkiva. U radu su korišteni gotovi, komercijalni poliakrilamidni gelovi (4-12% Bis-Tris gel).

Gel je stavljen u aparaturu za poliakrilamidnu elektroforezu (X Cell SureLock Mini-Cell, Invitrogen, Carlsbad, SAD), uz prethodno uklanjanje češlja. U jažice su potom naneseni uzorci, pripremljeni kao što je prethodno opisano, te proteinski standard (Precision Plus prestained Protein Standards) pomoću kojeg se naknadno određivala molekulska masa proteina od interesa.

Elektroforeza se odvijala uz stalni napon od 120V u jednom od dva komercijalna pufera: MES (50mM MES pH 7.2, 50mM Tris, 0.1% SDS, 1mM EDTA) ili MOPS SDS pufer za elektroforezu (50mM MOPS pH 7.7, 50mM Tris, 0.1% SDS, 1mM EDTA). Koji se pufer koristio i koliko je elektroforeza trajala ovisilo je o veličini proteina koje smo željeli analizirati (slika 7).

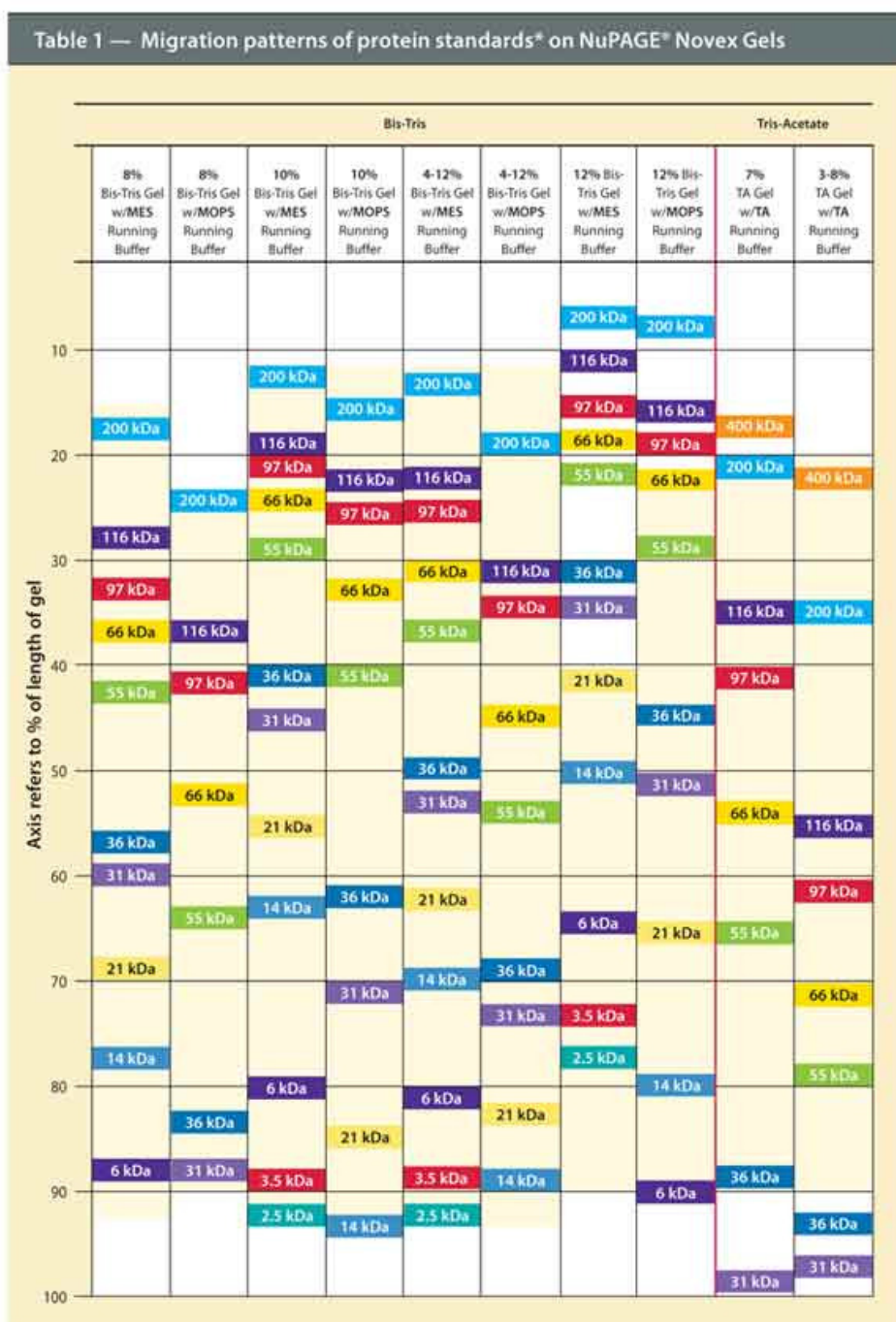
### **3.2.13. Prijenos proteina na membranu (*engl.* western blotting)**

Western blot analiza je prijenos elektroforetski razdvojenih proteina sa poliakrilamidnog gela na membranu. U radu je korištena aparatura za tzv. mokri prijenos (Mini Trans Blot Cell, Bio Rad, Hercules, SAD).

Po završetku elektroforeze u plitku posudu sa puferom za prijenos na membranu (0.2 M glicin, 25mM Tris, 0.1% SDS, 20% etanol, pH 8.3) stavljena su 2 filter papira, PVDF membrana (prethodno aktivirana u etanolu), te poliakrilamidni gel. «Sendvič» kojeg su redom činili filter papir-membrana-gel-filter papir, stavljen je u aparaturu za mokri prijenos, pazeći da njegov položaj u odnosu na elektrode omogući prijelaz negativno nabijenih proteina sa gela na membranu.

Prijenos se odvijao tijekom jednog sata u puferu za prijenos na membranu, pri stalnom naponu od 100V. Nakon prijenosa membrana je inkubirana 10 minuta u otopini 0.2% Ponceau crveno / 1% octena kiselina, te potom odbojavana u 1% otopini octene kiseline. Tim postupkom je bilo moguće vizualizirati proteine na membrani, tj. provjeriti efikasnost

prijenosa. Pri analizi uzoraka mišićnog tkiva, vizualizacija proteina se koristila i za usporedbu miozina, najzastupljenijeg proteina u mišićnom tkivu, kojim se procjenjuje kvaliteta analiziranog mišića. Uslijed nepravilnog smrzavanja mišićnog tkiva, odnosno uslijed distrofičnog procesa, ispitivani uzorak može imati potpuni nedostatak, odnosno smanjenu količinu miozina u odnosu na kontrolu. Za takav se uzorak rezultat dobiven nakon inkubacije sa specifičnim protutijelima ne može pravilno interpretirati.



**Slika 7.** Profil razdvajanja proteinskog standarda u različitim gelovima korištenjem MOPS ili MES pufera (preuzeto iz komercijalnog kataloga «Invitrogen», Carlsbad, SAD za 2006)

### 3.2.14. Inkubacija membrane sa specifičnim protutijelima

Nakon završenog prijenosa proteini su vezani za površinu membrane što omogućuje njihovu identifikaciju pomoću specifičnih protutijela.

Membrana je inkubirana 1 sat u otopini blokirajućeg reagensa kako bi se spriječila pojava nespecifičnog signala. Za to je korištena otopina 5% mlijeka u TBS Tween puferu (100 mM Tris, 1.5M NaCl, 0.5% Tween 20 (polioksietilensorbitan monolaurat), pH 8.0). Slijedile su inkubacije od jednog sata sa jednim od specifičnih primarnih protutijela navedenih u Tablici 4, te nadalje inkubacija sa odgovarajućim sekundarnim protutijelom.

Između svake inkubacije membrana je dobro isprana (4x5 min) u TBS Tween puferu. Na samom kraju membrana je inkubirana u West Pico kemiluminiscentnom supstratu (Super Singnal<sup>®</sup> West Pico Chemiluminescent Substrate, «Pierce», Rockford, SAD), te stavljena u kazetu sa filmom. Prva ekspozicija obično je trajala 3 min, nakon čega se, ovisno o jačini signala, vrijeme slijedeće ekspozicije skratilo ili produžilo.

S obzirom da je korištena PVDF membrana, postupak inkubacije sa različitim primarnim i sekundarnim protutijelima mogao se ponavljati 2-3 puta, pri čemu je između svakog novog ciklusa membrana inkubirana 30 min na 55°C u otopini za dehibridizaciju (65mM Tris HCl pH 6.8, 2% SDS), te potom dobro isprana u TBS Tween puferu. Postupkom dehibridizacije uklonjena su sva prethodno vezana protutijela pa se membrana iznova mogla inkubirati sa nekim drugim primarnim i sekundarnim protutijelom.

**Tablica 4.** Protutijela i njihova razrjeđenja korištena u analizi prijenosom na membranu i imunohistokemiji

<b>PRIMARNO PROTUTIJELO</b>	<b>SEKUNDARNO PROTUTIJELO</b>
<b>Proteinska analiza prijenosom na membranu</b>	
monoklonsko anti V5 (1:5000)	anti-miš IgG-HRP (1:10 000)
poliklonsko anti calpain 3-IS2 regija (1:150)	anti-zec IgG-HRP (1:10 000)
poliklonsko anti titin- m10 regija (1: 300)	anti-zec IgG-HRP (1:10 000)
poliklonsko anti KY (1:3000)	anti-zec IgG-HRP (1:10 000)
monoklonsko anti MURF1 (1:100)	anti-zec IgG-HRP (1:10 000)
monoklonsko anti PSMC3 (1:2500)	anti-miš IgG-HRP (1:10 000)
<b>Imunohistokemija</b>	
monoklonsko anti V5 (1:200)	anti-miš IgG-Alexa 488/546 ili 633 (1:1000)
poliklonsko anti V5 (1:200)	anti-zec IgG-Alexa 488/546 ili 633 (1:1000)
monoklonsko anti titin (1:10)	anti-miš IgG-Alexa 488/546 ili 633 (1:1000)
poliklonsko anti laminin (1:400)	anti-zec IgG-Alexa 488/546 ili 633 (1:1000)

### 3.2.15. Imunohistokemija

#### 3.2.15.1. Analiza fenotipa NIH3T3 stanica

Stanice, pripremljene u mikrotitarskoj pločici sa 6 jažica, su nakon završene transfekcije isprane 3 puta po 5 minuta u 1x PBS-u, te potom fiksirane u 3.7% otopni formaldehida. Nakon ispiranja u 1 x PBS-u, stanice su permeabilizirane tijekom 30 minuta u otopini 1xPBS/ 0.2% Triton X-100, te potom inkubirane 1 sat u otopini 1xPBS/20%SVF. Uslijedila je inkubacija sa jednim ili više primarnih protutijela (Tablica 4), te u nastavku sa jednim ili više odgovarajućih sekundarnih protutijela. Pri korištenju sekundarnih protutijela pazilo se da njihova fluorescencija ne interferira, te da se svako od njih može naknadno promatrati pod mikroskopom.

U nastavku su stanice inkubirane 2 sata sa protutijelima usmjerenim protiv aktina, a kako bi se njegovom vizualizacijom proučavao fenotipa stanica. U nekim je slučajevima stanicama dodavana i boja Topro 3 (1:500) kojom su se bojale jezgre stanica.

Na samom kraju stanice su pokrivene pokrovnim stakalcem, te promatrane pod konfokalnim mikroskopom (Leica, Wetzlar, Njemačka).

#### 3.2.15.2. Proučavanje lokalizacije plazmidne DNA u *in vivo* uvjetima (unosom u miša)

Pedeset mikrograma plazmida pcDNA3.1D/V5-His-TOPO/Mex1-Mex6 uneseno je elektroprijenosom u lijevi prednji mišić *tibialis anterior* (TA) 6 kontrolnih (129SvPasIco), odnosno 5 LGMD2A miševa (C3-Kin-lacZ).

Nakon 7 dana miševi su žrtvovani, pri čemu je TA mišić zamrznut na plutenom čepu koji je tridesetak sekundi držan u izopentanu ohlađenom u tekućem dušiku. U 3 kontrolna i 3 LGMD2A miša orijentacija mišića bila je poprečna, a u preostale 3 kontrole i 2 LGMD2A miša uzdužna. Od svakog smrznutog mišića pripremljeni su histološki preparati sa rezovima debljine 8  $\mu$ m, koji su se potom koristili za imunohistokemijsku detekciju unesenog plazmida, kao i endogenog titina i laminina.

Rezovi su blokirani 1 sat u otopini 1 x PBS/ 15% fetalni goveđi serum, a potom 2 sata sa primarnim protutijelima na sobnoj temperaturi. Uzdužni rezovi bili su inkubirani sa mišjim monoklonskim protutijelima usmjerenim protiv titina, te zečjim poliklonskim protutijelima usmjerenim protiv V5 peptida. Poprečni rezovi inkubirani su sa zečjim poliklonskim protutijelima usmjerenim protiv laminina i mišjim monoklonskim protutijelima protiv V5 peptida. Razrjeđenja korištenih protutijela navedena su u Tablici 4. Nakon ispiranja sa 1 x PBS (3 x 10 minuta), rezovi su inkubirani 1 sat u tami i na sobnoj temperaturi sa

sekundarnim protutijelima konjugiranim sa Alexa 546 ili Alexa 488 bojom. Nakon ispiranja u 1 x PBS (10 minuta) preparati su inkubirani 15 minuta sa Topro3 bojom (1:500), a u cilju vizualizacije staničnih jezgri, te potom isprani u 1 x PBS (3 x 10 minuta). Na kraju su rezovi pokriveni pokrovnim stakalcem uz prethodno dodavanje Fluoromount – G pripravka, te nakon 24 sata gledani pod konfokalnim mikroskopom (Leica, Wetzlar, Njemačka).

### **3.2.16. Enzimska reakcija određivanja aktivnosti kalpaina 3**

Mišićno tkivo izvagano je i homogenizirano u puferu za lizu kao što je već prethodno opisano. Nakon centrifugiranja (8 000g, 5 min, 4°C) 25 µl nadtaloga (otprilike 100 µg proteina) inkubirano je na 37°C u 50 µl reakcijske smjese koja je sadržavala 3 µg kalpain3<sup>C129S</sup> staničnog lizata i 5 mM CaCl<sub>2</sub>. Kalpain 3<sup>C129S</sup> stanični lizat pripremljen je unosom pcDNA3.1D/V5-His-TOPO/hC129S plazmida u NIH3T3 stanice koje su potom lizirane na prethodno opisan način. Stanični lizat pohranjen je na –80°C. Izbor supstrata (kalpain 3<sup>C129S</sup>) i princip enzimske reakcije objašnjeni su u poglavlju «Rezultati».

Enzimska reakcija zaustavljena je nakon jednog sata dodavanjem 15µl LDS NuPage pufera 4x / 400mM DTT. Dvadeset mikrolitara reakcijske smjese analizirano je prethodno opisanim metodama proteinske analize: SDS-PAGE, prijenos na membranu i inkubacija sa specifičnim protutijelima. Za određivanje aktivnosti kalpaina 3 korištena su anti V5 monoklonska protutijela, te poliklonska anti-kalpain 3 antitijela usmjerena protiv IS2 dijela kalpaina 3.

### **3.2.17. Metoda dvostrukog hibrida**

Postojanje interakcije između dva proteina određuje se pomoću metode dvostrukog hibrida (*engl.* yeast-two-hybrid). Princip metode i interpretacija rezultata objašnjeni su u poglavlju “Rezultati”.

Metoda dvostrukog hibrida relativno je jednostavna, a sastoji se od:

- **Vežanja DNA slijeda proteina od interesa sa određenim plazmidom**

cDNA slijedovi proteina od interesa povezani su sa plazmidima pGAD, odnosno pAS ili pGBKT7 na prethodno opisan način.

#### ▪ **Transformacije stanica kvasca sa plazmidima**

Pedeset mikrolitara kompetentnih kvašćevih stanica pomiješano je sa 0.25 ug plazmida, a potom je smjesi dodano 300 µl otopine PEG/litijev acetat. Nakon kratkog miješanja na vorteksu, smjesa je inkubirana 30 minuta na 30°C. Uslijedio je termički šok (42°C, 15 min), a potom centrifugiranje 15 sekundi na 13000 rpm. Talog je odvojen od nadtaloga, te je resuspendiran u 250 µl tzv. "recovery" medija. Smjesa je ostavljena 1 sat i 30 minuta na 30°C, te potom zasađena na Petrijeve ploče sa DOB medijem (0.17% kvašćeve dušične baze, 2% dekstroza, 0.5% amonij-sulfat) kojem je dodana smjesa aminokiselina (*engl.* complete supplement mixture) s izuzetkom leucina, odnosno triptofana (CSM-Leu, CSM-Trp).

Za transformaciju pGAD plazmida koristile su se AH109 kvašćeve stanice, koje su nakon transformacije zasađene na podlogu sa manjkom leucina, kojeg je pGAD plazmid sposoban sintetizirati. Y187 stanice korištene su za pAS ili pGBKT7 plazmid, a zasađene su na podlogu sa manjkom triptofana, s obzirom da spomenuti plazmidi sadrže gen za njegovu sintezu.

#### ▪ **Rasta kvašćevih kolonija u neselektivnom mediju**

Kolonija kvasca koja sadrži pGAD, odnosno pAS plazmid vrhom je čačkalice prenesena u 100 µl destilirane vode, te dobro resuspendirana. Za svaku suspenziju određen je turbiditet pri valnoj duljini od 600nm, te je ista količina oba plazmida nanosena u obliku kruga na isto mjesto Petrijeve ploče sa neselektivnim medijem YPD (2% pepton, 1% kvašćev ekstrakt, 2% dekstroza, pH 6.5). Ploče su inkubirane 24-36 sati na 30°C.

#### ▪ **Rasta kvašćevih kolonija u selektivnom mediju**

Jedna od izraslih kolonija kvasca na neselektivnom mediju vrhom je čačkalice resuspendirana u 100 µl destilirane vode, te nasađena na Petrijevu ploču sa selektivnim medijem, tj. DOB medijem i smjesom svih aminokiselina osim histidina, triptofana i leucina (CSM-His-Leu-Trp). Petrijeve ploče inkubirane su 4-5 dana na 30°C.

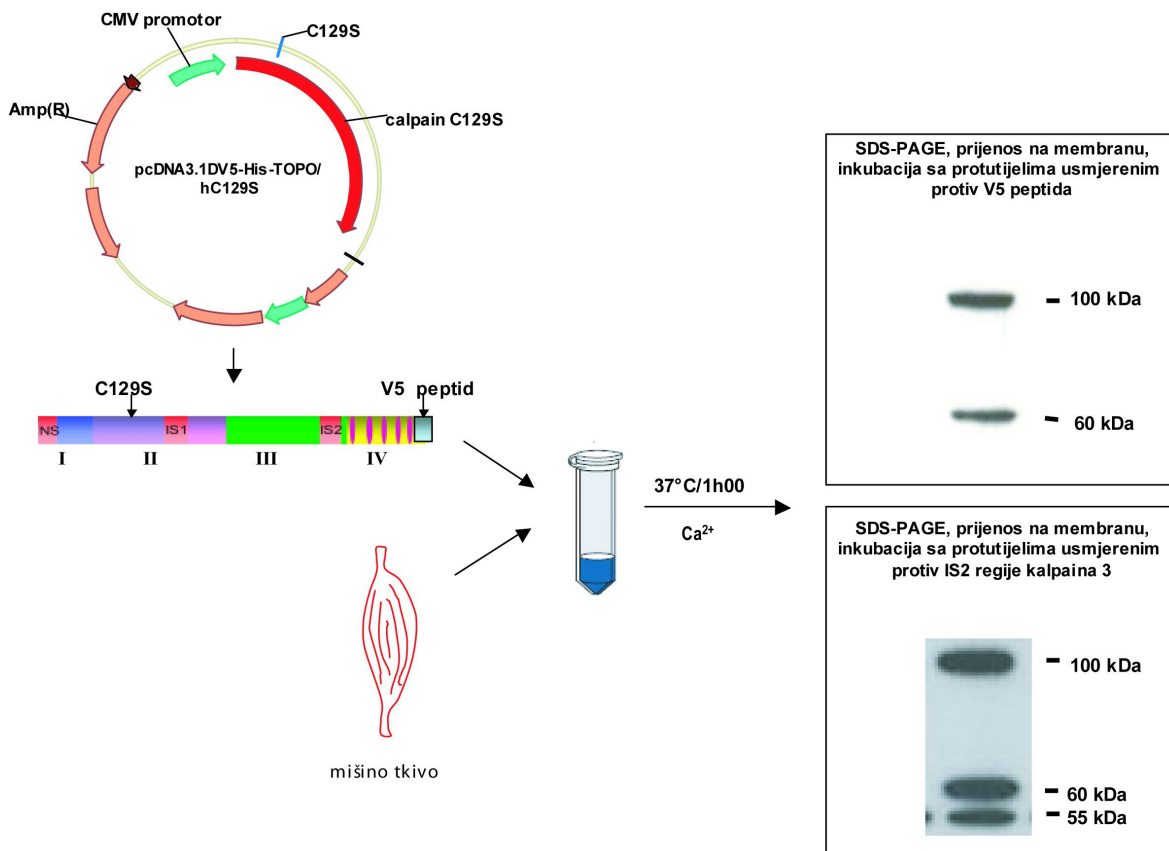


## 4.1. ENZIMSKI TEST ZA ODREĐIVANJE AKTIVNOSTI KALPAINA 3

### 4.1.1. Princip enzimskog testa

Kalpain 3<sup>C129S</sup> je inaktivni kalpain 3 koji ne može aktivirati ni sebe ni druge molekule kalpaina 3, ali može biti cijepan od strane drugih aktivnih molekula kalpaina 3. Pritom kao rezultat cijepanja nastaju N-terminalni fragment veličine od 30 kDa i C-terminalni fragment od 55 kDa. Ove činjenice iskorištene su za razvitak enzimskog testa kojim se aktivnost kalpaina 3 u *in vitro* uvjetima određuje prema mogućnosti cijepanja supstrata, kalpaina 3<sup>C129S</sup>. Cijepanje supstrata vidljivo je prisustvom proteinske vrpce od 60 kDa koja sadržava C-terminalni dio supstrata (55 kDa) i V5-peptid (5 kDa) koji potječe od vektora (pcDNA3.1D/V5-His-TOPO).

Istim testom moguće je i testirati izražaj i autolizu kalpaina 3 korištenjem protutijela usmjerenih protiv kalpaina 3. Epitop spomenutih protutijela nalazi se u području IS2 regije i prisutan je i u kalpainu 3 i u korištenom supstratu (kalpain 3<sup>C129S</sup>), no veća molekularna masa supstrata, a zbog prisustva V5-peptida, omogućava razlikovanje proteinskih vrpca supstrata od onih koje pripadaju kalpainu 3 iz testiranog mišićnog ili nekog drugog uzorka (slika 8).



Slika 8. Princip enzimskog testa za određivanje aktivnosti kalpaina 3

#### 4.1.2. Optimizacija enzimskog testa

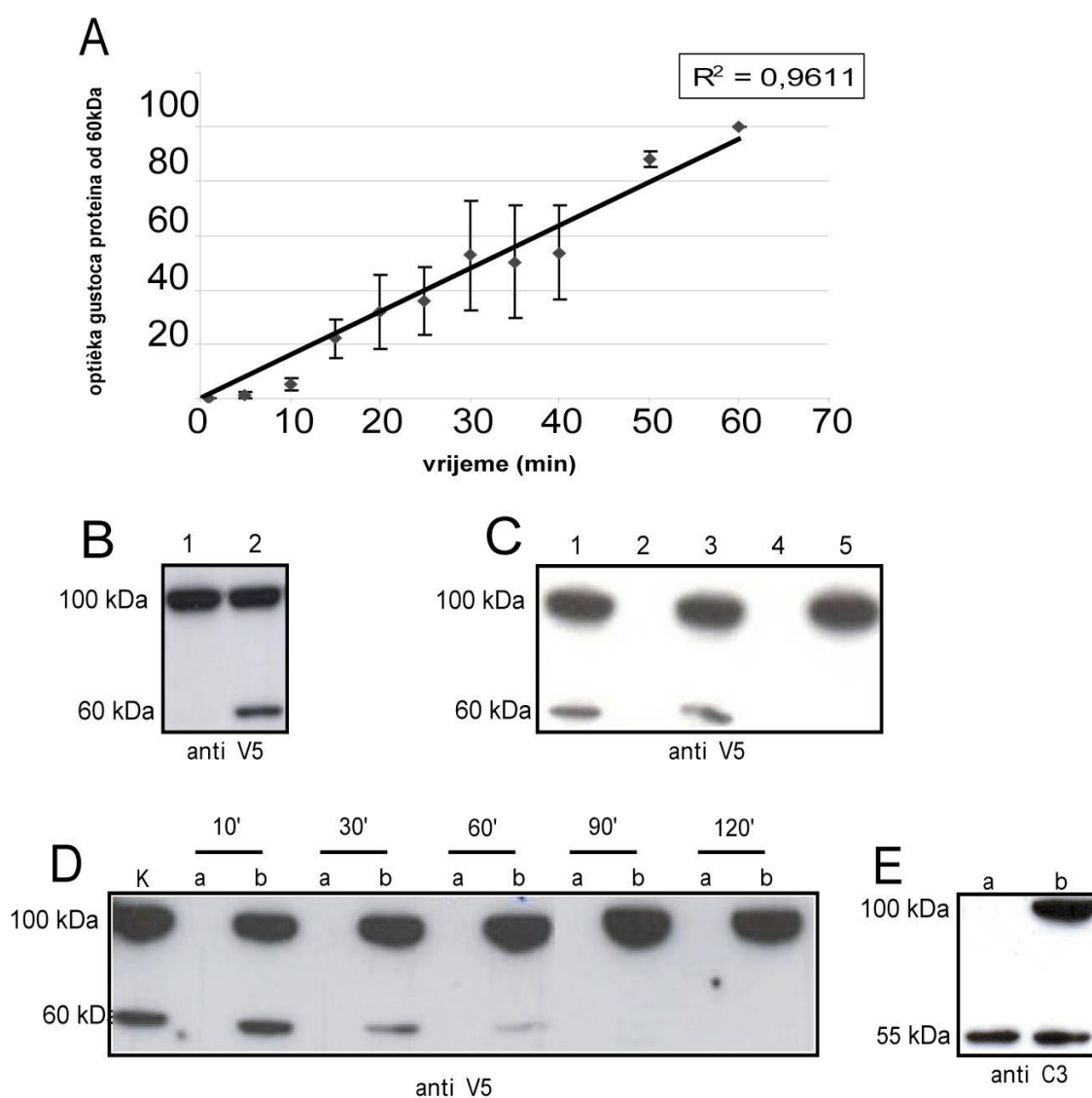
Kako bi se odredila količina kalpaina 3<sup>C129S</sup> koja je optimalna za enzimski test, različite koncentracije supstrata analizirane su SDS-PAGE metodom i prijenosom na membranu nakon *in vitro* produkcije (transfekcije i lize stanica). Procijenjeno je da je 3 µg liziranih stanica sa izraženim supstratom optimalno za enzimski test pri efikasnosti transfekcije između 20-30 %.

Za provjeru linearnosti enzimske reakcije test je izvođen pri različitim vremenima inkubacije, od 1 do 60 minuta. Prema dobivenim rezultatima, trajanje inkubacije od jednog sata određeno je kao optimalno jer se aktivnost lako detektira i još uvijek je u linearnom području (slika 9A).

S obzirom da u literaturi postoje proturječni podaci koji se tiču ovisnosti aktivnosti kalpaina 3 o kalciju, test je izveden uz i bez prisustva kalcija. Na slici 9B. vidljivo je da je kalcij neophodan za aktivnost kalpaina 3.

Pri optimizaciji testa provjereno je i da li različit način smrzavanja mišića (direktno u tekućem dušiku, odnosno smrzavanje u izopentanu ohlađenom u tekućem dušiku) mijenja rezultat enzimskog testa. Kao što je pokazano na slici 9C. za oba mišića dobiven je isti rezultat, što upućuje da način smrzavanja ne utječe na krajnji rezultat enzimskog testa.

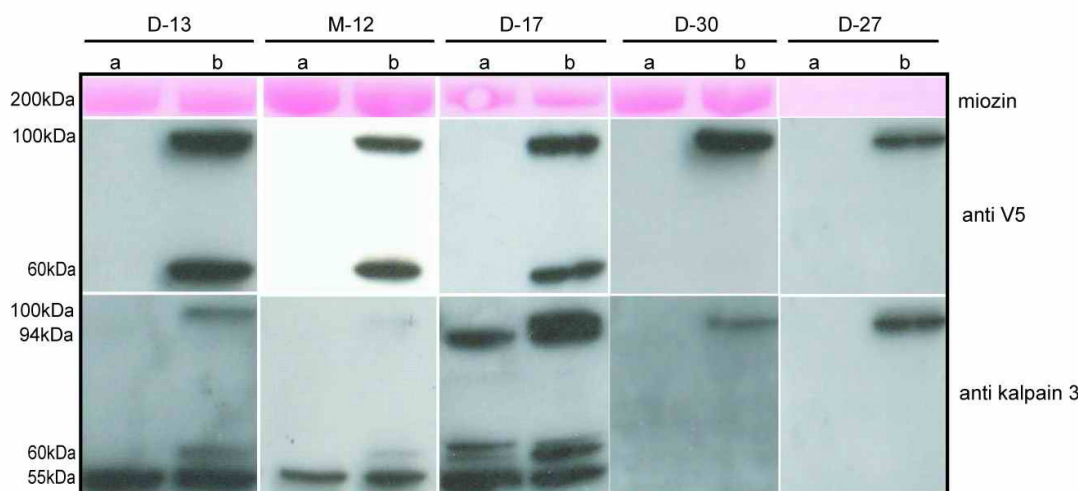
S obzirom da je u literaturi već pokazano da loše «rukovanje» mišićem može dovesti do razgradnje kalpaina 3 i time lažno pozitivnih rezultata, isto je provjereno za enzimski test. Točnije, mišićni uzorci preinkubirani su 0, 10, 30, 60, 90 i 120 minuta na 37°C prije inkubacije sa supstratom 1 sat na 37°C. Deset minutna preinkubacija dala je iste rezultate kao uzorak bez preinkubacije (0 minuta). Svaka duža preinkubacija rezultirala je u sve većem smanjenju aktivnosti kalpaina 3 (slika 9D). Istovremeno kako se aktivnost tijekom vremena smanjivala, izražaj kalpaina 3 ostao je isti i nakon 120 minuta preinkubacije (slika 9E).



**Slika 9. Optimizacija enzimskog testa za određivanje aktivnosti kalpaina 3** (A) Linearnost enzimskog testa pri različitom vremenu inkubacije. Prisutnost proteinske vrpce od 60kDa bila je kvantitativno određena nakon različitih vremena inkubacije. (B) Rezultati enzimske aktivnosti kalpaina 3 bez (stupac 1) i sa kalcijem (stupac 2). Kalpain 3 nije bio aktivan bez prisustva kalcija. (C) Rezultati dobiveni za dva mišića smrznuta u tekućem dušiku (stupac 1), odnosno u izopentanu ohlađenom u tekućem dušiku (stupac 3). Stupac 5 odgovara uzorku supstrata bez mišića, a stupci 2 i 4 uzorcima mišića bez supstrata. (D) Smanjenje enzimske aktivnosti kalpaina 3 uslijed različitog vremena preinkubacije (10, 30, 60, 90 i 120 minuta). K odgovara uzorku bez preinkubacije (0 minuta). Stupci (a) i (b) odgovaraju uzorcima inkubiranim bez i sa supstratom. (E) Preinkubacija od 120 minuta nije promjenila izražaj kalpaina 3, ali je enzimska aktivnost u potpunosti izgubljena. Stupci (a) i (b) odgovaraju uzorcima inkubiranim bez i sa supstratom.

### 4.1.3. Analiza humanih biopsija enzimskim testom

Rezultati enzimskog testa za ukupno 79 humanih biopsija prikazani su u Tablici 5A-D, odnosno na slici 10. U cilju procjene mogućnosti korištenja enzimskog testa u dijagnostičke svrhe, analiza aktivnosti kalpaina 3 provedena je kao slijepi pokus u kojem se tek nakon završenog enzimskog testa rezultat aktivnosti kalpaina 3 usporedio sa prije poznatim rezultatima analize CAPN3 gena.



**Slika 10. Analiza izražaja (anti kalpain 3 protutijelo) i enzimske aktivnosti (anti V5 protutijelo) kalpaina 3 u 5 humanih biopsija.** Svaka biopsija inkubirana je bez (stupac a) i sa supstratom (stupac b). Proteinska vrpca od 100kDa odgovara supstratu, kalpainu 3<sup>C129S</sup>, 94kDa kalpainu 3 iz mišića, 60kDa produktu cijepanja supstrata kalpainom 3, 55kDa autoliziranom i aktivnom kalpainu 3 iz mišića. Normalan izražaj i aktivnost kalpaina 3 opažena je u kontrolnom mišiću (D-13). Mišići M-12 i D-17 su 2 LGMD2A mišića za koje je pronađen normalan izražaj i aktivnost kalpaina 3. Ipak, za mišić D-17, prisustvo p94 i proteinskih vrpce oko 60kDa (stupac a) ukazuju da autoliza kalpaina 3 nije potpuna i znatno je sporija u odnosu na kontrolu. Mišić D-30 odgovara LGMD2A mišiću sa potpunim nedostatkom i izražaja i aktivnosti kalpaina 3. U slučaju zadnjeg mišića (D-27) rezultate enzimskog testa nije moguće interpretirati na pravilan način, a uslijed potpunog nedostatka miozina.

Bojanje membrane (nakon prijenosa proteina) sa Ponceau crvenom otopinom omogućilo je vizualizaciju miozina, kojim se procjenjuje kavaliteta korištenog mišića. Uzorci u kojih je miozin bio smanjen ili negativan bili su isključeni iz analize, tj. njihov rezultat enzimske aktivnosti kalpaina 3 nije se uzimalo u obzir.

Iz Tablice 5A vidljivo je da je u svih 9 kontrolnih uzoraka dobivena normalna enzimska aktivnost kalpaina 3. U 23/34 LGMD2A biopsije opažena je ili smanjena ili negativna enzimska aktivnost kalpaina 3. U gotovo svim uzorcima izražaj kalpaina 3 strogo je

korelirao sa dobivenim rezultatima enzimskog testa. Izuzetak su 4 biopsije (D-23, B-14, B-15, G-2) u kojih je izražaj kalpaina 3 znatno smanjen, ali je enzimska aktivnost u potpunosti izgubljena. U preostalih 11/34 (32%) LGMD2A biopsija dobiven je normalan i izražaj i aktivnost kalpaina 3, unatoč prisustvu mutacija u CAPN3 genu (Tablica 5B). Tablica 5C prikazuje rezultate enzimskog testa dobivene za biopsije bolesnika sa drugim, ne LGMD2A, neuromuskularnim bolestima. Normalan izražaj i aktivnost kalpaina 3 dobiven je gotovo za sve analizirane uzorke, s izuzetkom dvije LGMD2B biopsije. U jedne je unatoč normalnom izražaju kalpaina 3 enzimska aktivnost smanjena (D-15), a u druge su smanjeni i izražaj i aktivnost kalpaina 3 (D-16). U tablici 5D prikazani su rezultati aktivnosti kalpaina 3 za nedijagnosticirane biopsije. U gotovo svih uzoraka dobiven je rezultat normalnog izražaja i aktivnosti kalpaina 3. Samo u jedne biopsije (B-2) uočen je smanjen izražaj i aktivnost kalpaina 3.

**Tablica 5. Prikaz rezultata enzimskog testa za 79 humanih biopsija. (A) Kontrolne biopsije (B) LGMD2A biopsije (C) Biopsije sa drugim neuromuskularnim oboljenjima (D) Nedijagnosticirane biopsije.**

**A**

Biopsija	Status	Miozin	Izražaj kalpaina 3	Aktivnost kalpaina 3
D-1	normalan	normalan	normalan	normalna
D-2	normalan	normalan	normalan	normalna
D-3	normalan	normalan	normalan	normalna
D-4	normalan	normalan	normalan	normalna
D-5	normalan	smnjanjen	normalan	normalna
D-10	DMD prenositeljica	normalan	normalan	normalna
D-11	DMD prenositeljica	normalan	normalan	normalna
D-12	DMD prenositeljica	normalan	normalan	normalna
M-9	DMD prenositeljica	normalan	normalan	normalna

**B**

Biopsija	Status	Miozin	Izražaj kalpaina 3	Aktivnost kalpaina 3
G-10037	c.[2362_2363delAGinsTCATCT] + [664G>A]	negativan	negativan	negativna
G-10081	c.[2362_2363delAGinsTCATCT] + [2362_2363delAGinsTCATCT]	negativan	negativan	negativna
G-12807	c.[2362_2363delAGinsTCATCT] + [2362_2363delAGinsTCATCT]	negativan	negativan	negativna
D-31	c.[550delA] + [550delA]	smnjanjen	negativan	negativna
G-T2	c.[550delA] + [550delA]	negativan	negativan	negativna
D-27	p.[Phe200_Leu204del] + [?]	negativan	negativan	negativna
G-1	c.[946-1G>A] + [1466G>A]	smnjanjen	normalan	normalna
G-3	p.[Ser86Phe] + [Ser86Phe]	smnjanjen	smnjanjen	smnjanjena
D-19	c.[550delA] + [550delA]	normalan	negativan	negativna
D-20	c.[550delA] + [2092C>T]	normalan	negativan	negativna
D-22	c.[616delG] + [1339T>C]	normalan	negativan	negativna
D-26	c.[1992+1G>T] + [2036_2037delCA]	normalan	negativan	negativna

B-13	c.[550delA] + [?]	normalan	negativan	negativna
G-4	c.[717delT] + [c.717delT]	normalan	negativan	negativna
G-5	c.[717delT] + [c.717delT]	normalan	negativan	negativna
G-6	c.[2362_2363delAGinsTCATCT] + [2362_2363delAGinsTCATCT]	normalan	negativan	negativna
B-23	c.[550delA] + [1524G>A]	normalan	negativan	negativna
G-08188	c.[2362_2363delAGinsTCATCT] + [2362_2363delAGinsTCATCT]	normalan	negativan	negativna
D-28	c.[550delA] + [2288A>G]	normalan	negativan	negativna
D-29	p.[Gly445Arg] + [?]	normalan	negativan	negativna
D-30	p.[Phe200_Leu204del] + [?]	normalan	negativan	negativna
M-10	c.[883_884delGAinsCT; 887delA] + [2442G>A]	normalan	negativan	negativna
M-11	c.[535G>C] + [1746-20C>G]	normalan	negativan	negativna
G-T3	c.[550delA] + [550delA]	normalan	negativan	negativna
D-21	c.[550delA] + [550delA]	normalan	negativan	negativna
D-24	c.[550delA] + [1063C>T]	normalan	smanjen	smanjena
D-23	c.[550delA] + [865C>T]	normalan	<b>smanjen</b>	<b>negativna</b>
B-14	p.[Arg448Cys] + [Arg448Cys]	normalan	<b>smanjen</b>	<b>negativna</b>
B-15	p.[Arg437Gly] + [Arg437Gly]	normalan	<b>smanjen</b>	<b>negativna</b>
G-2	p.[Pro319Leu] + [Ser86Phe]	normalan	<b>smanjen</b>	<b>negativna</b>
G-7	c.[2230A>G] + [946-1G>A]	normalan	smanjen	smanjena
M-12	c.[1466G>A] + [1711delC]	normalan	normalan	normalna
D-25	c.[1099G>A] + [1322delG]	normalan	normalan	normalna
D-17	c.[550delA] + [1468C>T]	normalan	normalan	normalna
D-18	p.[Arg493Trp] + [Phe525Ser]	normalan	normalan	normalna
D-32	c.[550delA] + [1465C>T]	normalan	normalan	normalna
G-T1	p.[Ala702Val] + [Ala702Val]	normalan	normalan	normalna
B-17	c.[1192T>C] + [1524+1G>C]	/	normalan	normalna
B-19	p.[Arg355Trp] + [Glu647X]	/	normalan	normalna
B-16	p.[Arg355Trp] + [?]	/	normalan	normalna
B-20	p.[Gly445Arg] + [?]	/	normalan	normalna
B-22	p.[Arg440Gln] + [?]	/	normalan	normalna

### C

Biopsija	Status	Miozin	Izražaj kalpaina 3	Aktivnost kalpaina 3
D-6	FSHD	normalan	normalan	normalna
D-7	FSHD	normalan	normalan	normalna
D-8	FSHD	normalan	normalan	normalna
D-9	FSHD	normalan	normalan	normalna
B-12	kongenitalna miopatija	/	normalan	normalna
D-13	LGMD2I	normalan	normalan	normalna
D-14	LGMD2B	normalan	normalan	normalna
D-15	LGMD2B	normalan	normalan	smanjena
D-16	LGMD2B	normalan	smanjen	smanjena

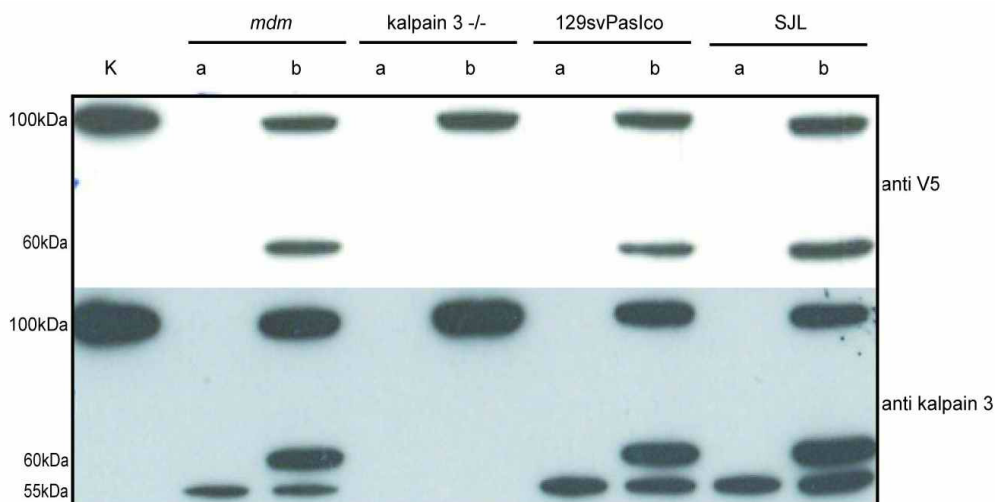
### D

Biopsija	Status	Miozin	Izražaj kalpaina 3	Aktivnost kalpaina 3
M-2	LGMD fenotip	smanjen	smanjen	smanjena
M-1	LGMD fenotip	smanjen	negativan	negativna
B-2	mišićna slabost	normalan	smanjen	smanjena
B-9	mišićna slabost	normalan	normalan	normalna

M-3	poliomiozitis	normalan	normalan	normalna
M-4	poliomiozitis	normalan	normalan	normalna
M-5	LGMD fenotip	normalan	normalan	normalna
M-6	LGMD fenotip	normalan	normalan	normalna
M-7	LGMD fenotip	normalan	normalan	normalna
M-8	LGMD fenotip	normalan	normalan	normalna
B-1	visoke CK vrijednosti	/	normalan	normalna
B-4	visoke CK vrijednosti	/	normalan	normalna
B-7	visoke CK vrijednosti	/	normalan	normalna
B-3	mišićna slabost	/	normalan	normalna
B-5	mišićna slabost	/	normalan	normalna
B-6	mišićna slabost	/	normalan	normalna
B-8	mišićna slabost	/	normalan	normalna
B-11	mišićna slabost	/	normalan	normalna
B-10	mišićna slabost	normalan	normalan	normalna

#### 4.1.4. Analiza različitih mišjih modela enzimskim testom

Enzimski test korišten je i za analizu aktivnosti kalpaina 3 u LGMD2A mišjeg modela, kao i u SJL i *mdm* miševa. Kao što je prikazano na slici 11. normalna enzimaska aktivnost postojala je u svih analiziranih miševa, osim, kao što se i očekivalo, u LGMD2A mišjem modelu (kalpain 3 *-/-*).



**Slika 11. Analiza izražaja (anti kalpain 3 protutijelo) i enzimске aktivnosti (anti V5 protutijelo) kalpaina 3 u različitim mišjih modela.** Svaki analizirani mišić bio je inkubiran bez (stupac a) i sa supstratom (stupac b). Protein od 100kDa odgovara nepocijepanom supstratu, protein od 60kDa produktu cijepanja supstrata kalpainom 3, a protein od 55kDa autoliziranoj, aktivnoj formi kalpaina 3 iz mišića. Normalna enzimaska aktivnost kalpaina 3 postojala je u kontroli 129SvPaslco, te *mdm* i SJL mišu. Nepostojanje izražaja, kao i enzimске aktivnosti kalpaina 3 uočeno je u LGMD2A modelu (kalpain 3 *-/-*). K odgovara uzorku supstrata bez mišića.

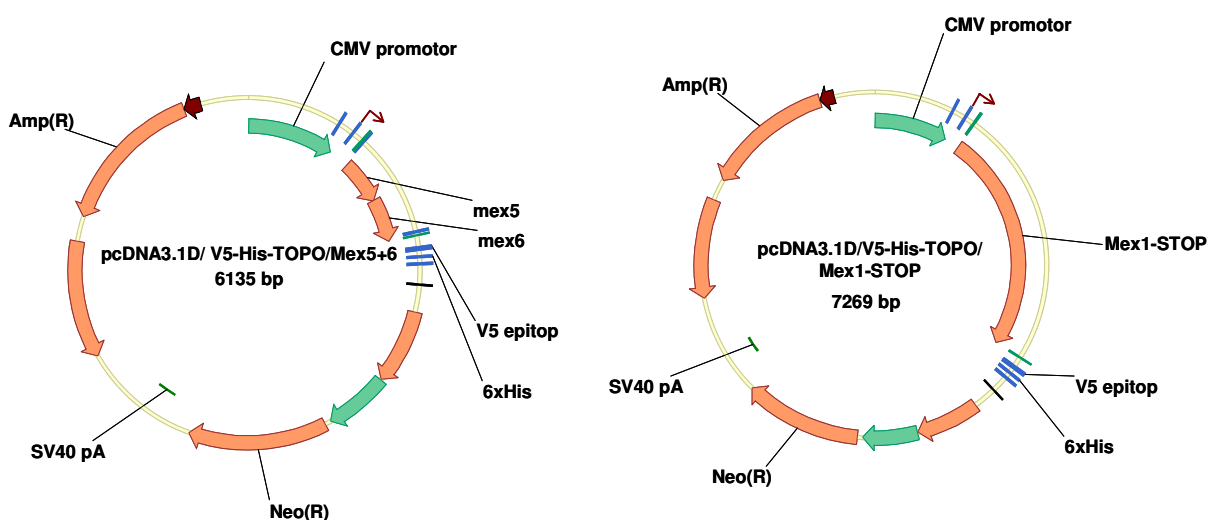
## 4.2. ODNOS KALPAINA 3 I TITINA U NASTANKU POJASNE M. DISTROFIJE TIP 2A (LGMD2A)

Istraživanje usmjereno prema boljem razumijevanju odnosa kalpaina 3 i titina u nastanku LGMD2A uključivalo je otkrivanje mjesta u C-terminalnom dijelu titina koja su podložna cijepanju, uz već poznatu IS7 regiju. Za bolje razumijevanje dobivenih rezultata u *in vitro* uvjetima istraživanje je prošireno na LGMD2A mišje modele i čovjeka, u kojima se nastojalo potvrditi postojanje cijepanja titina kalpainom 3, kao i njihova važnost u nastanku pojasne mišićne distrofije tip 2A.

### 4.2.1. Cijepanje C-terminalnog dijela titina kalpainom 3

#### 4.2.1.1. Cijepanje C-terminalnog dijela titina kalpainom 3 u *in vitro* uvjetima

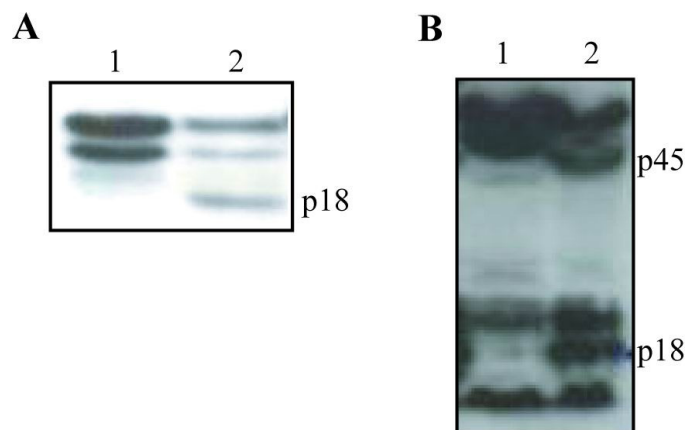
Slijed C-terminalnog dijela titina koji sadrži (a) IS7 i m10 regiju (Mex5+Mex6), odnosno (b) područje od m3 regije do STOP kodona (Mex1-STOP) kloniran je u pcDNA3.1.D-V5-His-TOPO plazmid (slika 12). Spomenuti plazmidi izraženi su u NIH3T3 stanicama u prisustvu pSRD/kalpain 3, odnosno pSRD/kalpain3<sup>C129S</sup> plazmida, koji su bili već prisutni u laboratoriju. Transfecirane stanice su u nastavku lizirane, a proteini su razdvojeni poliakrilamidnom gel elektroforezom, preneseni na membranu, te inkubirani sa protutijelom usmjerenim protiv V5 peptida.



Slika 12. Shematski prikaz plazmida. pcDNA3.1D/V5-His-TOPO sa IS7 i m10 regijom titina (Mex5+6), odnosno sa titinom od m3 regije do STOP kodona (Mex1-STOP).



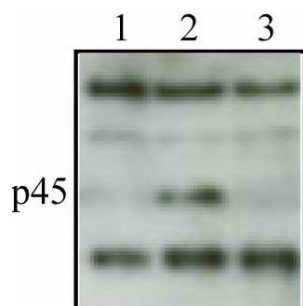
Kraći slijed titina (Mex5-6) bio je pocijepan u prisustvu kalpaina 3, pri čemu je vidljiva proteinska vrpca od 18 kDa. U dužem slijedu titina (Mex1-6) osim fragmenta od 18kDa, uočeno je i prisustvo dodatne proteinske vrpce od 45kDa (slika 13).



**Slika 13. Cijepanje C-terminalnog dijela titina kalpainom 3 (anti V5 protutijelo).** Stupac 1 odgovara lizatu stanica transfeciranih sa titinom i inaktivnom formom kalpaina 3 (kalpain 3<sup>C129S</sup>), a stupac 2 titinu i aktivnom kalpainu 3. (A) Titin (IS7 i m10 regija) pocijepan je kalpainom 3, pri čemu je uočljiv produkt cijepanja od 18kDa. (B) Kalpain 3 cijepa titin (od m3 regije do STOP kodona) pri čemu nastaju proteinske vrpce od 18 i 45 kDa.

#### 4.2.1.2. Cijepanje titina kalpainom 3 u mišjem modelu

Citoskeletni mišićni proteini kontrolnog miša, kao i 2 različita LGMD2A modela analizirani su poliakrilamidnom gel elektroforezom, preneseni na membranu, te inkubirani sa protutijelima usmjerenim prema m10 regiji titina (m10-1). Kao što je pokazano na slici 14. u normalnog je miša uočeno prisustvo proteinske vrpce od 45kDa, dok je ista bila odsutna u oba analizirana LGMD2A mišja modela.

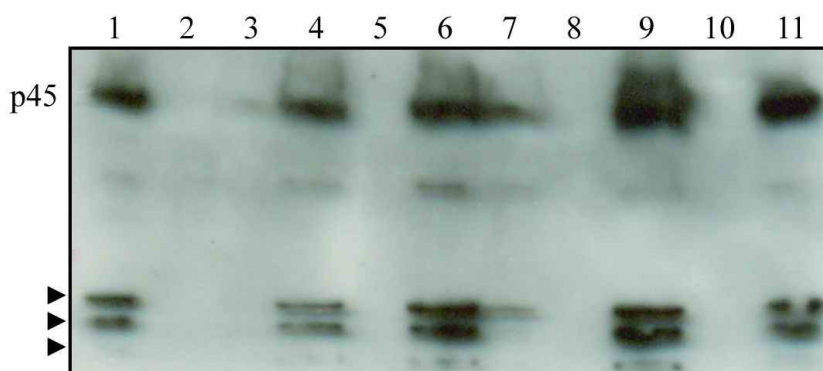


**Slika 14. Cijepanje titina kalpainom 3 u mišjim modelima.** Stupac 2 odgovara frakciji citoskeletnih proteina kontrolnog miša (129SvPasIco), a stupci 1 i 3 LGMD 2A mišjim modelima. U kontrolnog miša uočljivo je prisustvo proteinske vrpce od 45kDa (p45).

#### 4.2.1.3. Cijepanje titina kalpainom 3 u humanim biopsijama

Prisutnost proteinske vrpce od 45kDa (p45) testirana je i u humanim biopsijama. Ukupno je testirano 10 biopsija: 5 LGMD2A, jedna LGMD2J, te 4 kontrolne biopsije koje potječu od 2 zdrave osobe, jedne DMD prenositeljice, te jednog FSHD bolesnika. Kao i kod miševa, citoskeletni proteini humanih mišića analizirani su poliakrilamidnom gel elektroforezom, preneseni na membranu, te inkubirani sa protutijelima usmjerenim protiv m10 regije titina (m10-1).

U sve 4 kontrolne biopsije uočena je prisutnost p45, kao i tri dodatna produkta cijepanja, veličine od 10 do 20 kDa. U 4 od 5 analiziranih LGMD2A biopsija, kao i u jedne LGMD2J biopsije uočen je nedostatak sva 4 produkta cijepanja. U jednoj preostaloj LGMD2A biopsiji (slika 15, stupac 7) uočena su samo 2 od 4 produkta cijepanja, a njihov je intenzitet bio znatno slabiji u odnosu na kontrolne uzorke.

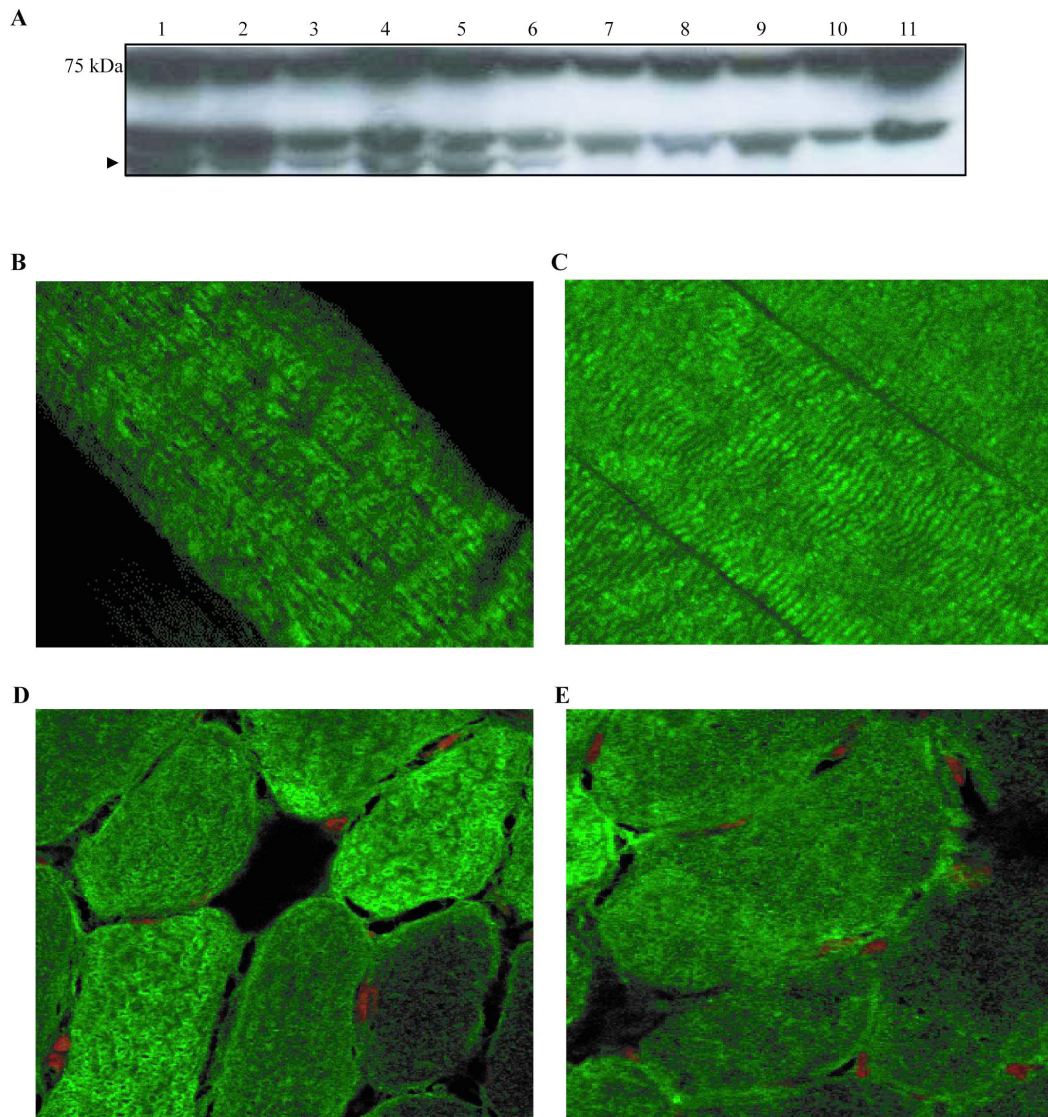


**Slika 15. Cijepanje titina kalpainom 3 u humanim biopsijama.** Proteinska vrpca od 45kDa, kao i 3 dodatna proteinska fragmenta označena crnim strelicama odgovaraju produktima cijepanja titina kalpainom 3. Stupci 1, 4, 6, 9 i 11 odgovaraju kontrolnim biopsijama. Stupci 2, 3, 7, 8 i 10 odgovaraju LGMD2A biopsijama, a stupac 5 LGMD2J biopsiji.

#### 4.2.2. Lokalizacija p45 proteinskog fragmenta u mišićnoj stanici

Unosom plazmida pcDNA3.1D/V5-His-TOPO/Mex1-6 u miševе promatrao se smještaj C-terminalnog dijela titina (LGMD2A miševi) i p45 proteinskog fragmenta koji nastaje cijepanjem C-terminalnog titina u kontrolnih miševa (slika 16A), a uslijed prisustva kalpaina 3. S obzirom da C-terminalni titin na svom C-terminalnom kraju sadrži V5 peptid, u analizi je korišteno protutijelo usmjereno protiv V5 peptida, kojim se omogućilo

razlikovanje unesenog od endogenog titina. Imunohistokemijska analiza uzdužnih rezova mišića pokazala je da je u kontrolnih miševa V5 signal difuzno razmješten u stanici (slika 16B), dok je u LGMD2A miševa isključivo u području sarkomere (slika 16C), poput endogenog titina. Bojanje poprečnih rezova sa Topro3 bojom pokazalo je da C-terminalni titin (nepocijepani ili p45 forma) ne ulazi u jezgru (slika 16D i E).



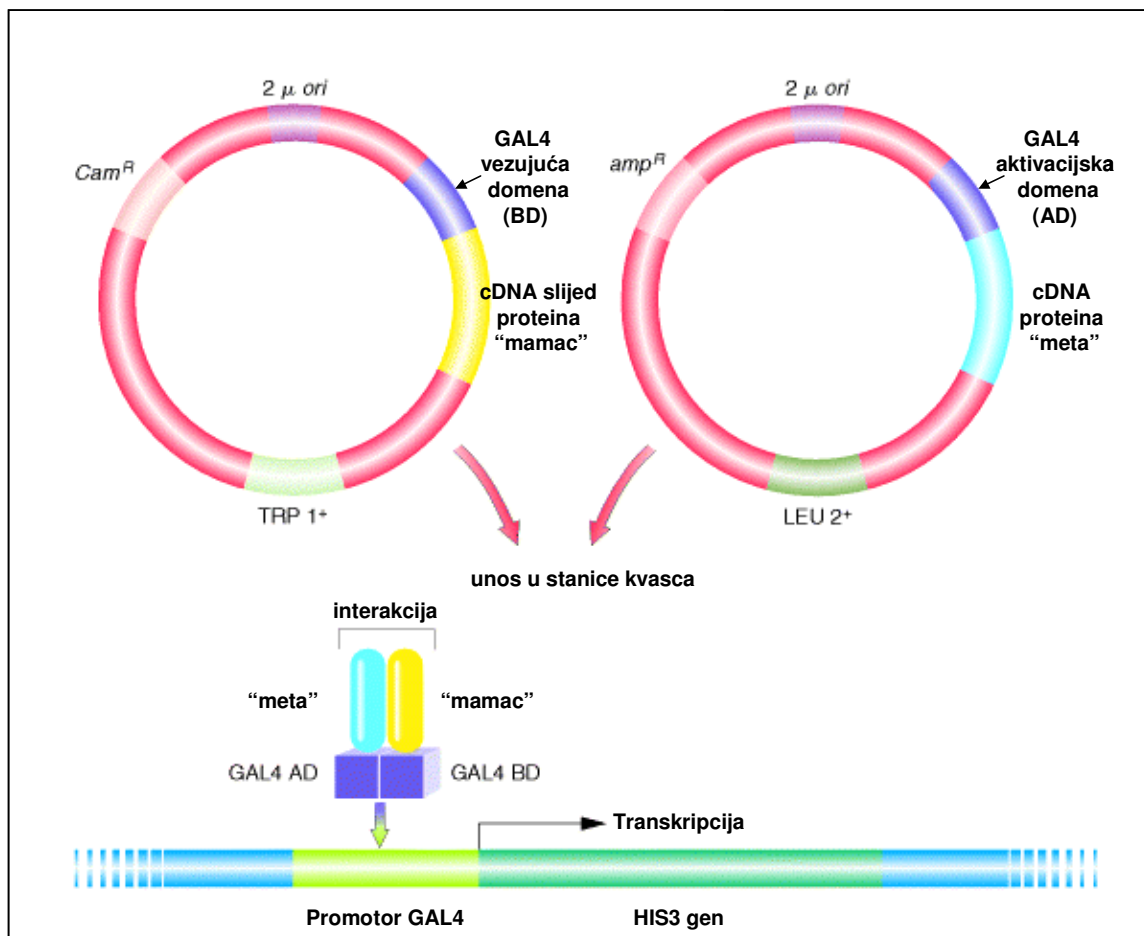
**Slika 16. Određivanje smještaja C-terminalnog titina (anti V5 protutijelo) unosom u miševe. (A)** Proteinska analiza mišića sa protutijelom usmjerenim protiv V5 peptida. Stupci 1-6 odgovaraju kontrolnim miševima, a stupci 7-11 LGMD2A miševima. Strela pokazuje p45, proteinski fragment cijepanja C-terminalnog titina kalpainom 3. **(B)** Difuzan smještaj p45 proteinskog fragmenta u kontrolnog miša. **(C)** Sarkomerni smještaj nepocijepanog C-terminalnog titina u LGMD2A miša. **(D)** Bojanje staničnih jezgri (crveno) i p45 proteina (zeleno) u kontrolnog miša. **(E)** Bojanje staničnih jezgri (crveno) i p45 proteina (zeleno) u LGMD2A miša.

### 4.3. ODNOS KALPAINA 3 I TITINA U NASTANKU POJASNE M. DISTROFIJE TIP 2J (LGMD 2J)

Ispitivanjem različitih karakteristika kalpaina 3 (interakcija sa titinom, proteolitička aktivnost, cijepanje C-terminalnog dijela titina) u prisustvu Mex6 mutacija, razjasnila se moguća uloga kalpaina 3 u nastanku LGMD2J.

#### 4.3.1. Utjecaj Mex6 mutacija na interakciju kalpaina 3 i titina

Sustav dvostrukog hibrida koji je korišten u doktorskoj disertaciji temelji se na korištenju transkripcijskog faktora GAL4. U stanice kvasca unose se 2 različita plazmida. Jedan plazmid sadržava cDNA slijed proteina “mamac” (pAS/kalpain 3) koji se nalazi u nastavku GAL 4 vezujuće domene. Drugi plazmid sadržava cDNA slijed proteina “meta” (pGAD/titin-normalan ili mutiran slijed) koji se nalazi u nastavku GAL 4 aktivacijske domene. Nakon izražaja spomenutih proteina u stanicama kvasca, te u slučaju interakcije između dva proteina doći će do približavanja GAL4 vezujuće i aktivacijske domene, te će



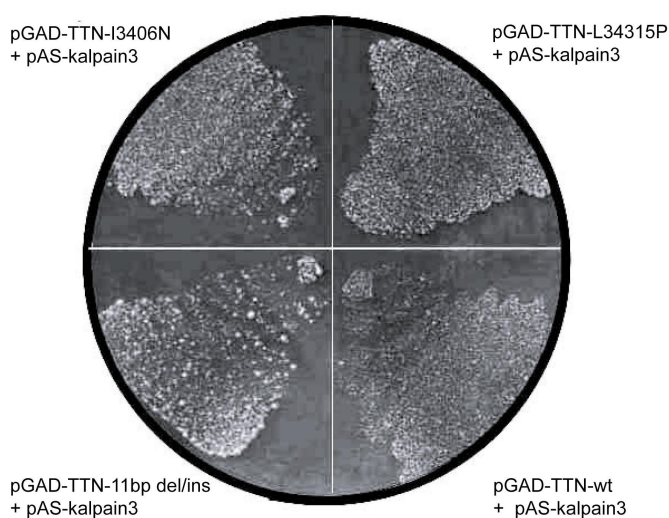
Slika 17. Shematski prikaz metode dvostrukog hibrida (modificirano prema 192)

biti omogućena transkripcija gena za sintezu histidina.

Zasađivanjem transformiranih kvasaca na selektivni medij bez histidina omogućen je rast samo onih stanica koje mogu sintetizirati histidin, što je ujedno znak interakcije između dva analizirana proteina (slika 17).

Interakcija između kalpaina 3 i titina, u području IS7 regije kodirane Mex5 egzonom potvrđena je metodom dvostrukog hibrida. Istovremeno, cilj pokusa bio je provjeriti da li je spomenuta interakcija onemogućena uslijed prisustva mutacija u Mex6 egzonu (I34306N, L34315P i 11bp del/ins).

Kao što je vidljivo na slici 18, kvašičeve kolonije dobivene su za sve testirane slijedove titina i kalpaina 3, na osnovu čega se može zaključiti da prisustvo mutacija u Mex6 egzonu ne mijenja interakciju titina sa kalpainom 3.

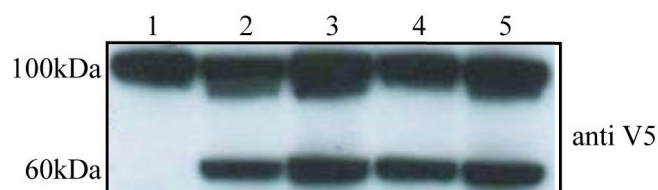


**Slika 18. Rezultat metode dvostrukog hibrida za interakciju kalpaina 3 i različitih slijedova Mex5+Mex6 titina.** Kvašičeve kolonije rasle su na histidin-, leucin-, triptofan- selektivnom mediju (-HLT) i dobivene su za sve korištene kombinacije.

#### 4.3.2. Utjecaj Mex6 mutacija na izražaj i aktivnost kalpaina 3

##### 4.3.2.1. Utjecaj Mex6 mutacija na izražaj i aktivnost kalpaina 3 u *in vitro* uvjetima

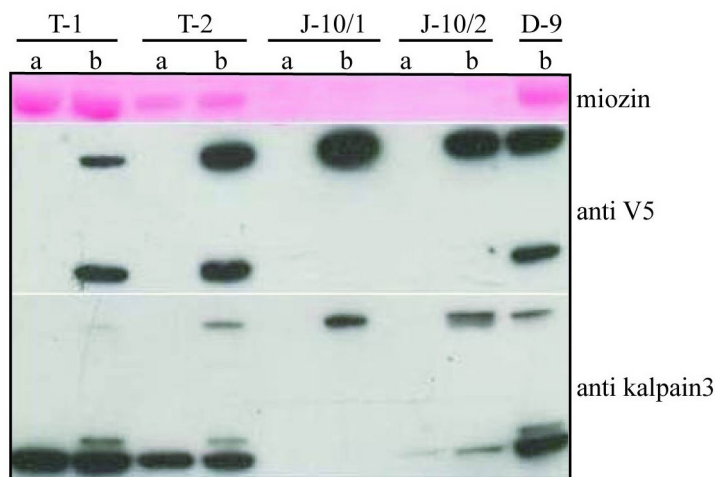
Aktivnost kalpaina 3 u *in vitro* uvjetima ispitivana je istovremenom transfekcijom i izražajem kalpaina 3, njegovog supstrata (kalpain 3<sup>C129S</sup>) i normalnog ili mutiranog slijeda titina (tri Mex6 mutacije). Prisutnost proteinske vrpce od 60 kDa (slika 19) pokazuje da prisutnost mutacija u Mex6 egzonu nije spriječila cijepanje supstrata (kalpain 3<sup>C129S</sup>) aktivnim kalpainom 3.



**Slika 19. Rezultat enzimske aktivnosti kalpaina 3 (anti V5 protutijela) u prisustvu Mex6 mutacija u *in vitro* uvjetima.** Aktivnost kalpaina 3 testirana je kao mogućnost cijepanja supstrata (kalpain 3<sup>C129S</sup>) u prisustvu normalnog slijeda titina (stupac 2), titina sa L34315P mutacijom (stupac 3), titina sa 11bp del/ins mutacijom (stupac 4) i titina sa I34306N mutacijom (stupac 5). Stupac 1 odgovara NIH3T3 staničnom lizatu nakon transfekcije i izražaja supstrata, kalpaina 3<sup>C129S</sup>. Proteinska vrpca od 100kDa odgovara kalpainu 3<sup>C129S</sup>, dok 60kDa odgovara produktu cijepanja supstrata kalpainom 3.

#### 4.3.2.2. Utjecaj Mex6 mutacija na izražaj i aktivnost kalpaina 3 u hum.biopsijama

Aktivnost kalpaina 3 ispitana je na humanim biopsijama koje potječu od 2 TMD i jednog LGMD2J bolesnika. Kao što je pokazano na slici 20. u oba je TMD mišića dobiven normalan izražaj, kao i normalna aktivnost kalpaina 3. U dva različita mišića (m.flexor carpi i dijafragma) LGMD2J bolesnika nije bilo moguće očitati rezultat enzimskog testa, a zbog gotovo potpunog nedostatka miozina (slika 20).

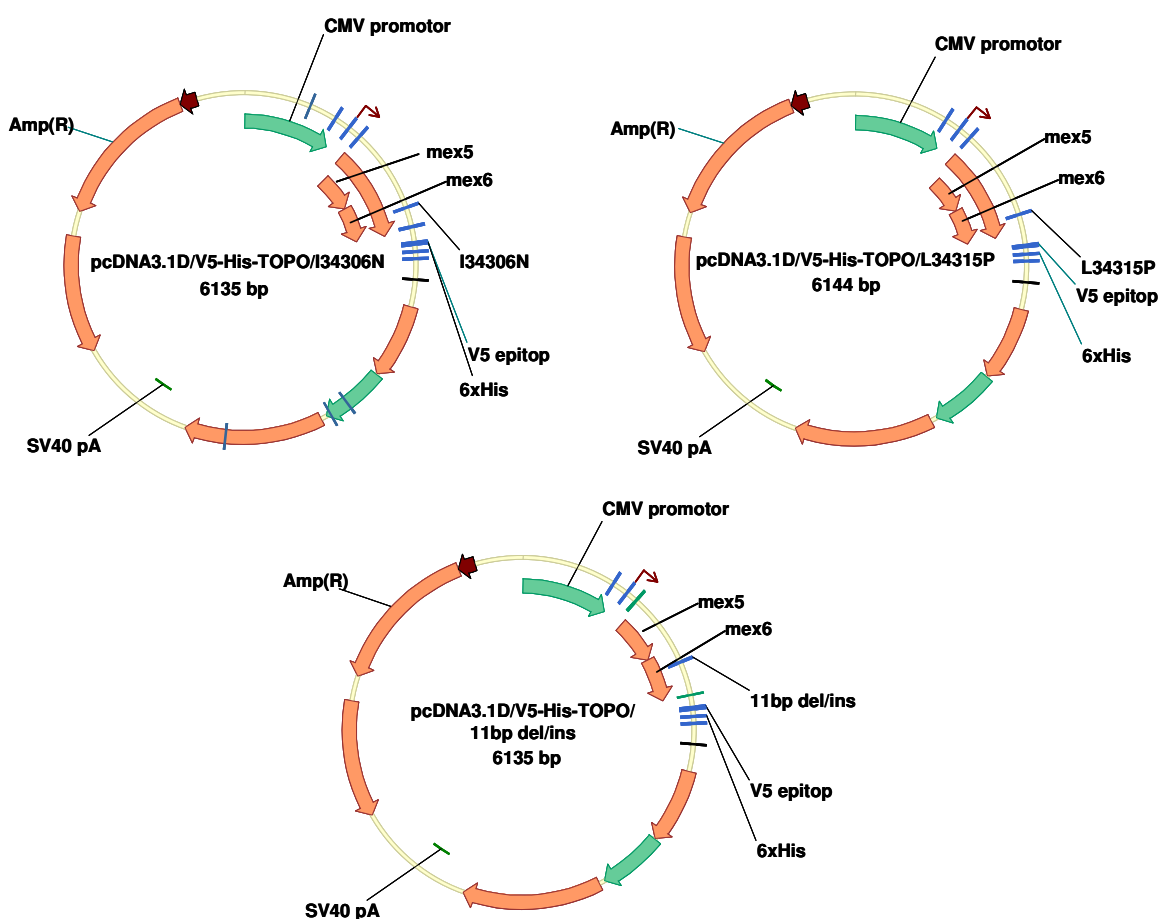


**Slika 20. Rezultat izražaja miozina (bojanje sa Ponceau Red otopinom), enzimske aktivnosti kalpaina 3 (anti V5 protutijela) i izražaja kalpaina 3 (anti kalpain 3 protutijela) za 5 humanih biopsija.** Svaki mišić bio je inkubiran bez (stupci a) i sa supstratom (stupci b). Proteinska vrpca od 100kDa odgovara supstratu, kalpainu 3<sup>C129S</sup>, 60kDa produktu cijepanja supstrata, dok je vrpca od 55kDa autolizirani i aktivirani kalpain 3 iz mišića. D-9 odgovara kontrolnom mišiću, dok su T1 i T2 dva TMD mišića. J-10/1 and J-10/2 su dva različita mišića iste LGMD2J biopsije.

### 4.3.3. Utjecaj Mex6 mutacija na cijepanje C-terminalnog dijela titina kalpainom 3

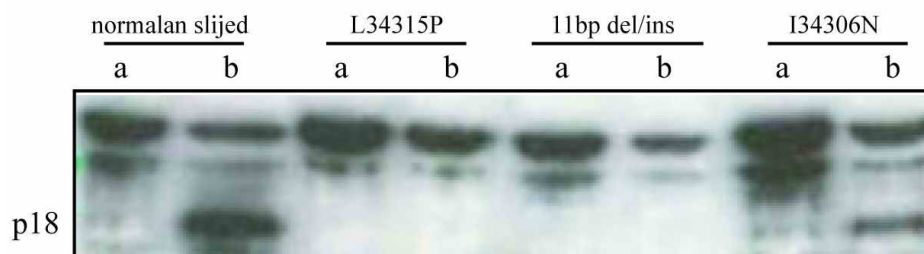
Za ispitivanje utjecaja prisustva Mex6 mutacija na cijepanje titina (IS7 regija) kalpainom 3, slijed IS7 i m10 regija titina, kodiranih Mex5 i Mex6 egzonom i koji sadrži tri prije spomenute Mex6 mutacije, kloniran je pcDNA3.1D/V5-His-TOPO plazmid (slika 21).

Spomenuti plazmidi potom su uneseni u NIH3T3 stanice u prisustvu kalpaina 3 ili njegove inaktivne forme (kalpain 3<sup>C129S</sup>). Transfecirane stanice su lizirane, a proteini su razdvojeni poliakrilamidnom gel elektroforezom, preneseni na membranu, te inkubirani sa protutijelom usmjerenim protiv V5 peptida. Kao što je prikazano na slici 22. normalni slijed titina je, kao što je već i pokazano, pocijepan pri čemu nastaje proteinski fragment od 18kDa. Isti način cijepanja karakteristika je i titina koji u svom slijedu nosi mutaciju I34306N. U preostale dvije mutacije spomenuti produkt cijepanja nije vidljiv.



Slika 21. Shematski prikaz plazmida pcDNA3.1D/V5-His-TOPO sa Mex6 mutacijama: I34306N, L34315P, 11bp del/ins.

S obzirom da je mutacija 11bp del/ins jedina do sada opisana mutacija koja uzrokuje LGMD2J, izostanak cijepanja titina kalpainom 3, a uslijed prisustva mutacije potvrđen je i u *in vivo* uvjetima (slika 15).



**Slika 22. Cijepanje titina kalpainom 3 u prisustvu Mex6 mutacija.** Različiti slijedovi titina bili su izraženi u NIH3T3 stanicama sa kalpainom 3 (stupci b) ili njegovom inaktivnom formom, kalpainom 3<sup>C129S</sup> (stupci a). p18 proteinska vrpca uočena je kod titina sa normalnim slijedom, odnosno onim sa I34306N mutacijom.

#### 4.4. ISPITIVANJE SUPSTRATA KALPAINA 3 U C-TERMINALNOM DIJELU TITINA

Ispitivanje supstrata kalpaina 3 izvođeno je u *in vitro* uvjetima analiziranjem proteina za koje se metodom dvostrukog hibrida pokazalo da ulaze u interakciju sa kalpainom 3 ili C-terminalnim dijelom titina. U istraživanje su bili uključeni proteini MURF obitelji, KY protein, podjedinica proteasoma PSMC3, teletonin i miosprin (CMYA5).

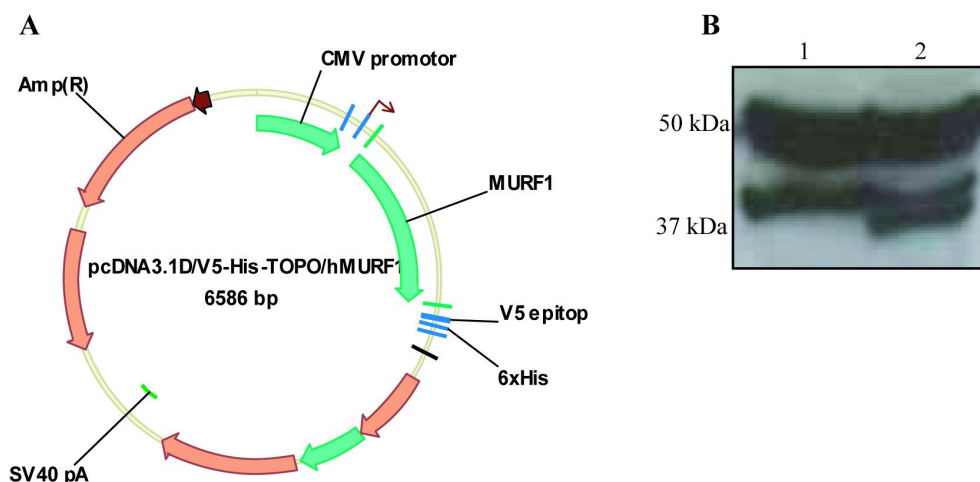
##### 4.4.1. Obitelj MURF proteina

###### 4.4.1.1. Analiza MURF1 proteina kao mogućeg supstrata kalpaina 3

Humani slijed komplementarne DNA MURF1 (AJ291713, gi: 18073355) unesen je u ekspresijski vektor pcDNA3.1D/V5-His-TOPO prema postupku opisanom u poglavlju «Materijali i metode».

Rezultirajući plazmid (slika 23A) potom je izražen u NIH3T3 stanicama, zajedno sa pTOM/kalpain 3 ili pTOM/kalpain 3<sup>C129S</sup> plazmidom. Stanični lizat transfeciranih stanica analiziran je poliakrilamidnom gel elektroforezom, prenesen na membranu, te inkubiran protutijelom usmjerenim protiv V5 peptida. Kao što je vidljivo na slici 23B u staničnom lizatu sa MURF1 proteinom i aktivnim kalpainom 3 uočava se postojanje proteinske vrpce od 37kDa koja je odsutna u lizatu sa MURF1 proteinom i inaktivnim kalpainom 3, a koja pokazuje da je MURF1 supstrat kalpaina 3.

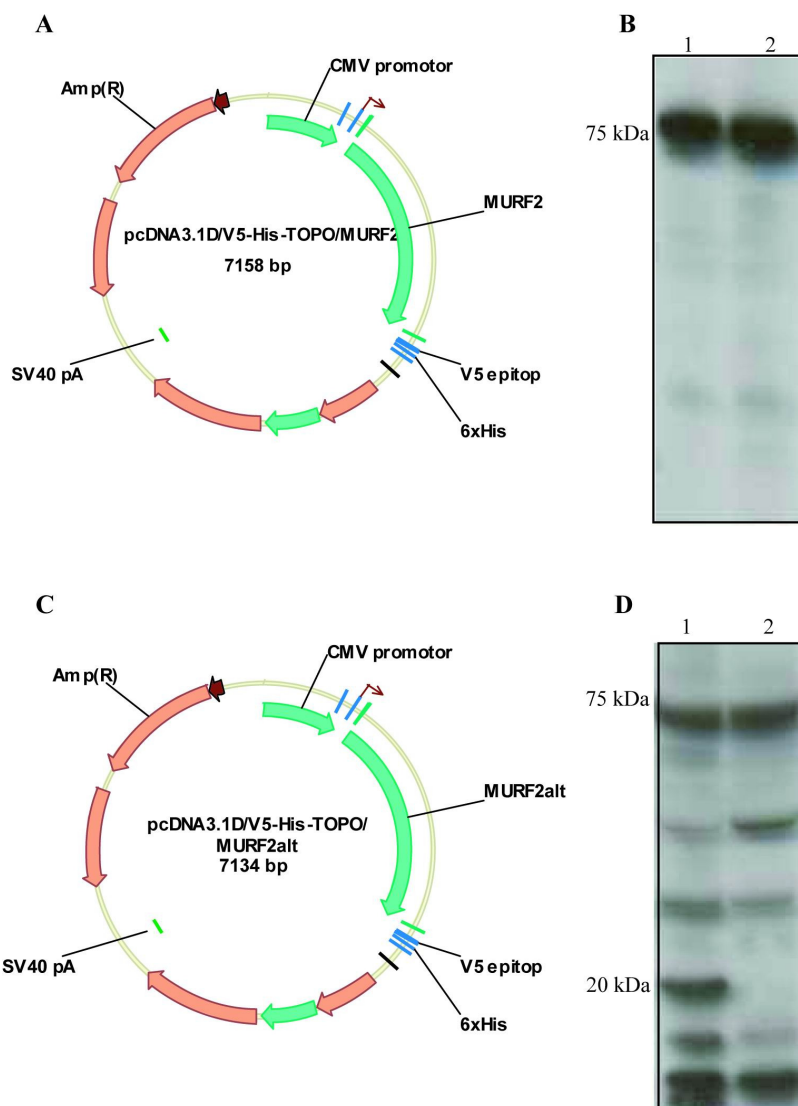




**Slika 23. (A) Shematski prikaz plazmida pcDNA3.1D/V5-His-TOPO/MURF1. (B) Analiza MURF1 proteina kao supstrata kalpaina 3.** Stupac 1 odgovara lizatu stanica sa MURF1 i inaktivnim kalpainom 3<sup>C129S</sup>, a stupac 2 lizatu sa MURF1 i kalpainom 3. U stupcu 2 vidljiva je proteinska vrpca od 37kDa, koja je produkt cijepanja MURF1 proteina kalpainom 3.

#### 4.4.1.2. Analiza MURF2 i MURF2alt proteina kao mogućih supstrata kalpaina 3

Lančanom reakcijom polimeraze umnoženi su, te potom klonirani u pcDNA3.1D/V5-His-TOPO plazmid: i) najzastupljenija izoforma MURF2 proteina u mišiću, MURF2-60kDa (AJ243489, gi: 14588847), odnosno ii) MURF2-alternativna izoforma 60kDa (AJ431704, gi: 24939888) koja se od MURF2-60kDa razlikuje u C-terminalnom dijelu. Analiza spomenutih proteina, na isti način kao MURF1 protein, pokazala je odsustvo bilo kakvih produkata cijepanja u slučaju MURF2 proteina. Za razliku od toga alternativna forma je supstrat kalpaina 3, što potvrđuje proteinska vrpca od 20kDa (slika 24).



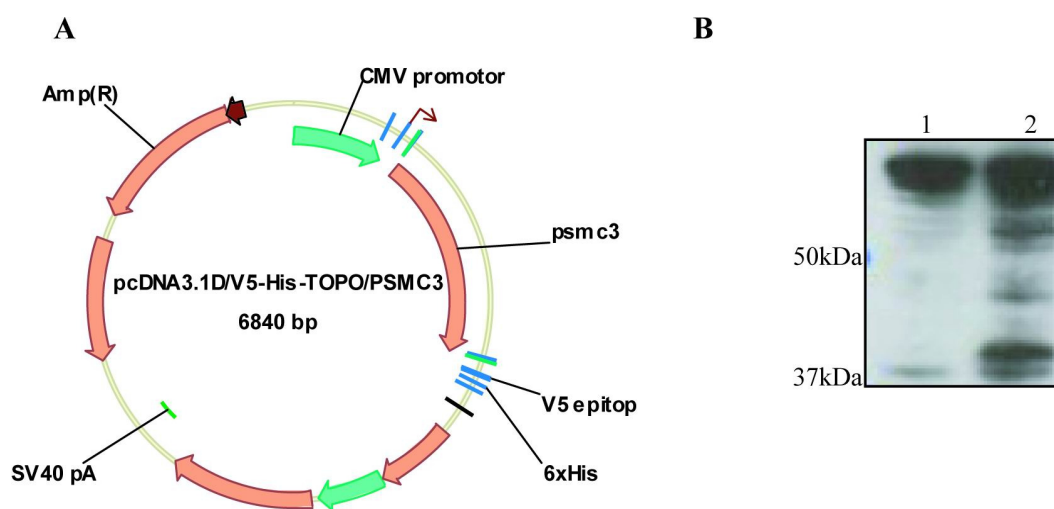
**Slika 24.** (A) Shematski prikaz plazmida pcDNA3.1D/V5-His-TOPO/MURF2. (B) Analiza MURF2 proteina kao supstrata kalpaina 3. (C) Shematski prikaz plazmida pcDNA3.1D/V5-His-TOPO/MURF2alt. (D) Analiza MURF2alt proteina kao supstrata kalpaina 3. Stupac 1 odgovara lizatu stanica sa MURF2 ili MURF2alt i kalpainom 3, a stupac 2 lizatu sa MURF2 ili MURF2alt i inaktivnim kalpainom 3<sup>C129S</sup>. U stupcu 2, slike D vidljiva je proteinska vrpca od 20kDa, koja je produkt cijepanja MURF2alt proteina kalpainom 3.

#### 4.4.2. Analiza PSMC3 proteina kao mogućeg supstrata kalpaina 3

Komercijalni plazmid pCMVSPORT6/PSMC3 (BC005783; gi: 13543236) korišten je za umnažanje humanog slijeda PSMC3, proteinske podjedinice proteasoma, te potom kloniran u pcDNA3.1D7V5-His-TOPO plazmid (slika 25A).

Analiza plazmida u NIH3T3 stanicama na način opisan za prethodno navedene proteine pokazala je prisustvo proteinske vrpce od 40kDa, prisutne isključivo u lizatu stanica sa

PSMC3 i aktivnim kalpainom 3. To ujedno potvrđuje PSMC3 kao supstrat kalpaina 3. (slika 25B).



Slika 25. (A) Shematski prikaz plazmida pcDNA3.1D/V5-His-TOPO/PSMC3. (B) Analiza PSMC3 proteina kao supstrata kalpaina 3. Stupac 1 odgovara lizatu stanica sa PSMC3 i i inaktivnim kalpainom 3<sup>C129S</sup>, a stupac 2 lizatu sa PSMC3 i kalpainom 3. U stupcu 2 vidljiva je proteinska vrpca od 40kDa, koja je produkt cijepanja PSMC3 proteina kalpainom 3.

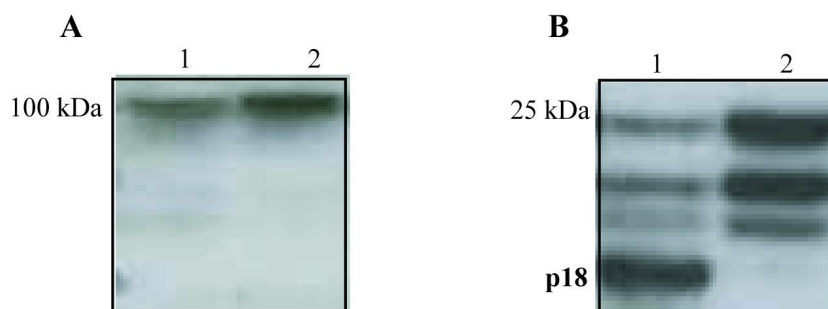
#### 4.4.3. KY protein

##### 4.4.3.1. Analiza KY kao mogućeg supstrata kalpaina 3

pCTGFP/mKY plazmid (G.Blanco, MRC Mammalian Genetics Unit, Harwell, Velika Britanija) koji sadrži mišji slijed KY proteina (AJ293727, gi: 48715087) korišten je za transfekciju NIH3T3 stanica zajedno sa pTOM/kalpain 3, odnosno pTOM/kalpain 3<sup>C129S</sup> plazmidom. Analiza lizata transfeciranih stanica, sa protutijelom usmjerenim protiv KY proteina, pokazala je odsustvo produkata cijepanja, tj. KY protein nije supstrat kalpaina 3 (slika 26A).

##### 4.4.3.2. Utjecaj KY proteina na aktivnost kalpaina 3

U NIH3T3 stanice unosili su se plazmidi pCTGFP/mKY, pcDNA3.1D/V5-His-TOPO/titinMex5-6, te pTOM/kalpain 3. Analiza stančnog lizata, sa protutijelom usmjerenim protiv V5 peptida, pokazala je da je unatoč prisustvu KY proteina kalpain 3 aktivan i cijepa C-terminalni dio titina (slika 26B).



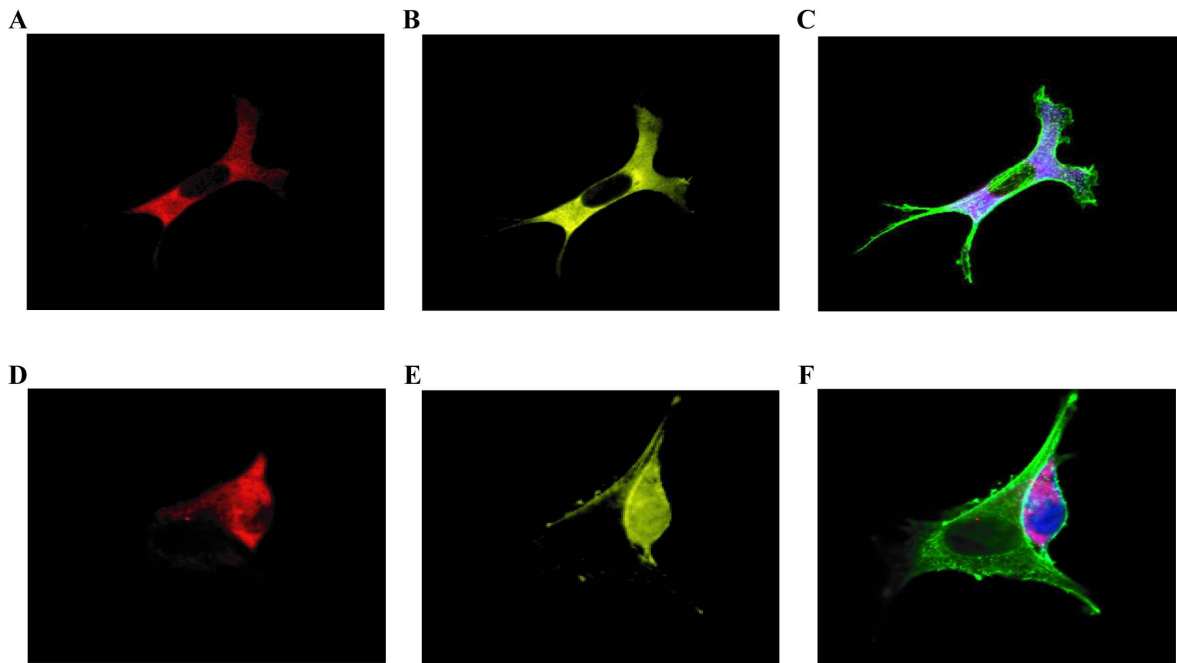
**Slika 26. (A) Analiza KY proteina kao supstrata kalpaina 3 (anti KY protutijelo).** Stupac 1 odgovara lizatu stanica sa KY proteinom i i inaktivnim kalpainom 3<sup>C129S</sup>, a stupac 2 lizatu sa KY proeinom i kalpainom 3. **(B) Utjecaj KY proteina na aktivnost kalpaina 3 (anti V5 protutijelo).** Stupac 1 odgovara lizatu stanica sa KY proteinom, titinom i kalpainom 3. Stupac 2 odgovara staničnom lizatu sa KY proteinom, titinom i inaktivnim kalpainom 3<sup>C129S</sup>. U stupcu 1 uočljivo je prisustvo produkta cijepanja titina kalpainom 3 (p18).

#### 4.4.3.3. Utjecaj KY proteina na morfologiju stanica sa izraženim kalpainom 3

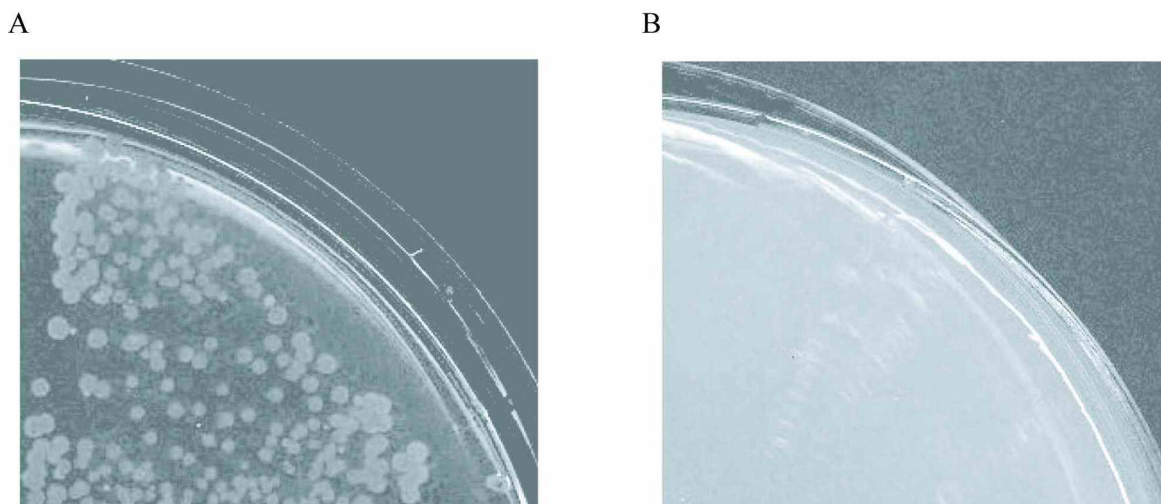
U NIH3T3 stanice uneseni su pCTGFP/mKY i pTOM/kalpain3, odnosno pCTGFP/mKY i pTOM/kalpain3<sup>C129S</sup> plazmid. Stanice su po završenoj transfekciji fiksirane, te podvrgnute imunohistokemijskoj analizi. Mikroskopski pregled preparata pokazao je da stanice sa izraženim kalpainom 3<sup>C129S</sup> zadržavaju tipičan izduženi, zvjezdasti oblik fibroblasta (slika 27A-C). Stanice fibroblasta sa izraženim aktivnim kalpainom 3 imaju uobičajeno okrugli oblik, koji je zadržan unatoč prisustvu KY proteina.

#### 4.4.3.4. Interakcija KY proteina sa C terminalnim dijelom titina

Interakcija između KY proteina (pGBKT7/KY) i C-terminalnog dijela titina (pGAD/titin-Mex5-6) analizirana je metodom dvostrukog hibrida. Nepostojanje interakcije među analiziranim proteinima i time nemogućnost sinteze histidina uzrokuje izostanak rasta kvašćevih kolonija na selektivnom mediju (slika 28B).



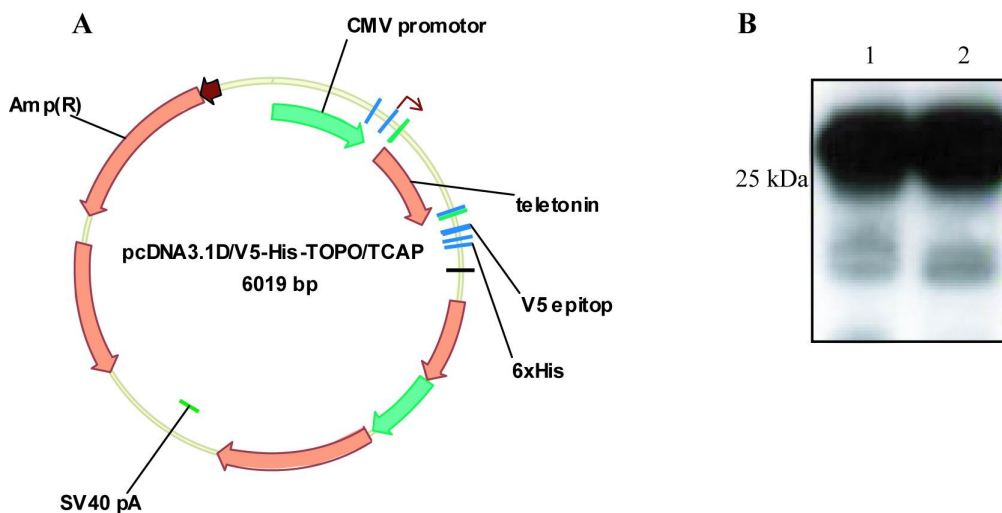
**Slika 27. Utjecaj KY proteina na morfologiju stanica sa izraženim kalpainom 3.** (A) Izražaj kalpaina 3<sup>C129S</sup> (anti kalpain 3 protutijelo) u citoplazmi stanice fibroblasta. (B) Izražaj KY proteina (anti KY protutijelo) u citoplazmi stanice fibroblasta. (C) Stanica fibroblasta, sa uobičajenim izduženim oblikom, na kojoj je istovremeno prikazan smještaj KY proteina, kalpaina 3<sup>C129S</sup> i aktina. (D) Izražaj aktivnog kalpaina 3 u stanici fibroblasta. Uslijed prisutnosti kalpaina 3 stanica fibroblasta poprima okrugli oblik. (E) Izražaj KY proteina u stanici fibroblasta sa izraženim kalpainom 3. (F) Prikaz dviju stanica fibroblasta. U stanici izduženog oblika prikazan je smještaj aktina. U drugoj, okrugloj stanici istovremeno je prikazan smještaj KY proteina, kalpaina 3 i aktina.



**Slika 28. Rezultat metode dvostrukog hibrida za KY i C-terminalni dio titina** (A) Rast kvašćevih kolonija na mediju sa manjkom leucina i triptofana. (B) Izostanak rasta kvašćevih kolonija na selektivnom mediju (medij sa manjkom histidina, leucina i triptofana).

#### 4.4.4. Analiza teletonina (TCAP) kao mogućeg supstrata kalpaina 3

Humani slijed teletonina (NM\_003673; gi: 19924299) kloniran je u pcDNA3.1D/V5-His-TOPO plazmid (slika 29A), te analiziran na prethodno opisan način. Kao što je vidljivo na slici 29B, teletonin nije supstrat kalpaina 3 jer se nije uočio niti jedan produkt cijepanja u lizatu NIH3T3 stanica sa teletoninom i aktivnim kalpainom 3.

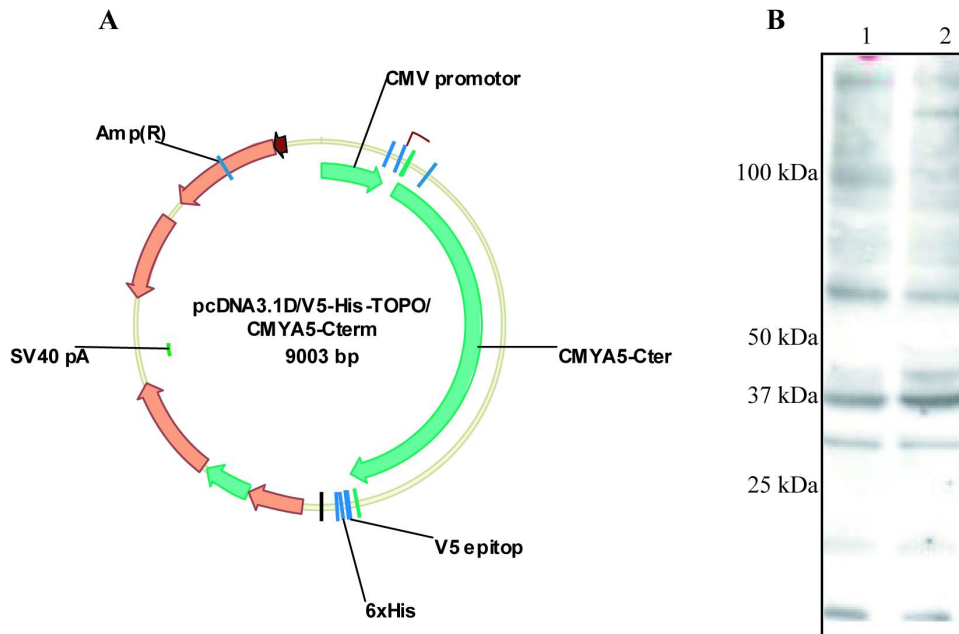


Slika 29. (A) Shematski prikaz plazmida pcDNA3.1D/V5-His-TOPO sa teletoninom. (B) Analiza teletonina kao supstrata kalpaina 3. Stupac 1 odgovara lizatu stanica sa teletoninom i kalpainom 3, a stupac 2 lizatu sa teletoninom i inaktivnim kalpainom 3<sup>C129S</sup>.

#### 4.4.5. Analiza miosprina (CMYA5) kao mogućeg supstrata kalpaina 3

S obzirom da je veličina komplementarne DNA miosprina (CMYA5; NM\_153610; gi: 62241002) 12 kb, u pcDNA3.1D/V5-His-TOPO plazmid unesen je samo C-terminalni dio miosprina (3.5 kb) koji sadržava BBox', BBC, FN3 i SPRY domene.

Plazmid pcDNA3.1D/V5-His-TOPO/CMYA5-Cterm (slika 30A) izražen je u NIH3T3 stanicama, te analiziran na način opisan za prethodno navedene proteine. Na slici 30B nisu vidljivi proteinski fragmenti koji bi upućivali na zaključak da je miosprin supstrat kalpaina 3. Takav rezultat nije bilo moguće potvrditi jer u svakom slijedećem pokusu nije bila postignuta dovoljna izraženost miosprina.



**Slika 30. (A) Shematski prikaz plazmida pcDNA3.1D/V5-His-TOPO sa C-terminalnim dijelom miosprina. (B) Analiza C-terminalnog dijela miosprina kao supstrata kalpaina 3. Stupac 1 odgovara lizatu stanica sa miosprinom i kalpainom 3, a stupac 2 lizatu sa miosprinom i inaktivnim kalpainom 3<sup>C129S</sup>.**

## 5.1. ENZIMSKI TEST ZA ODREĐIVANJE AKTIVNOSTI KALPAINA 3

Pojasna mišićna distrofija tip 2A (LGMD2A) se poput drugih pojasnih distrofija odlikuje varijabilnošću kliničke slike. Stoga je klinički postavljenu dijagnozu LGMD2A potrebno potvrditi molekularnom analizom odgovornog gena (CAPN3), odnosno proteina (kalpain 3). Proteinska analiza kalpaina 3 relativno je jednostavna i brza, ali nije u potpunosti osjetljiva, s obzirom da je opisano nekoliko CAPN3 mutacija koje pokazuju normalan izražaj kalpaina 3. Do danas je takav rezultat opisan u 7 mutacija «missense» tipa: p.Thr184Met i p.Gly222Arg (193), p.Arg489Gln, p.Arg490Gln i p.Arg490Trp (194), te p.Gly496Arg i p.Ser606Leu (195). Proteinsku analizu nadalje komplicira mogućnost lažno pozitivnih rezultata, tj. sekundarno smanjenje izražaja kalpaina 3 u pacijenata sa pojasnim mišićnim distrofijama tip 2B (148), tip 2J (149) i tip 2I (196). Analiza CAPN3 gena pouzdaniji je dijagnostički pristup od proteinske analize. No većina CAPN3 mutacija su privatne mutacije i samo se pojedine javljaju sa većom učestalošću. To ujedno znači da otkrivanje CAPN3 mutacija podrazumijeva, ukoliko spektar mutacija u nekoj populaciji nije poznat, analizu sve 24 kodirajuće jedinice CAPN3 gena, što ovaj pristup čini kompliciranim, skupim i neadekvatnim za rutinsku praksu. U cilju poboljšanja LGMD2A dijagnostike, ali i boljeg i lakšeg istraživanja funkcije kalpaina 3 i njegovih drugih karakteristika, dio disertacije bio je usmjeren prema razvitku enzimskog testa za određivanje aktivnosti kalpaina 3. Enzimski test, čiji je princip opisan u poglavlju «Rezultati», istovremeno analizira izražaj kalpaina 3, kao i njegovu autolitičku i proteolitičku aktivnost usmjerenu prema supstratu, inaktivnom kalpainu 3 (kalpain 3<sup>C129S</sup>).

Mogućnost primjene optimiziranog enzimskog testa ispitana je na 79 humanih biopsija, odnosno 3 različita mišja modela. Analiza humanih biopsija (kontrolnih, LGMD2A, ne-LGMD2A i nedijagnosticiranih) provedena je kao slijepi pokus, u kojem su se rezultati aktivnosti kalpaina 3 uspoređivali tek nakon završenog testa sa prije poznatim rezultatima analize CAPN3 gena i/ili kalpaina 3. Nakon provjere kvalitete mišića ukupno je analizirano 34 uzoraka mišića bolesnika sa LGMD2A, odnosno 9 uzoraka mišića zdravih osoba (kontrolne biopsije). Dok su u kontrolnih biopsija sve karakteristike kalpaina 3 bile, prema očekivanju normalne, u 23 LGMD2A biopsije pronađena je smanjena ili potpuno izostala aktivnost kalpaina 3. Rezultati dobiveni za LGMD2A biopsije gotovo su u potpunosti odgovarali prethodno dobivenim rezultatima klasične proteinske analize kalpaina 3. Ipak, u 4 je mišića (D-23, B-14, B-15 i G-2) pokazana veća osjetljivost



enzimskog testa, s obzirom da je klasičnom proteinskom analizom dobiven smanjen izražaj kalpaina 3, a ezimskim testom potpuni gubitak proteolitičke aktivnosti. Veća osjetljivost enzimskog testa pokazana je i tijekom njegove optimzacije, gdje je preinkubacija mišića od 120 minuta na 37°C rezultirala potpunim gubitkom enzimske aktivnosti uz zadržan normalan izražaj kalpaina 3. U preostalih 11/34 LGMD2A biopsija, što odgovara nešto više od 30% analiziranih LGMD2A biopsija, enzimski test je pokazao normalan izražaj i aktivnost kalpaina 3. To je malo veći postotak od već objavljenog istraživanja po kojem postotak LGMD2A biopsija sa normalno izraženim kalpainom 3 iznosi 20% (194). Zadržavanje ili gubitak enzimske aktivnosti kalpaina 3 u LGMD2A biopsija sa različitim CAPN3 mutacijama u popriličnom je skladu sa već objavljenim istraživanjem korelacije genotipa i fenotipa u LGMD2A bolesnika (86). Prema tom istraživanju, ali i enzimskom testu mutacije «nonsense» ili «frameshift» tipa rezultiraju potpunim gubitkom izražaja, pa time i aktivnosti kalpaina 3, što se najčešće očituje i kao teža klinička slika. Iako je uvriježeno pravilo da se mutacije «missense» tipa povezuju sa blažom kliničkom slikom, ipak se smatra da je njihov učinak na izražaj kalpaina 3 i time kliničku sliku nepredvidiv. Enzimski test potvrđuje te činjenice, pa tako neke od analiziranih «missense» mutacija (p.Arg437Gly (c.1309C>T), p.Arg448Cys (c.1342C>G)) uzrokuju potpuni gubitak izražaja i aktivnosti kalpaina 3, dok druge (p.Gly367Ser (c.1099G>A), p.Trp398Arg (c.1192T>C), p.Arg355Trp (c.1063C>T), p.Arg489Gln (1466G>A), p.Arg489Trp (c.1465C>T), p.Arg490Trp (c.1468C>T)) nemaju utjecaja na njegovo proteolitičko djelovanje, barem prema kalpainu 3<sup>C129S</sup>. Ovo je ujedno prvi puta da se za ovdje nabrojene “missense” mutacije pokazala normalna aktivnost kalpaina 3. Izuzetak je mutacija p.Arg490Trp (c.1468C>T) za koju je već pokazan normalan izražaj kalpaina 3 (194), ali smanjena mogućnost autolize, što je i potvrđeno enzimskim testom. Takav rezultat ujedno upućuje na zaključak da nemogućnost odvijanja normalne autolize ne sprječava proteolitičko djelovanje. Objašnjenje dobivenim rezultatima za «missense» mutacije još nije poznato, a nije ni vidljiva eventualna korelacija između položaja mutacije u genu i utjecaja na aktivnost kalpaina 3. Ipak, na osnovu dobivenih rezultata može se zaključiti da bi određivanje aktivnosti kalpaina 3 dalo bolju procjenu težine i progresije kliničke slike nego jednostavna procjena tih faktora na osnovu tipa mutacije. Za potvrdu ove pretpostavke potrebna je analiza daleko većeg broja biopsija. Istovremeno, vrlo je važno napomenuti da rezultati enzimskog testa pokazuju da LGMD2A može nastati ne samo zbog gubitka proteolitičke aktivnosti kalpaina 3, već i zbog gubitka nekih drugih svojstava

kalpaina 3 poput nemogućnosti prepoznavanja *in vivo* supstrata ili nenormalne lokalizacije u stanici.

S izuzetkom dva uzorka u svih ostalih ne-LGMD2A biopsija (FSHD, LGMD2B, LGMD2I i CMD) dobivena je normalna aktivnost kalpaina 3, zajedno s njegovim normalnim izražajem. Obje biopsije u kojih je pronađeno smanjenje aktivnosti kalpaina 3 odgovarale su bolesnicima sa LGMD2B, od kojih je jedan složeni heterozigot (c. [401C>T] + [c.5022delT]), a drugi homozigot sa delecijom u egzonu 29 (c.3152delG). U prvoj biopsiji aktivnost kalpaina 3 bila je očekivano smanjena s obzirom da je takav bio i njegov izražaj. Ovakav rezultat nije neuobičajen s obzirom da već postoji nekoliko opisanih slučajeva LGMD2B bolesnika sa smanjenim izražajem kalpaina 3 (148, 197). Smanjenje kalpaina 3 u LGMD2B bolesnika moglo bi se objasniti postojanjem interakcije između kalpaina 3 i disferlina (150), odnosno mogućnosti da spomenute DYSF mutacije obuhvaćaju područje disferlina neophodno za interakciju sa kalpainom 3. Ipak, utemeljenost ove hipoteze zahtijeva poznavanje točnog mjesta interakcije. U LGMD2B biopsiji sa c.3152delG mutacijom uočena je smanjena aktivnost kalpaina 3 unatoč njegovom normalnom izražaju. Takav rezultat govori još jednom u prilog veće osjetljivosti enzimskog testa u odnosu na klasičnu proteinsku analizu, ali ujedno pokazuje da bi promjene u svojstvima kalpaina 3 mogle biti puno češće u LGMD2B bolesnika nego se dosad mislilo. U cilju boljeg razumijevanja složenog odnosa između kalpaina 3 i disferlina bilo bi potrebno analizirati više LGMD2B biopsija, te vidjeti da li su spomenute promjene aktivnosti kalpaina 3 povezane s pojavom LGMD2B fenotipa.

Nedijagnosticirane biopsije uključivale su pacijente sa hiperCKemijom, polimiozitisom, LGMD fenotipom ili mišićnom slabošću, te je u većine njih već bila napravljena analiza više različitih gena uključenih u nastanak raznih mišićnih distrofija, no bez pozitivnog rezultata. Jedna od testiranih biopsija (B-2) pokazala je smanjen izražaj i aktivnost kalpaina 3, dok su u svih ostalih dobiveni normalni rezultati za kalpain 3. U spomenute biopsije B-2 napravljena je analiza cijelog CAPN3 gena, no nije pronađena niti jedna mutacija. Osim toga, klinička slika nije odgovarala simptomima LGMD2A, pa je vjerojatnije da spomenuta biopsija odgovara jednoj od onih distrofija koje pokazuju sekundarno smanjenje izražaja kalpaina 3: LGMD2B, LGMD2I ili LGMD2J.

S obzirom da se primjena enzimskog testa na humanim biopsijama pokazala uspješnom, analizirano je i nekoliko različitih mišjih modela: kontrolni 129SvPasIco, LGMD2A mišji

model, SJL i *mdm* miš. Kontrolni miš pokazao je normalan izražaj i aktivnost kalpaina 3, dok je, prema očekivanju, u LGMD2A miša dobiven negativan izražaj, a time i negativna aktivnost kalpaina 3. SJL miš je LGMD2B mišji model za kojeg je bilo interesantno provjeriti svojstva kalpaina 3, a s obzirom na rezultate dobivene za LGMD2B biopsije. Za SJL miša je već pokazano da izražaj kalpaina 3 nije smanjen (198) što je, uz normalnu aktivnost, potvrđeno i enzimskim testom. To upućuje na zaključak da delecija od 171bp u genu za disferlin SJL miša, uz zadržani okvir čitanja ne sadrži mjesto interakcije disferlina sa kalpainom 3. Kao što je već spomenuto u uvodnom dijelu, sekundarno smanjenje kalpaina 3 karakteristika je i *mdm* miša, prirodno postojećeg modela karakteriziranog mišićnom distrofijom s miozitisom i delecijom 83 aminokiseline u N2-A regiji titina (199). Spomenuta delecija uklanja 21 od 88 aminokiselina veznog mjesta za kalpain 3 onemogućujući interakciju titina i kalpaina 3 te njegovu destabilizaciju. Unatoč tome proteolitička aktivnost, analizirana enzimskim testom, bila je normalna, upućujući na zaključak da *mdm* mutacija nema utjecaja na autolizu ili aktivnost kalpaina 3.

Enzimski test predstavlja jednostavnu i brzu metodu određivanja izražaja i aktivnosti kalpaina 3. Korištenjem testa pokazano je da 30% LGMD2A biopsija ima normalno aktivan kalpain 3, odnosno da bi LGMD2B pacijenti sa sekundarnim promjenama u kalpainu 3 mogli biti brojniji nego se trenutno misli. Unatoč uočenim lažno pozitivnim, odnosno lažno negativnim rezultatima enzimski test poboljšava trenutno dostupne LGMD2A dijagnostičke metode kalpaina 3 jer ima veću osjetljivost, te istovremeno analizira 3 različita svojstva kalpaina 3. Štoviše, enzimski test ima moguću primjenu u bazičnom istraživanju kalpaina 3 kojim se nastoje što bolje razumijeti osobine i funkcije ove proteaze. S obzirom na pretpostavku da se kalpain 3 u mišiću nalazi u inaktivnom stanju ukazuje se potreba za otkrivanjem njegovog aktivacijskog/aktivacijskih signala, kojima bi bilo moguće bolje razumijeti način regulacije ove proteaze u mišićnoj stanici. Enzimski test, s obzirom na mogućnost praćenja aktivnosti kalpaina 3 bilo u *in vitro* ili *in vivo* uvjetima, mogao bi znatno doprijeti tom istraživanju.

## 5.2. ULOGA ODNOSA KALPAINA 3 I TITINA U NASTANKU LGMD 2A

### 5.2.1. Cijepanje C-terminalnog titina kalpainom 3

Titin je jedan od nekoliko, trenutno poznatih *in vitro* supstrata kalpaina 3. Cijepanje titina, analizom C-terminalnog dijela kodiranog sa krajem Mex4 i zadnja dva egzona (Mex5 i Mex6), bilo je dokazano prisustvom proteinskog fragmenta od 18kDa (139). S obzirom na veličinu analiziranog C-terminalnog dijela titina, te dobivenog proteinskog fragmenta p18 mjesto cijepanja najvjerojatnije se nalazi pri kraju IS7 (Mex5), odnosno na početku m10 (Mex6) područja. U cilju ispitivanja postojanja i drugih mjesta cijepanja u C-terminalnom dijelu titina, korišten je slijed titina koji je na razini gena odgovarao kraju egzona Mex1 pa sve do STOP kodona. Analiza tog dužeg slijeda rezultirala je pojavom p18, ali i dodatnog proteinskog fragmenta veličine otprilike 50kDa, upućujući na postojanje još jednog mjesta cijepanja. Položaj ovog drugog mjesta cijepanja najvjerojatnije je unutar proteinskog slijeda kodiranog egzonom Mex3, tj. unutar jedinstvenog slijeda IS6 ili m8 imunoglobulinskog ponavljanja.

Kako bi se odredila važnost rezultata dobivenih u *in vitro* uvjetima ista je analiza napravljena na uzorcima mišića kontrolnih miševa i zdravih osoba. Za razliku od rezultata dobivenih u *in vitro* uvjetima, analiza kontrolnih miševa rezultirala je prisustvom proteinskog fragmenta veličine 45kDa. Ovaj produkt cijepanja odgovara fragmentu od 50kDa uočenom tijekom *in vitro* analize. Razlika od nekoliko kDa posljedica je prisutnosti V5 peptida na C-terminalnom kraju titina korištenog u *in vitro* analizi. U skladu sa rezultatima dobivenim na mišu, analiza uzoraka mišića zdravih osoba također je rezultirala pojavom p45 fragmenta. Ipak, u humanih biopsija uočeno je prisustvo još 3 produkta cijepanja. Njihova veličina bila je oko 10, 15 i 20kDa. Fragment od 15kDa najvjerojatnije odgovara p18 fragmentu uočenom tijekom *in vitro* analize. Kao i u prethodnom slučaju, razlika u veličini posljedica je prisutnosti V5 peptida na C-terminalnom dijelu titina. Nepostojanje p18 fragmenta prilikom analize kontrolnog miša nije u potpunosti jasno, no pretpostavlja se da korišteno protutijelo (m10-1) pokazuje različitu osjetljivost prema mišjem, odnosno humanom proteinskom slijedu titina.

Nakon potvrde titina kao *in vivo* supstrata kalpaina 3, odvijanje procesa cijepanja titina kalpainom 3 testirano je na uzorcima mišića dva mišja modela za LGMD2A. Iako svaki model karakterizira drugačija mutacija u genu za kalpain 3, zajednički im je potpuni

nedostatak izražaja kalpaina 3. Dok jedan model karakterizira delecija u katalitičkoj domeni proteina, drugi model sadrži deleciju smještenu na samom početku gena. Analiza titina u oba je modela pokazala izostanak pojave p45 fragmenta, što potvrđuje da spomenuti produkt cijepanja nastaje kao posljedica proteolitičkog djelovanja kalpaina 3 prema titinu. U nastavku su analizirani i mišići 5 bolesnika s LGMD2A. U četiri biopsije prethodno je, korištenjem enzimskog testa, pokazan potpuni nedostatak izražaja, a time i aktivnosti kalpaina 3. Osim toga, u sve četiri biopsije pronađen je i potpuni nedostatak sva 4 produkta cijepanja titina kalpainom 3. Na osnovu rezultata dobivenih u LGMD2A mišjih modela i humanih biopsija, može se zaključiti da cijepanje titina kalpainom 3 predstavlja važan dio normalne homeostaze skeletnog mišića, a moguće je i da neodvijanje tog procesa ima određenu ulogu u nastanku pojase mišićne distrofije tip 2A.

U preostaloj LGMD2A humanoju biopsiji uočeno je prisustvo p45 i p20 proteinskih fragmenata, ali je njihov intenzitet bio slabiji u odnosu na kontrolne uzorke. Osim toga, enzimskim testom je pokazan normalan izražaj i aktivnost kalpaina 3. Prethodno su genskom analizom u tog bolesnika otkrivene dvije CAPN3 mutacije: 1322delG i Gly367Ser. Prva mutacija smještena je u egzonu 10, a uzrokuje pomak okvira čitanja. Točnije, uslijed njezinog prisustva javlja se preuranjeni STOP kodon, te nastaje “krnji” protein koji je najvjerojatnije razgrađen odmah nakon sinteze. Na osnovu toga se može zaključiti da normalan izražaj i aktivnost kalpaina 3 potječe od drugog alela koji nosi Gly367Ser mutaciju, smještenu u egzonu 8 CAPN3 gena. To ujedno upućuje na zaključak da spomenuta mutacija pripada skupini mutacija “missense” tipa koje nemaju utjecaja na proteolitičko mjesto kalpaina 3. Ipak, potrebno je napomenuti da unatoč činjenici da je u *in vitro* uvjetima kalpain 3 bio normalno izražen i aktivan, u *in vivo* uvjetima nije bio u mogućnosti u potpunosti cijepati svoj supstrat, C-terminalni dio titina. Razlika u cijepanju dva različita supstrata već je otprije poznata za nekoliko mutacija “missense” tipa koje su cijepale kalpain 3<sup>C129S</sup>, dok su bile inaktivne prema drugom supstratu, fodrinu (108). Ta razlika objašnjena je postojanjem drugačijih mehanizama prepoznavanja, odnosno uključenosti različitih domena kalpaina 3 u prepoznavanje ova dva supstrata. Isto tako je moguće da u *in vivo* uvjetima određeni faktori sprječavaju normalno i potpuno prepoznavanje i cijepanje supstrata, dok u *in vivo* uvjetima nema prepreka za odvijanje tih procesa. Kako bi potvrdili ovdje prikazane rezultate i donijeli određene zaključke bilo bi potrebno analizirati veći broj biopsija sa normalnim izražajem i aktivnošću kalpaina 3.

### **5.2.2. Istraživanje funkcije produkata cijepanja titina kalpainom 3**

Važnost cijepanja titina kalpainom 3, te pojava p45 fragmenta nastojala se ispitati unosom C-terminalnog dijela titina u kontrolne i LGMD2A miševe. U LGMD2A miševima uneseni titin nije bio pocijepan, a lokalizacija mu je bila u potpunosti sarkomerna. Za razliku od toga u kontrolnih miševa, djelovanjem kalpaina 3, uneseni titin bio je pocijepan, a nastali p45 fragment pokazao je da nije isključivo vezan uz sarkomeru. Iako svi do sada prezentirani rezultati upućuju na važnost cijepanja titina kalpainom 3 teško je predvidjeti pravu svrhu tog procesa. Moguće je da je cijepanje potrebno za odvajanje titina i njegovog C-terminalnog dijela ili je možda upravo odvajanje titina od C-terminalnog kraja potrebno za njegovu normalnu funkciju. S druge strane moguće je i da p45 proteinski fragment, jednom kad je odvojen od ostatka titina, ima određenu ulogu u stanici. Za bolje razumijevanje postavljenih hipoteza neophodno je, za buduća istraživanja, konstruirati odgovarajuće mišje modele: jedan sa delecijom p45 fragmenta, drugi sa njegovim povećanim izražajem. Analiza takvih mišjih modela pomogla bi u boljem razumijevanju svojstava p45 fragmenta, osobito da li je nedostatak spomenutog fragmenta uključen u nastanak pojase mišićne distrofije tip 2A.

## **5.3. ULOGA ODNOSA KALPAINA 3 I TITINA U NASTANKU LGMD2J**

### **5.3.1. Utjecaj Mex6 mutacija na funkciju kalpaina 3**

Osim što kalpain 3 cijepa C-terminalni dio titina u blizini ili u samoj IS7 regiji, to je ujedno i jedno od tri mjesta u titinu za koje je metodom dvostrukog hibrida pokazano da stupa u interakcije sa kalpainom 3 (129). U susjednoj, m10 regiji, smještene su tri različite Mex6 mutacije. Najčešća od njih pronađena je u finskoj populaciji i riječ je o istovremenoj deleciji i inserciji 11 bp, što na razini proteina uzrokuje promjenu četiri aminokiselinska ostatka (Glu34286\_Trp34289delinsValLysGluLys), uz zadržan okvir čitanja (27). Preostale dvije mutacije su "missense" tipa, a pronađene su u jedne francuske (Leu34315Pro), odnosno belgijske (Ile34306Asn) obitelji (189, 190).

Sve tri Mex6 mutacije uzrokuju nastanak tibijalne mišićne distrofije, dok je 11bp del/ins mutacija pronađena i u homozigotnom obliku što je osobina pojase mišićne distrofije tip 2J. Proteinska analiza nekih TMD, odnosno LGMD2J bolesnika, pokazala je postojanje

sekundarnog smanjenja izražaja kalpaina 3, što je bio prvi dokaz stvarnog, a ne samo *in vitro* postojanja interakcije između titina i kalpaina 3. Do sada nema objašnjenja toj pojavi, ali se pretpostavlja da bi Mex6 mutacije mogle onemogućiti interakciju kalpaina 3 i titina, što bi dovelo do njegove destabilizacije i pojačane proteolitičke aktivnosti (149). S obzirom na smještaj Mex6 mutacija u neposrednoj blizini veznog mjesta za kalpain 3, sekundarno smanjenje kalpaina 3 upravo se može objasniti prisustvom Mex6 mutacija, a koje bi mogle utjecati na interakciju titina i kalpaina 3 ili na proteolitičku aktivnost kalpaina 3, posebice na njegovo cijepanje C-terminalnog dijela titina. U cilju potvrde te pretpostavke nekoliko svojstava kalpaina 3 analizirano je u *in vitro* i *in vivo* uvjetima.

Prvo analizirano svojstvo bila je mogućnost interakcije kalpaina 3 sa titinom u prisustvu Mex6 mutacija. Interakcija između različitih slijedova titina (normalnog ili mutiranog) i kalpaina 3 testirana je korištenjem metode dvostrukog hibrida. Rast kolonija na selektivnom hranjivom mediju za sve analizirane kombinacije pokazao je postojanje interakcije kalpaina 3 sa normalnim, ali i mutiranim titinom. To je ujedno značilo da Mex6 mutacije nemaju utjecaja na interakciju titina i kalpaina 3.

Slijedeći korak bilo je određivanje aktivnosti kalpaina 3 u prisustvu Mex6 mutacija, pri čemu je korišten prije spomenuti enzimski test za određivanje aktivnosti kalpaina 3. U *in vitro* uvjetima dobivena je normalna aktivnost kalpaina 3 iako te rezultate treba uzeti sa zadržkom jer su i titin i kalpain 3 bili uneseni transfekcijom u stanice fibroblasta, te nema dokaza da je među njima došlo do interakcije kakva normalno postoji između kalpaina 3 i titina. Za dobivanje informativnijih rezultata analizirani su uzorci mišića osoba s TMD i LGMD2J. U TMD biopsija nije uočena nikakva promjena aktivnosti u odnosu na kontrolni uzorak, dok je kod LGMD2J uzoraka interpretacija rezultata bila nemoguća zbog razgradnje proteina koja je nastupila zbog nepravilnog pohranjivanja mišića. Stoga je jedina preostala mogućnost, a koja može dati podatak o aktivnosti kalpaina 3 u prisutnosti Mex6 mutacija, analiza nedavno konstruiranog LGMD2J mišjeg modela koji nosi mutaciju 11 bp del/ins u homozigotnom obliku (neobjavljeni rezultati).

Kao što je prethodno spomenuto kalpain 3 cijepa titin u području IS7 i m10 regije, što se očituje pojavom p18 proteinskog fragmenta. Kako se u neposrednoj blizini mjesta cijepanja nalaze Mex6 mutacije ispitano je ima li njihovo prisustvo kakav utjecaj na cijepanje titina kalpainom 3. *In vitro* analiza 11bp del/ins i Leu34315Pro mutacija pokazala je odsustvo p18, tj. izostanak cijepanja titina kalpainom 3. To je ujedno bila i prva uočena

posljedica ove dvije Mex6 mutacije na odnos kalpaina 3 i titina. Moguće objašnjenje izostanka cijepanja je promjena strukturnih karakteristika C-terminalnog dijela titina, a uslijed prisustva mutacija, što onemogućava normalno proteolitičko djelovanje kalpaina 3. Mutacija 11bp del/ins istovremena je delecija i insercija 11 bp, koja uključuje gubitak triptofana (Trp), visoko konzervirane aminokiseline prisutne u svih imunoglobulinskih ponavljanja, koja se smatra bitnom i za njihovu strukturnu stabilnost (200). U Leu34315Pro mutacije dolazi do zamjene 34315. aminokiseline leucina prolinom. Obje su aminokiseline nepolarne i hidrofobne, no zbog specifičnih strukturnih karakteristika prolina moguće je da promjena strukture titina onemogućava kalpain 3 da cijepa svoj supstrat. Preostalu Mex6 mutaciju, Ile34306Asn, karakterizira zamjena 34306. aminokiseline izoleucina u asparagin. Čini se da ova aminokiselinska zamjena ne uzrokuje dovoljno velike strukturne promjene C-terminalnog dijela titina, s obzirom da je *in vitro* analiza te mutacije rezultirala prisustvom p18 fragmenta. Ipak, intenzitet p18 produkta cijepanja je u slučaju Ile34306Asn mutacije bio smanjen u odnosu na normalni slijed titina. Takvo djelomično cijepanje titina zanimljivo je ako je poznata informacija da se klinička slika bolesnika sa Ile34306Asn mutacijom čini blažom u odnosu na 11bp del/ins mutaciju (B.Udd, osobna komunikacija). Potvrda ovdje prikazanih rezultata i postojanja eventualne korelacije između kliničke slike i cijepanja titina zahtjeva analizu dodatnih bolesnika sa tom Mex6 mutacijom. U slučaju 11bp del/ins mutacije rezultati su potvrđeni analizom uzorka mišića bolesnika s LGMD2J. Spomenuta analiza pokazala je odsustvo sva 4 produkta cijepanja titina kalpainom 3 u LGMD2J biopsije, što je rezultat identičan onom dobivenom za LGMD2A biopsije.

Ovdje prikazani rezultati pokazali su da prisutnost Mex6 mutacije doista imaju utjecaj na kalpain 3, što se očituje kao sekundarno smjernenje izražaja kalpaina 3 u TMD i LGMD2J bolesnika. Dok interakcija titina i kalpaina 3 nije promjenjena u prisutnosti Mex6 mutacija, uočeno je da spomenute mutacije onemogućavaju cijepanje titina kalpainom 3, što je prethodno pokazano i za pojasnu mišićnu distrofiju tip 2A. Stoga se može zaključiti da LGMD2A i LGMD2J, unatoč mutacijama u različitim genima, karakterizira ista nemogućnost cijepanja titina kalpainom 3. Kao što je već spomenuto, izostanak spomenutog procesa mogao bi biti, barem djelomično, odgovoran za nastanak distrofičnog procesa. Važnost rezultata dobivenih za Mex6 mutacije je u činjenici da je pokazana važnost uloge kalpaina 3 i njegovog odnosa sa titinom u nastanku na samo LGMD2A, već i LGMD2J.



#### 5.4. ISPITIVANJE SUPSTRATA KALPAINA 3 U C-TERMINALNOM DIJELU TITINA

U cilju razumijevanja mehanizma nastanka pojasne mišićne distrofije tip 2A, Ono i sur. su 1998. godine (142) *in vitro* analizirali svojstva mutiranog kalpaina 3 koji je sadržavao jednu od 9 mutacija “missense” tipa (Leu182Gln, Gly234Glu, Pro319Leu, His334Gln, Val354Gly, Arg490Trp, Arg572Gln, Ser744Gly, Arg769Gln) prethodno već pronađenih u bolesnika sa LGMD2A. Kako su neki od analiziranih mutanata i dalje zadržavali sposobnost autolize, odnosno sposobnost vezanja za titin pretpostavilo se da ta svojstva nisu ključna za pojavu distrofičnog procesa. Jedino svojstvo koje je bilo zajedničko svim mutantima bio je gubitak proteolitičkog djelovanja kalpaina 3. Takvi su rezultati uputili na zaključak da su proteolitička cijepanja kalpainom 3 vrlo važna i neophodna za normalnu homeostazu skeletnog mišića. Smatra se da ta cijepanja nisu jednostavni razgradni procesi, već događaji koji reguliraju i mijenjaju svojstva i funkciju supstrata, kao i puteva prijenosa signala u koje su uključeni (81). Takve pretpostavke ujedno ukazuju na potrebu za identifikacijom supstrata kalpaina 3 što bi omogućilo daljnje razumijevanje njegove funkcije, kao i mehanizam nastanka distrofičnog procesa.

Do sada je otkriveno tek nekoliko supstrata kalpaina 3, među kojima su talin, vineksin, titin, te filamin C (139). Proteolitičko djelovanje kalpaina 3 prema spomenutim proteinima pokazano je u *in vitro* uvjetima. Potvrda postojanja cijepanja titina u *in vivo* uvjetima po prvi put je dokazana u ovoj disertaciji. Nedavno je pokazano i da miozin laki lanac 1 (MLC1) ima smanjeni izražaj u prisutnosti kalpaina 3, zbog čega je zaključeno da je MLC1 još jedan supstrat kalpaina 3 (141).

U okviru doktorske radnje analizirano je nekoliko proteina, potencijalnih supstrata kalpaina 3. Za te je proteine metodom dvostrukog hibrida pokazano da stupaju u interakcije sa kalpainom 3 ili titinom. S obzirom na istraživanje uloge odnosa kalpaina 3 i C-terminalnog dijela titina, prednost je dana proteinima za koje je poznato, iz literature ili metodom dvostrukog hibrida, da su smješteni u blizini C-terminalnog dijela titina u području M-crte. Ti proteini uključivali su MURF obitelj proteina, KY protein, teletonin, podjedinicu proteasoma PSMC3 i miosprin (CMYA5). Za MURF1, MURF2alt i PSMC3 proteine pokazano je da su *in vitro* supstrati, dok tri preostala proteina nisu bila pocijepana kalpainom 3.

Teletonin (TCAP) je sarkomerni protein izražen u skeletnom i srčanom mišiću u području Z-crte (97). Nedavno je lokaliziran i u području M-crte u neposrednoj blizini titin kinazne domene (I.Richard, osobno komunikacija). S obzirom na smještaj u blizini veznog mjesta za kalpain 3, ali i mjesta interakcije titina sa MURF proteinima, teletonin je analiziran kao potencijalni supstrat kalpaina 3. Kao što je već spomenuto, proteinska analiza je pokazala da teletonin nije supstrat kalpaina 3. Isti je rezultat dobiven i za miosprin. Miosprin (CMYA5) je novo otkriveni protein, za kojeg je metodom dvostrukog hibrida pokazano sa stupa u interakcije sa disbindinom koji je nadalje povezan sa distrobrevinom, dijelom distrofin-glikoproteinskog kompleksa (183). Nedavno je otkriveno i da miosprin ulazi u interakcije i sa C-terminalnim dijelom titina (I.Richard, osobno komunikacija). Njegova precizna funkcija nije poznata, ali se pretpostavlja da bi mogao imati ulogu u miofibrilogenezi (185). S obzirom na njegovu veliku molekulsku masu analiziran je samo njegov C-terminalni dio, koji sadrži sve domene (BBC, FN3 i SPRY) zbog kojih se miosprin smatra članom TRIM obitelji proteina. Prva analiza C-terminalnog dijela miosprina u prisutnosti kalpaina 3 nije pokazala prisutnost niti jednog produkta cijepanja. Spomenuti rezultat nije bilo moguće potvrditi jer se pri svakoj ponovnoj analizi uočio nedovoljan izražaj miosprina. Osim toga treba napomenuti da ovdje prikazani rezultati ne isključuju mogućnost da je neki drugi dio molekule miosprina podložan proteolitičkom djelovanju kalpaina 3. Stoga bi bilo potrebno ponoviti istu analizu, ali sa cjelokupnim proteinom.

Iako je prvotno pokazano da stupa u interakcije sa titinom (181), najnovije istraživanje ipak je pokazalo da nema direktne interakcije između KY proteina i C-terminalnog dijela titina (201). Takav je rezultat potvrđen i u ovom radu. Nadalje je pokazano da KY nije supstrat kalpaina 3, ali i da nema utjecaja na morfologiju stanica sa izraženim kalpainom 3, kao ni na njegovu proteolitičku aktivnost. Unatoč nepostojanju interakcije između KY proteina i kalpaina 3, on ostaje interesantan protein koji bi mogao imati određenu ulogu u prijenosu signala povezanim sa C-terminalnim dijelom titina. Najnoviji podaci govore o KY proteinu kao mogućem aktivnom sudioniku, odnosno kao o proteinu koji je indirektno povezan sa proteinima uključenim u prijenos signala koji započinje od molekule titina (201).

Od proteina MURF obitelji kao potencijalni supstrati kalpaina 3 analizirani su MURF1, MURF2-60kDa i njegova alternativna izoforma MURF2alt-60kDa. MURF1 je E3-

ubikvitin ligaza uključena u niz različitih staničnih procesa. Metoda dvostrukog hibrida pokazala je da MURF1 stupa u interakcije sa kalpainom 3, kao i sa titinom u neposrednoj blizini titin kinazne domene. Analiza MURF1 proteina u prisutnosti kalpaina 3 pokazala je postojanje proteinskog fragmenta veličine 37kDa što upućuje na zaključak da je MURF1 supstrat kalpaina 3. Tijekom razdvajanja u poliakrilamidnom gelu MURF1 putovao je većom molekulskom masom od teoretske, a što se može objasniti visokim udjelom kiselih aminokiselina na C-terminalnom kraju proteina. Spomenuta razlika molekulske mase onemogućila je lokalizaciju mjesta cijepanja.

MURF2 javlja se u nekoliko izoformi, ali je umnažanjem mišićne cDNA dobivena samo njegova najučestalija mišićna izoforma, MURF2-60kDa. MURF2 dijeli mnoge strukturne i funkcionalne karakteristike sa MURF1 proteinom. MURF2-60kDa je uz to i dio, nedavno otkrivenog, signalnog puta koji započinje od titin kinazne domene (178). Unatoč sličnostima sa MURF1 proteinom, MURF2-60kDa nije bio pocijepan kalpainom 3. Kada je bila analizirana njegova alternativna izoforma uočen je proteinski fragment od 20kDa, na osnovu čega se zaključilo da je MURF2alt-60kDa još jedan *in vitro* supstrat kalpaina 3. Točno mjesto cijepanja nije bilo moguće odrediti, a ponovno zbog veće molekulske mase od teoretske. Ipak, kako spomenuti proteinski fragment od 20kDa nije bio vidljiv prilikom analize MURF2-60kDa može se pretpostaviti da se mjesto cijepanja nalazi na samom C-terminalnom kraju proteina, unutar zadnjih 40-tak aminokiselina po kojima se MURF2-60kDa i njegova alternativna izoforma razlikuju.

Podjedinica proteasoma, PSMC3, prvotno je identificirana kao protein koji stupa u interakcije sa Tat proteinom, tj. aktivatorom izražaja i replikacije virusnih gena. Naknadno je otkrivena kao sastavni dio 19S regulatornog dijela 26S proteasoma. Regulatorni dio proteasoma sadrži 6 ATP-aza, gdje je jedna od njih upravo PSMC3. Točna funkcija PSMC3, odnosno 19S komponente je nepoznata ali se pretpostavlja da je ovaj dio proteasoma odgovoran za prepoznavanje poliubikvitiniranih proteina, kao i za njihovo premještanje do 20S komponente proteasoma koja ima proteolitičko djelovanje (202). Analiza PSMC3 kao potencijalnog supstrata kalpaina 3 otkrila je postojanje proteinskog fragmenta veličine oko 40kDa. Kao i u slučaju MURF proteina, povećana molekulska masa nije dopustila preciznije otkrivanje mjesta cijepanja.

Zanimljivo je primjetiti da su sva tri novootkrivena supstrata kalpaina 3 uključena u proces razgradnje proteina, bilo kao ubikvitin ligaze ili kao dijelovi proteasoma. U literaturi već

postoji nekoliko objavljenih istraživanja koja su pokazala povezanost procesa razgradnje proteina i kalpaina 3. Tako je pokazano da su proteini uključeni u poliubkvitinilaciju, E2 konjugirajući enzimi ili podjedinice proteasoma imali smanjeni izražaj u odsutnosti kalpaina 3 (143). Nedavno je dokazano da aktivnost kalpaina 3 i proces razgradnje proteina ne djeluju kao dva paralelna, već kao jedan serijski proces. To je istraživanje pokazalo da nedostatak kalpaina 3 rezultira nakupljanjem starih i oštećenih proteina, te da spomenute nakupine mogu dovesti do smrti stanice i biti, barem jednim dijelom, odgovorne za nastanak distrofičnog procesa (145). Svi ti rezultati upućuju na potrebu nastavka istraživanje prema boljem razumijevanju uloge kalpaina 3 u procesu razgradnje proteina. Potvrda otkrivenih supstrata u *in vivo* uvjetima, određivanje posljedica proteolitičke aktivnosti kalpaina 3 prema tim supstratima, odnosno posljedica izostanka njegovog djelovanja pomogle bi objasniti da li je ova potencijalna uloga kalpaina 3 nekako povezana sa nastankom LGMD2A.

Iako su tijekom izrade doktorske radnje otkrivena tri nova supstrata kalpaina 3 neophodno je nastaviti istraživanje u ovom smjeru, te potvrditi dobivene rezultate i u *in vivo* uvjetima. Osim toga, rezultati nedavno završene metode dvostrukog hibrida (I.Richard, osobna komunikacija) pokazali su velik broj drugih proteina koji stupaju u interakcije sa kalpainom 3. Korištenjem odgovarajućeg metodološkog pristupa (npr. usporedba izraženih proteina 2D elektroforezom) bilo bi moguće utvrditi koji su od pronađenih «partnera» kalpaina 3 ujedno i njegovi supstrati. Otkrivanje novih supstrata kalpaina 3, posebice u području M-crte, doprinijelo bi boljem razumijevanju mehanizma LGMD2A i LGMD2J. Ti, još neotkriveni, supstrati osobito bi pomogli objasniti važnost cijepanja titina kalpainom 3 i kako nedostatak tog procesa može rezultirati distrofičnim procesom.

Na temelju dobivenih rezultata doktorske radnje doneseni su slijedeći zaključci:

1. Enzimski test predstavlja novu metodu analize kalpaina 3, kojom se omogućava istovremeno određivanje izražaja, autolitičke i proteolitičke aktivnosti kalpaina 3
2. Spomenuti enzimski test ima moguću primjenu u rutinskoj dijagnostici LGMD2A, a zbog veće osjetljivosti u odnosu na klasičnu proteinsku analizu kalpaina 3, kao i u bazičnim istraživanjima kalpaina 3, posebice u onima usmjerenim prema pronalasku aktivacijskog/aktivacijskih signala kalpaina 3.
3. Primjena optimiziranog enzimskog testa na uzorcima biopsija mišića bolesnika s pojasnom mišićnom distrofijom tip 2A (LGMD2A) pokazala je da njih 30% ima normalnu enzimsku aktivnost kalpaina 3, što upućuje na zaključak da bi neka druga svojstva kalpaina 3, poput neprepoznavanja supstrata ili promjenjenog smještaja u stanici, mogla biti odgovorna za nastanak LGMD2A.
4. Primjena enzimskog testa na humanim biopsijama pokazala je i da bi pacijenti sa pojasnom mišićnom distrofijom tip 2B koji pokazuju sekundarno smanjenje izražaja kalpaina 3 mogli biti daleko brojniji nego što se trenutno misli, što upućuje na zaključak o mogućoj uključenosti kalpaina 3 i u nastanku ovog tipa pojasnih mišićnih distrofija.
5. C-terminalni dio titina sadrži dva mjesta koja su podložna cijepanju kalpainom 3, što je u kontrolnih miševa i uzoraka mišića zdravih osoba vidljivo kao prisustvo p15 i p45 proteinskih fragmenata.
6. Produkti cijepanja titina, p15 i p45, nisu prisutni u LGMD2A mišjih modela, kao ni u uzorcima mišića bolesnika s LGMD2A, što potvrđuje da su spomenuti fragmenti doista posljedica proteolitičkog djelovanja kalpaina 3 prema titinu.
7. Cijepanje titina kalpainom 3 predstavlja važan proces u normalnoj mišićnoj homeostazi, te bi izostanak ovog procesa mogao biti, barem djelomično, odgovoran za nastanak LGMD2A. To ujedno govori u prilog postavljenoj hipotezi da je jedna od uloga kalpaina 3 regulacija puteva prijenosa signala koji započinju od molekule titina.
8. Preliminarni rezultati smještaja p45 proteinskog fragmenta upućuju na njegovu moguću ulogu u mišićnoj stanici, što treba potvrditi na odgovarajućim mišjim modelima.
9. Mutacije gena koji kodira titin, a koje su smještene u njegovom posljednjem egzonu (Mex6) i odgovorne za nastanak LGMD2J i TMD, ne mijenjaju interakciju

kalpaina 3 sa titinom, ali djelomično (Ile34309Asn) ili potpuno (Leu34315Pro i 11bp del/ins) onemogućavaju cijepanje titina kalpainom 3. Ovakav rezultat upućuje na zaključak da i pojasnu mišićnu distrofiju tip 2J, poput LGMD2A, karakterizira isti izostanak cijepanja C-terminalnog dijela titina kalpainom 3.

10. Analiza više različitih proteina, smještenih u neposrednoj blizini C-terminalnog dijela titina rezultirala je identifikacijom tri nova *in vitro* supstrata, tj. proteina cijepana kalpainom 3: MURF1, MURF2alt i PSMC3. Povezanost sva tri supstrata s procesom proteinske razgradnje upućuje na zaključak o mogućoj ulozi kalpaina 3 u tom procesu, te bi nastavak istraživanja trebao pokazati koliko je ta potencijalna uloga kalpaina 3 bitna za nastanak LGMD2A.
11. Analiza MURF2 proteina, teletonina, KY proteina i miosprina pokazala je da spomenuti proteini nisu supstrati kalpaina 3.
12. Osim što nije supstrat kalpaina 3, KY protein nema ni utjecaja na proteolitičku aktivnost kalpaina 3, a potvrđeno je i da ne stupa u direktnu interakciju sa C-terminalnim dijelom titina.

Disertacija je bila usmjerena prema boljem razumijevanju funkcije kalpaina 3, posebice uloge odnosa kalpaina 3 i titina u etiopatogenezi pojasne mišićne distrofije tip 2A (LGMD2A).

U cilju poboljšanja trenutno dostupnih LGMD2A dijagnostičkih metoda, kao i onih koji se koriste za osnovna znanstvena istraživanja kalpaina 3, prvi dio disertacije bio je posvećen razvitku i optimizaciji enzimskog testa kojim se istovremeno uz izražaj analizira i autolitička i proteolitička aktivnost kalpaina 3 u *in vitro* uvjetima. Primjena enzimskog testa na 34 uzorka mišića molekularno potvrđenih bolesnika s LGMD2A pokazala je da u 30% LGMD2A biopsija kalpaina 3 ima normalnu enzimsku aktivnost. Ovaj rezultat upućuje na zaključak da bi, osim proteolitičke aktivnosti kalpaina 3, i neka njegova druga svojstva mogla biti odgovorna za nastanak LGMD2A.

Istraživanje usmjereno prema boljem razumijevanju odnosa kalpaina 3 i titina pokazalo je da u C-terminalnom dijelu titina postoje dva mjesta podložna cijepanju kalpainom 3. Rezultirajući proteinski fragmenti, p45 i p15, odsutni su ukoliko nema izražaja kalpaina 3 (LGMD2A), ali i ukoliko su prisutne mutacije u Mex6 egzonu gena za titin (LGMD2J). Stoga se može zaključiti da je, unatoč različitom genskom uzroku, izostanak cijepanja titina zajednička karakteristika LGMD2A i LGMD2J, te bi mogao, barem djelomično, biti odgovoran za nastanak ove dvije distrofije.

Ispitivanje različitih proteina kao potencijalnih supstrata kalpaina 3 pokazalo je da su MURF1, MURF2alt i PSMC3 cijepani kalpainom 3 u *in vitro* uvjetima. Uključenost sva tri supstrata u proces proteinske razgradnje upućuje na moguću povezanost kalpaina 3, odnosno nastanka LGMD2A fenotipa, sa tim procesom.

**THE ROLE OF CALPAIN 3 AND TITIN RELATIONSHIP IN THE  
ETHIOPATOGENESIS OF LIMB GIRDLE MUSCULAR DYSTROPHY TYPE 2A  
(LGMD2A)**

**Astrid Milić**

**Zagreb, 2007.**

This PhD thesis was directed towards a better understanding of calpain 3 function, especially possible involvement of calpain 3 and titin relationship in the ethiopathogenesis of LGMD2A.

In order to improve presently available LGMD2A diagnostic methods, as well as those used in calpain 3 fundamental research, the first part of the thesis was focussed on the development of an *in vitro* calpain 3 activity assay in which the expression, the autocatalytic and proteolytic properties of calpain 3 are tested at once. This activity assay was validated on 34 human biopsies with molecularly diagnosed LGMD2A, revealing that 30% of LGMD2A biopsies have a normal calpain 3 activity. This finding suggests that additional calpain 3 properties could be responsible for the appearance of LGMD2A phenotype.

The work aimed at better understanding of the relationship between calpain 3 and titin resulted in the identification of two C-terminal titin fragments, p45 and p15, that are products of *in vivo* cleavage by calpain 3. Titin fragments were not observed in the absence of calpain 3 (LGMD2A), as well as in the presence of mutations in the last exon of the gene coding for titin (LGMD2J). This inadequate processing of titin represents a common characteristic of LGMD2A and LGMD2J and may be, at least partially, part of their pathophysiological mechanisms.

The search for calpain 3 substrates resulted in the identification of MURF1, MURF2alt and PSMC3 as calpain 3 *in vitro* substrates. Implication of these proteins in the process of protein degradation suggests a possible involvement of calpain 3, and therefore LGMD2A phenotype, in this process.



1. Marieb EN. Human Anatomy and Physiology. 6 izd. San Francisco: Benjamin Cummings; 2004.
2. Junqueira LC, Carneiro J, Kelley RO. Osnove histologije. Zagreb: Školska knjiga; 1999, str.195-215.
3. Nelson DL i Cox MM. Lehninger's Principles of Biochemistry. 4 izd. New York: WH Freeman; 2005.
4. Lovering RM, Porter NC, Bloch RJ. The muscular dystrophies: from genes to therapies. *Phys Ther* 2005;85:1372-88.
5. Wells DJ. Viral and non-viral methods for gene transfer into skeletal muscle. *Curr Opin Drug Discov Devel* 2006;9:163-8.
6. Mendell JR i Clark KR. Challenges for gene therapy for muscular dystrophy. *Curr Neurol Neurosci Rep* 2006;6:47-56.
7. Hoffman EP, Brown RH, Kunkel LM. The protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. *Cell* 1987;51:919-28.
8. Koenig M, Hoffman EP, Bertelson CJ, Monaco AP, Feener C, Kunkel LM. Complete cloning of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) cDNA and preliminary genomic organization of the DMD gene in normal and affected individuals. *Cell* 1987;50:509-17.
9. Hauser MA, Horrigan SK, Salmikangas P i sur. Myotilin is mutated in limb girdle muscular dystrophy 1A. *Hum Mol Genet* 2000;9:2141-7.
10. Muchir A, Bonne G, Van der Kooi AJ i sur. Identification of mutations in the gene encoding lamins A/C in autosomal dominant limb girdle muscular dystrophy with atrioventricular conduction disturbances (LGMD1B). *Hum Mol Genet* 2000;9:1453-9.

11. Minetti C, Sotgia F, Bruno C i sur. Mutations in the caveolin-3 gene cause autosomal dominant limb-girdle muscular dystrophy. *Nat Genet* 1998;18:365-8.
12. Speer MC, Vance JM, Grubber JM i sur. Identification of a new autosomal dominant limb-girdle muscular dystrophy locus on chromosome 7. *Am J Hum Genet* 1999;64:556-62.
13. Messina DN, Speer MC, Pericak-Vance MA, McNally EM. Linkage of familial dilated cardiomyopathy with conduction defect and muscular dystrophy to chromosome 6q23. *Am J Hum Genet* 1997;61:909-17.
14. Palenzuela L, Andreu AL, Gamez J i sur. A novel autosomal dominant limb-girdle muscular dystrophy (LGMD 1F) maps to 7q32.1.-32.2. *Neurology* 2003;61:404-6.
15. Starling A, Kok F, Passos-Bueno MR, Vainzof M, Zatz M. A new form of autosomal dominant limb-girdle muscular dystrophy (LGMD 1G) with progressive fingers and toes flexion limitation maps to chromosome 4p21. *Eur J Hum Genet* 2004;12:1033-40.
16. Richard I, Broux O, Allamand V i sur. Mutations in the proteolytic enzyme calpain3 cause limb-girdle muscular dystrophy type 2A. *Cell* 1995; 81:27-40.
17. Bashir R, Britton S, Strachan T i sur. A gene related to *Caenorhabditis elegans* spermatogenesis factor *fer-1* is mutated in limb-girdle muscular dystrophy type 2B. *Nat Genet* 1998;20:37-42.
18. Liu J, Aoki M, Illa I i sur. Dysferlin, a novel skeletal muscle gene, is mutated in Miyoshi myopathy and limb girdle muscular dystrophy. *Nat Genet* 1998;20:31-6.
19. Noguchi S, McNally EM, Ben Othmane K i sur. Mutations in the dystrophin-associated protein gamma-sarcoglycan in chromosome 13 muscular dystrophy. *Science* 1995;270:819-22.
20. Roberds SL, Leturcq F, Allamand V i sur. Missense mutations in the adhalin gene linked to autosomal recessive muscular dystrophy. *Cell* 1994;78:625-33.

21. Lim LE, Duclos F, Broux O i sur. Beta-sarcoglycan: characterization and role in limb-girdle muscular dystrophy linked to 4q12. *Nat Genet* 1995;11:257-65.
22. Bonnemann CG, Modi R, Noguchi S i sur. Beta-sarcoglycan (A3b) mutations cause autosomal recessive muscular dystrophy with loss of the sarcoglycan complex. *Nat Genet* 1995;11:266-73.
23. Nigro V, de Sa Moreira E, Piluso G i sur. Autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophy, LGMD2F, is caused by a mutation in the delta-sarcoglycan gene. *Nat Genet* 1996;14:195-8.
24. Moreira ES, Wiltshire TJ, Faulkner G i sur. Limb-girdle muscular dystrophy type 2G is caused by mutations in the gene encoding the sarcomeric protein telethonin. *Nat Genet* 2000;24:163-6.
25. Frosk P, Weiler T, Nylen E i sur. Limb-girdle muscular dystrophy type 2H associated with mutation in TRIM32, a putative E3-ubiquitin-ligase gene. *Am J Hum Genet* 2002;70:663-72.
26. Brockington M, Yuva Y, Prandini P i sur. Mutations in the fukutin-related protein gene (FKRP) identify limb girdle muscular dystrophy 2I as a milder allelic variant of congenital muscular dystrophy MDC1C. *Hum Mol Genet* 2001;10:2851-9.
27. Hackman P, Vihola A, Haravuori H i sur. Tibial muscular dystrophy is a titinopathy caused by mutations in TTN, the gene encoding the giant skeletal-muscle protein titin. *Am J Hum Genet* 2002;71:492-500.
28. Balci B, Uyanik G, Dincer P i sur. An autosomal recessive limb girdle muscular dystrophy (LGMD2) with mild mental retardation is allelic to Walker-Warburg syndrome (WWS) caused by a mutation in the POMT1 gene. *Neuromusc Disord* 2005;15:271-5.

29. Von Tell D, Bruder CEG, Anderson LVB, Anvret M, Ahlberg G. Refined mapping of the Welander distal myopathy region on chromosome 2p13 positions the new candidate region telomeric of the DYSF locus. *Neurogenetics* 2003;4:173-7.
30. Kayashima T, Matsuo H, Satoh A i sur. Nonaka myopathy is caused by mutations in the UDP-N-acetylglucosamine-2-epimerase/N-acetylmannosamine kinase gene (GNE). *J Hum Genet* 2002;47:77-9.
31. Eisenberg I, Avidan N, Potikha T i sur. The UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase/N-acetylmannosamine kinase gene is mutated in recessive hereditary inclusion body myopathy. *Nat Genet* 2001;29:83-7.
32. Goldfarb LG, Park KY, Cervenakova L i sur. Missense mutations in desmin associated with familial cardiac and skeletal myopathy. *Nat Genet* 1998;19:402-3.
33. Vicart P, Caron A, Guicheney P i sur. A missense mutation in the alpha-B-crystallin chaperone gene causes a desmin-related myopathy. *Nat Genet* 1998;20:92-5.
34. Laing NG, Laing BA, Meredith C i sur. Autosomal dominant distal myopathy: linkage to chromosome 14. *Am J Hum Genet* 1995;56:422-7.
35. Helbling-Leclerc A, Zhang X, Topaloglu H i sur. Mutations in the laminin alpha-2-chain gene (LAMA2) cause merosin-deficient congenital muscular dystrophy. *Nature Genet* 1995;11:216-8.
36. Brockington M, Sewry CA, Herrmann R i sur. Assignment of a form of congenital muscular dystrophy with secondary merosin deficiency to chromosome 1q42. *Am J Hum Genet* 2000;66:428-35.
37. Longman C, Brockington M, Torelli S i sur. Mutations in the human LARGE gene cause MDC1D, a novel form of congenital muscular dystrophy with severe mental retardation and abnormal glycosylation of alpha-dystroglycan. *Hum Mol Genet* 2003;12:2853-61.

38. Hayashi YK, Chou FL, Engvall E i sur. Mutations in the integrin alpha7 gene cause congenital myopathy. *Nat Genet* 1998;19:94-7.
39. Kobayashi K, Nakahori Y, Miyake M i sur. An ancient retrotransposal insertion causes Fukuyama-type congenital muscular dystrophy. *Nature* 1998;394:388-92.
40. Beltran-Valero de Bernabe D, Currier S, Steinbrecher A i sur. Mutations in the O-mannosyltransferase gene POMT1 give rise to the severe neuronal migration disorder Walker-Warburg syndrome. *Am J Hum Genet* 2002;71:1033-43.
41. Beltran-Valero de Bernabe D, van Bokhoven H, van Beusekom E i sur. A homozygous nonsense mutation in the fukutin gene causes a Walker-Warburg syndrome phenotype. *J Med Genet* 2003;40:845-84.
42. Beltran-Valero de Bernabe D, Voit T, Longman C i sur. Mutations in the FKR1 gene can cause muscle-eye-brain disease and Walker-Warburg syndrome. *J Med Genet* 2004;41:e61
43. Van Reeuwijk J, Janssen M, van den Elzen C i sur. POMT2 mutations cause alpha-dystroglycan hypoglycosylation and Walker-Warburg syndrome. *J Med Genet* 2005;42:907-12.
44. Yoshida A, Kobayashi K, Manya H i sur. Muscular dystrophy and neuronal migration disorder caused by mutations in a glycosyltransferase, POMGnT1. *Dev Cell* 2001;1:717-24.
45. Moghadaszadeh B, Petit N, Jaillard C i sur. Mutations in SEP1 cause congenital muscular dystrophy with spinal rigidity and restrictive respiratory syndrome. *Nat Genet* 2001;29:17-8.
46. Pan TC, Zhang RZ, Sudano DG, Marie SK, Bonnemann CG, Chu ML. New molecular mechanism for Ullrich congenital muscular dystrophy: a heterozygous in-frame deletion in the COL6A1 gene causes a severe phenotype. *Am J Hum Genet* 2003;73:355-69.

47. Camacho Vanegas O, Bertini E, Zhang RZ i sur. Ullrich scleroatonic muscular dystrophy is caused by recessive mutations in collagen type VI. PNAS 2001;98:7516-21.
48. Demir E, Sabatelli P, Allamand V i sur. Mutations in COL6A3 cause severe and mild phenotypes of Ullrich congenital muscular dystrophy. Am. J Hum Genet 2002;70:1446-58.
49. Bione S, Maestrini E, Rivella S i sur. Identification of a novel X-linked gene responsible for Emery-Dreifuss muscular dystrophy. Nat Genet 1994;8:323-7.
50. Bonne G, Di Barletta MR, Varnous S i sur. Mutations in the gene encoding lamin A/C cause autosomal dominant Emery-Dreifuss muscular dystrophy. Nat Genet 1999;21:285-8.
51. Raffaele di Barletta M, Ricci E, Galluzzi G i sur. Different mutations in the LMNA gene cause autosomal dominant and autosomal recessive Emery-Dreifuss muscular dystrophy. Am. J Hum Genet 2000;66:1407-12.
52. Brais B, Bouchard JP, Xie YG i sur. Short GCG expansions in the PABP2 gene cause oculopharyngeal muscular dystrophy. Nat Genet 1998;18:164-7.
53. Smith FJD, Eady RAJ, Leigh IM i sur. Plectin deficiency results in muscular dystrophy with epidermolysis bullosa. Nat Genet 1996;13:450-7.
54. Wijmenga C, Hewitt JE, Sandkuijl LA i sur. Chromosome 4q DNA rearrangements associated with facioscapulohumeral muscular dystrophy. Nat Genet 1992;2:26-30.
55. Brook JD, McCurrach ME, Harley HG i sur. Molecular basis of myotonic dystrophy: expansion of a trinucleotide (CTG) repeat at the 3-prime end of a transcript encoding a protein kinase family member. Cell 1992;68:799-808.
56. Liquori CL, Ricker K, Moseley ML i sur. Myotonic dystrophy type 2 caused by a CCTG expansion in intron 1 of ZNF9. Science 2001;293:864-7.

57. Guglieri M, Magri F, Comi GP. Molecular etiopathogenesis of limb girdle muscular and congenital muscular dystrophies: Boundaries and contiguities. *Clin Chim Acta* 2005;361:54-79. (korištenje slike uz dopuštenje Elseviera)
58. Walton JN, Nattrass FJ. On the classification, natural history and treatment of the myopathies. *Brain* 1954;77:169-231.
59. Bushby KMD. Making sense of the limb girdle muscular dystrophies. *Brain* 1999;122:1403-20.
60. Laval SH i Bushby KM. Limb-girdle muscular dystrophies-from genetics to molecular pathology. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2004;30:91-105.
61. Bushby K i Beckmann JS. Report of the 30<sup>th</sup> and 31<sup>st</sup> ENMC international workshop- The limb-girdle muscular dystrophies-and proposal for a new nomenclature. *Neuromuscul Disord* 1995;5:337-43.
62. Salmikangas P, Mykkanen OM, Gronholm M, Heiska L, Kere J, Carpen O. Myotilin, a novel sarcomeric protein with two Ig-like domains, is encoded by a candidate gene for limb-girdle muscular dystrophy. *Hum Mol Genet* 1999;8:1329-36.
63. Shackleton S, Lloyd DJ, Jackson SNJ i sur. LMNA, encoding lamin A/C, is mutated in partial lipodystrophy. *Nat Genet* 2000;24:153-6.
64. Fatkin D, MacRae C, Sasaki T i sur. Missense mutations in the rod domain of the lamin A/C gene as causes of dilated cardiomyopathy and conduction-system disease. *New Eng J Med* 1999;341:1715-24.
65. De Sandre-Giovannoli A, Chaouch M, Kozlov S i sur. Homozygous defects in LMNA, encoding lamin A/C nuclear-envelope proteins, cause autosomal recessive axonal neuropathy in human (Charcot-Marie-Tooth disorder type 2) and mouse. *Am J Hum Genet* 2002;70:726-36.

66. Eriksson M, Brown WT, Gordon LB i sur. Recurrent de novo point mutations in lamin A cause Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Nature* 2003;423:293-8.
67. Navarro CL, De Sandre-Giovannoli A, Bernard R i sur. Lamin A and ZMPSTE24 (FACE-1) defects cause nuclear disorganization and identity restrictive dermatopathy as a lethal neonatal laminopathy. *Hum Mol Genet* 2004;13:2493-2503.
68. Carbone I, Bruno C, Sotgia F i sur. Mutation in the CAV3 gene causes partial caveolin-3 deficiency and hyperCKemia. *Neurology* 2000;54:1373-6.
69. Betz RC, Schoser BGH, Kasper D i sur. Mutations in CAV3 cause mechanical hyperirritability of skeletal muscle in rippling muscle disease. *Nat Genet* 2001;28:218-9.
70. 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.
71. Gath I, Ebert J, Godtel-Ambrust U, Ross R, Reske-Kunz AB, Forstermann U. NO synthase II in mouse skeletal muscle is associated with caveolin 3. *Biochem J* 1999;340:723-8.
72. Sotgia F, Lee JK, Das K i sur. Caveolin-3 directly interacts with the C-terminal tail of beta-dystroglycan. Identification of a central WW-like domain within caveolin family members. *J Biol Chem* 2000;275:38048-58.
73. Fardeau M, Hillaire D, Mignard C, Mignard D, Collin H. Limb-girdle muscular dystrophy frequent in Reunion Island. *Neurology India* 1989;37Suppl 7
74. Erb W. Ueber die «Juvenile Form» der progressiven Muskelatrophie ihre Beziehungen zur sogenannten Pseudohypertrophie der Muskeln. *Dtsch Arch Klin Med* 1884;34:467-519.



75. Fardeau M, Hillaire D, Mignard C i sur. Juvenile limb-girdle muscular dystrophy, Clinical, histopatological and genetic data from a small community living in the Reunion Island. *Brain* 1996;119:295-308.
76. Beckmann JS, Richard I, Hillaire D i sur. A gene for limb-girdle muscular dystrophy maps to chromosome 15 by linkage. *C R Acad Sci III* 1991;312:141-8.
77. Fougerousse F, Broux O, Richard I i sur. Mapping of a chromosome 15 region involved in limb girdle muscular dystrophy. *Hum Mol Genet* 1994;3:285-93.
78. Allamand V, Broux O, Richard I i sur. Preferential localization of the limb-girdle muscular dystrophy type 2A gene in the proximal part of a 1-cM 15q15.1-q15.3. *Am J Hum Genet* 1995;56:1417-30.
79. Young K, Foroud T, Williams P. Confirmation of linkage of limb-girdle muscular dystrophy, type 2, to chromosome 15. *Genomics* 1992;13:1370-1.
80. Passos-Bueno MR, Richard I, Vainzof M. Evidence of genetic heterogeneity for the adult form of limb-girdle muscular dystrophy following linkage analysis with 15q probes in Brazilian families. *J Med Genet* 1993;30:385-7.
81. Duguez S, Bartoli M, Richard I. Calpain 3: a key regulator of the sarcomere? *FEBS J* 2006;273:3427-36.
82. Pogoda TV, Krakhmaleva IN, Lipatova NA, Shakhovskaya NI, Shishkin SS, Limborska SA. High incidence of 550delA mutation of CAPN3 in LGMD patients from Russia. *Human Mutation* 2000;15:295-300.
83. Georgieva B, Todorova A, Tournev I, Mitev V, Plageras P, Kremensky I. 550delA mutation in the calpain 3 (CAPN3) gene: DMD/BMD, SMA, or LGMD2A--clinically misdiagnosed cases. *Am J Med Genet A* 2005;136:399-400.

84. Chrobakova T, Hermanova M, Kroupova I i sur. Mutations in Czech LGMD2A patients revealed by analysis of calpain3 mRNA and their phenotypic outcome. *Neuromuscul Disord* 2004;14:659-65.
85. Canki-Klain N, Milić A, Kovač B i sur. Prevalence of the 550delA mutation in calpainopathy (LGMD 2A) in Croatia. *Am J Med Genet* 2004;125A:152-6.
86. Fanin M, Fulizio L, Nascimbeni AC i sur. Molecular diagnosis in LGMD2A: mutation analysis or protein testing? *Hum Mutat* 2004;24:52-62.
87. Topaloglu H, Dincer P, Richard I i sur. Calpain-3 deficiency causes a mild muscular dystrophy in childhood. *Neuropediatrics* 1997;28:212-6.
88. Dincer P, Leturcq F, Richard I i sur. A biochemical, genetic and clinical survey of autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophies in Turkey. *Ann Neurol* 1997;42:222-9.
89. Urtasun M, Saenz A, Roudaut C i sur. Limb-girdle muscular dystrophy in Guipuzcoa (Basque country, Spain). *Brain* 1998;121:1735-47.
90. Fanin M, Nascimbeni AC, Fulizion L, Angelini C. The frequency of limb girdle muscular dystrophy type 2A in northeastern Italy. *Neuromusc Disord* 2005;15:218-24.
91. Milić A i Canki-Klain N. Calpainopathy (LGMD2A) in Croatia: molecular and haplotype analysis. *Croat Med J* 2005;46:657-63.
92. Bansal D, Miyake K, Vogel SS i sur. Defective membrane repair in dysferlin-deficient muscular dystrophy. *Nature* 2003;423:168-72.
93. Shi W, Chen Z, Schottenfeld BA, Stahl RC, Kunkel LM, Chan Y. Specific assembly pathway of sarcoglycans is dependent on beta- and delta-sarcoglycan. *Muscle Nerve* 2004;29 :409-19.

94. Holt KH i Campbell KP. Assembly of the sarcoglycan complex. Insights for muscular dystrophy. *J Biol Chem* 1998;273:34667-70.
95. Yoshida T, Pan Y, Hanada H, Iwata Y, Shigekawa M. Bidirectional signaling between sarcoglycans and the integrin adhesion system in cultured L6 myocytes. *J Biol Chem* 1998;273:1583-90.
96. Knoll R, Hoshijima M, Hoffman HM i sur. The cardiac mechanical stretch sensor machinery involves a Z disc complex that is defective in a subset of human dilated cardiomyopathy. *Cell* 2002;111:947-55.
97. Valle G, Faulkner G, De Antoni A. Telethonin, a novel sarcomeric protein of heart and skeletal muscle. *FEBS Lett* 1997;415:163-8.
98. Mayans O, van der Ven PFM, Wilm M i sur. Structural basis for activation of the titin kinase domain during myofibrillogenesis. *Nature* 1998;395:863-9.
99. Kudryashova E, Kudryashova D, Kramerova I, Spencer MJ. Trim32 is a ubiquitin ligase mutated in limb girdle muscular dystrophy type 2H that binds to skeletal muscle myosin and ubiquitinates actin. *J Mol Biol* 2005;354:413-24.
100. Esapa CT, Benson MA, Schroder JE i sur. Functional requirements for fukutin-related protein in the Golgi apparatus. *Hum Mol Genet* 2002;11:3319-31.
101. Guroff G. A neutral, calcium-activated proteinase from the soluble fraction of rat brain. *J Biol Chem* 1964;239:149-55.
102. Ohno S, Emori Y, Imajoh S, Kawasaki H, Kisaragi M, Suzuki K. Evolutionary origin of a calcium-dependent protease by fusion of genes for a thiol protease and a calcium-binding protein? *Nature* 1984;312:566-70.
103. Goll DE, Thompson VF, Hongqi L, Wei W, Cong J. The calpain system. *Physiol Rev* 2003;83:731-801.

104. Ohno S, Minoshima S, Kudoh J i sur. Four genes for the calpain family locate on four distinct human chromosome. *Cytogen Cell Genet* 1990;53:225-9.
105. Hosfield CM, Elce JS, Davies P, Jia Z. Crystal structure of calpain reveals the structural basis for  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent protease activity and a novel mode of enzyme activation. *EMBO J* 1999;18:6880-9.
106. Berti PJ i Storer AC. Alignment/Phylogeny of the Papain Superfamily of Cysteine Proteases. *J Mol Biol* 1995;246:273-83.
107. Sorimachi H, Ishiura S, Suzuki K. Structure and physiological function of calpains. *Biochem J* 1997a;328:721-32.
108. Sorimachi H, Ono Y, Suzuki K. Skeletal muscle-specific calpain, p94, and connectin/titin: their physiological functions and relationship to limb-girdle muscular dystrophy type 2A. *Adv Exp Med Biol* 2000;481:383-95.
109. Schad E, Farkas A, Jekely G, Tompa P, Friedrich P. A novel human small subunit of calapins. *Biochem J* 2002;362:383-8.
110. Moldoveanu T, Hosfield CM, Lim D, Elce JS, Jia Z, Davies PL. A  $\text{Ca}(2+)$  switch aligns the active site of calpain. *Cell* 2002;108:649-60.
111. Ma H, Yang HQ, Takano E, Hatanaka M, Maki M. Amino-terminal conserved region in proteinase inhibitor domain of calpastatin potentiates its calpain inhibitory activity by interacting with calmodulin-like domain of the proteinase. *J Biol Chem* 1994;269:24430-6.
112. Tompa P, Musci Z, Orosz G, Friedrich P. Calpastatin subdomains A and C are activators of calpain. *J Biol Chem* 2002;277:9022-6.
113. Spencer MJ i Mellgren RL. Overexpression of a calpastatin trangene in mdx muscle reduces dystrophic pathology. *Hum Mol Genet* 2002;11:2645-55.

114. Croall DE i Demartino GN. Calcium-activated neutral protease (calpain) system: structure, function and regulation. *Physiol Rev* 1991;71:813-47.
115. Hirai S, Kawasaki H, Yaniv M, Suzuki K. Degradation of transcription factors, c-Jun and C-Fos, by calpain. *FEBS Lett* 1991;287: 57-61.
116. Vanags DM, Porn-Ares MI, Coppola S, Burgess DH, Orrenius S. Protease involvement in fodrin cleavage and phosphatidylserine exposure in apoptosis. *J Biol Chem* 1996;271:31075-85.
117. Chua BT, Guo K, Li P. Direct cleavage by the calcium-activated protease calpain can lead to inactivation of caspases. *J Biol Chem* 2000;275:5131-5.
118. Santella L, Kyojuka K, De Riso L, Carafoli E. Calcium, protease action, and the regulation of the cell cycle. *Cell Calcium* 1998;23:123-30.
119. Glading A, Lauffenburger DA, Wells A. Cutting to the chase: calpain proteases in cell motility. *Trends Cell Biol* 2002;12:46-54.
120. Spencer MJ, Croall DE, Tidball JG. Calpains are activated in necrotic fibers from mdx dystrophic mice. *J Biol Chem* 1995;270:10909-14.
121. Shimohama S, Suenaga T, Araki W, Yamaoka Y, Shimizu K, Kimura J. Presence of calpain II immunoreactivity in senile plaques in Alzheimer's disease. *Brain Res* 1991;558:105-8.
122. Azuma M i Shearer TR. Involvement of calpain in diamide-induced cataract in cultured lenses. *FEBS Lett* 1992;307:313-7.
123. Shields DC, Schaecker KE, Saido TC, Banik NL. A putative mechanism of demyelination in multiple sclerosis by a proteolytic enzyme, calpain. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:11486-91.

124. Blomgren K, Zhu C, Wang X i sur. Synergistic activation of caspase-3 by m-calpain after neonatal hypoxia-ischemia: a mechanism of "pathological apoptosis"? *J Biol Chem* 2001;276:10191-8.
125. Yoshida K, Inui M, Harada K i sur. Reperfusion of rat heart after brief ischemia induces proteolysis of caldesmon (nonerythroid spectrin or fodrin) by calpain. *Circ Res* 1995;77:603-10.
126. Mundo E, Soldati L, Bellodi L, Bianchi G. The calpain-calpastatin system in obsessive-compulsive disorder. *Biol Psychiatry* 1997;42:228-9.
127. Sorimachi H, Imajoh-Ohmi S, Emori Y i sur. Molecular cloning of a novel mammalian calcium-dependent protease distinct from both m- and mu- type: specific expression of the mRNA in skeletal muscle. *J Biol Chem* 1989;264:20106-11.
128. Sorimachi H, Kinabara K, Kimura S i sur. Muscle specific calpain, p94, responsible for limb girdle muscular dystrophy type 2A, associates with connectin through IS2, a p94 specific sequence. *J Biol Chem* 1995;270:31158-62.
129. Kinbara K, Sorimachi H, Ishiura S, Suzuki K. Muscle-specific calpain, p94, interacts with the extreme C-terminal region of connectin, a unique region flanked by two immunoglobulin C2 motifs. *Arch Biochem Biophys* 1997;342:99-107.
130. Herasse M, Ono Y, Fougereuse F i sur. Expression and functional characteristics of calpain 3 isoforms generated through tissue-specific transcriptional and posttranscriptional events. *Mol Cell Biol* 1999;19:4047-55.
131. Stockholm D, Herasse M, Marchand S i sur. Calpain 3 mRNA expression in mice after denervation and during muscle regeneration. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001;280:C1561-9.
132. Fougereuse F, Durand M, Suel L i sur. Expression of genes (CAPN3, SGCA, SGCB, and TTN) involved in progressive muscular dystrophies during early human development. *Genomics* 1998;48:145-56.

133. Ma H, Fukiage C, Azuma M, Shearer TR. Cloning and expression of mRNA for calpain Lp82 from rat lens:splice variant of p94. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998;39:454-61.
134. Konig N, Raynaud F, Feane H i sur. Calpain 3 is expressed in astrocytes of rat and *Microcebus* brain. *J Chem Neuroanat* 2003;25:129-36.
135. Taveau M. Caracterisation de la fonction et du mecanisme d'activation de la calpaina 3, une protease musculaire deficiente dans la dystrophie des ceintures de type 2A. Pariz, Francuska: Universite Pais VI-Pierre et Marie Curie; 2003, str. 44.
136. Garcia Diaz BE, Gauthier S, Davies PL. Ca<sup>2+</sup> dependency of calpain 3 (p94) activation. *Biochemistry* 2006;45:3714-22.
137. Sorimachi H, Toyama-Sorimachi N, Saido TC i sur. Muscle-specific calpain, p94, is degraded by autolysis immediately after translation, resulting in disappearance from muscle. *J Biol Chem* 1993;268:10593-605.
138. Kinbara K, Ishiura S, Tomioka S i sur. Purification of native p94, a muscle-specific calpain, and characterisation of its autolysis. *Biochem J* 1998;335:589-96.
139. Taveau M, Bourg N, Sillon G, Roudaut C, Bartoli M, Richard I. Calpain 3 is activated through autolysis within the active site and lyses sarcomeric and sarcolemmal components. *Mol Cell Biol* 2003;23:9127-35.
140. Guyon JR, Kudryashova E, Potts A i sur. Calpain 3 cleaves filamin C and regulates its ability to interact with gamma- and delta-sarcoglycans. *Muscle Nerve* 2003;28:472-83.
141. Cohen N, Kramerova I, Kudryashova E i sur. Identification of putative in vivo substrates of calpain 3 by comparative proteomics of overexpressing transgenic and nontransgenic mice. *Proteomics* 2006;6:6075-84.

142. Ono Y, Shimada H, Sorimachi H i sur. Functional defects of a muscle-specific calpain, p94, caused by mutations associated with limb-girdle muscular dystrophy type 2A. *J Biol Chem* 1998;273:17073-8.
143. Combaret L, Bechet D, Claustre A, Taillandier D, Richard I, Attaix D. Down-regulation of genes in the lysosomal and ubiquitin-proteasome proteolytic pathways in calpain-3-deficient muscle. *Int J Biochem Cell Biol* 2003;35:676-84.
144. Bartoli M i Richard I. Calpains in muscle wasting. *Int J Biochem Cell Biol* 2005;37:2115-33.
145. Kramerova I, Kudryashova E, Venkatraman G, Spencer MJ. Calpain 3 participates in sarcomere remodeling by acting upstream of the ubiquitin-proteasome pathway. *Hum Mol Genet* 2005;14:2125-34.
146. Baghdiguan S, Martin M, Richard I i sur. Calpain 3 deficiency is associated with myonuclear apoptosis and profound perturbation of the I $\kappa$ B $\alpha$ /NF- $\kappa$ B pathway in limb-girdle muscular dystrophy type 2A. *Nat Med* 1999;5:503-11.
147. Richard I, Roudaut C, Marchand S i sur. Loss of Calpain 3 Proteolytic Activity Leads to Muscular Dystrophy and to Apoptosis-associated I $\kappa$ B $\alpha$ /Nuclear Factor  $\kappa$ B Pathway Perturbation in Mice. *J Cell Biol* 2000;151:1583-90.
148. Anderson LV, Harrison RM, Pogue R i sur. Secondary reduction in calpain 3 expression in patients with limb girdle muscular dystrophy type 2B and Miyoshi myopathy (primary dysferlinopathies). *Neuromuscul Disord* 2000;10:553-9.
149. Haravuori H, Vihola A, Straub V i sur. Secondary calpain3 deficiency in 2q-linked muscular dystrophy: titin is the candidate gene. *Neurology* 2001;56:869-77.
150. Huang Y, Verheesen P, Roussis A i sur. Protein studies in dysferlinopathy patients using llama-derived antibody fragments selected by phage display. *Eur J Hum Genet* 2005;13:721-30.



151. Labeit S, Barlow DP, Gautel M i sur. A regular pattern of two types of 100-residue motif in the sequence of titin. *Nature* 1990;345:273-6.
152. Bang ML, Centner T, Fornoff F i sur. The complete gene sequence of titin, expression of an unusual approximately 700-kDa titin isoform, and its interaction with obscurin identify a novel Z-line to I-band linking system. *Circ Res* 2001;89:1065-72.
153. Labeit S i Komerer B. Titins: giant proteins in charge of muscle ultrastructure and elasticity. *Science* 1995;270:293-6.
154. Gautel M, Goulding D, Bullard B, Weber K, Furst DO. Te central Z-disc of titin is assembled from a novel repeat in variable copy numbers. *J Cell Sci* 1996;109:2747-54.
155. Labeit S, Lahmers S, Burkart C i sur. Expression of distinct classes of titin isoforms in striated and smooth muscles by alternative splicing and their conserved interaction with filamins. *J Mol Biol* 2006;362:664-81.
156. Sorimachi H, Freiburg A, Kolmerer B i sur. Tissue-specific expression and  $\alpha$ -actinin binding properties of the Z-disc: implications for the nature of vertebrate Z-discs. *J Mol Biol* 1997b;270:688-95.
157. Kolmerer B, Olivieri N, Witt CC, Herrmann BG, Labeit S. Genomic organisation of the M line titin and its tissue-specific expression in two distinct isoforms. *J Mol Biol* 1996;256:556-63.
158. Granzier HL i Labeit S. The giant protein titin: a major player in myocardial mechanics, signalling, and disease. *Circ Res* 2004;94:284-95.
159. Ohtsuka H, Yajima H, Maruyama K, Kimura S. The N-terminal Z repeat 5 of connectin/titin binds to the C-terminal region of  $\alpha$ -actinin. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;235:1-3.

160. Gregorio CC, Trombitas K, Centner T i sur. The NH2 terminus of titin spans the Z-disc: its interaction with a novel 19-kD ligand (T-cap) is required for sarcomeric integrity. *J Cell Biol* 1998;143:1013-27.
161. Mues A, van der Ven PMF, Young P, Fusrst DO, Gautel M. Two immunoglobulin-like domains of the Z-disc portion of titin interact in a conformation-dependent way with telethonin. *FEBS Lett* 1998;428:111-4.
162. Miller MK, Bang ML, Witt CC i sur. The muscle ankyrin repeat proteins: CARP, aknrd2/Arpp and DARP as a family of titin filament-based stress response molecules. *J Mol Biol* 2003;333:951-4.
163. Nakada C, Tsukamoto Y, Oka A i sur. Altered expression of ARPP protein in skeletal muscles of patients with muscular dystrophy, congenital myopathy and spinal muscular atrophy. *Pathobiology* 2003;71:43-51.
164. Linke WA i Granzier H. A spring tale: new facts on titin elasticity. *Biophys J* 1998;75:2613-4.
165. Gutierrez-Cruz G, van Heerden AH, Wang K. Modular motif, structural folds and affinity profiles of the PEVK segment of human fetal skeletal muscle titin. *J Biol Chem* 2001;276:7442-9.
166. Kulke M, Fujita-Becker S, Rostkova E i sur. Interaction between PEVK-titin and actin filaments: origin of a viscous force component in cardiac myofibrils. *Circ Res* 2001;89:874-81.
167. Soteriou A, Gamage M, Trinick J. A survey of interactions made by the giant protein titin. *J Cell Sci* 1993;104:119-23.
168. Houmeida A, Holt J, Tskhovrebova L, Trinick J. Studies of the interaction between titin and myosin. *J Cell Biol* 1995;131:1471-81.

169. Hackman JPV, Vihola AK, Udd B. The role of titin in muscular disorders. *Ann Med* 2003;35:434-41.
170. Centner T, Yano J, Kimura E i sur. Identification of muscle specific ring finger proteins as potential regulators of the titin kinase domain. *J Mol Biol* 2001;306:717-26.
171. Witt SH, Granzier H, Witt CC, Labeit S. MURF-1 and MURF-2 target a specific subset of myofibrillar proteins redundantly: towards understanding MURF-dependent muscle ubiquitination. *J Mol Biol* 2005;350:713-22.
172. McElhinny AS, Kakinuma K, Sorimachi H, Labeit S, Gregorio CC. Muscle-specific RING finger-1 interacts with titin to regulate sarcomeric M-line and thick filament structure and may have nuclear functions via its interaction with glucocorticoid modulatory element binding protein-1. *J Cell Biol* 2002;157:125-36.
173. Kedar V, McDonough H, Ayra R, Li HH, Rockman HA, Patterson C. Muscle-specific RING finger 1 is a bona fide ubiquitin ligase that degrades cardiac troponin I. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:18135-40.
174. Bodine SC, Latres E, Baumhueter S i sur. Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. *Science* 2001;294:1704-8.
175. Spencer JA, Eliazar S, Ilaria RL, Richardson JA, Olson EN. Regulation of microtubule dynamics and myogenix differentiation by MURF, a striated muscle RING-finger protein. *J Cell Biol* 2000;150:771-84.
176. McElhinny AS, Perry CN, Witt CC, Labeit S, Gregorio CC. Muscle-specific RING finger-2 (MURF-2) is important for microtubule, intermediate filament and sarcomeric M-line maintenance in striated muscle development. *J Cell Sci* 2004;117:3175-88.
177. Pizon V, Iakovenko A, van der Ven PFM i sur. Transient association of titin and myosin with microtubules in nascent myofibrils directed by the MURF2 RING-finger protein. *J Cell Sci* 2002;115:4469-82.

178. Lange S, Xiang F, Yakovenko A i sur. The kinase domain of titin controls muscle gene expression and protein turnover. *Science* 2005;308:1599-1603.
179. Lange S, Auerbach D, McLoughlin P i sur. Subcellular targeting of metabolic enzymes to titin in heart muscle may be mediated by DRAL/FHL-2. *J Cell Sci* 2002;115:4925-36.
180. Blanco G, Coulton GR, Biggin A i sur. The kyphoscoliosis (ky) mouse is deficient in hypertrophic responses and is caused by a mutation in a novel muscle-specific protein. *Hum Mol Genet* 2001;10:9-16.
181. Beatham J, Romero R, Townsend SK, Hacker T, Van den Ven PF, Blanco G. Filamin C interacts with the muscular dystrophy KY protein and is abnormally distributed in mouse KY deficient muscle fibres. *Hum Mol Genet* 2004;13:2863-74.
182. Young P, Ehler E, Gautel M. Obscurin, a giant sarcomeric Rho guanine nucleotide exchange factor protein involved in sarcomere assembly. *J Cell Biol* 2001;154:123-36.
183. Benson MA, Tinsley CL, Blake DJ. Myospryn is a novel binding protein for dysbindin in muscle. *J Biol Chem* 2004;279:10450-8.
184. Tkatchenko AV, Pietu G, Cros N i sur. Identification of altered gene expression in skeletal muscles from Duchenne muscular dystrophy patients. *Neuromuscul Disord* 2001;11:269-77.
185. Durham JT, Brand OM, Arnold M i sur. Myospryn is a direct transcriptional target for MEF2A that encodes a striated muscle, alpha-actinin-interacting, costamere-localized protein. *J Biol Chem* 2006;281:6841-9.
186. Satoh M, Takanashi M, Sakamoto T, Hiroe M, Marumo F, Kimura A. Structural analysis of the titin gene in hypertrophic cardiomyopathy: identification of a novel disease gene. *Biochem Biophys Res Com* 1999;262:411-7.

187. Itoh-Satoh M, Hayashi T, Nishi H i sur. Titin mutations as the molecular basis for dilated cardiomyopathy. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;291:385-93.
188. Gerull B, Gramlich M, Atherton J i sur. Mutations of TTN, encoding the giant muscle filament titin, cause familial dilated cardiomyopathy. *Nat Genet* 2002;30:201-4.
189. De Seze J, Udd B, Haravuori H i sur. The first European family with tibial muscular dystrophy outside the Finnish population. *Neurology* 1998;51:1746-8.
190. Van der Bergh PYK, Bouquiaux O, Verellen C i sur. Tibial muscular dystrophy in a Belgian family. *Ann Neurol* 2003;54:248-51.
191. Fougousse F, Gonin P, Durand M, Richard I, Raymackers JM. Force impairment in calpain 3-deficient mice is not correlated with mechanical disruption. *Muscle Nerve* 2003;27:616-23.
192. Griffiths AJF, Gelbart WM, Miller JH, Lewontin RC. *Modern genetic analysis*. New York: W.H.Freeman & Co;1999.
193. Anderson LV, Davison K, Moss JA i sur. Characterization of monoclonal antibodies to calpain 3 and protein expression in muscle from patients with limb-girdle muscular dystrophy type 2A. *Am J Pathol* 1998;153:1169-79.
194. Fanin M, Nascimbeni AC, Fulizio L, Trevisan CP, Meznaric-Petrusa M, Angelini C. Loss of calpain-3 autocatalytic activity in LGMD2A patients with normal protein expression. *Am J Pathol* 2003;163:1929-36.
195. Talim B, Ognibene A, Mattioli E, Richard I, Anderson LV, Merlini L. Normal calpain expression in genetically confirmed limb-girdle muscular dystrophy type 2A. *Neurology* 2001;56:692-3.
196. Saenz A, Leturcq F, Cobo AM i sur. LGMD2A: genotype-phenotype correlations based on a large mutational survey on the calpain 3 gene. *Brain* 2005;128:732-42.

197. Fanin M, Pegoraro E, Matsuda-Asada C, Brown RH Jr, Angelini C. Calpain-3 and dysferlin protein screening in patients with limb-girdle dystrophy and myopathy. *Neurology* 2001;56:660-5.
198. Bittner RE, Anderson LV, Burkhardt E i sur. Dysferlin deletion in SJL mice (SJL-Dysf) defines a natural model for limb girdle muscular dystrophy 2B. *Nat Genet* 1999;23:141-2.
199. Garvey SM, Rajan C, Lerner AP, FrankelWN, Cox GA. The muscular dystrophy with myositis (mdm) mouse mutation disrupts a skeletal muscle-specific domain of titin. *Genomics* 2002;79:146-9.
200. Improta S, Politou AS, Pastore A. Immunoglobulin-like modules from titin I-band: extensible components of muscle elasticity. *Structure* 1996;4:323-37.
201. Beatham J, Gehmlich K, Van der Ven PF i sur. Constitutive upregulations of titin-based signalling proteins in KY deficient muscles. *Neuromuscul Disord* 2006;16:437-45.
202. Corn PG, McDonald ER, Herman JG, El-Deiry WS. Tat-binding protein-1, a component of the 26S proteasome, contributes to the E3 ubiquitin ligase function of the von Hippel-Lindau protein. *Nat Genet* 2003;35:229-37.

**Internet stranice korištene u pisanju disertacije:**

- The biomedical literature (Pub Med) [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)
- Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM) [www.ncbi.nlm.nih.gov/omim](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim)
- Leiden Muscular Dystrophy pages [www.dmd.nl](http://www.dmd.nl)

Astrid Milić rođena je 7. ožujka 1975. u Sisku. Osnovnu školu završila je u Sisku, a srednju biološku školu u Gimnaziji Petrinja, te u XII Gimnaziji u Zagrebu. 1993. godine upisala je Farmaceutsko-biokemijski fakultet, gdje je 1998. godine diplomirala na smjeru medicinska biokemija. Poslijediplomski studij upisala je 1999. godine na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu, polje biologija, smjer molekularna i stanična biologija. Magistarski rad obranila je 2002. godine, a godinu dana kasnije izabrana je u istraživačko zvanje asistenta na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu.

Od 2000. godine zaposlena je kao znanstveni novak na projektima MZT RH 108041/1998 i 0108052/2002 "Genetsko i epidemiološko istraživanje mišićnih distrofija u Hrvatskoj", pod vodstvom prof.dr.sc. Nine Canki-Klain. U okviru Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu sudjeluje u izvođenju nastave izbornog kolegija I godine dodiplomske nastave «Biologija stanice», odnosno izbornog predmeta doktorskog studija "Genetska osnova i nove dijagnostičke metode monogenских mišićnih i živčanih bolesti".

Tijekom 2000. godine usavršavala se u Parizu u Laboratoriju za biokemiju i molekularnu genetiku, Hôpital Cochin Port Royal i u Institutu za miologiju, Hôpital Pitié-Salpêtrière, a 2002. godine u Laboratoriju za molekularnu genetiku i stanične kulture, Zavod za medicinsku genetiku, Hôpital Timone, Marseille, Francuska (stipendija «Zaklade M.Čačković» Medicinskog fakulteta u Zagrebu). Dobitnica je jednogodišnje stipendije AFM-a (Association Française contre les Myopathies) koju je u akademskoj godini 2005/06 iskoristila za izradu doktorske disertacije u znanstveno-istraživačkom institutu «Généthon» (Evry, Francuska).

Do sada je sudjelovala na 6 međunarodnih kongresa i dvije ljetne škole. Koautor je 4 CC indeksirana znanstvena rada, te 14 kongresnih sažetaka.

Aktivno govori engleski i francuski jezik. Član je Hrvatskog društva za biokemiju i molekularnu biologiju, Društva za kliničku genetiku Hrvatske, te Hrvatskog društva za neuroznanost.

## **POPIS RADOVA:**

### **Popis CC radova:**

**Milić A**, Daniele N, Lochmuller H et al. A third of LGMD2A biopsies have normal calpain 3 proteolytic activity as determined by an *in vitro* assay. *Neuromuscul Disord* 2007;17:148-56

**Milić A**, Canki-Klain N. Calpainopathy (LGMD2A) in Croatia: molecular and haplotype analysis. *Croat Med J* 2005;46:657-63

Canki-Klain N, **Milić A**, Kovač B et al. Prevalence of the 550delA mutation in calpainopathy (LGMD 2A) in Croatia. *Am J Med Genet* 2004;125A:152-6

Šerman Lj, Šerman A, Lauc G, **Milić A**, Latin V, Aleksandrova A, Šerman D. Comparison of glycosylation patterns of placental proteins between normal pregnancy and missed abortion. *Coll Antropol* 2004; 28:301-8

### **Diplomski rad:**

“Glikozilacija proteina placente u normalnoj i patološkoj trudnoći”

### **Magistarski rad:**

“Pojasne mišićne distrofije u Hrvatskoj uzrokovane mutacijama gena za kalpain 3 (CAPN3)”

### **Popis kongresnih sažetaka:**

Daniele N, **Milić A**, Bartoli M et al. Measuring calpain 3 proteolytic activity using an *in vitro* substrate. *Neuromuscul Disord* 2006;16Suppl 1:54-5.

Canki-Klain N, Kovač B, **Milić A**, Malnar M. Clinics, genetics and epidemiology of limb girdle muscular dystrophy type 2A (LGMD2A) in Croatia. *LGMD Symposium* 12-13.5.2006, Evry, Francuska

Canki-Klain N, **Milić A**, Malnar M. Clinical and non-invasive genetic study of first six Croatian patients with dysferlinopathy. *Neuromuscul Disord* 2005; 15:691-2

**Milić A**, Canki-Klain N (2005) Mutation and haplotype analysis of calpainopathy (LGMD 2A) in Croatia. *Myologie/Myology* 2005,226.

Bauer-Šegvić A, **Milić A**, Ljubanović D, Canki-Klain N. Oculopharyngeal muscular dystrophy-case report. 15th Ljudevit Jurak international symposium on comparative pathology, Zagreb 2004, 97.

**Milić A**, Canki-Klain N. Neinvazivna dijagnostika disferlinopatija. *Neurol Croat* 2004; 53Suppl 3:123.



**Milić A**, Zurak N, Brinar V, Canki-Klain N. Oculopharyngeal muscular dystrophy-genotype studies in a Croatian population. *Eur J Hum Genet* 2003;11Suppl 1:203, P0653.

**Milić A**, Piluso G, Ventriglia V et al. Mutation spectrum of CAPN3 gene in LGMD 2A patients in Croatia. *Eur J Hum Genet* 2002;10Suppl 1:181, P0512.

Canki-Klain N, **Milić A**, Kovač B et al. Carrier frequency of 550delA mutation in CAPN3 gene in Croatia. *Acta Myologica* 2002; XXI:73.

Canki-Klain N, Richard P, Mitrović Z, **Milić A**, Urtizbera A, Zurak N. Severe form of oculopharyngeal muscular dystrophy in a Croatian family with compound heterozygote for the (GCG)<sub>8</sub> mutation and (GCG)<sub>7</sub> allele in PABP2 gene. *Neuromuscul Disord* 2001;11:654, F.P.3.4.

**Milić A**, Kovač B, Leturcq F, Zurak N, Canki-Klain N. High incidence of 550delA mutation in limb-girdle muscular dystrophy type 2A (LGMD2A) in Croatia. *Eur J Hum Genet* 2001;9Suppl 1:278, P0909.

Hećimović S, Tanacković G, **Milić A** et al. Molecular diagnosis of Duchenne/Becker muscular dystrophy (DMD/BMD) in Croatia. *Neurol Croat* 2000;49Suppl 3:101.

Canki-Klain N, **Milić A**, Hećimović S et al. DNA analysis contribution to diagnosis in advanced stages of DMD/BMD. *Acta Myologica* 2000; XIX:120.

Canki-Klain N, **Milić A**, Leturcq F, Zurak N. Clinical, genetic and epidemiological study of calpainopathy (LGMD2A) in Croatia. *Neurol Croat* 2000;49Suppl 3:78-9.