

UNIVERZITET U BEOGRADU
HEMIJSKI FAKULTET

DRAGANA B. LAGUNDŽIN

**PROMENA STRUKTURE I
REAKTIVNOSTI VEZUJUĆEG PROTEINA
1 ZA FAKTORE RASTA SLIČNE
INSULINU KAO POSLEDICA
METABOLIZMA GLUKOZE**

DOKTORSKA DISERTACIJA

BEOGRAD, 2014.

UNIVERZITET U BEOGRADU
HEMIJSKI FAKULTET

Dragana B. Lagundžin

**Promena strukture i reaktivnosti
vezujućeg proteina 1 za faktore rasta
slične insulinu kao posledica
metabolizma glukoze**

Doktorska disertacija

Beograd, 2014.

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF CHEMISTRY

Dragana B. Lagundžin

**Alteration of the structure and reactivity
of the insulin-like growth factor binding
protein 1 due to glucose metabolism**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2014.

Mentor: dr Ljuba Mandić, redovni profesor
Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu

Mentor: dr Olgica Nedić, naučni savetnik
Institut za primenu nuklearne energije, Univerzitet u Beogradu

Članovi komisije:

dr Ljuba Mandić, redovni profesor
Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu

dr Olgica Nedić, naučni savetnik
Institut za primenu nuklearne energije, Univerzitet u Beogradu

dr Marija Gavrović Jankulović, redovni profesor
Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu

Datum odbrane doktorske teze: _____

„Za Jayden Luku, Danicu i Ivana“

Eksperimentalni deo ove doktorske disertacije urađen je u Institutu za primenu nuklearne energije-INEP u Zemunu.

Najveću zahvalnost dugujem svom mentoru, dr Olgici Nedić, naučnom savetniku iz INEP-a, koja je predložila temu i rukovodila izradom ovog rada. Neizmerno sam zahvalna na svim savetima i podršci, kao i stručnosti i iskustvu koji su mi pomogli u fazama izrade teze.

Posebno se zahvaljujem dr Ljubi Mandić, redovnom profesoru Hemijskog fakulteta u Beogradu, koja je pratila moj rad od samog početka izrade ove teze. Njena velika zainteresovanost i sugestije su mi bile od izuzetnog značaja da rad privedem kraju.

Takođe želim da se zahvalim dr Mariji Gavrović-Jankulović na interesovanju, predlozima i sugestijama u finalnoj izradi rada.

Od srca se zahvaljujem svom timu, od kojeg sam dobijala podršku i pozitivnu energiju. Dragana, Gorane i Miloše, hvala vam na svemu.

Zahvalila bih se i dr Romani Masnikosi na nesebičnim savetima i idejama, kao i svim svojim kolegama iz INEP-a.

Mojoj mami i bratu se zahvaljujem na razumevanju, strpljenju i pomoći koju su mi od srca pružali svih ovih godina.

Na kraju, zahvalila bih se svom najvećem prijatelju (i kolegici), Sanji, i svim ostalim prijateljima koji su uvek bili uz mene i hrabрили me.

Dragana Lagundžin

Promena strukture i reaktivnosti vezujućeg proteina 1 za faktore rasta slične insulinu kao posledica metabolizma glukoze

IZVOD

Vezujući proteini za faktore rasta slične insulinu (IGFBP), zajedno sa IGF ligandima i IGF receptorima (IGF-1R i IGF-2R) čine sistem koji utiče na rast i razvoj skoro svake ćelije, tkiva i organa. IGFBP-1 je jedini od šest IGFBP molekula čija se koncentracija menja na dnevnoj bazi, u zavisnosti od koncentracije insulina u krvi, odnosno od metaboličkih potreba vezanih za potrošnju glukoze. Kod zdravih osoba je konstatovano postojanje direktne negativne sprege između koncentracije IGFBP-1 i insulina, dok se kod osoba sa izmenjenim metabolizmom glukoze ta sprema često gubi. Cilj ovog istraživanja je bio da se ispita da li se i u kojoj meri IGFBP-1 menja post-translaciono i da li interaguje sa drugim proteinima iz okruženja, što bi moglo doprineti efektima uočenim na nivou ose IGFBP-1/IGF/insulin kod osoba sa nepravilnim metabolizmom glukoze ili osoba izloženih metaboličkom opterećenju.

Eksperimentalno je utvrđeno postojanje monomera, nekoliko fragmenata, oligomera i kompleksa IGFBP-1. Rezultati su dalje pokazali da se kod osoba sa poremećajem u metabolizmu glukoze, kao što su diabetes mellitus ili hipoglikemija, menjaju koncentracije i strukturne karakteristike IGFBP-1. Najintenzivnije post-translacione promene IGFBP-1 se javljaju kod pacijenata sa dijabetesom tipa 2. Prisutnost većeg broja različitih molekulskih formi IGFBP-1 kod ovih pacijenata, pre svega multimera, ukazuje na potencijalno veće učešće IGF sistema u regulaciji koncentracije glukoze u stanju dijabetesa. Profesionalno bavljenje sportom, takođe, dovodi do promene u koncentraciji i strukturi IGFBP-1. Koncentracija ukupnog IGFBP-1 raste kod sportista ali, usled povećane proteolize, značajno se uvećava udeo IGFBP-1 fragmenata. Glavni fragment IGFBP-1 u serumu sportista je mase 9 kDa i, verovatno, nastaje kao posledica povećane aktivnosti matriksne metaloproteaze 9. Primenom masene spektrometrije, kod sportista je ustanovljena izmenjena reaktivnost IGFBP-1 na čipovima sa različitim jonoizmenjivačkim površinama, ukazujući na promenu u fizičko-hemijskim karakteristikama IGFBP-1, pre svega u naelektrisanju. Pušenje, kao uzročnik stvaranja slobodnih radikala i dodatni faktor rizika od vaskularnih komplikacija kod dijabetičara, prema dobijenim rezultatima, nije od uticaja na oligomerizaciju (oksidaciju) IGFBP-1 u cirkulaciji.

Na kraju, opšti zaključak bi bio da promene u metabolizmu glukoze, bez obzira da li su izazvane poremećajima ili povećanom potrebom za glukozom, dovode do promene u koncentraciji i strukturi IGFBP-1, što se u najvećoj meri iskazuje kroz izmenjen stepen oligomerizacije i proteolize IGFBP-1. Proces stvaranja kompleksa IGFBP-1 sa α 2-makroglobulinom je najotporniji na uticaje. Pošto oligomeri i fragmenti IGFBP-1 uglavnom ne vezuju IGF ligande, redistribucijom IGFBP-1 između više različitih molekulskih formi, u uslovima izmenjenog metabolizma glukoze, može se znatno uticati na stepen vezivanja, odnosno biodostupnosti IGF peptida.

Ključne reči: IGFBP-1, post-translacione promene, metabolizam glukoze, Diabetes Mellitus tip 2, hipoglikemija, sport, pušenje

Naučna oblast: Biohemija

Uža naučna oblast: Biohemija proteina

UDK broj: 577.112

Alteration of the structure and reactivity of the insulin-like growth factor binding protein 1 due to glucose metabolism

ABSTRACT

The insulin-like growth factor binding proteins (IGFBPs), IGF ligands and IGF receptors (IGF-1R i IGF-2R) comprise a system involved in growth and development of almost every cell, tissue and organ. Among six IGFBPs, IGFBP-1 is the only one that exhibits diurnal variation and correlates with the level of insulin in blood. Concentrations of IGFBP-1 and insulin are inversely proportional in healthy people. That correlation could be lost in the case of altered glucose metabolism. The aim of this study was to examine whether and to what extent IGFBP-1 changes post-translationally and whether IGFBP-1 interacts with other proteins in the surrounding that could contribute to the effects detected in the IGFBP-1/IGF/insulin axis in persons with impaired glucose metabolism or in those with hypermetabolism.

The existence of IGFBP-1 monomer, several fragments, oligomers and complexes was confirmed experimentally. The results have further shown that IGFBP-1 concentration and structure undergo certain changes in patients with impaired glucose metabolism, as in the case of diabetes mellitus and hypoglycemia. The most pronounced post-translational modifications of IGFBP-1 were seen in patients with diabetes type 2. The presence of the greatest number of different forms of IGFBP-1, especially oligomeric, in these patients suggests possibly greater involvement of the IGF system in glucose regulation in the state of diabetes. Professional physical training may also lead to alterations in the concentration and structure of IGFBP-1. The total concentration of IGFBP-1 increases in athletes, however, due to extensive proteolysis, the concentration of IGFBP-1 fragments increases significantly. The main IGFBP-1 fragment in the sera of athletes is of 9 kDa, and it is most likely produced by the increased activity of matrix metalloproteinase 9. Altered reactivity of IGFBP-1 in athletes was detected by using mass spectrometry and chips with different ion-exchange surfaces, suggesting changes in physico-chemical characteristics of IGFBP-1, namely charge density. According to our findings, cigarette smoking, known to cause free radical generation and cardiovascular complications in diabetes, had no effect on oligomerisation (oxidation) of IGFBP-1 in the circulation.

In conclusion, changes in glucose metabolism lead to alterations in the concentration and structure of IGFBP-1. These alterations are mostly expressed through modified oligomerization and proteolysis of IGFBP-1. The formation of complexes between IGFBP-1 and α 2-macroglobulin seems to resist changes. Since oligomers and fragments of IGFBP-1 mostly do not bind IGF molecules, redistribution of IGFBP-1 between several molecular forms, in the case of altered glucose metabolism, can affect degree of IGF binding or its bioavailability.

Key words: IGFBP-1, post-translational modifications, glucose metabolism, Diabetes Mellitus 2, hypoglycemia, sport, smoking

Scientific field: Biochemistry

Special scientific field: Biochemistry of proteins

UDK number: 577.112

SKRAĆENICE

α 2M – alfa2-makroglobulin

AIDS – sindrom stečene imunodeficijencije

ALS – podjedinica nestabilna u kiseljoj sredini

ALT – alanin aminotransferaza

AST – aspartat aminotransferaza

BMI - „body mass index“

CHO ćelije – ćelije jajnika kineskog hrčka

CK – kreatin kinaza

ConA – lektin iz *Canavalia ensiformis*

D – pacijenti sa dijabetesom tip 2

DEAE – dietilaminoetil

DJ – denzitometrijska jedinica

DM – Diabetes Mellitus

DNK – dezoskiribonukleinska kiselina

ECL – lektin iz *Erythrina cristagalli*

EDTA - dinatrijum-etilendiamin-tetrasirćetna kiselina

ELISA – imunoenzimski test

FGR – zastoj u rastu fetusa

Fuc – fukoza

GH – hormon rasta

GlcNAc – N-acetil-glukozamin

H – pacijenti sa hipoglikemijom

HbA1c – glikovani hemoglobin

HBS – pufer koji sadrži HEPES i NaCl

HEPES - 4-(2-hidroksietil)-1-piperazin-etansulfonska kiselina

IAC – imunoafinitetna hromatografija

IDA – iminodisirćetna kiselina

Ig – imunoglobulin
IGF – faktor rasta sličan insulinu
IGFBP – vezujući protein za faktore rasta slične insulinu
IGFBP-Pr – proteaza vezujućeg proteina za faktore rasta slične insulinu
IGF-R – receptor za faktore rasta slične insulinu
IL – interleukin
IMAC – imobilizovana metal-afinitetna hromatografija
IP – imunoprecipitacija
K – kontrolni uzorak
Kd – konstanta disocijacije
Lac – laktoza
LAC – lektinska afinitetna hromatografija
LCA – lektin iz *Lens culinaris*
LDH – laktat dehidrogenaza
Man – manoza
MES – pufer koji sadrži 2-(N-morfolino)-etansulfonsku kiselinu i NaCl
MMP – matriksna metaloproteaza
NGF – γ -nervni faktor rasta
OGTT – oralni test tolerancije glukoze
P – pušači
PBS – fosfatni pufer sa NaCl
PHA-E – lektin iz *Phaseolus vulgaris E*
PHA-L – lektin iz *Phaseolus vulgaris L*
PSA- prostata specifični antigen
PZU – pufer za pripremu uzoraka
RCA-I – lektin iz *Ricinus communis*
RIA – radioimunološki test
S – sportisti
SDS - natrijum-dodecil-sulfat
SNA – lektin iz *Sambucus nigra*

SPA – sinapinska kiselina

sWGA – sukcinilovani lektin iz *Triticum vulgare*

TBS – pufer koji sadrži Tris i NaCl

TBST – pufer koji sadrži Tris, NaCl i Tween

TEMED - N,N,N',N' – tetrametilen-diamin

TFA – trifluorosirćetna kiselina

TG – transglutaminaza

TIBC – ukupni kapacitet vezivanja gvožđa

TIMP – tkivni inhibitor matriksnih metaloproteaza

Tris - Tris(hidroksimetil)-aminometan

TSH – hormon koji stimulira tiroideu

UEA – lektin iz *Ulex europaeus*

WGA – lektin iz *Triticum vulgare*

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. PREGLED LITERATURE	3
2.1 Sistem faktora rasta sličnih insulinu	3
2.1.1 Strukturne karakteristike komponenti IGF sistema kod ljudi	4
2.1.1.1 Faktori rasta slični insulinu (IGF-I i IGF-II)	4
2.1.1.2 IGF receptori (IGF-1R i IGF-2R)	5
2.1.1.3 IGF vezujući proteini (IGFBP)	6
2.1.1.4 IGFBP proteaze (BP-Pr)	8
2.1.2 Sinteza, fiziološke koncentracije i regulacija IGF i IGFBP molekula	9
2.1.3 Fiziološka uloga IGF sistema	13
2.2 IGF sistem i metabolizam glukoze	16
2.2.1 Homologija insulin/IGF i IR/IGF-1R	16
2.2.2 Sprega insulin/IGFBP-1/IGF-I	19
2.3 Post-translacione modifikacije IGFBP-1	20
2.3.1 Fosforilovanje IGFBP-1	22
2.3.2 Proteoliza IGFBP-1	25
2.3.3 Polimerizacija IGFBP-1	26
2.3.4 Kompleksi IGFBP-1 sa drugim molekulima	27
2.4 Učešće IGFBP-1 u pojedinim (pato)fiziološkim procesima	28
2.4.1 Oralni test tolerancije glukoze – OGTT	29
2.4.2 Diabetes mellitus tip 2 –DM2.....	30
2.4.3 Hipoglikemija	31
2.4.4 Aktivni trening	32

2.4.5 Fetalni rast	33
3. MATERIJAL I METODE	36
3.1 Osnovne hemikalije	36
3.2 Puferi i rastvori	39
3.3 Smole	41
3.4 Antitela	41
3.5 Uređaji i aparati	42
3.6 Uzorci seruma	42
3.7 Određivanje standardnih biohemijskih parametara	44
3.8 Određivanje koncentracije insulina, IGF-I i IGFBP-1	44
3.9 Određivanje specifičnosti antitela	44
3.10 Izolovanje IGFBP-1 iz amnionske tečnosti i citosola placente	45
3.11 Imobilizovana metal-afinitetna hromatografija (IMAC).....	46
3.12 Imunoafinitetna hromatografija (IAC)	47
3.13 Lektinska afinitetna hromatografija (LAC).....	47
3.14 Imunoprecipitacija (IP).....	48
3.15 Elektroforetsko razdvajanje proteina (SDS-PAGE) i imunoblot	48
3.16 Želatinska zimografija	49
3.17 SELDI-TOF masena spektrometrija	49
3.18 Denzitometrijska analiza	50
3.19 Statistička obrada podataka	51
4. REZULTATI I DISKUSIJA	52
4.1 Izolovanje IGFBP-1.....	52
4.1.1 Izolovanje IGFBP-1 iz amnionske tečnosti	53
4.1.2 Izolovanje IGFBP-1 iz citosola placente	56
4.2 Specifičnost anti-IGFBP-1 antitela	57
4.2.1 Ispitivanje specifičnosti anti-IGFBP-1 antitela metodom imunoblota	57

4.2.2 Ispitivanje specifičnosti anti-IGFBP-1 antitela metodom vezivanja liganda	60
4.3 Ispitivanje i razdvajanje molekularskih formi IGFBP-1 metodama afinitetne hromatografije	61
4.3.1 Ispitivanje formi IGFBP-1 metodom metal-afinitetne hromatografije	62
4.3.2 Ispitivanje formi IGFBP-1 metodom imunoafinitetne hromatografije	65
4.3.3 Ispitivanje formi IGFBP-1 metodom lektinske afinitetne hromatografije	68
4.4 Ispitivanje povezanosti metabolizma glukoze i insulina sa promenama u IGFBP-1	70
4.4.1 Ispitivanje formi IGFBP-1 metal-afinitetnom hromatografijom kod zdravih osoba i pacijenata sa DM2 ili hipoglikemijom	72
4.4.2 Ispitivanje formi IGFBP-1 imunoafinitetnom hromatografijom kod zdravih osoba i pacijenata sa DM2 ili hipoglikemijom	73
4.4.3 Analiza fragmenata IGFBP-1 metodom SELDI-TOF/MS kod zdravih osoba i pacijenata sa DM2 ili hipoglikemijom	75
4.5 Ispitivanje povezanosti intenzivne fizičke aktivnosti sa promenama IGFBP-1	79
4.5.1 Ispitivanje formi IGFBP-1 kod sportista metodom imunoblota	80
4.5.2 Ispitivanje formi IGFBP-1 kod sportista imunoafinitetnom hromatografijom	84
4.5.3 Ispitivanje aktivnosti MMP-9 metodom želatiniske zimografije	86
4.5.4 Analiza fragmenata IGFBP-1 metodom SELDI-TOF/MS kod sportista i neaktivnih osoba	87
4.6 Ispitivanje povezanosti pušenja sa promenama IGFBP-1	90
5. ZAKLJUČCI.....	93
6. LITERATURA.....	95

1. UVOD

IGF sistem čine faktori rasta slični insulinu (IGF-I i IGF-II), dva tipa membranskih receptora (IGF-1R i IGF-2R), šest vezujućih proteina (IGFBP-1 do IGFBP-6) i njihove proteaze. Zbog strukturne homologije IGF molekula i insulina, kao i IGF-1R i insulinskog receptora (IR), veliki je stepen unakrsne reaktivnosti. Insulin vezan za IGF-1R može izazvati mitozu i rast ćelija, a IGF-I ili IGF-II vezan za IR može stimulisati metabolizam glukoze. Utvrđeno je i postojanje hibridnog IGF-1R/IR receptora, o čijoj se ulozi jako malo zna. Faktori koji kontrolišu, i pre svega odlučuju, koji će se ligand vezati za koji receptor i šta će biti fiziološka posledica te interakcije, su uglavnom nepoznati. Sposobnost IGF molekula da stimulišu transport glukoze u ćelije je oko 100 puta manja od efekta insulina, ali je koncentracija IGF peptida u krvi oko 1000 puta veća nego insulina. Ujedno, IGF molekuli su već prisutni u cirkulaciji, u kompleksima sa IGFBP, dok se insulin, kada se ukaže potreba za njim, mora prvo izlučiti iz pankreasa. Zaliha insulina je relativno mala i, nakon izlučivanja, se mora brzo ponovo sintetisati. Sa druge strane, IGF/IGFBP kompleksi su rezervoar u cirkulaciji. Sve skupa, potencijalno dejstvo IGF peptida nije zanemarljivo.

IGFBP-1 je jedini od šest IGFBP molekula čija se koncentracija menja na dnevnoj bazi, u zavisnosti od koncentracije insulina u krvi, odnosno od metaboličkih potreba vezanih za potrošnju glukoze. Kod zdravih osoba je konstatovano postojanje direktne negativne sprege između koncentracije IGFBP-1 i insulina. Kod osoba sa izmenjenim metabolizmom glukoze, ta sprega se često gubi, a nepoznato je koji faktori posreduju. IGFBP-1 ima nekoliko Ser ostataka koji podležu fosforilovanju. Do sada je utvrđeno postojanje nefosforilovane i pet fosforilovanih formi IGFBP-1. One vezuju ligande sa različitim afinitetom, a afinitet raste sa stepenom fosforilovanja. Nefosforilovana i manje fosforilovane forme IGFBP-1 imaju manji afinitet za IGF ligande nego receptori, dok fosfoforme sa velikim brojem fosfatnih grupa čine IGFBP-1 inhibitorom dejstva IGF. Poznato je da je IGFBP-1 supstrat za tkivnu transglutaminazu i da se stvaraju dimeri i veći oligomeri. Afinitet oligomera za IGF je izuzetno mali, a udeo ukupnog IGFBP-1 u oligomerima može biti značajan. Nije poznat mehanizam koji kontroliše stepen oligomerizacije i fiziološke posledice njihovog stvaranja. Fragmenti

IGFBP-1 (kao i ostalih IGFBP) uglavnom ne vezuju IGF, pa je proteoliza jedan od načina da se kontroliše njegova koncentracija i vezivanje IGF. Što je veći stepen fosforilovanja IGFBP-1, veća je proteolitička rezistencija. IGFBP-1 stvara komplekse sa α 2-makroglobulinom i pretpostavka je da ovaj kompleks štiti IGFBP-1 od proteolize. O drugim ulogama kompleksa se ne zna.

Kada se govori o metabolizmu glukoze, posebni pravac čini metabolizam sportista. Sportisti su, naime, sa posebnim zahtevima u pogledu obezbeđenja energije. Profesionalno bavljenje sportom nameće ekstremne metaboličke uslove i opseg promena je daleko veći nego kod osoba koje nisu aktivne. U interesu sporta je da se uvrđi na koji način IGFBP-1 doprinosi metabolizmu glukoze pod fizičkim opterećenjem i može li se rasporedom i sadržajem treninga (i ishrane) postići bolja kontrola promene glukoze.

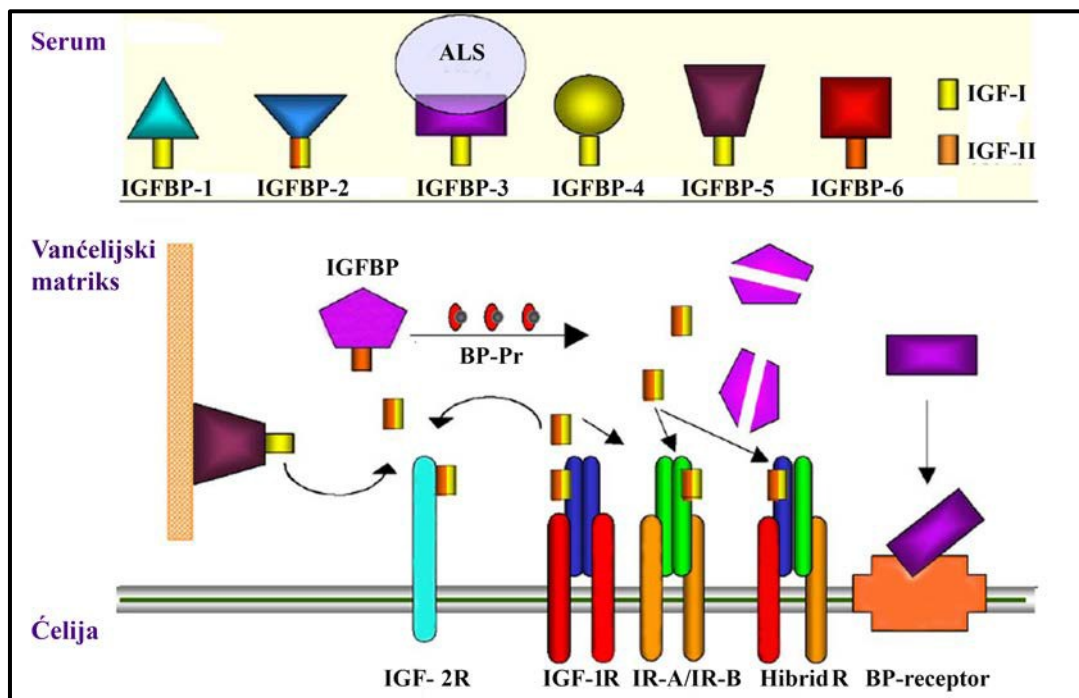
Tema ovog rada je bilo ispitivanje da li se i u kojoj meri događaju post-translacione promene IGFBP-1, kao i interakcije sa drugim proteinima iz okruženja, koje bi mogle doprineti efektima uočenim na nivou ose IGFBP-1/IGF/insulin kod osoba sa nepravilnim metabolizmom glukoze ili metabolizmom pod opterećenjem. U radu su kao uzorci korišćeni serumski pet grupa ispitanika: zdrave odrasle osobe, pacijenti sa dijabetesom tip 2, pacijenti sa hipoglikemijom, sportisti i pušači.

Ciljevi ovog istraživanja su bili: a) optimizacija postupka izolovanja IGFBP-1 (hromatografskim metodama - gel filtracija, jonoizmenjivačka, hidrofobna), b) određivanje koncentracija insulina, IGF-I i IGFBP-1 (radioimunohemijskim i imunoenzimskim metodama), c) razdvajanje IGFBP-1 molekularnih vrsta iz uzoraka (hromatografskim metodama - metal-, lektin- i imunoafinitetna, elektroforezom i metodama blota – ligand, imuno i lektin), d) utvrđivanje stepena proteolize IGFBP-1 u serumu (zimografijom), e) praćenje interakcija uz primenu 125 I-IGF-I (gama spektrometrijom) i f) ispitivanje fizičko-hemijskih karakteristika IGFBP-1 (masenom spektrometrijom sa čipovima različitih reaktivnih površina, SELDI-TOF/MS).

2. PREGLED LITERATURE

2.1 Sistem faktora rasta sličnih insulinu

Sistem faktora rasta sličnih insulinu (IGF) predstavlja složeni sistem koga sačinjavaju: peptidni hormoni (IGF-I i IGF-II), membranski receptori (IGF-1R i IGF-2R), IGF vezujući proteini (IGFBP-1 do IGFBP-6) i IGFBP proteaze (BP-Pr). IGF ligandi ostvaruju svoje dejstvo vezujući se za specifične membranske receptore i sekretorne vezujuće proteine. Na Slici 1 šematski su prikazane osnovne komponente IGF sistema (1).



Slika 1. Šematski prikaz komponenti IGF sistema

Komponente IGF sistema i njihove složene interakcije zajedno regulišu važne biološke procese kao što su ćelijski rast, proliferacija, diferencijacija, apoptoza, migracija i transformacija ćelija. Pored navedenih činilaca IGF sistema, zbog preklapajućih funkcija i unakrsne reaktivnosti, u ovaj sistem u „širem smislu” se mogu svrstati i insulin, dve forme insulinskog receptora (IR-A i IR-B) i hibridni receptor (IGF-1R/IR). IGF sistem utiče na somatski rast tokom celog životnog ciklusa. Pored regulacije rasta, IGF sistem ima značajnu ulogu u metabolizmu ugljenih hidrata, lipida i proteina.

2.1.1 Strukturne karakteristike komponenti IGF sistema kod ljudi

2.1.1.1 Faktori rasta slični insulinu (IGF-I i IGF-II)

IGF-I i IGF-II su jednolančani peptidi (~7,6 kDa) koji se sastoje od 70, odnosno, 67 ostataka aminokiselina. Oba peptida imaju četiri domena: B, C, A i D (redosled od N- do C-terminalnog kraja). Međusobno se IGF-I i IGF-II molekuli razlikuju u 30% sekvence, i to u najvećoj meri u domenima C i D (1, 2). Tri disulfidna mosta se formiraju u okviru strukture IGF-I: Cys⁶-Cys⁴⁸, Cys¹⁸-Cys⁶¹ i Cys⁴⁷-Cys⁵² (1). Aminokiselinski ostaci na IGF-I molekulu, koji su značajni za vezivanje IGF-1R, su Ala⁸, Glu⁹, Val¹¹, Phe²³ i Tyr²⁴ u B domenu, Arg³⁶ i Arg³⁷ u C domenu i Val⁴⁴ u A domenu (1). Zamenom B domena na IGF-I molekulu sa ekvivalentnim delom molekula insulina, umanjujese afinitet vezivanja za IGF vezujuće proteine 1000 puta (3). Aminokiselina Glu³ na IGF-I, odnosno Glu⁶ na IGF-II je značajna za vezivanje svih IGF vezujućih proteina (1). Struktura IGF-II molekula je proučena u mnogo manjoj meri od IGF-I, a kristalna struktura do sada nije definisana (1). Urađena je strukturna analiza interakcije IGF-II i njegovog receptora IGF-2R, i zaključeno je da su za vezivanje direktno odgovorni hidrofobni ostaci aminokiselina Leu⁸, Phe¹⁹ i Leu⁵³ na molekulu IGF-II, kao i Glu⁶, Thr¹⁶ i Asp²⁵ koji se nalaze u blizini (4).

2.1.1.2 IGF receptori (IGF-1R i IGF-2R)

Receptor IGF-1R pripada grupi transmembranskih tirozin-kinaza, sintetizira se od glikozilovanog prekursora i dalje podleže procesima dimerizacije i proteolize. Nastaju α i β strukturne podjedinice povezane disulfidnim vezama (5). Dve vanćelijske α podjedinice od 135 kDa i dve transmembranske β podjedinice od 95 kDa čine heterotetramer β - α - α - β od 350 kDa (6-8). Mesta za vezivanje liganda nalaze se na α podjedinici, dok je domen tirozin-kinaze smešten na citoplazmatskom delu regiona β podjedinice. Ligandi se vezuju za IGF-1R različitim afinitetima (1, 9): najveći afinitet vezivanja je za IGF-I ($K_d=0,2$ nM), 2-15 puta manji je afinitet za IGF-II i najmanji afinitet je za insulin ($K_d>100$ nM). Aktivacijom IGF-1R mogu se izazvati različiti odgovori: ćelijska proliferacija, diferencijacija, migracija ili zaštita od apoptoze (1, 2).

Receptor IGF-2R (300 kDa), poznat kao katjon-nezavisni manozna-6-fosfatni (M6P) receptor, strukturno je potpuno različit od IGF-1R. Receptor je jednolančani polipeptid koji se sastoji iz tri regiona: vanćelijskog, kojeg čine 15 ponavljajućih domena od po 147 ostataka aminokiselina (10), transmembranskog (23 ostatka aminokiselina) i unutarćelijskog, koga čine 163 ostatka aminokiselina (11). IGF-2R vezuje molekul IGF-II sa velikim afinitetom ($K_d=0,2$ nM), ima veoma mali afinitet za IGF-I ($K_d=0,4$ pM), a insulin ne vezuje (12-14). IGF-2R, takođe, vezuje proteine koji sadrže M6P. Ključni domeni za vezivanje IGF-II za IGF-2R su 11 i 13 (15), dok se molekuli koji sadrže M6P vezuju za domene 1-3 i 7-9 (16, 17).

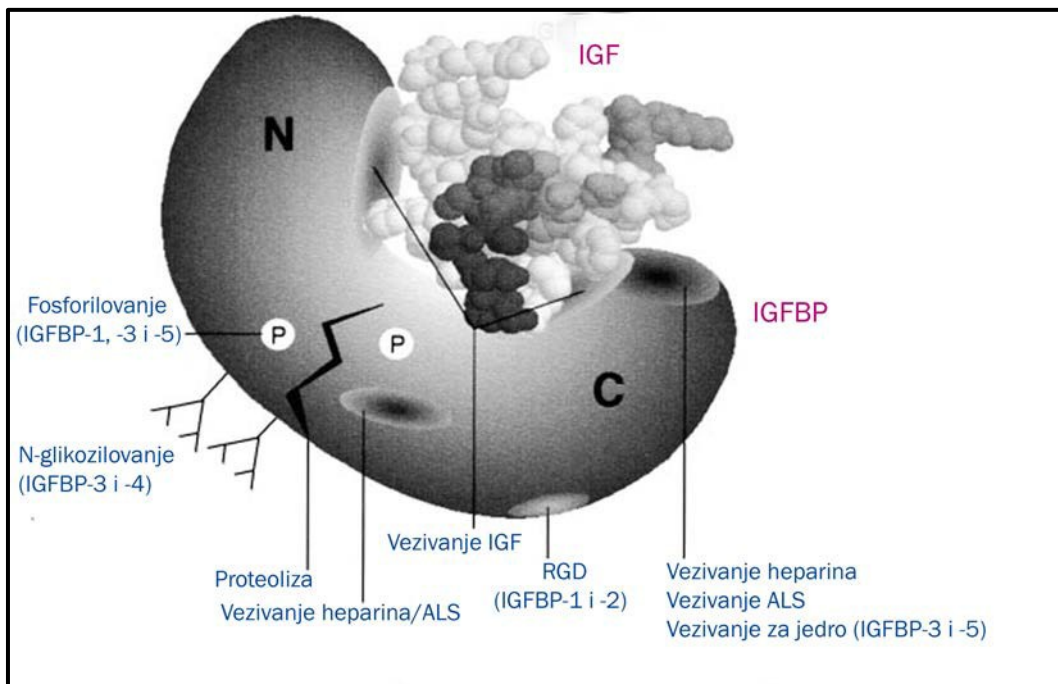
Hibridni receptori nastaju heterodimerizacijom polovina receptora IGF-1R i IR, i mogu vezati sva tri liganda: insulin, IGF-I i IGF-II (18). Studije su pokazale da se hibridni receptori funkcionalno više ponašaju kao IGF-1R nego IR, jer je njihova aktivacija i vezivanje IGF-I sličnog afiniteta kao tipični IGF-1R (18). Aktivacija hibridnog receptora insulinom, sa druge strane, je sa mnogo manjim afinitetom (18). Smatra se da je uloga ovog receptora u povećavanju osetljivosti ćelije na IGF-I, jer se prisustvom dve vrste receptora obezbeđuje više mesta za vezivanje. Takođe, različite izoforme IR (IR-A i IR-B) doprinose funkcionalnim razlikama hibridnih receptora. Afinitet vezivanja IGF-II za IR-A je vrlo veliki, tako da se IR-A smatra drugim po

važnosti receptorom za IGF-II kod fetalnih i malignih ćelija, što nije slučaj za IR-B (18).

2.1.1.3 IGF vezujući proteini (IGFBP)

IGF vezujući proteini predstavljaju familiju od šest strukturno sličnih proteina, koji vezuju IGF ligande sa velikim afinitetom i specifičnošću (11). Sekvenciona analiza je pokazala 50% homologije ovih proteina u okviru iste vrste i 80% homologije istog IGFBP molekula kod različitih vrsta kičmenjaka. Prekursori svih šest vezujućih proteina su forme koje imaju sekretorne signalne peptide (20-39 aminokiselina), dok se svi zreli, formirani proteini nalaze u vanćelijskom matriksu (16). IGFBP molekuli se sastoje od 216 do 289 aminokiselinskih ostataka (19). Svi vezujući proteini imaju istu domensku organizaciju, odnosno tri domena slične veličine. Razlikuju se: N- i C-terminalni domeni, čija je struktura očuvana prilikom nastajanja različitih IGFBP molekula i L-centralni, varijabilni domen. Za vezivanje IGF molekula odgovorni su terminalni domeni, dok se na L-domenu nalaze mesta za potencijalne post-translacione modifikacije (Slika 2).

N-terminalni domen sadrži 6 disulfidnih veza, koje formiraju ostaci Cys kod svih vezujućih proteina, osim kod IGFBP-6 koji ima 5 disulfidnih mostova. Fragmenti IGFBP molekula koji sadrže N-terminalni domen mogu i samostalno vezati IGF peptide sa afinitetom koji je 10-1000 puta manji od afiniteta celog molekula IGFBP (20). C-terminalni domen, takođe, sadrži Cys ostatke, koji formiraju 3 disulfidne veze kod svih vezujućih proteina. Rezultati nekih studija ukazuju da izolovani C-fragment ne vezuje IGF-I (21), dok je, prema drugim studijama, takvo vezivanje moguće. Prema ovoj drugoj grupi, afinitet C-fragmenta za IGF-I je do 1000 puta manji od afiniteta celog IGFBP (22-24). L-centralni domen ne sadrži ostatke Cys, osim kod IGFBP-4. Fragmenti IGFBP, pored toga što posreduju u interakcijama u kojima učestvuju IGF ligandi, mogu imati i ligand nezavisna dejstva, nakon vezivanja za druge molekule (najčešće na površini ćelija).



Slika 2. Struktura IGFBP molekula – funkcionalni domeni, mesta za post-translacione modifikacije i mesta za interakciju sa drugim molekulima (preuzeto iz reference 16)

IGFBP-1 je prvo izolovan iz ljudske placente kao placentalni protein 12 (25). Kod čoveka, sastoji se iz 234 aminokiseline. L-domen ima puno ostataka Pro, Glu, Ser i Thr (PEST) i u regionu ovih aminokiselina dolazi do proteolize (26). Drugi karakteristični motiv u strukturi IGFBP-1 je Arg-Gly-Asp (RGD) sekvenca u C-domenu, koju prepoznaju membranski integrini. Interakcija IGFBP-1 sa integrinima otvara put ka procesima u kojima ovaj vezujući protein može ispoljiti IGF nezavisna dejstva (27). IGFBP-1 može postojati u nativnom obliku, kao prost protein (25 kDa) ili u obliku izoformi koje se međusobno razlikuju po stepenu fosforilovanja (~30 kDa). Jones i saradnici su 1993. definisali potencijalna mesta fosforilovanja IGFBP-1 iz cirkulacije u L-domenu: Ser¹⁰¹, Ser¹¹⁹ i Ser¹⁶⁹ (28). Metodom masene spektrometrije otkrivena je izoforma fosforilovana na Ser⁹⁸. U eksperimentu sa ćelijama je ustanovljeno da se ovo fosforilovanje odigrava kao posledica hipoksije (29). Izoforma fosforilovana na Ser⁹⁵ karakterističnija je za IGFBP-1 iz amnijske tečnosti (26). pI vrednost IGFBP-1 je 4,0-4,8.

Pošto se ova doktorska teza bavi strukturnim promjenama, interakcijama i fiziološkim značajem IGFBP-1, drugi vezujući proteini će biti samo spomenuti u sklopu celovitog IGF sistema.

IGFBP-2 (36 kDa) je protein koji sadrži RGD sekvencu (27), a njegova pI vrednost je 6,2-7,1. IGFBP-3 je najzastupljeniji vezujući protein čija neglikozilovana forma ima masu 29 kDa. Postoje tri mesta u centralnom varijabilnom delu za N-glikozilovanje: Asn⁸⁹, Asn¹⁰⁹ i Asn¹⁷² (30). U cirkulaciji se nalaze dve glikoforme mase 40 i 45 kDa, koje grade stabilan kompleks sa glikoproteinom ALS („acid labile subunit“). IGFBP-3 podleže fosforilovanju na Ser¹¹¹ i Ser¹¹³ (31, 32). pI vrednost neglikozilovane forme je 6,0-9,0, a glikoformi 4,8-8,2. IGFBP-4, takođe, podleže N-glikozilovanju, prisutan je u dve izoforme od 24 i 28 kDa, a njegova pI vrednost je 6,1-6,3 (33). IGFBP-5 postoji u obliku nekoliko glikoformi mase između 29 i 34 kDa, a potencijalna mesta O-glikozilovanja su Thr¹⁰³, Thr¹⁰⁴ i Thr¹¹¹ (34). IGFBP-5 podleže fosforilovanju, gradi komplekse sa ALS i njegova pI vrednost je 6,4-8,0. IGFBP-6 je O-glikozilovan dajući veći broj glikoformi mase 28-34 kDa i pI vrednosti 4,8-5,8. Potencijalna mesta O-glikozilovanja su Thr¹¹⁹, Thr¹²¹, Thr¹²², Thr²¹², Ser¹²⁰, Ser¹²⁴ i Ser²⁰⁸ (35).

2.1.1.4 IGFBP proteaze (BP-Pr)

IGFBP proteaze (BP-Pr) su prvi put nađene u cirkulaciji trudnica kao uzročnici proteolitičke degradacije IGFBP-3 (36). Nakon toga, proteaze su otkrivene i u drugim telesnim tečnostima, u različitim fiziološkim i patofiziološkim stanjima. BP-Pr se mogu svrstati u tri klase: serin proteaze (kalikreini), katepsini i matriksne metaloproteaze, MMP (37). Prostata specifični antigen (PSA) je serin proteaza sposobna za razgradnju IGFBP-3 i IGFBP-5 (38). γ -nervni faktor rasta (NGF) pripada istoj grupi proteaza, ima 65% strukturne homologije sa PSA, a proteolitičku aktivnost ispoljava prema IGFBP-4 i IGFBP-6 (38). Katepsini su unutarćelijske lizozomalne proteinaze koje su aktivne u kiseloj sredini. Katepsin D, na primer, je sposoban da razlaže sve IGFBP molekule (38). Matriksne metaloproteaze su hidrolaze za čiju je aktivnost neophodno prisustvo

određenih metalnih jona. Grupu matriksnih metaloproteaza nađenih kod ljudi čine 23 različita proteina, koji se mogu podeliti u šest klasa: kolagenaze (MMP-1, MMP-8, MMP-13 i MMP-18), želatinaze (MMP-2 i MMP-9), stromelizini (MMP-3, MMP-10 i MMP-11), matrilizini (MMP-7 i MMP-26), matriksne metaloproteaze membranskog tipa (MT(1-6)-MMP) i klasa heterogenih MMP (39). Različite matriksne metaloproteaze imaju afinitet prema različitim IGFBP molekulima.

2.1.2 Sinteza, fiziološke koncentracije i regulacija IGF i IGFBP molekula

Poreklo IGF molekula u cirkulaciji je pretežno iz jetre (40). Jetra je, ujedno, glavno mesto sinteze IGFBP molekula, mada se sinteza odvija i u drugim tkivima. IGF-I, IGF-II, IGFBP-1, -2 i -4 se sintetišu u hepatocitima, dok se IGFBP-3 i -4 stvaraju u endotelnim i Kupferovim ćelijama jetre (41). IGFBP-1 se, osim u hepatocitima, sintetiše i u decidui, ćelijama granulose jajnika, bubrezima i vezivnom tkivu (42). Dodatna sinteza IGFBP-2 se odvija u nekim nervnim ćelijama (43). IGFBP-4 stvaraju fibroblasti, ćelije prostate i kostiju (44, 45). Povećana sinteza IGFBP-5 se dešava u bubrezima i fetalnom tkivu (33, 46), dok se IGFBP-6 lokalno sintetiše u ćelijama jajnika, prostate i u fibroblastima (47).

Sinteza i lučenje IGF molekula je direktno povezana sa životnom dobi. IGF-I i IGF-II se sintetišu još u ranoj embrionalnoj fazi i mogu se detektovati u cirkulaciji fetusa u 15. nedelji, mada u koncentracijama koje su male u odnosu na one kod odraslih osoba (48). Tokom života, koncentracija IGF-II molekula je najveća u cirkulaciji i tkivima embriona, dok koncentracija IGF-I dostiže svoj maksimum u fazi puberteta (49). Kod odraslih osoba (50), koncentracija IGF-II je četiri puta veća (50-80 nmol/L) od koncentracije IGF-I (10-30 nmol/L). Koncentracija IGF-I opada sa životnom dobi, dok je promena IGF-II neznatna. Koncentracija IGF-I i, u manjem stepenu, IGF-II, kao i koncentracije IGFBP-3 i ALS se povećavaju tokom fetalnog rasta, dok se u istom periodu koncentracije IGFBP-1, -2 i -6 smanjuju (51).

Hormon rasta (GH) je glavni regulator sinteze IGF-I (a verovatno i IGF-II) u jetri i njegovog izlučivanja (52).

Prekomerno lučenje IGF-I se sprečava povratnom negativnom spregom, inhibicijom sinteze i lučenja GH (53). Sa približavanjem kraja fetalnog perioda, smanjuje se koncentracija GH, a povećava IGF-I. Pokazano je da je povećana sinteza IGF-I u direktnoj vezi sa povećanjem težine fetusa, dok IGF-II nema takav efekat. O ulozi IGF-II u post-natalnom periodu se malo zna. Kod miševa i pacova se smanjuje lučenje IGF-II skoro u svim tkivima posle rođenja i u post-natalnom periodu je ovaj molekul prisutan u veoma maloj koncentraciji. Kod ljudi to nije slučaj, odnosno zadržava se visoka koncentracija IGF-II do kraja života (54).

Insulin i ishrana imaju važnu ulogu u regulaciji IGF-I. Nutritivni status je važan za održavanje koncentracije IGF-I u cirkulaciji, koja se smanjuje tokom produženog gladovanja, uprkos povećanoj koncentraciji GH (55). U fazi ekstremnog gladovanja gubi se pozitivna sprega između GH i IGF-I. Pretpostavka je da je ovaj disbalans posledica promene na nivou receptora za GH, odnosno njihove smanjene osetljivosti na hormon (56). Insulin, koji se prvenstveno luči iz β ćelija pankreasa, takođe utiče na koncentraciju IGF-I molekula. Insulin povećava koncentraciju receptora za GH i podstiče signalni put za sintezu IGF-I, samim tim, hiperinsulinemija može dovesti do povećane sinteze IGF-I (57). Osim insulina, pokazano je da i drugi hormoni imaju uticaj na sintezu IGF-I. Gonadotropin stimuliše ekspresiju mRNA za IGF-I u granuloznim ćelijama, TSH u tireoidnim ćelijama, dok angiotenzin II podstiče sintezu IGF-I u kardiovaskularnom sistemu (58). I polni hormoni pozitivno utiču na stvaranje IGF-I: estradiol, podstičući lučenje GH, i testosteron, stimulišući stvaranje aromatičnog jezgra estradiola i/ili inhibicijom negativne povratne sprege odgovorne za lučenje GH (59).

Za razliku od insulina, IGF molekuli se ne skladište u specijalizovanim endokrinim ćelijama iz kojih se, po potrebi, izlučuju. Celokupna rezerva IGF je u cirkulaciji. Više od 90% IGF molekula se nalazi u binarnim i tercijarnim kompleksima sa vezujućim proteinima. Pošto je fiziološki aktivna samo slobodna forma IGF, vezujući proteini kompleksiranjem sa IGF inhibiraju njihovo dejstvo i produžavaju njihov poluživot (60). IGF molekuli u najvećoj meri formiraju komplekse sa IGFBP-3. Ovako formirani kompleksi mogu biti binarni (40-50 kDa, 20% od ukupnih kompleksa) ili ternarni (150 kDa, 80%). Uopšteno, svi IGFBP formiraju binarne komplekse sa IGF, dok ternarne komplekse, uz komponentu ALS grade samo IGFBP-3 i IGFBP-5. Poluživot ovih kompleksa je nekoliko sati, a njihovo uklanjanje zavisi od brzine

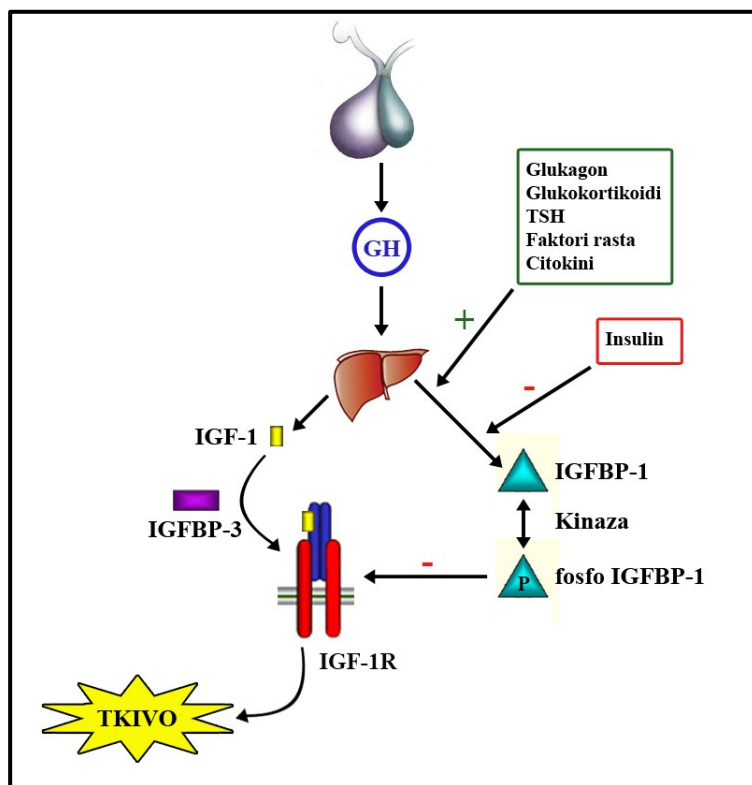
proteolitičke degradacije. Ternarni kompleksi, zbog svoje veličine, ne mogu proći kroz endotel krvnih sudova, te predstavljaju rezervoar IGF molekula u cirkulaciji. Slobodni IGF molekuli i oni vezani u binarnim kompleksima mogu prelazati kapilarnu barijeru i stići do tkiva. Distribucija IGF molekula između različitih IGFBP zavisi od koncentracije IGFBP, njihovih afiniteta prema IGF i aktivnosti specifičnih BP-Pr (60). Pored ovih kompleksa, nađeni su i drugi, u čijem sastavu su pojedini proteini iz cirkulacije, ali je njihova koncentracija veoma mala (61).

IGFBP molekuli mogu biti u rastvornom obliku, vezani za ćelijsku membranu i/ili lokalizovani u vanćelijskom matriksu (62, 63). Njihova ekspresija zavisi od stepena razvoja i vrste tkiva, a na nju utiču hormoni, ishrana, citokini i sami IGF molekuli.

IGFBP-1 je najzastupljeniji IGF vezujući protein u amnionskoj tečnosti, gde mu je koncentracija 0,06-3,00 mmol/L (64). Koncentracija IGFBP-1 u krvi je 100-1000 puta manja u odnosu na amnionsku tečnost (65, 66) i podleže dnevnoj promeni. Najveću koncentraciju IGFBP-1 dostiže ujutro, dok je najmanja koncentracija upopodnevnom satima (67). Na koncentraciju cirkulišućeg IGFBP-1 utiču brojni metabolički, nutritivni i antropometrijski faktori (68). Koncentracija IGFBP-1 je u negativnoj korelaciji sa koncentracijom IGF-I i insulina (69-71), kao i sa BMI („body mass index“). Insulin inhibira sintezu IGFBP-1 u jetri na nivou transkripcije (72), dok je glukagon stimuliše, nezavisno od koncentracije insulina (73). Unos hrane drastično snižava koncentraciju IGFBP-1, dok gladovanje i restrikcija unosa proteina imaju suprotni efekat (74, 75). Koncentracija IGFBP-1 se smanjuje posle obroka bogatog ugljenim hidratimanekoliko puta u roku od par sati, kao odgovor na povećan nivo insulina u krvi (76). Međutim, konstantnim produženim unosom ugljenih hidrata može se povećati koncentracija IGFBP-1, u sklopu posledica koje nastaju smanjenjem osetljivosti na insulin (68). Aktivni trening i vežbanje mogu povećati koncentraciju IGFBP-1 (77-79). Drugi hormoni koji povećavaju nivo IGFBP-1 (Slika 3) su glukokortikoidi, TSH, GH, faktori rasta i citokini (80).

Fosforilovan oblik IGFBP-1 ima veći afinitet prema IGF-I od nefosforilovanog, što za posledicu ima inhibiciju IGF dejstva i njegovog vezivanja za receptor (81). Takođe, različit stepen fosforilovanja IGFBP-1 utiče na ukupni afinitet prema ligandima. Postojanje i međusobni odnos različitih fosfoformi IGFBP-1, zapravo, odlučuje da li će krajnji efekat IGFBP-1 biti inhibitorni na aktivnost IGF ili ne. Dokle

god je veći udeo izrazito fosforilovanih formi, ukupni afinitet IGFBP-1 je veći of afiniteta IGF-1R prema ligandu. Da bi se ligand „predao“ receptoru neophodno je defosforilovanje IGFBP-1.



Slika 3. Uticaj različitih hormona na sintezu i regulaciju IGF-I i IGFBP molekula

Koncentracija IGFBP-1 u krvi postepeno raste sa starenjem, verovatno kao posledica smanjene supresije insulinom i stimulacije citokinima inflamacije (82). Pored amnionske tečnosti i krvi, fiziološki izvori IGFBP-1 su placenta, endometrijum, mleko, urin, seminalna plazma, sinovijalna i intersticijalna tečnost (64).

IGFBP-2 je najzastupljeniji vezujući protein u seminalnoj plazmi (oko 300 nmol/L) i cerebrospinalnoj tečnosti, a može se naći i u krvi, mleku, urinu, sinovijalnoj i intersticijalnoj tečnosti (64). Koncentracija IGFBP-2 u cirkulaciji zdravih ljudi je 8-20 nmol/L. Do povećanja IGFBP-2 dolazi u stanju neuhranjenosti i anoreksije, kao i kod

dugog gladovanja. IGFBP-3 je najzastupljeniji vezujući protein u cirkulaciji, koncentracije 80-100 nmol/L. Maksimalnu koncentraciju dostiže tokom puberteta, u fazi rasta, nakon čega postepeno opada sa godinama (83). I njegova koncentracija može biti smanjena usled neuhranjenosti. IGFBP-3 je prisutan u mleku, urinu, folikularnoj, cerebrospinalnoj, amnionskoj, sinovijalnoj, intersticijalnoj tečnosti i seminalnoj plazmi (64). Ostali vezujući proteini su u različitoj meri prisutni u pojedinim fiziološkim tečnostima i tkivima. IGFBP-4 je nađen u svim telesnim tečnostima, a koncentracija mu je u cirkulaciji oko 10 nmol/L (84). Najveća koncentracija IGFBP-5 (oko 20 nmol/L) je u cerebrospinalnoj tečnosti i vezivnom tkivu. Sa starenjem se koncentracija IGFBP-4 povećava, dok se IGFBP-5 smanjuje (85). Koncentracija IGFBP-5 u cirkulaciji je u korelaciji sa gustinom koštane mase i ukupnom aktivnošću alkalne fosfataze (85). IGFBP-6 je prisutan u cerebrospinalnoj tečnosti i krvi, u koncentracijod oko 8 nmol/L. Koncentracija IGFBP-6 u cirkulaciji muškaraca je oko 70% veća nego kod žena, kod kojih se dodatno smanjuje za oko 30% tokom trudnoće (86).

2.1.3 Fiziološka uloga IGF sistema

IGF-I stimuliše ćelijski rast i diferencijaciju u skoro svim tkivima (87). On je akutni anabolični hormon koji svoje dejstvo ispoljava prvenstveno u metabolizmu proteina i ugljenih hidrata. Učestvuje u sintezi proteina i glikogena povećavajući transport aminokiselina i glukoze unutar ćelija. Zajedno sa insulinom, IGF-I sinergistički deluje kao hipoglikemijski hormon (88). IGF-I i IGF-II imaju ključnu ulogu u fetalnom i placentnom razvoju tokom gestacije. IGF-I stimuliše rast fetusa kada su hranljivi sastojci dostupni i njegova sinteza je posebno osetljiva u uslovima kada nema dovoljno hranljivih supstanci. Pokazano je da IGF-I povećava krvni pritisak u bubrezima, brzinu glomerularne filtracije i reapsorpciju fosfata u proksimalnim tubulama (89). Osim svoje uloge u normalnom rastu tkiva, IGF-I takođe utiče i na rast tumora. Pretpostavka je da velika koncentracija IGF-I u dužem vremenskom periodu može stimulisati rast kancerskih ćelija, te se IGF-I smatra i tumorskim markerom.

Koncentracija IGF-II je velika u placenti, što ukazuje na njegovu važnu ulogu u razvoju placente i transferu hranljivih sastojaka. Smatra se da veličina materice, dostupnost hranljivih supstanci i nivo kiseonika, zajedno sa dejstvom faktora rasta (naročito IGF-I, IGF-II i IGFBP-1), kao i insulina, imaju ključnu ulogu u fetalnom razvoju (90). Funkcije IGF-II se mogu povezati i sa različitim tumorskim stanjima. Patološki oblici IGF-II, takozvani „veliki IGF-II”, mogu se vezati za sve IGFBP molekule (91). Uloga IGF-II u odraslom periodu života nije razjašnjena, ali se manje koncentracije povezuju sa dužim životnim periodom (92).

IGFBP molekuli stimulišu ili inhibiraju dejstvo IGF *in vivo* i *in vitro*. Nekoliko IGFBP, uključujući IGFBP-1, IGFBP-2, IGFBP-4 i IGFBP-6, inhibiraju dejstvo IGF molekula, onemogućavajući njegovo vezivanje za receptor (19, 60, 93, 94). Pored regulacije transporta IGF molekula, vezujući proteini mogu produžiti poluživot u cirkulaciji ili im omogućiti produženo dejstvo usporenim otpuštanjem. Poznata su i dejstva IGFBP molekula koja su IGF nezavisna (19, 94).

Ključna uloga IGFBP-1 je regulacija dostupnosti IGF-I za fiziološke procese. Smatra se da IGFBP-1 olakšava transport IGF-I iz krvi u tkiva i povećava njegovu aktivnost (64). Poluživot IGF-I molekula u kompleksu sa IGFBP-1 se produžava sa 10 min na 30 min (81). Male koncentracije IGFBP-1 se dovode u vezu sa metaboličkim sindromom, insulinskom rezistencijom, gojaznošću i sa kardiovaskularnim faktorom rizika (69, 70). Iako njegov udeo, u odnosu na neke druge IGFBP, u cirkulaciji odraslih osoba nije velik, IGFBP-1 je najvažniji IGF vezujući protein tokom gestacijskog perioda. Nekoliko studija je pokazalo da IGFBP-1 reguliše rast embriona (kao lokalni regulator bioaktivnosti IGF molekula) i stimuliše migraciju trofoblata. Za obavljanje ove uloge odgovoran je C-terminalni kraj, tačnije RGD sekvenca, koju prepoznaje familija integrinskih receptora lokalizovanih na površini ćelija (95-98). Uloga IGFBP-1 je vrlo značajna u fiziološkim i patološkim stanjima jajnika, endometrijuma i trofoblata (99). IGFBP-1 je glavni vezujući protein endometrijuma u sekretornoj, takozvanoj progesteronskoj fazi. Sindrom policističnih jajnika je povezan sa gojaznošću i rezistencijom na insulin, a praćen je sniženom koncentracijom IGFBP-1 u serumu.

U serumu odraslih ljudi nalazi se pretežno visokofosforilovani oblik IGFBP-1 (100). U amnionskoj tečnosti nalaze se u većoj meri izoforme ovog proteina koje su manje fosforilovane, uz veliki udeo nefosforilovane forme IGFBP-1 (101). Kao što je

već rečeno, u toku trudnoće, molekuli IGF i IGFBP predstavljaju vrlo važne faktore za razvoj i diferencijaciju tkiva majke i fetusa. Tokom ranog razvića, skoro sva tkiva fetusa proizvode ove proteine i eksprimiraju njihove specifične receptore (102). Koncentracija IGF-I fetusa i majke je povećana tokom trudnoće i u pozitivnoj korelaciji je sa težinom ploda. IGFBP-1 u cirkulaciji majke je, prilikom rađanja, u negativnoj korelaciji sa težinom ploda, ukazujući na njegovu ulogu kao inhibitora fetalnog rasta, u smislu lokalnog modulatora/kontrolora aktivnosti IGF-I (103). Nedavno je pokazano da je deo unutarćelijskog IGFBP-1 lokalizovan u blizini mitohondrija, gde deluje kao faktor preživljavanja i štiti jetru od apoptoze (104).

IGFBP-2 ispoljava samo inhibitorni efekat na ćelijski rast i razmnožavanje. IGFBP-3 ima i stimulatorni i inhibitorni efekat na rast. Vezivanjem IGF-I za IGFBP-3 dolazi do smanjenja aktivnosti IGF-I, usled smanjenja njegove dostupnosti za interakciju sa receptorima (105). Ternarni kompleks IGFBP-3, IGF-I/II i ALS čini rezervoar IGF-I/II u cirkulaciji. Pokazano je da sinergističko dejstvo IGFBP-3 i IGF-I dovodi do bržeg zarastanja rana (106). Glikozilovanje IGFBP-3 predstavlja važnu post-translacionu modifikaciju ovog proteina, čijom promenom se može uticati na afinitet prema ligandu (107). Otkriveni su receptori za IGFBP-3 na površini ćelija nekih tumora, a dejstva koja IGFBP-3 ispoljava posredstvom ovih receptora se smatraju IGF nezavisnim (108, 109). IGFBP-3 reaguje sa heparinom i transferinom (110). Povećana sinteza IGFBP-3 indirektno indukuje apoptozu, jer su ligandi u većoj meri kompleksirani i nedostupni za vezivanje za IGF-1R (111). Regulacija dostupnosti IGF molekula posredstvom IGFBP-4 ostvaruje se u specifičnim ćelijama, kao što su Lajdigove ćelije testisa, gde inhibira sintezu testosterona, ili osteoblasti, gde inhibira sintezu DNK (112).

IGFBP-5 stvara ternarne komplekse sa IGF i ALS, te je njena uloga u skladištenju i transportu (113). Specifičnost IGFBP-5 u odnosu na druge IGFBP je što ima veliki afinitet za hidroksiapatit i vezuje se za ćelije kostiju (114). IGFBP-5 može da interaguje sa proteinima vanćelijskog matriksa i time povećava lokalnu koncentraciju IGF. Ovako vezani IGF molekuli se sporo otpuštaju produžavajući efekat postepenim vezivanjem za IGF-1R. IGFBP-5 se može vezati i direktno za površinu osteoblasta, nezavisno od prisustva IGF molekula, najverovatnije preko receptora za IGFBP-5. Pretpostavka je da vezivanje IGFBP-5 za svoj receptor ima sinergistički efekat na

signalne puteve IGF-I (115). IGFBP-6 je jedini vezujući protein koji prvenstveno vezuje IGF-II, afinitetom većim 20-100 puta nego za IGF-I (116). Vrlo se malo zna o njegovoj funkciji, ali inhibira aktivnost IGF-II u ćelijama kostiju, keratinocitima, mioblastima i u ćelijama tumora debelog creva (117).

2.2 IGF sistem i metabolizam glukoze

Za održavanje koncentracije glukoze u krvi, u vrlo uskom koncentracionom opsegu, zaslužan je složen sistem glukoregulatornih hormona i faktora. Insulin, kao najvažniji činilac, je neophodan za održavanje stabilnog stanja, snižavanje koncentracije glukoze u krvi nakon unošenja hrane i za inhibiciju procesa glukoneogeneze i glikogenolize u jetri. IGF-I i IGF-II, takođe, imaju sposobnost snižavanja koncentracije glukoze, iako je njihov hipoglikemijski potencijal samo 6% potencijala insulina (118).

Dejstva IGF molekula u metabolizmu glukoze su komplementarna dejstvu insulina. Za sličnost u njihovim aktivnostima je odgovorna homologija u strukturi insulina i IGF, kao i njihovih receptora, što dovodi do unakrsne reaktivnosti (119). Zahvaljujući svom dinamičnom uticaju na homeostazu glukoze, kao i količini koja je daleko veća od količine insulina (120), IGF molekuli u cirkulaciji predstavljaju znatan hipoglikemijski potencijal, koji je kontrolisan njihovim vezivanjem za IGFBP molekule (121). Kao što je ranije rečeno, najzastupljeniji vezujući protein u cirkulaciji, IGFBP-3, formira komplekse velike molekulske mase sa IGF i ovi kompleksi su rezervoar za čuvanje IGF molekula. Proces oslobađanja IGF proteolizom IGFBP-3 je relativno brz i odigrava se u roku 10-15 min (122). Brzini dejstva IGF molekula doprinosi činjenica da je njihov depo već u cirkulaciji, da nije neophodna indukcija njihove sinteze, niti lučenje iz granula. Promena statusa ishranjenosti reguliše koncentraciju IGF i IGFBP-3 u dužem vremenskom periodu. Suprotno ovome, IGFBP-1 je akutno regulisan hormonima koji imaju suprotno dejstvo insulinu.

Hormoni, koji doprinose povećanju sadržaja glukoze u krvi, utiču i na povećanje koncentracije IGFBP-1. Brojne studije su pokazale da glukagon (73), kateholamini (123) i glukokortikoidi (124) povećavaju koncentraciju IGFBP-1 *in vivo*. Pokazano je

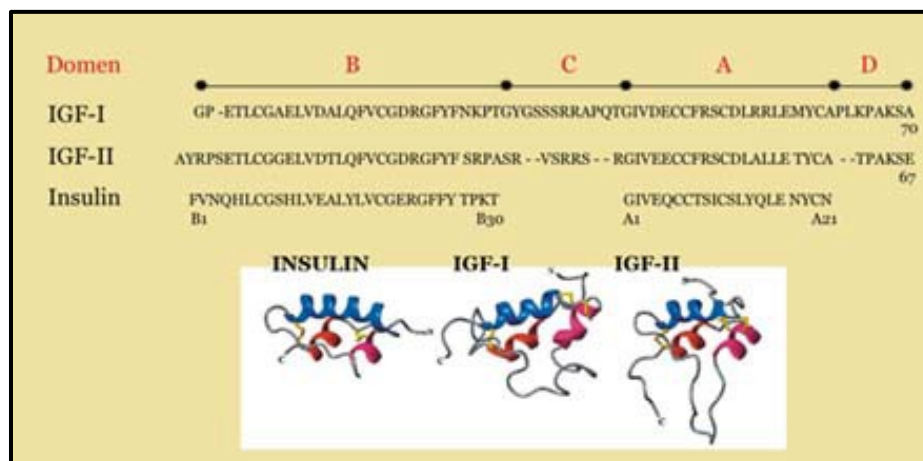
da i drugi faktori mogu direktno stimulisati stvaranje IGFBP-1, kao što su citokini (125) i AMP aktivirana protein kinaza (126).

Kao potvrda inhibitornog potencijala IGFBP-1 na dejstva IGF molekula slična insulinu u cirkulaciji, poslužila je studija u kojoj je pokazano da infuzija IGFBP-1 dovodi do povećavanja glukoze u krvi (127). Uzevši u obzir sve eksperimentalne i kliničke dokaze, zaključeno je da IGF/IGFBP-1 sprega ima komplementarnu ulogu insulinu i njegovim kontraregulatornim hormonima i faktorima u homeostazi glukoze.

Ubrizgavanjem IGF-I snižava se koncentracija glukoze kod zdravih osoba, pacijenata sa Diabetes mellitus-om tip 1 (DM1) i tip 2 (DM2), čak i kod pacijenata koji imaju neki oblik rezistencije na insulin, ukoliko je ona izazvana mutacijom gena za IR (128-130). Efekat snižavanja glukoze posredstvom IGF molekula se postiže, kao i u slučaju insulina, preko povećanja perifernog preuzimanja glukoze i sinteze glikogena u mišićnom tkivu, kao i supresijom sinteze glukoze u jetri. Dodatno je pokazano da se IGF tretmanom povećava osetljivost na insulin (131). Tačan mehanizam ovog uticaja nije poznat, ali je moguće da uključuje direktan efekat IGF na tkiva, kao i inhibiciju GH lučenja povratnom spregom. Prethodno je već rečeno da se IGF molekuli vezuju za IR i hibridni receptor, a ove interakcije dovode do metaboličkih procesa istovetnih onima koje reguliše insulin.

2.2.1 Homologija insulin/IGF i IR/IGF-1R

IGF molekule, kao što je već navedeno, čine četiri različita domena. Domeni A (42-70) i B (1-29) molekula IGF-I pokazuju 43% homologije sa A (A1-A21) i B (B1-B30) domenima insulina (i proinsulina), dok je podudarnost A (41-67) i B (1-32) domena molekula IGF-II sa domenima insulina 41%. Sekvence ova tri peptida su prikazane na Slici 4 (1, 132).



Slika 4. Strukturna homologija IGF-I, IGF-II i insulina

Za razliku od insulina, IGF molekuli ne gube svoj C domen u procesu transformacije prohormona u aktivni hormon (133). C-domen IGF molekula i C-domen proinsulina nemaju homologiju u primarnoj strukturi.

Pored sličnosti IGF molekula i insulina, receptori IGF-1R i IR imaju, takođe, veliku strukturnu sličnost. Oba receptora su tirozin-kinaze i nastaju od istog prekursora. Homologija između dva liganda i njihovih receptora dovodi do unakrsne reaktivnosti (134), mada je afinitet vezivanja u tim interakcijama manji. U mnogim zdravim i malignim ćelijama ekspirira se hibridni receptor, heterotetramer, čija je jedna polovina $\alpha\beta$ dimer IGF-1R, a druga $\alpha\beta$ dimer tipa IR-A ili IR-B (135, 136). Hibridni receptor, kao što je ranije napomenuto, ima veći afinitet za IGF-I nego za IGF-II i insulin, ali je njegov biološki značaj i dalje nepoznat (18). IGF-I i insulin, vezani za svoje native receptore, koriste različite unutarćelijske signalne puteve za svoja dejstva, koja prvenstveno imaju ulogu u regulaciji rasta (IGF-I), odnosno metabolizma (insulin). Unakrsnim vezivanjem omogućava se regulacija koncentracije glukoze od strane IGF molekula, odnosno regulacija rasta od strane insulina.

2.2.2 Sprega insulin/IGFBP-1/IGF-I

IGFBP-1 se sintetiše u jetri i izlučuje u cirkulaciju kao fosforilovan protein. Proces sinteze je hormonski regulisan, a veći broj studija je pokazao da insulin direktno inhibira sintezu IGFBP-1 (137-140). Kod zdravih osoba koncentracije insulina i IGFBP-1 se menjaju u suprotnom smeru (141). Povećanje nivoa insulina posle ishrane dovodi do smanjivanja koncentracije IGFBP-1 u cirkulaciji zdravih osoba. Ovakav odnos mogu narušiti mnogi faktori i patofiziološka stanja. Katabolička stanja kao što su AIDS (142), krajnja faza bolesti bubrega (143) i kancer (144) dovode do neadekvatnog povećanja koncentracije IGFBP-1, nezavisno od koncentracije insulina.

Koncentracija IGFBP-1 je povećana kod pacijenata sa DM1, insulinskom rezistencijom ili hipoglikemijom (140, 145), dok sniženakoncentracija ovog proteina može biti kod pacijenata sa DM2 (146, 147).

Prva studija o povezanosti metabolizma glukoze i slobodnog IGF-I je uključivala 17 zdravih osoba koje nisu bile gojazne, a merenja su vršena ujutro posle noćnog gladovanja i 4 h posle doručka bogatog ugljenim hidratima (148). Uočeno je petostruko smanjenje koncentracije IGFBP-1 neposredno posle doručka, dok je koncentracija IGF-I ostala ista tokom izvođenja oralnog testa tolerancije glukoze (OGTT). Zaključeno je da promene IGFBP-1, iako značajne, nisu dovoljne da promene koncentraciju slobodnog IGF-I.

Merenjem koncentracije IGF-I i IGFBP-1 natašte (149, 150), kao i posle gladovanja u kraćem vremenskom periodu (151), ustanovljena je negativna korelacija ova dva proteina. Međutim, uočeno je da smanjenje koncentracije IGFBP-1 posle doručka bogatog ugljenim hidratima nije praćeno povećanjem koncentracije IGF-I. Sa druge strane, povećanje IGFBP-1 koje se dešava u završnoj fazi OGTT testa ili tokom noći je praćeno smanjenjem koncentracije IGF-I. Objašnjenje je u različitoj brzini degradacije IGF-I i IGFBP-1. Poluživot IGFBP-1 je kod čoveka oko 2 h (140, 152), a njegovo uklanjanje iz cirkulacije je nezavisno od IGF-I (153). Sa druge strane, za uklanjanje slobodnog IGF-I je potrebno samo 14 min (154, 155). Stoga, smanjenje koncentracije IGFBP-1 ne bi nužno moralo da dovede do povećanja IGF-I u kratkom

vremenskom intervalu, dok bi povećanje koncentracije IGFBP-1 i dalje moglo uticati na smanjenje koncentracije IGF-I (156).

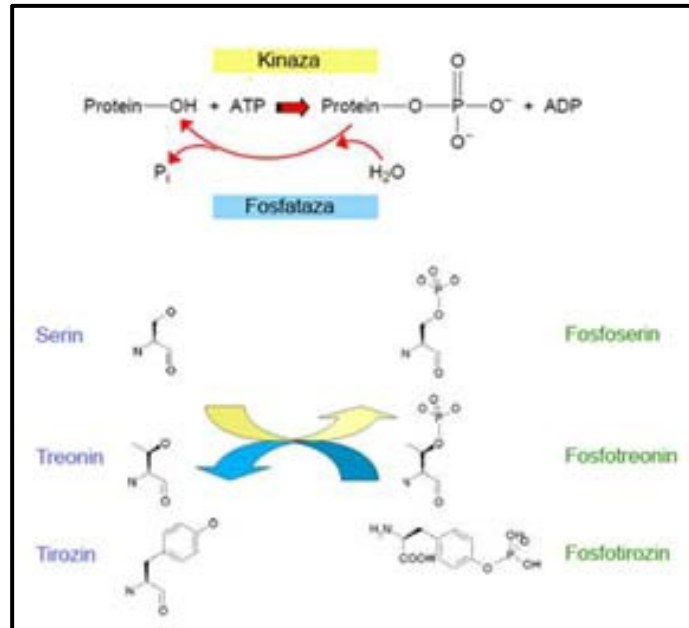
2.3 Post-translacione modifikacije IGFBP-1

Dostupnost i aktivnost IGF molekula, kao što je već rečeno, regulišu IGF vezujući proteini, a njihov afinitet za ligande se može menjati na dva načina: vezivanjem za vanćelijski matriks ili druge biomolekule i post-translacionim modifikacijama. Post-translacione modifikacije se dešavaju u centralnom L-domenu kod svih IGFBP molekula.

Do sada je opisano nekoliko modifikacija IGFBP-1 kojima se menja afinitet za IGF molekule, čime se stimuliše ili inhibira aktivnost IGF: fosforilovanje (157, 158), proteoliza (159), polimerizacija (160, 161) i, gledano u širem smislu, kompleksiranje sa drugim proteinima (162).

Fosforilovanje proteina je verovatno najznačajniji regulatorni mehanizam kod eukariota. Procesima fosforilovanja i defosforilovanja se menja aktivnost mnogim enzimima i receptorima. Fosforilovanje proteina predstavlja kovalentno vezivanje fosfatne grupe estarskom vezom na hidroksilnu grupu aminokiselina Ser, Thr i Tyr. Ovaj proces katalizuje grupa enzima protein-kinaza (163). Suprotan proces, defosforilovanje, regulišu fosfataze (Slika 5).

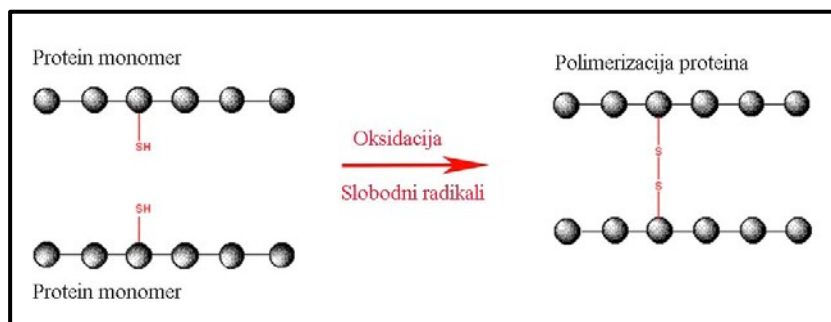
U ćelijama je fosforilovanje dinamičan proces, koji u nekim slučajevima traje samo nekoliko sekundi. Fosforilovanje IGFBP molekula utiče na njihovu aktivnost, stabilnost, formiranje tercijarne strukture i interakcije sa drugim molekulima.



Slika 5. Mehanizam fosforilovanja aminokiselina

Proteoliza proteina je proces regulisan brojnim mehanizmima, a brzina degradacije proteina zavisi od koncentracije proteaza i njihovih inhibitora. Fosforilovanje i glikozilovanje mogu biti od uticaja na brzinu proteolitičke degradacije. Ovakvim strukturnim modifikacijama protein, obično, postaje otporniji na dejstvo enzima. Post-translacionim modifikacijama proteina ograničava se pristup proteazama posredstvom elektrostatičkih i sternih smetnji (164). U stanjima hipermetabolizma, kao što su tumor, dijabetes i opekotine, veliko je prisustvo proteolitičkih enzima i fragmenata IGFBP u cirkulaciji (165). Do sada nije uočeno da je IGFBP-1 podložan glikozilovanju, ali jeste proteolitičkoj fragmentaciji.

Polimerizacijom i kompleksiranjem sa drugim proteinima, može se stabilizovati osnovni protein i smanjiti njegova proteolitička fragmentacija. Sa druge strane, polimerizacija može biti odraz oksidativne modifikacije proteina. Oksidacijom proteina, u prisustvu slobodnih radikala i drugih reaktivnih molekulskih vrsta, slobodne tiolne grupe grade disulfidne veze, povezujući veći broj monomernih jedinica. Šematski prikaz nastajanja polimera proteina posredstvom oksidacije je dat na Slici 6 (166).



Slika 6. Stvaranje polimera proteina oksidacijom tiolne grupe

Polimeri IGFBP-1 nastaju i u procesu transglutaminacije. Ova modifikacija je enzimski katalizovana i podrazumeva stvaranje kovalentnih veza između Gln i Lys ostataka koji pripadaju različitim proteinskim molekulima. Polimeri obično nemaju fiziološke uloge koje imaju monomeri, što je slučaj i sa IGFBP-1.

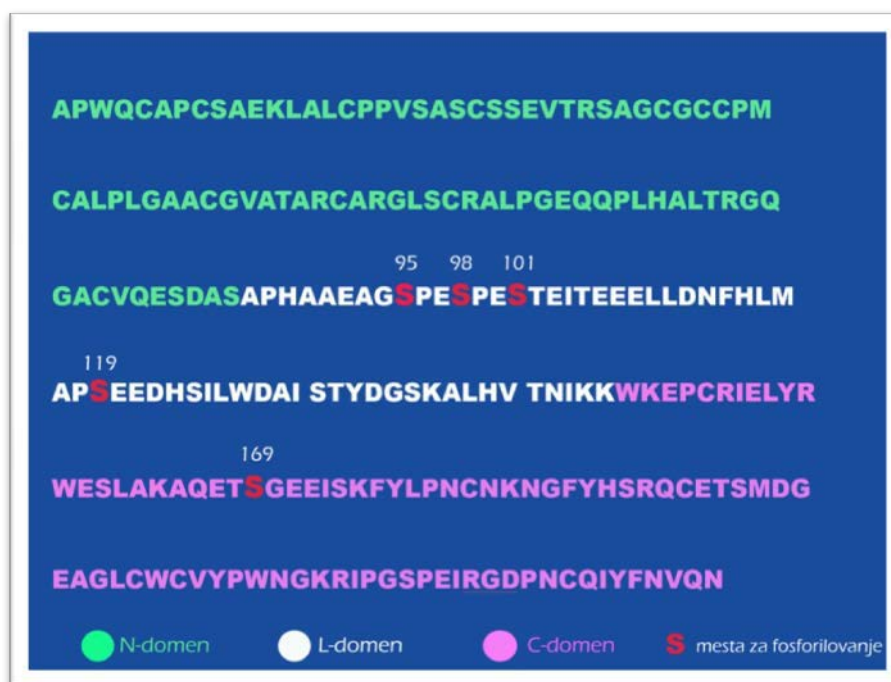
Stvaranje kompleksa između dva ili više biomolekula ne pripada post-translacionim modifikacijama, ali jeste post-translacioni događaj kojim se mogu obezbediti dodatne karakteristike i uloge novonastalih spojeva. IGFBP-1 je učesnik nekih proteinskih kompleksa, o kojima će kasnije biti reči.

2.3.1 Fosforilovanje IGFBP-1

Nakon izolovanja IGFBP-1 iz amnionske tečnosti metodom anjonske jonoizmenjivačke hromatografije, identifikovane su dve osnovne forme ovog proteina (28). Iako su obe forme IGFBP-1 imale istu aminokiselinsku sekvencu, jedna jepodsticalarast ćelija (167), a druga inhibirala (168). Ove dve forme IGFBP-1 su se razlikovale u fosforilovanju.

Daljim eksperimentima otkrivena su potencijalna mesta fosforilovanja IGFBP-1. Jones i saradnici su 1993. definisali ta mesta u L-domenu IGFBP-1: Ser¹⁰¹, Ser¹¹⁹ i Ser¹⁶⁹ (28). U eksperimentu sa jajnim ćelijama kineskog hrčka (CHO ćelije) izolovan je IGFBP-1 obeležen radioaktivno sa ³²P, a nakon proteolize je izvršeno

radiosekvenciranje (29). Kao najvažnije mesto fosforilovanja pokazao se Ser¹⁰¹, sa ukupno 63% ugrađenog ³²P. Nedavnim istraživanjem (26) metodom masene spektrometrije, otkrivena su nova mesta fosforilovanja na molekulu IGFBP-1 izolovanom iz amnionske tečnosti čoveka (16-18 nedelja gestacije). Identifikovano je šest izoformi IGFBP-1: nefosforilovani oblik i pet fosfoformi. Najzastupljenija forma IGFBP-1 je bila nefosforilovana, dok su u opadajućim koncentracijama bili prisutni mono-, bi-, tri- i tetrafosforilovani oblici. Identifikovana su četiri Ser ostatka podložna fosforilovanju u L-domenu: Ser⁹⁵, Ser⁹⁸, Ser¹⁰¹ i Ser¹¹⁹, kao i jedan u terminalnom C-domenu: Ser¹⁶⁹ (Slika 7).



Slika 7. Primarna struktura IGFBP-1 (tri domena su prikazana različitim bojama) i ostaci Ser (S) koji podležu fosforilovanju

Pronalaskom ovolikog broja izoformi IGFBP-1, zaključeno je da IGFBP-1 u amnionskoj tečnosti podleže intenzivnijim post-translacionim modifikacijama od

IGFBP-1 u CHO ćelijama ili u cirkulaciji. Uzrok ovome je, najverovatnije, različita aktivnost protein-kinaza unutar ćelija i fosfataza u vanćelijskom matriksu.

Važno je istaći da se tri od pet Ser ostatka koji se fosforiluju nalaze u delu sekvence AGSPESPESTE koja sadrži PEST region, udaljen 27 aminokiselina od mesta na kome se proteolizom odvaja C-terminalni fragment (169). PEST sekvenca je izrazito hidrofilni region i proteini koji je sadrže u primarnoj strukturi su pogodne mete za proteolizu (170). Dakle, fosforilovanje IGFBP-1 može stabilizovati protein na dejstvo proteaza.

U cirkulaciji zdravih osoba su prisutne visokofosforilovane forme IGFBP-1 (100), koje imaju 6 puta veći afinitet za IGF od nefosforilovanog oblika. Shodno tome, pokazano je da fosforilovani oblici inhibiraju dejstvo IGF-I (168, 171, 172), dok se defosforilovanjem IGFBP-1 oslobađa IGF-I i povećava njegova aktivnost. Ova promena je potvrđena merenjem indukcije sinteze DNK (167, 168, 171). Pretpostavlja se da visokofosforilovane forme IGFBP-1 sprečavaju vezivanje IGF molekula za receptore. Ovo objašnjenje treba uzeti sa rezervom, jer ne nudi tumačenje mehanizma kojim bi nefosforilovana forma stimulisala dejstvo IGF-I. Takođe, stepen fosforilovanja IGFBP-1 kod pacova nema nikakav uticaj na aktivnost IGF-I, što navodi na razmišljanje o razlikama u mehanizmima regulacije kod različitih vrsta (173).

Tokom trudnoće, u cirkulaciji majke je izmenjen odnos pojedinih fosfoformi IGFBP-1. Westwood i saradnici su konstatovali povećano prisustvo nefosforilovanog oblika i tri forme manje fosforilovanog IGFBP-1 (100). Pretpostavka je da je smanjeno fosforilovanje IGFBP-1 u funkciji povećane potrebe za slobodnim IGF molekulima, koji stimulišu rast placente i fetusa. Placentna alkalna fosfataza, koja se sintetiše u trofoblastu, može da defosforiluje fosfoformu IGFBP-1 (174), čime aktivno učestvuje u regulaciji brzine proteolize IGFBP-1, a posredno i u dostupnosti slobodnih IGF molekula.

2.3.2 Proteoliza IGFBP-1

Povećana proteolitička degradacija IGFBP molekula je karakteristična za mnoga patofiziološka stanja, kao što su infekcija i inflamacija (175). Kao što je ranije napomenuto, više različitih enzima dovodi do proteolize pojedinih IGFBP molekula, među kojima su plazmin (176), prostata specifični antigen (PSA), nervni faktor rasta (NGF), matriksne metaloproteaze (MMPs) i katepsin D (177). Proteoliza predstavlja jedan od mehanizama za regulaciju bioaktivnosti vezujućih proteina i faktora rasta. Proteolitički fragmenti imaju funkcionalna svojstva koja se razlikuju od onih koje ima intaktni protein (178).

Matriksne metaloproteaze su prisutne na kontaktnoj površini između majke i fetusa (tzv. „fetal-maternal interface”) ili, kako se još naziva, na citotrofoblast/decidualnoj barijeri (179, 180). Zajedno sa svojim inhibitorima u tkivima („tissue inhibitors of matrix proteases“, TIMP), ova grupa enzima ima važnu ulogu u regulaciji migracije trofoblasta (181). Inhibitori TIMP-1 i TIMP-2, kao i alfa2-makroglobulin (α 2M), koje luče ćelije decidue, sprečavaju proteolizu IGFBP-1 koju izazivaju MMP (181). IGFBP-1 se sintetiše u decidualizovanom endometriju, koji nastaje nakon implantacije embriona i predstavlja majčin deo placente tokom trudnoće. Proteoliza IGFBP-1 je mehanizam kojim se povećava dostupnosti slobodnog IGF-I tokom razvoja placente (181). Fragmenti IGFBP-1 koji nastaju ovom prilikom ne vezuju IGF molekule. MMP-3 i MMP-9 vrše proteolizu IGFBP-1, stvarajući fragmente molekulskih masa od 9, 12,5, 14,5, 17,5 i 21 kDa, što je utvrđeno metodom SDS-PAGE (181). Svi nastali fragmenti, osim fragmenta mase 9 kDa, su N-terminalni. Mesto fragmentacije na molekulu IGFBP-1 je Lys¹⁴⁵/Lys¹⁴⁶ (181). Primarni fragmenti su N-terminalni fragment mase 21 kDa i C-terminalni fragment mase 9 kDa. Daljim proteolitičkim razlaganjem N-fragmenta od 21 kDa nastaju fragmenti od 12,5, 14,5 i 17,5 kDa. Fragmenti masa 14,5 i 17,5 kDa su nađeni i u medijumu HepG2 ćelija i u amnionskoj tečnosti (182, 183). Osim pomenutih enzima, i MMP-11 proteolizuje IGFBP-1 (184).

Visokofosforilovana forma IGFBP-1, glavna u cirkulaciji, je otpornija na proteolitičku degradaciju od nefosforilovanog oblika (183). Shodno tome, proteolitički

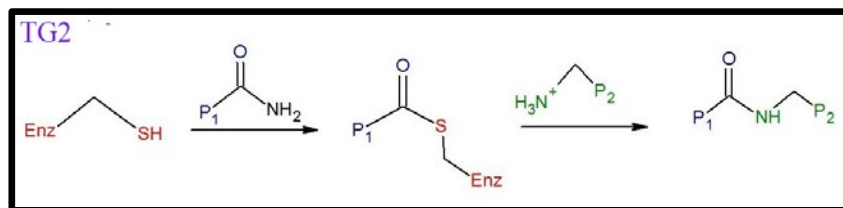
fragmenti IGFBP-1 su u cirkulaciji zdravih osoba prisutni u vrlo maloj koncentraciji. Dodatni faktor koji štiti IGFBP-1 od razlaganja je $\alpha 2M$, inhibitor većeg broja proteaza. IGFBP-1 gradi komplekse sa $\alpha 2M$, o kojima će kasnije biti reči (162).

Proteaze iz urina, takođe, imaju sposobnost fragmentacije IGFBP-1. Wang i njegova grupa (185) su iz uzoraka urina osoba sa multiplim mijelomom izolovali IGFBP-1 specifičnu proteazu, koja je bila podjednako efikasna u razlaganju i fosforilovanih i nefosforilovanog oblika IGFBP-1. Primarno mesto dejstva ove proteaza je Ile¹³⁰/Ser¹³¹, a dobijeni fragmenti su molekulske masa od 20 kDa (N-terminalni fragment) i 14 kDa (C-terminalni fragment). Druga potencijalna mesta za proteolizu IGFBP-1 enzimima iz urina su: Thr¹³²/Tyr¹³³, Val¹⁴¹/Thr¹⁴², Ile¹⁵³/Glu¹⁵⁴, Ile¹⁷³/Ser¹⁴⁷ i Val¹⁵⁹/Glu¹⁶⁰.

2.3.3 Polimerizacija IGFBP-1

Polimerizacija je post-translaciona modifikacija IGFBP-1 koja reguliše odgovor ćelije na IGF molekule. Već je rečeno da IGFBP-1 podleže oksidativnoj polimerizaciji, ali je i supstrat za tkivnu transglutaminazu, koja katalizuje formiranje kovalentno povezanih multimera velike molekulske mase (161).

Transglutaminaza (TG2, EC 2.3.2.13) je citosolni enzim koji je zastupljen u mnogim ćelijama i tkivima. Osim u citosolu, pronađena je i u jedru, a može se dislocirati na površinu ćelije i u vanćelijski matriks (161, 186). TG2 spada u red aciltransferaza i za njenu aktivnost potrebni su joni kalcijuma. Katalizuje post-translacionu modifikaciju proteina ubacivanjem stabilne (epsilon-(gama-glutamil)lizin) izopeptidne veze ili konjugovanjem poliamina sa ostatkom Gln u proteinskom nizu (187), što dalje dovodi do međusobnog povezivanja proteinskih molekula (Slika 8). Mehanizam za katalitičko stvaranje polimera uključuje tiolnu grupu Cys u aktivnom centru TG2. Tiolna grupa reaguje sa amidnom grupom koja se nalazi na površini proteina i stvara tioestarski intermedijer uz oslobađanje amonijaka. Ovaj intermedijer može reagovati sa amino-grupom drugog supstrata (najčešće na Lys ostatku) dajući, kao krajnji proizvod, stabilnu izopeptidnu vezu između dva molekula proteina.



Slika 8. Mehanizam polimerizacije proteina (P1 i P2) katalizovan tkivnom translutaminazom (TG2)

Uopšteno, fiziološki značaj stvaranja polimera je postizanje veće mehaničke i hemijske stabilnosti krajnjeg proizvoda, odnosno povećanje otpornosti na proteolitičku degradaciju (188). Sa druge strane, polimerizacija menja reaktivnost proteina prema ligandu, a u nekim slučajevima organizam polimere može registrovati kao neoantigene i aktivirati imunski sistem.

IGFBP-1, kao i drugi proteini koji su supstrat za TG2, u sekvenci imaju povezana dva ostatka Gln, koji su potencijalni akceptori amino-grupe. Sekvenciona analiza je pokazala da su kod IGFBP-1 to aminokiseline Gln⁶⁶/Gln⁶⁷ (161). Forme IGFBP-1 koje nisu fosforilovane imaju sposobnost brže i efikasnije polimerizacije. Polimerizacijom se, dakle, dodatno utiče na ravnotežu između slobodnih i vezanih IGF molekula, koja zavisi od ravnoteže fosforilovanih i nefosforilovane forme IGFBP-1. O afinitetu polimera IGFBP-1 za IGF peptide, njihovom poluživotu ili fiziološkoj ulozi, nema podataka.

2.3.4 Kompleksi IGFBP-1 sa drugim molekulima

U cirkulaciji zdravih osoba fragmenti IGFBP-1 su prisutni u tragu. Otkrićem kompleksa ovog proteina sa drugim, mnogo većim proteinom, alfa2-makroglobulinom ($\alpha 2M$), došlo se do pretpostavke o mogućem mehanizmu zaštite IGFBP-1 od proteaza. $\alpha 2M$ je glikoprotein molekulske mase oko 700 kDa, koji se sastoji iz četiri jednake

subjedinice. Njegova koncentracija u cirkulaciji je velika, 2-4 g/L (188). Svaka subjedinica sadrži više reaktivnih mesta, za koje se pretpostavlja da omogućavaju vezivanje i prenošenje drugih molekula u krvi. Pored toga što direktno inhibira proteaze, $\alpha 2M$ štiti razne molekule od izlaganja proteazama. $\alpha 2M$ stvara komplekse sa faktorom rasta fibroblasta (189), faktorom rasta vaskularnog endotela (190), faktorom rasta epiderma (191) i transformišućim faktorom rasta- $\beta 1$ (192). Ovim interakcijama se povećava aktivnost faktora rasta i podstiče se ćelijska proliferacija (193). Na sličan način je povećan mitogeni efekat IGF-I (162), čija se koncentracija u lokalnom okruženju ćelije povećava nakon vezivanja IGFBP-1 za $\alpha 2M$. Pokazano je da je $\alpha 2M$ modulator IGFBP-1/IGF-I interakcije i da je deo mehanizma kontrole transporta i aktivnosti IGF-I. Mehanizam povećavanja aktivnosti IGF-I usled interakcije IGFBP-1 i $\alpha 2M$ još uvek nije razjašnjen. Na osnovu eksperimenta sa ćelijama fibroblasta, pretpostavljeno je da su u mehanizam uključeni jedan ili dva receptora za $\alpha 2M$ (LRP/ $\alpha 2MR$), koji prepoznaju i slobodni i vezani oblik $\alpha 2M$ (155). Vezivanje kompleksa IGFBP-1/ $\alpha 2M$ za receptor dovodi do njegovog brzog uklanjanja iz cirkulacije, čime se smanjuje inhibicioni efekat IGFBP-1 na parakrino i autokrino dejstvo IGF-I (162).

IGFBP-1 se može vezati i za $\alpha 5\beta 1$ integrin, čime se stimuliše ćelijska migracija, što je pokazano u kulturi CHO ćelija (96). Za interakciju sa integrinima odgovoran je RGD fragment u sekvenci IGFBP-1. Integrini su familija heterodimernih membranskih glikoproteina, koji na površini ćelije igraju ulogu receptora. Poznato je da u mnogim tkivima ćelijska migracija uključuje vezivanje integrinskog receptora za RGD sekvencu proteina vanćelijskog matriksa (194). Shodno tome, interakcijom sa integrinom, IGFBP-1 ima direktan uticaj na migraciju ćelija. Smatra se da je ovo dejstvo IGFBP-1 nezavisno od IGF peptida, odnosno da ne obuhvata aktivaciju IGF-1R.

2.4 Učešće IGFBP-1 u pojedinim (pato)fiziološkim procesima

Različiti IGFBP molekuli učestvuju u različitim (pato)fiziološkim procesima u organizmu, a IGFBP-1 je direktno uključen u reakcije koje su važne za regulisanje

koncentracije glukoze u cirkulaciji i u mitogene/metaboličke puteve koji su odgovorni za rast fetusa.

2.4.1 Oralni test tolerancije glukoze – OGTT

Oralni test tolerancije glukoze je klinički test za određivanje brzine uklanjanja glukoze iz krvi. Test se koristi za dijagnozu dijabetesa, rezistencije na insulin i drugih poremaćaja u metabolizmu glukoze. Standardna procedura izvođenja testa podrazumeva određivanje početne koncentracije glukoze u krvi tj. pre unošenja rastvora glukoze (nulti uzorak) i dalje nakon uzimanja glukoze oralno, 75 g u 200 mL vode (195). Obično se na svaki puni sat (1-3 h) meri koncentracija glukoze u krvi. U uzorcima se nekad određuje i koncentracija insulina i C-peptida. Referentna vrednost za koncentraciju glukoze u krvi pre OGTT je 4,0-6,2 mmol/L (0 sat). Kod zdravih osoba maksimalna koncentracija glukoze u krvi se dostiže posle 1 h i ne bi trebalo da prelazi 11,1 mmol/L (195, 196). Nakon dostignutog maksimuma, koncentracija glukoze opada i vraća se ili približava početnoj vrednosti nakon 2 h. Koncentracija insulina je, takođe, najveća posle 1 h, ali je za postizanje bazalne vrednosti potrebno 3 h, nekad i duže. Nivo ukupnog IGF-I ostaje isti tokom OGTT, dok se smanjenje koncentracije IGFBP-1 događa posle 2 h i nastavlja do kraja testa (197). Postoji fazno pomeranje odgovora u osi insulin/IGFBP-1. Koncentracija IGFBP-1, naime, opada tek nakon što se povećana koncentracija insulina u krvi održava izvesno vreme. Kod osoba sa smanjenom tolerancijom na glukozu, svi odgovori kasne za 1 do 2 h.

Tokom OGTT, kod zdravih osoba dolazi i do promene u međusobnom odnosu izoformi IGFBP-1. Utvrđeno je da se tokom testa najpre iz cirkulacije uklanja oblik IGFBP-1 koji je najviše fosforilovan (198). Ranije je rečeno da fosforilovanje stabilizuje IGFBP-1 u pogledu proteolize, ali očigledno da specifična situacija, kao što je OGTT, dovodi do aktivacije enzima koji podstiče razlaganje fosfoforme IGFBP-1. Iako se ne zna identitet ovog enzima, moguće je da je u pitanju fosfataza. Smanjenje forme IGFBP-1 sa najvećim afinitetom za IGF molekule, ima za posledicu preraspodelu

IGF liganada na druge IGFBP-1 forme, manje fosforilovane, sa manjim afinitetom za IGF, što znači lakše otpuštanje IGF peptida.

2.4.2 Diabetes mellitus tip 2 –DM2

Diabetes mellitus tip 2 je patofiziološko stanje koje nastaje kombinacijom faktora rezistencije na insulin i nedovoljnog lučenja insulina iz pankreasa. Poznat je i kao insulin nezavisni tip dijabetesa (196). Za IGFBP-1 se veruje da je uključen u mehanizam naknadnog, sporijeg snižavanja glukoze u krvi, u poređenju sa brzim efektima koje ima sam insulin. IGFBP-1 je ujedno i marker osetljivosti na insulin, s obzirom da je u inverznoj korelaciji sa rezistencijom na insulin i da insulin direktno utiče na IGFBP-1 sintezu (199). Nizak bazalni nivo IGFBP-1 ukazuje na hiperinsulinemiju (200, 201) i povezan je sa razvojem DM2 (199). Mala koncentracija ovog proteina može biti marker rezistencije na insulin, posledica gojaznosti i marker potencijalnih kardiovaskularnih bolesti (199). Pošto IGFBP-1 utiče na koncentraciju slobodnog, fiziološki aktivnog IGF-I, pokazano je da je povećana koncentracija IGF-I u cirkulaciji u direktnoj vezi sa smanjenim rizikom od nastanka DM2 (202). Prema jednoj studiji, koncentracija IGFBP-1 kod zdravih osoba je bolji pokazatelj odgovora organizma na hiperinsulinemiju, nego što su to koncentracije glukoze i insulina (203). U ranoj trudnoći, niska koncentracija IGFBP-1 može biti marker potencijalnog nastanka gestacionog dijabetesa (204). Pod grupom sa visokim faktorom rizika od nastanka DM2 se smatra ona kod koje se javlja kombinacija sledećih faktora: nasleđe DM2 u porodici, velika koncentracija glukoze u krvi, širok obim struka (u odnosu na visinu osobe) i niske vrednosti IGFBP-1 (205). Sa druge strane, objavljeni su rezultati studije (206) koja je ukazala na paradoksalno povećanje koncentracije IGFBP-1 nakon post-prandijalne hiperglikemije kod gojaznih pacijenata koji imaju DM2 i, suprotno, smanjen odgovor IGFBP-1 na povećanje nivoa insulina tokom OGTT. Ovakvi podaci ukazuju da je mehanizam regulacije veoma složen, sa većim brojem učesnika osim insulina i IGFBP-1.

U eksperimentu u kome su testirane razne kombinacije biohemijskih parametara kao potencijalnih markera za nastanak i razvoj DM2, utvrđeno je da je određivanje para IGFBP-1/proinsulin korisnije nego para IGFBP-1/insulin (205). Konstatovano je da na progresiju DM2 više utiče nivo proinsulina („32-33 split proinsulin”) nego nivo insulina (207). Povezanost IGFBP-1 i proinsulina sugerše da portalni prenos insulina reflektuje različite (i naizgled neočekivane) koncentracije IGFBP-1 u krvi (208, 209).

2.4.3 Hipoglikemija

Kao što je rečeno, koncentracija IGFBP-1 raste tokom gladovanja i stanja hipoglikemije. Veruje se da je za povećanje koncentracije IGFBP-1 kod akutnih hipoglikemija odgovorna supresija endogenog izlučivanja insulina (210). Promena IGFBP-1 se događa na isti način kod stanja akutne hipoglikemije izazvane insulinom i kod pacijenata sa DM1 (insulin zavisni tip dijabetesa). Povećanje koncentracije IGFBP-1 u krvi počinje tek jedan sat nakon što glukoza dostigne svoj najniži nivo (211) i kašnjenje u kontraregulatornom fiziološkom odgovoru ne čini IGFBP-1 dobrim markerom kod akutnih hipoglikemija. Produženo trajanje povećane koncentracije IGFBP-1 u krvi kod dužeg perioda gladovanja, može efikasno blokirati neželjenu hipoglikemijsku aktivnost IGF molekula (211). U stanjima produženog gladovanja, stimulacija sinteze IGFBP-1 zavisi kako od insulina, tako i od kontraregulatornih hormona, pre svega kortizola (212). Poznato je da su efekti insulina i kortizola veoma izraženi tokom gladovanja, međutim sam mehanizam njihovog uticajana sintezu IGFBP-1 nije utvrđen. U eksperimentu sa pacovima, kojima je prethodno odstranjena nadbubrežna žlezda i čija je koncentracija kortikosterona u krvi bila gotovo nemerljiva, došlo je do promene IGFBP-1 u skladu sa promenom insulina, mada, ne u tolikoj meri kao kod kontrolne grupe pacova sa nadbubrežnom žlezdom (145).

2.4.4 Aktivni trening

Dinamično i metabolički aktivno skeletno mišićno tkivo ima sposobnost brze adaptacije na promenu funkcionalnih komandi, što doprinosi pozitivnim efektima vežbanja i aktivnog treninga. Fizički trening pozitivno utiče na zaštitu organizma od DM2 i kardiovaskularnih bolesti. Mali je broj objavljenih radova na temu povezanosti aktivnog treninga i promene IGF sistema, iako se pretpostavlja da je od svih lokalnih faktora rasta koji imaju uticaj na adaptaciju mišićnog tkiva, uloga IGF-I najznačajnija (213). Smatra se da, pored IGF-I, i molekuli IGFBP-1 i IGFBP-3 imaju ulogu u procesu adaptacije organizma u uslovima brzih promena koncentracije glukoze tokom aktivnog treninga.

Koncentracija IGFBP-1 se povećava posle napornog vežbanja, uporedo sa ubrzanom potrošnjom rezervi glukoze, što je dovelo do pretpostavke o fiziološkoj ulozi IGFBP-1 u zaštiti organizma od hipoglikemije (78, 213, 214). Pretpostavljena je obrnuta proporcionalnost u koncentraciji slobodnog IGF-I i IGFBP-1 u cirkulaciji (156, 197). Međutim, smanjenje koncentracije slobodnog IGF-I zajedno sa povećanjem koncentracije IGFBP-1 je potvrđeno u nekim (206), ali ne i u svim eksperimentima (215, 216).

Produženi aktivni trening i vežbanje imaju različit efekat na IGF-I i IGFBP molekule u cirkulaciji osoba koje su već u dobroj fizičkoj kondiciji i onih koje su tek počele da treniraju (217). Veoma naporan trening, gde je potrošnja energije mnogo veća od unosa, može dovesti do smanjenja koncentracije IGF-I u krvi (218). Međutim, kod osoba srednje dobi uočeno je povećanje IGF-I tokom vežbanja (219), što upućuje na povezanost procesa starenja, vežbanja i njihovog kombinovanog efekta na IGF sistem.

Faktori koji utiču na promene IGFBP-1 tokom vežbanja mogu biti hormonski (insulin, kortizol, adrenalin, glukagon) ili neki drugi kao što su intenzitet treninga, mišićna masa i nutritivni status. Ovi ostali faktori mogu uticati direktno na IGFBP-1 ili preko pomenutih hormona. Ranije se smatralo da je za povećanu sintezu IGFBP-1 tokom vežbanja isključivo odgovorno smanjenje koncentracije insulina u krvi. Međutim, kada su smanjene koncentracije insulina i glukoze nadoknađene oralnim uzimanjem šećera, i dalje je zapažena povećana koncentracija IGFBP-1, mada u manjoj

meri (78). Zaključeno je da i drugi faktori učestvuju u samom procesu regulacije. Jedan od njih je interleukin 6 (IL-6), čija se koncentracija povećava tokom vežbanja i dovodi do povećanja IGFBP-1 (213). Istraživači koji su ustanovili spregu IL-6/IGFBP-1 nisu našli promenu u koncentraciji IGF-I. Uočili su, međutim, rast koncentracije kortizola 3 h pre povećanja koncentracije IGFBP-1. Shodno tome, pretpostavka je bila da porast kortizola stimuliše sintezu IGFBP-1, podstičući transkripciju.

Drugi važan metabolički put, osim insulinskog, kojim se utiče na koncentraciju IGFBP-1 tokom vežbanja je proteoliza. U većem broju studija je pokazano da tokom aktivnog treninga dolazi do znatnog povećanja koncentracije i aktivnosti MMP u cirkulaciji (220). MMP se sintetišu lokalno u skeletnom mišiću, dejstvom određenih stimulanasa, a naročito onih koji uzrokuju mehanički stres, kao što je naporno vežbanje (221). Želatinaze (MMP-2 i MMP-9) su do sada najviše ispitivane MMP u mišićnom tkivu (221).

Već je rečeno da je deo IGFBP-1 u krvi vezan za α 2M, koji ga štiti od proteolize. Aktivno vežbanje može uticati na povećanje koncentracije α 2M, ali i na kvalitativne promene u strukturi samog α 2M molekula (222). Konstatovano je da aktivni trening dovodi do skraćanja saharidnih lanaca na molekulima α 2M i alfa1-kiselog glikoproteina, dok se njihova koncentracija ne menja. Pretpostavka je da se delovi saharidnih lanaca utroše tokom vežbanja za potrebe metabolizma. Promena u strukturi α 2M može izmeniti interakciju α 2M sa ligandima, menjajući njihovu raspodelu između slobodne i vezane forme.

2.4.5 Fetalni rast

Fetalni rast je složen proces na koji utiču genetski, nutritivni, hormonski faktori, kao i faktori okruženja. IGF sistem je jedan od faktora koji ima ključnu ulogu u procesu rasta i pravilnog razvoja fetusa i placente. U regulaciji fetalnog rasta učestvuju IGF sistemi i fetusa i majke (223, 224). U tkivu fetusa, IGF molekuli mogu da se detektuju od prvog trimestra trudnoće na dalje. Koncentracija IGF molekula u cirkulaciji fetusa se povećava sa odmicanjem trudnoće i u direktnoj je vezi sa težinom ploda pri rođenju

(225). Pokazano je da mutacije gena za IGF kod miševa dovode do različitih oblika zastoja u rastu (226). Od 9-12. nedelje gestacije dolazi do naglog porasta koncentracije IGFBP-1 i IGFBP-2 u amnionskoj tečnosti, a oni su ujedno i glavni vezujući proteini ljudskog fetusa (225). Od 16. nedelje gestacije konstantovano je uspostavljanje inverzne korelacija između koncentracije IGFBP-1 fetusa i težine ploda. Drugim rečima, što je više IGFBP-1, manje je bioaktivnog slobodnog IGF-I/II, a samim tim je i rast fetusa manji. IGFBP-1 je determinanta u kontrolnom mehanizmu koja direktno reguliše sam proces rasta. Kod majke, koncentracije IGF-I i IGFBP-1 u cirkulaciji takođe rastu sa odmicanjem trudnoće. Na mestu razgraničavanja fetusa i majke, IGFBP-1 i IGFBP-3 se luče u velikim količinama, a njihovim modifikacijama se naknadno menja afinitet za IGF-I. Izvesno je da greške u post-translacionom procesu mogu promeniti tok fetalnog razvoja i rasta u materici (224). Do restrikcije rasta fetusa može doći i usled anomalija IGF receptora, ali taj patofiziološki put nije usko povezan sa samim IGFBP molekulima (227).

Zastoj u rastu fetusa („fetal growth restriction”, FGR) je poremećaj u trudnoći, kada fetus nije sposoban da dostigne genetski predodređenu težinu (228). Mnogo studija je pokazalo da je koncentracija IGF-I manja kod novorođene dece smanjenog rasta. IGF-II ima važniju ulogu od IGF-I tokom embrionalnog rasta (229, 230), dok su za fetalni rast važna oba faktora. U ovim razvojnim fazama, glavni regulator njihovog dejstva je IGFBP-1, koji se sintetiše u jetri i drugim tkivima fetusa (231, 232).

Uzrok povećane sinteze i transporta IGFBP-1 u cirkulaciji fetusa ili majke, što dovodi do zastoja u rastu fetusa, još nije poznat. Jedna od hipoteza je da su za zastoj odgovorni povećana koncentracija glukokortikoida i fetalni stres, koji dovode do insuficijencije placente (233, 234). Normalan razvoj placente je kritičan faktor za fetalni rast. Glukokortikoidi u fiziološkom opsegu su neophodni u procesu implantacije, kao i tokom gestacijskog perioda. Međutim, prevelika izloženost ovim hormonima dovodi do defekta u razvoju placente i fetusa (235). U eksperimentu sa životinjama, davanje sintetičkih glukokortikoida majci tokom kasne faze gestacije, dovelo je do smanjenja veličine placente (236). Glukokortikoidi učestvuju u procesu nastanka sinciotrofoblasta spajanjem ćelija citotrofoblasta, kao i u njegovoj diferencijaciji i sazrevanju (237, 238). Kortikosteroidi utiču i na sekretornu funkciju placente, najviše na

lučenje prostaglandina, placentnog laktogena, leptina, estrogena i progesterona (239, 240).

Fosforilovanje IGFBP-1 je znatno važniji mehanizam regulacije aktivnosti i funkcije ovog molekula u fetalnom periodu rasta, nego što je to promena u njegovoj koncentraciji (29). Ranije je rečeno da IGFBP-1 u amnionskoj tečnosti tokom „zdrave” trudnoće nije fosforilovan ili je fosforilovan u malom stepenu, za razliku od IGFBP-1 u cirkulaciji (100). Pored toga što fosforilovani IGFBP-1 ima veći afinitet za IGF od nefosforilovanog oblika, on vezuje radije IGF-I nego IGF-II (241). Prema tome, tokom trudnoće afinitet IGFBP-1 za IGF-I je manji nego za IGF-II zbog prisustva nefosforilovanog i malo fosforilovanog oblika IGFBP-1 (241). U cirkulaciji majke, kao i u amnionskoj tečnosti, prisustvo izoformi IGFBP-1 koje se razlikuju u stepenu fosforilovanja se drastično menja tokom trudnoće (241). Gotovo celokupan IGFBP-1 je nefosforilovan u ranoj trudnoći (kako u amnionskoj tečnosti, tako i u decidui), dok serum majke sadrži sve oblike IGFBP-1. Sa napredovanjem trudnoće počinju da se stvaraju fosfoforme IGFBP-1 u decidui. Na kraju gestacionog perioda, skoro sav IGFBP-1 je potpuno fosforilovan. Odnos pojedinih fosfoformi se menja u slučaju FGR (242). Ovakva promena međusobnog odnosa fosfoformi je značajna ne samo u fiziološkom, nego i u dijagnostičkom smislu. Hakala-Ala-Pietila i saradnici su pokazali da određivanje IGFBP-1 iz amnionske tečnosti u drugom trimestru, može poslužiti u proceni rasta fetusa (243).

U toku su intenzivna istraživanja koja obuhvataju određivanje stepena fosforilovanja pojedinih Ser ostataka IGFBP-1, a u cilju sagledavanja mogućnosti upotrebe takvih podataka u dijagnostičke svrhe. Određivanjem relativnog prisustva fosfopeptida nakon fragmentacije IGFBP-1 primenom metode masene spektrometrije, ustanovljeno je povećanje stepena fosforilovanja na Ser¹⁰¹ (4 puta), Ser⁹⁸/Ser¹⁰¹ (7 puta) i Ser¹⁶⁹ (23 puta) kod novorođene dece sa FGR (244). Pošto se ovi Ser ostaci nalaze u regionu IGFBP-1 koji je odgovoran za vezivanje IGF peptida, oni direktno regulišu afinitet za IGF ligande. Promenom rasporeda i stepena fosforilovanja IGFBP-1, prema tome, utiče se na vezivanje IGF molekula, odnosno na rast fetusa.

3. MATERIJAL I METODE

3.1 Osnovne hemikalije

U radu su korišćene osnovne hemikalije, nabavljene od sledećih proizvođača:

Beolab, Beograd

Etanol

Tween-20

Bio-Rad Laboratories, Hercules

Proteinski standardi za elektroforezu – “Low range molecular mass markers”

Proteinski standardi za SELDI-TOF/MS–“ProteinChip all-in-one protein standards II”

Sinapinska kiselina (SPA)

Trifluorosirćetna kiselina (TFA)

BIOSERV Diagnostics, Rostock

ELISA komplet za određivanje koncentracije IGFBP-1

Diagnostic System Laboratories, Webster

ELISA komplet za određivanje koncentracije IGFBP-1

Rekombinantni humani IGFBP-1

DrOetker, Zagreb

Želatin

ICN Biomedicals, Costa Mesa

Akrilamid

Natrijum-azid

Tris(hidroksimetil)-aminometan (Tris)

Rekombinantni humani IGF-I

INEP, Beograd

RIA komplet za određivanje koncentracije IGF-I

RIA komplet za određivanje koncentracije insulina

¹²⁵I-IGF-I

KODAK, Paris

Hemikalije za razvijanje i fiksiranje rentgen filmova

Rentgen film MXB (100 NIF – 13 × 18)

Merck-Alkaloid, Skoplje

Mangan-hlorid

Natrijum-dihidrogenfosfat

Natrijum-hidrogenfosfat

Merck, Darmstadt Brom-

fenol plavo Glacijalna

sirćetna kiselina Laktoza

(Lac)

PerkinElmer Life and Analytical Sciences, Boston

Nitrocelulozna membrana (0,45 µm), Whatman protran

Pierce, Minneapolis

ECL reagens

Pierce Biotechnology, Rockford

Komplet za imunoprecipitaciju (IP) - Pierce Coimmunoprecipitation kit

Sigma-Aldrich, Steinheim

4-(2-hidroksietil)-1-piperazin-etansulfonska kiselina (HEPES)

Amonijum persulfat

Coomassie Brilliant Blue R-250

Fukoza (Fuc)

Glicin

Manoza (Man)

Metil- α -glukopiranozid

Metil- α -manopiranozid

N,N' – metilen bisakrilamid

N,N,N',N' – tetrametilen-diamin (TEMED)

N-acetil-glukozamin (GlcNAc)

Natrijum-dodecil-sulfat (SDS)

Ponso S

Zorka Pharma, Šabac

Dinatrijum-etilendiamin-tetrasirćetna kiselina (EDTA)

Glicerol Gvožđe(III)-

hlorid Hlorovodonična

kiselina Kalcijum-hlorid

Magnezijum-hlorid

Metanol

Natrijum-acetat

Natrijum-hidroksid

Natrijum-hlorid

Vector Laboratories, Burlingame

U Tabeli 1 su navedeni korišćeni mobilizovani lektini i njihova specifičnost (245).

Tabela 1. Lektini i njihova specifičnost

Lektin	Poreklo	Specifičnost
Con A	<i>Canavalia ensiformis</i>	Man α (1,6) Man α (1,3)Man N-glikani
SNA	<i>Sambucus nigra</i>	Sia α (2,6)Gal, Sia α (2,6)GalNAc N-glikani
RCA-I	<i>Ricinus communis</i>	Gal β (1,4)GlcNAc N-glikani
PHA-E	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Gal β (1,4)GlcNAc β (1,2)Man Kompleksni glikani
PHA-L	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Gal β (1,4)GlcNAc β (1,2)[Gal β (1,4)GlcNAc β (1,6)]Man Kompleksni glikani
WGA	<i>Triticum vulgaris</i>	GlcNAc β (1,4)GlcNAc β (1,4)GlcNAc, Man β (1,4)GlcNAc β (1,4)GlcNAc N- i O-glikani
s-WGA	<i>Triticum vulgaris</i>	GlcNAc β (1,4)GlcNAc Ne vezuje sialinsku kiselinu (Sia)
ECL	<i>Erythrina cristagalli</i>	Gal β (1,4)GlcNAc
UEA	<i>Ulex europaeus</i>	Fuca(1,2)Gal
LCA	<i>Lens culinaris</i>	α -Man > α -Glc, α -GlcNAc

3.2 Puferi i rastvori

Afinitetna hromatografija sa imobilizovanim metalnim jonima (IMAC)

MES pufer (osnovni) - 50 mM MES (2-(N-morfolino)-etansulfonska kiselina)/0,5 M NaCl, pH 5,5

Fosfatnirastvor (FR) - 0,2 M NaH₂PO₄, pH 8,0

Boratnirastvor (BR) - 0,1 M Na₂B₄O₇/1 M NaCl, pH 10,0

Imunoafinitetna hromatografija (IAC)

TBS pufer (osnovni) - 10 mM Tris-HCl/1 M NaCl, pH 7,4

Elucioni pufer (EP) - 0,1 M glicin-HCl, pH 2,5

Neutralizacioni pufer (NP) - 1 M Tris-HCl, pH 8,0

Imunoprecipitacija

TBS pufer - 2,5 mM Tris/0,15 M NaCl/1 mM EDTA/1% NP-40/5% glicerol, pH 7,4

Neutralizacioni pufer (NP) - 2 M Tris-HCl, pH 8,9

Lektinska afinitetna hromatografija (LAC)

HBS puferi (osnovni) za:

ConA (pufer A) - 20 mM HEPES/0,5 M NaCl/0,08% NaN₃/1 mM CaCl₂/1 mM MgCl₂/1 mM MnCl₂, pH 7,5

LCA (pufer B) - 10 mM HEPES/0,08% NaN₃/0,1 mM CaCl₂/0,01 mM MnCl₂, pH 7,5

RCA-I, WGA i s-WGA (pufer C) - 10 mM HEPES/0,15 M NaCl/0,08% NaN₃, pH 7,5

ECL, SNA i UEA (pufer D) –pufer C + 0,1 mM CaCl₂, pH 7,5

PHA-E (pufer E) – pufer C + 0,1 mM CaCl₂+ 0,01 mM MnCl₂, pH 8,0

PHA-L (pufer E) – pufer C + 0,1 mM CaCl₂+ 0,01 mM MnCl₂, pH 7,5

Neutralizacioni pufer (NP) - 2 M Tris-HCl, pH 8,9

Elektroforeza i imunoblot

PBS -50mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄/0,15 M NaCl, pH 7,5

Pufer za uzorke (PZU) –0,125 M Tris-HCl/4% (m/V) SDS/20% glicerol/0,01% brom-fenol-plavo, pH 6,8

Pufer za elektroforezu - 25 mM Tris-HCl/0,19 M glicin/0,1% SDS, pH 8,3

Pufer za elektrotransfer (pufer za “blotovanje”) – 25 mM Tris-HCl/0,19 M glicin/20% metanol, pH 8,3

TBST pufer - 10mM Tris-HCl/0,15 M NaCl/0,1% Tween-20, pH 7,4

Izolovanje IGFBP-1 iz amnionske tečnosti

Osnovni fosfatni rastvor (FR) - 25 mM Na₂HPO₄, pH 7,1

Fosfatni rastvor FR2 - 25 mM Na₂HPO₄/0,2 M NaCl, pH 7,1

Elucioni pufer (EP) - 10 mM Na₂HPO₄/0,2 M NaCl/5% izopropanol, pH 7,1

Elucioni pufer za gel filtraciju EP2 – 20 mM Tris-HCl, pH 8,0

SELDI-TOF/MS

PBS - 50 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄/0,15 M NaCl, pH 7,2

Pufer za blokiranje (BP) - 0,5 M Tris-HCl, pH 8,0

Pufer za vezivanje (PVIM) - 0,1 M Na₂H/NaH₂PO₄ /0,5 M NaCl, pH 7,0

Pufer za vezivanje (PVQ) - 50 mM Na/amonijum fosfat, pH 7,0

Pufer za vezivanje (PVCM) - 50 mM Na/amonijum acetat, pH 5,0

Rastvor SPA - 50% sinapinska kiselina u rastvoru acetonitril/voda/trifluorosirćetna kiselina (50/49,9/0,1%)

3.3 Smole

DEAE-Sepharose, Sigma-Aldrich, Steinheim

Fenil-Sepharose, Sigma-Aldrich, Steinheim

G-75 Sephadex, Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala

G-100 Sephadex, Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala

IDA agarozna, Sigma-Aldrich, Steinheim

IAC smola - Proteomelab IgY-12 High Capacity Proteome Partitioning kit, Beckman Coulter, Fullerton

Lektin-agarozna smole su navedene u Tabeli 1.

3.4 Antitela

Poliklonska anti-IGFBP-1 antitela (koza), Santa Cruz Biotechnology Inc, Santa Cruz

Poliklonska anti-IGFBP-1 antitela (koza), Diagnostic System Laboratories, Webster

Poliklonska anti-IGFBP-1 antitela (kunić), GroPep, Adelaide

Poliklonska anti-IGFBP-1 antitela (kunić), AbD Serotec, Oxford

Poliklonska anti- α 2M antitela (kunić), AbD Serotec, Oxford

HRP-konjugovana anti-kozija IgG antitela (svinja), Biosource, Camarillo

HRP-konjugovana anti-kunićeva IgG antitela (magarac), Pierce Biotechnology, Rockford

3.5 Uređaji i aparati

U radu su korišćeni sledeći uređaji i aparati:

Centrifuga MiniSpin plus, Eppendorf

Centrifuga LC-321, Tehtnica

Filtriza ultrafiltraciju (membrane sa porama koje zadržavaju proteine masa većih od 10 kDa), Microcon centrifugal filter devices, Millipore

Frakcioni kolektor HeliFrac, Pharmacia

Gama brojač Wallac Wizard, Perkin-Elmer

Kinetor MR-1, LKB

Kombinovani pH/konduktometar InoLab 720, WTW

Magnetna mešalica ARE, Velp

Maseni spektrometar ProteinChip SELDI-TOF, serija 4000, Bio-Rad Laboratories

Sistem za elektroforezu Mini-PROTEAN Tetra Cell, Bio-Rad Laboratories

Spektrofotometar Ultrospec 2000, Pharmacia

Vaga analitička B6, Mettler

Vaga tehnička, Chyo

Vortex ZX3, Velp

3.6 Uzorci seruma

U ovom radu korišćeni su uzorci seruma odraslih osoba. Svi serumi su izdvojeni u roku od 40 min nakon venepunkcije, koja je urađena ujutro nakon 12 h gladovanja (osim u slučaju OGTT-a). Uzorci seruma su čuvani na -40 °C i analizirani su u roku od 2 meseca.

Kontrolnu grupu uzoraka (K) činili su serumi 120 osoba starosti 20-76 godina, BMI 20-32 kg/m², za koje je usmenom anketom i određivanjem osnovnih biohemijskih i hematoloških parametara odlučeno da se mogu svrstati u referentnu grupu. Referentne vrednosti osnovnih biohemijskih i hematoloških parametara su: glukoza 4,2-6,4 mmol/L, urea 1,7-8,3 mmol/L, kreatinin 53-124 μmol/L, ukupni bilirubin do 24 μmol/L, AST do 40 U/L, ALT do 37 U/L, LDH 230-460 U/L, CK do 270 U/L, holesterol 3,6-6,2 mmol/L, trigliceridi 0,4-2,3 mmol/L, gvožđe 11-27 μmol/L, TIBC 45-75 μmol/L, feritin 11-325 pmol/L, ukupni proteini 62-81 g/L, albumin 35-55 g/L, leukociti 4-12×10⁹/L, eritrociti 4,0-6,2×10¹²/L, trombociti 150-400×10⁹/L, hemoglobin 110-170 g/L, sedimentracija 3-9 mm/h, HbA1c 4,0-6,0%. Osobe u kontrolnoj grupi su bile nepušači, hranili su se svim vrstama namirnica i fizičkim aktivnostima su se bavile samo rekreativno. Za potrebe pojedinih eksperimenata, sakupljani su uzorci seruma sledećih grupa osoba:

1. Pacijenti sa DM2:

n=32, starost 40-62 godine, BMI 27-35 kg/m². Izabrani su pacijenti sa najlošijom kontrolom koncentracije glukoze, što je provereno u OGTT testu.

2. Osobe sa hipoglikemijom:

n=17, starost 32-56 godine, BMI 24-31 kg/m². Hipoglikemija je klinički dijagnostifikovana kao koncentracija glukoze u krvi ispod 4,0 mmol/L, sa epizodama pada ispod 3,0 mmol/L.

3. Sportisti:

n=30, starost 20-24 godine, BMI 21-24 kg/m². Sakupljani su uzorci profesionalnih fudbalera prilikom sistematskog pregleda.

4. Pušači:

n=15, starost 35-57 godine, BMI 26-34 kg/m². U ispitivanju su učestvovali pušači koji puše minimum 1 kutiju cigareta dnevno, u vremenskom periodu dužem od 10 godina.

Prilikom formiranja kontrolne grupe za svaki eksperiment, vodilo se računa da osobe kontrolne grupe i ispitanici imaju odgovarajuće godine i BMI.

3.7 Određivanje standardnih biohemijskih parametara

U serumima ispitivanih grupa ljudi određivana je koncentracija biohemijskih parametara: glukoza, trigliceridi, holesterol, ukupni proteini, albumin, ukupni bilirubin, AST, ALT, CK, LDH, gvožđe, TIBC i feritin, a HbA1c je određivan iz pune krvi. Korišćeni su komercijalni dijagnostički testovi (Human, Wiesbaden).

3.8 Određivanje koncentracije insulina, IGF-I i IGFBP-1

Za određivanje koncentracije insulina i IGF-I u serumima su korišćeni komercijalni RIA testovi. Referentne vrednosti su bile: za insulin 5-25 mU/L i za IGF-I 16-44 nmol/L (za starosnu dob od 20 do 40 godina), odnosno 10-30 nmol/L (za starosnu dob od 41 do 75 godina). Koncentracija IGFBP-1 je merena metodom ELISA, referentne vrednosti su bile 0,04-1,8 μ mol/L. Dobijene koncentracije IGFBP-1, prema proizvođaču, predstavljaju ukupni IGFBP-1 (nefosforilovani i fosforilovani).

3.9 Određivanje specifičnosti antitela

U ovom radu utvrđivano je prisustvo i promene različitih molekulskih formi IGFBP-1: momomera, oligomera, fragmenata i kompleksa. Praksa je pokazala da različita antitela, bez obzira na deklaraciju proizvođača, ne mogu podjednako efikasno prepoznati sve ove forme. Da bi se utvrdilo koja su anti-IGFBP-1 antitela najbolja za primenu u ovom radu, testirana su četiri poliklonska anti-IGFBP-1 antitela, od četiri proizvođača. Testiranje je rađeno imunoblotom (opisano u poglavlju 3.12), a kao uzorci korišćeni su rekombinantni IGFBP-1, serum, amnionska tečnost (pozitivna kontrola) i seminalna plazma (negativna kontrola).

U posebnom eksperimentu je izvedeno blokiranje i uklanjanje anti-IGFBP-1 antitela (Santa Cruz). Antitela su inkubirana sa rhIGFBP-1 u molskom odnosu 1:100 preko noći na 4 °C, a onda je rastvor primenjen u imunoblotu, umesto primarnih anti-IGFBP-1 antitela.

Dodatna provera specifičnosti izabranih anti-IGFBP-1 antitela je urađena u seriji eksperimenata kombinujući amnionsku tečnost, anti-IGFBP-1 antitela, sa ili bez liganda IGF-I (obebežen izotopom ¹²⁵I). U eksperimentima je kao fiziološki uzorak korišćena amnionska tečnost koja, osim IGFBP-1, ne sadrži druge IGFBP. Prvo je 10 µL amnionske tečnosti (koncentracije IGFBP-1 5,4 µmol/L) u 990 µL 50 mM PBS, pH 7,5 inkubirano sa 5 x 10⁵ cpm ¹²⁵I-IGF-I (1 pmol) na 4 °C preko noći, a potom hromatografisano na Sephadex G-100 koloni (1,8 x 60 cm). Eluiranje proteina je izvršeno PBS puferom, nakon čega je merena radioaktivnost u frakcijama zapremine 2 mL. U drugom eksperimentu je u inkubacionu smešu dodato 100 pmol neobebeženog IGF-I. U sledećem eksperimentu je inkubirana amnionska tečnost sa anti-IGFBP-1 antitelima (2,5 nmol IgG) preko noći, a nastali kompleksi IGFBP-1 sa antitelima su taloženi proteinom A (246). Nakon centrifugiranja, supernatant je inkubiran sa ¹²⁵I-IGF-I i analiziran na hromatografskoj koloni.

3.10 Izolovanje IGFBP-1 iz amnionske tečnosti i citosola placente

Početni uzorak za izolovanje IGFBP-1 bio je zbirni uzorak amnionske tečnosti zapremine 140 mL, u kome je sadržaj IGFBP-1 iznosio 18,9 mg. Izolovanje IGFBP-1 je rađeno u tri koraka, primenom različitih hromatografskih matriksa. Posle svakog koraka, rađeni su eksperimenti za kvalitativno (dot blot) i kvantitativno (ELISA) određivanje IGFBP-1.

1. DEAE-Sepharose: kolona je uravnotežena osnovnim puferom FR, pH 7,1 (poglavlje 3.2) i na nju je nanet celokupan uzorak. Nakon ispiranja nevezanih proteina, eluiranje sa kolone je izvedeno dodavanjem NaCl u osnovni pufer. U prisustvu 0,1 M NaCl eluira se albumin i većina drugih proteina, u rastvoru 0,2 M NaCl eluira se frakcija

proteina koja sadrži IGFBP-1, a sa 0,5 M NaCl eluiraju se ostali proteini sa kolone (247).

2. Fenil-agaroz: kolona je uravnotežena u rastvoru FR2, pH 7,1 (poglavlje 3.2) i na nju je nanet zbirni uzorak nekoliko frakcija izdvojenih u koraku 1, u kojima je detektovan IGFBP-1 (skupljene frakcije su osenčene na Slici 9). Za specifično eluiranje IGFBP-1 upotrebljen je pufer EP, pH 7,1 (poglavlje 3.2), a zatim destilovana voda (247).

3. Sephadex G-75: kolona (1,6 × 60 cm, V=120 mL, 3-80 kDa, 20-80 μm) je uravnotežena u destilovanoj vodi i na nju je nanet zbirni uzorak nekoliko frakcija iz koraka 2, u kojima je detektovan IGFBP-1 (skupljene frakcije su osenčene na Slici 10). Za eluiranje je korišćen pufer EP2. Frakcije u kojima je prisutan IGFBP-1 (Slika 11) su sakupljene i koncentrovane do 1 mL.

Na isti način je izolovan IGFBP-1 iz citosola placente.

3.11 Imobilizovana metal-afinitetna hromatografija (IMAC)

Kolona agaroze sa imobilizovanom iminodisirćetnom kiselinom, IDA (1mL) je zasićena vodenim rastvorom 0,1M FeCl₃ (248). Nevezani joni metala su isprani destilovanom vodom i 0,1% rastvorom sirćetne kiseline. Kolona je uravnotežena u MES puferu, pH 5,5 (poglavlje 3.2). 100 μL seruma u 900 μL MES pufera je naneto na kolonu i recirkulisano na sobnoj temperaturi u toku 1 h. Nevezani proteini su isprani MES puferom. Eluiranje vezanih proteina je izvršeno sa 8 mL rastvora PR, pH 8,0. Kolona je regenerisana sa 10 mL rastvora BR, pH 10,0 i isprana destilovanom vodom pre narednog zasićenja jonima gvožđa.

3.12 Imunoafinitetna hromatografija (IAC)

Za imunoafinitetnu hromatografiju upotrebljena je IgY smola u mikrospin kolonama. Matriks je sadržao imobilizovana antitela na α 2M. Na 500 μ L suspenzije IgY smole je naneto 20 μ L seruma u 480 μ L TBS pufera, pH 7,4 (poglavljje 3.2). Inkubacija na rotatoru, na sobnoj temperaturi, je trajala 15 min (249). Nevezani proteini su odvojeni centrifugiranjem na $2000 \times g$ u toku 30 s, a kolona je isprana TBS puferom (2 x 500 μ L). Vezani proteini su eluirani EP puferom, pH 2,5 (2 x 100 μ L). Posle odvajanja od matriksa centrifugiranjem, rastvor specifično eluiranih proteina je neutralisan NP puferom, pH 8,0. Matriks je takođe neutralisan sa NP i intenzivno ispran TBS puferom pre nanošenja sledećeg uzorka.

3.13 Lektinska afinitetna hromatografija (LAC)

Lektini koji su korišćeni u eksperimentalnom radu i njihova specifičnost, dati su u Tabeli 1 (poglavljje 3.1). Kolone u kojima je bila agarozna sa imobilizovanim lektinom (1 mL) uravnotežene su u odgovarajućim HBS puferima (poglavljje 3.2). 100 μ L seruma u 900 μ L odgovarajućeg HBS pufera je naneto na kolone. Recirkulacija je vršena na sobnoj temperaturi u toku 1 h. Nevezani proteini su isprani sa 20 mL odgovarajućeg HBS pufera. Eluiranje specifično vezanih proteina je izvršeno u dve faze: 1) haptenskim ugljenim hidratom rastvorenim u 15 mL odgovarajućeg HBS pufera, pH 7,5 i 2) haptenskim ugljenim hidratom u 7 mL 0,1 M sirćetne kiseline, pH 3,0 (107). Eluiranje sa PHA-E- i PHA-L-agaroze je vršeno u jednom koraku, upotrebom 10 mL 0,1 M sirćetne kiseline. Specifični haptenski ugljeni hidrati, korišćeni za eluiranje, su bili: 0,5 M Lac za SNA-agarozu, smeša 0,2 M metil- α -glukopiranzida i 0,2 M metil- α -manopiranzida za Con A- i LCA-agarozu, 0,2 M Lac za RCA-I- i ECL-agarozu, 0,5 M GlcNAc za WGA- i s-WGA-agarozu i 0,1 M Fuc za UEA-agarozu. Frakcije sa najvećom koncentracijom proteina su sakupljene i neutralisane NP puferom, pH 8,9. Dijaliza neutralisanih frakcija je izvedena spram 0,15 M NaCl na 4 °C preko noći.

Frakcije su koncentrovane do zapremine od 1 mL uz pomoć filtera za ultrafiltraciju (limit od 10 kDa).

3.14 Imunoprecipitacija (IP)

Za imunoprecipitaciju je korišćen komercijalni komplet. Epoksi-aktiviranoj smoli (50 μ L suspenzije u mikrosplin koloni) dodato je 10 μ g anti-IGFBP-1 antitela, prema uputstvu proizvođača (250). 40 μ L seruma u 160 μ L TBS pufera, pH 7,4 je naneto na smolu sa imobilizovanim antitelima i inkubirano na 4 °C preko noći. Nevezani proteini su uklonjeni centrifugiranjem na 2000 \times g u toku 30 s, a smola je isprana TBS puferom. Vezani proteini su eluirani sa 110 μ L elucionog pufera, pH 2,8 (10 μ L + 2 \times 50 μ L), izdvojeni centrifugiranjem i neutralisanisa NP, pH 8,9 (svi puferi su dostavljeni u kompletu IP).

3.15 Elektroforetsko razdvajanje proteina (SDS-PAGE) i imunoblot

Elektroforetsko razdvajanje proteina seruma (SDS-PAGE) rađeno je prema standardnoj proceduri (251). Serumi su razblaženi u PBS puferu, pH 7,4 u odnosu 1/20, a zatim u PZU u odnosu 1/1. U eksperimentima pod redukujućim uslovima, pufer za uzorke je sadržavao još i 10% 2-merkaptoetanol. Uzorci su kuvani 7 min, koliko je neophodno da se raskinu kompleksi IGF sa vezujućim proteinima. Elektroforeza je vršena pri naponu od 200 V i jačini struje od 120 mA. Proteini seruma su nakon završene elektroforeze preneti elektrotransferom na nitroceluloznu membranu. Slobodna mesta na membrani su blokirana 5% rastvorom odmašćenog mleka u 10 mM TBST puferu, pH 7,4 na sobnoj temperature, uz mućkanje, u toku 45 min. Nakon blokiranja, membrana je ispirana TBST puferom i inkubirana u rastvoru primarnih antitelana 4 °C preko noći. Membrana je ispirana TBST puferom, a zatim inkubirana u rastvoru sekundarnih antitela konjugovanih sa HRP, u toku 30 min. Nakon još jedne serije

ispiranja, membrane je prenetu u ECL reagens. Posle 5 min, membrana je izložena interakciji sa rentgen filmom. Vreme ekspozicije je optimizovano u cilju dobijanja najoštrijih signala od specifičnih proteinskih traka, uz što slabiji pozadinski signal (obično oko 20 min). Film je razvijan upotrebom komercijalnih reagenasa prema proceduri: razvijanje 5 min, ispiranje u 5% sirćetnoj kiselini 1 min, fiksiranje 10 min i ispiranje vodom 15 min.

U cilju detekcije IGFBP-1 u hromatografskim frakcijama dobijenim u eksperimentu izolovanja IGFBP-1, rađen je dot blot.

3.16 Želatinska zimografija

Za određivanje aktivnosti želatinaza u uzorcima seruma primenjena je standardna želatinska zimografija (252). Korišćeni su SDS-PAGE gelovi sa 0,1% želatinom. Gelovi su bojeni 0,4% rastvorom boje Coomassie brilliant blue R-250. Aktivnost proteaza je uočena kao svetla traka na gelu, gde je izvršena proteoliza želatina. Elektroforeza je izvedena na način opisan u poglavlju 3.12.

3.17 SELDI-TOF masena spektrometrija

Za detaljniju analizu molekulskih formi i fragmenata IGFBP-1 korišćen je maseni spektrometar ProteinChip SELDI. Za ispitivanje različitih uzoraka (serum, hromatografske proteinske frakcije) upotrebljeno je nekoliko vrsta čipova: PS20, IMAC30, Q10, CM10 (253).

PS20 čip (sa epoksidnom grupom na površini) korišćen je za imobilizovanje antitela. 5 μ L (200 μ g/mL) anti-IGFBP-1 antitela naneto je na čip i inkubirano na 4 °C, u vlažnoj komori, preko noći. Površina čipa je isprana PBS puferom, pH 7,2 (poglavlje 3.2), a nevezana mesta su blokirana puferom BP, pH 8,0 tokom 1 h. Čip je ispran PBS

puferom i naneto je 5 μ L uzorka. Nakon inkubiranja u vlažnoj komori 3 h, čip je ispran PBS puferom, zatim destilovanom vodom i osušen je na sobnoj temperaturi.

IMAC30 čip, sa imobilizovanim metalnim jonima, je primenjen u cilju ispitivanja IGFBP-1 izoformi. 0,1 M FeCl_3 rastvor je nanet na površinu čipa i inkubiran 10 min. Čip je ispran u fazama: destilovana voda, 0,1 M Na-acetat pufer, pH 4,0 i destilovana voda. Nakon ispiranja, čip je uravnotežen u puferu za vezivanje PVIM, pH 7,0 (poglavlje 3.2), naneto je 5 μ L uzorka i inkubacija je trajala 3 h u vlažnoj komori na sobnoj temperaturi. Čip je ispran puferom PV, pa destilovanom vodom i osušen je na sobnoj temperaturi.

Q10 čip je, kao jak anjonski jonoizmenjivač, korišćen za vezivanje i ispitivanje negativno naelektrisanih IGFBP-1 molekula. Čip je uravnotežen u puferu za vezivanje PVQ, pH 7,0 (poglavlje 3.2), naneto je 5 μ L uzorka i dalje je procedura bila ista kao za IMAC30 čip.

CM10 čip je, kao katjonski jonoizmenjivač, korišćen za vezivanje i ispitivanje pozitivno naelektrisanih IGFBP-1 molekula. Čip je uravnotežen u puferu za vezivanje PVCM, pH 5,0 (poglavlje 3.2), naneto je 5 μ L uzorka i dalje je procedura bila ista kao za IMAC30 čip.

Nakon sušenja čipova, nanet je rastvor sinapinske kiseline (poglavlje 3.2) i, nakon ponovnog sušenja, snimani su spektri. Maseni spektri su čitani u opsegu m/z 1-300000, uz 8815 laserskih snopova po reaktivnoj površini na čipu, a energija lasera je bila 6000 nJ. Kalibracija instrumenta je izvršena namenskim standardima. Spektri su čitani i analizirani koristeći program CIPHERGEN Express 3.0 (Bio-Rad Laboratories, Hercules).

3.18 Denzitometrijska analiza

Za denzitometriju proteinskih traka na imunoblotovima i zimogramima je korišćen program Image Master Total Laboratory v2.01 (Amersham BioSciences, Buckinghamshire). Rezultati su izraženi u denzitometrijskim jedinicama (DJ).

3.19 Statistička obrada podataka

Za sve statističke obrade podataka korišćen je program SPSS 16.0. Za utvrđivanje statistički značajnih razlika između grupa uzoraka korišćen je Studentov t -test.

4. REZULTATI I DISKUSIJA

U ovoj tezi su ispitivane post-translacione modifikacije i interakcije IGFBP-1, kao i moguća povezanost ovih pojava sa određenim (pato)fiziološkim stanjima kod čoveka. Analizirane su fosfoforme, polimeri i fragmenti IGFBP-1, kao i kompleksi IGFBP-1/ α 2M. Stanja u kojima bi mogle nastati promene u odnosu na zdravog odraslog nepušača, koji je prosečno fizički aktivan, jesu dijabetes, hipoglikemija, pušenje i profesionalna sportska aktivnost.

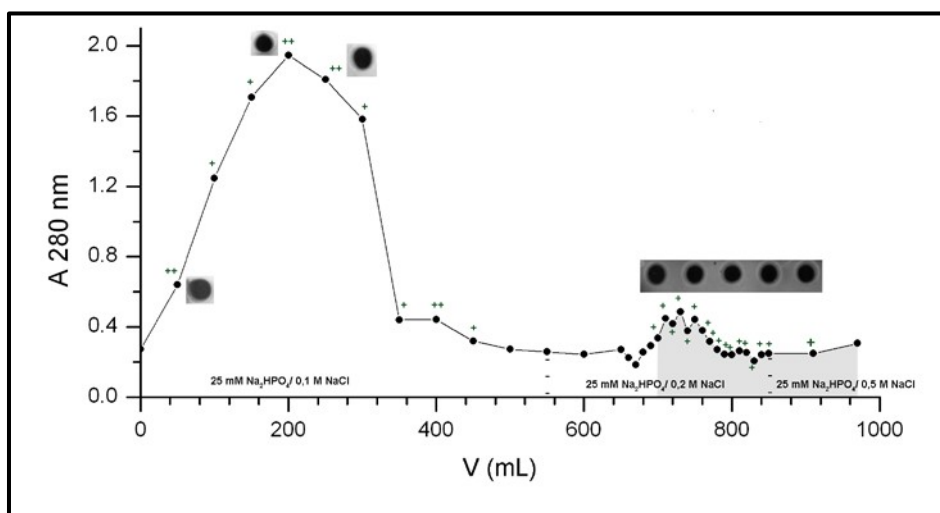
Poglavlje „Rezultati i diskusija” je podeljeno na celine, koje se bave analizom karakteristika IGFBP-1 kod zdravog čoveka, kod osoba sa poremećajem u regulaciji glukoze, kod aktivnih sportista - fudbalera i kod pušača bez utvrđenih zdravstvenih problema. Pre nego što se pristupilo ispitivanju IGFBP-1 molekulskih formi, izolovan je IGFBP-1 iz fizioloških uzoraka i detaljno je analizirana specifičnost većeg broja komercijalnih anti-IGFBP-1 antitela.

4.1 Izolovanje IGFBP-1

Komercijalno dostupan humani rekombinantni IGFBP-1 (hrIGFBP-1) je korišćen u našim eksperimentima ali, pošto je dostupan samo nefosforilovani peptid, želja je bila da se izoluje IGFBP-1 koji bi bio pravi fiziološki marker. Iako je zastupljenost pojedinih izoformi različita u različitim vrstama uzoraka, izolovanje IGFBP-1 je bilo moguće samo iz uzoraka u kojima je koncentracija relativno velika. Izolovanje iz seruma nije bilo moguće zbog vrlo male koncentracije. Izolovanje IGFBP-1 iz amnijske tečnosti i citosola placente je rađeno metodom kuplovanih hromatografija u tri etape: jonoizmenjivačka anjonska hromatografija, hidrofobna hromatografija i gel-filtracija, prema proceduri koju su razradili Wang i saradnici (247).

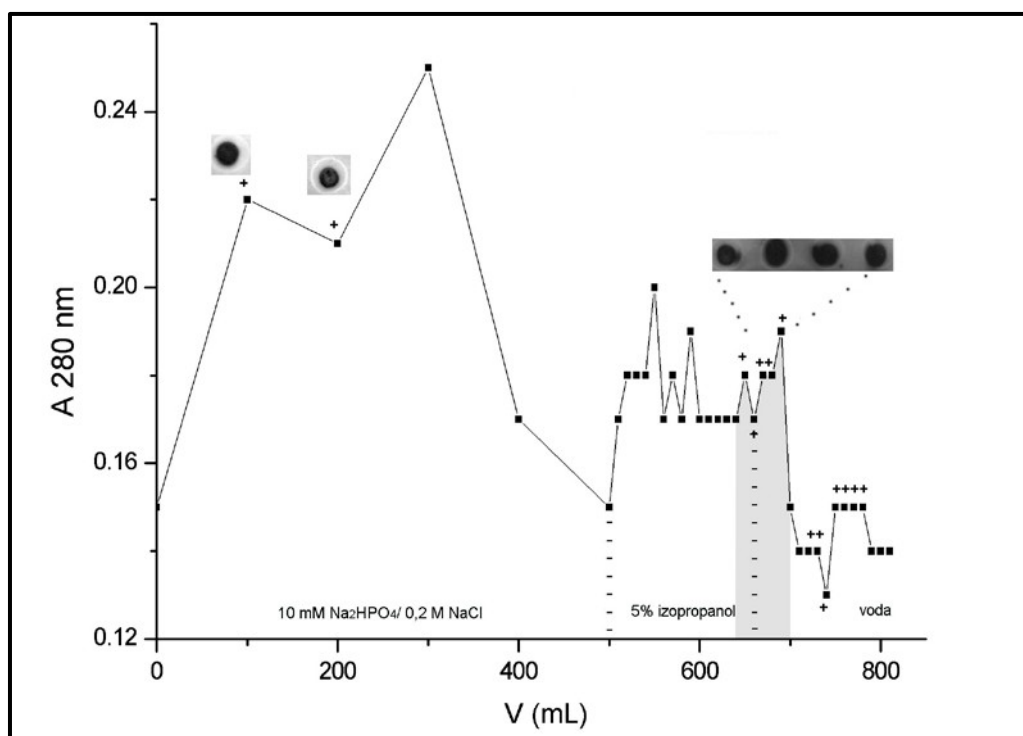
4.1.1 Izolovanje IGFBP-1 iz amnionske tečnosti

U početnom uzorku amnionske tečnosti za izolovanje IGFBP-1 određeno je ukupno 18,9 mg IGFBP-1. Metod i svi detalji izolovanja IGFBP-1 su dati u poglavlju 3.10. U skupljenem frakcijama je merena apsorbanca na 280 nm, a prisustvo IGFBP-1 utvrđeno je metodom dotblota sa anti-IGFBP-1 antitelima (Slika 9). Posle svakog koraka u izolovanju, koncentracija IGFBP-1 je određena metodom ELISA u frakcijama koje su bile imunoreaktivne u dot blotu (rezultati su prikazani u Tabeli 2).



Slika 9. Izolovanje IGFBP-1 iz amnionske tečnosti na koloni DEAE-Sepharose – promena apsorbance i imunoreaktivnosti eluiranih frakcija. Dot blot analiza: krstići na grafiku označavaju prisustvo IGFBP-1. Na grafiku je osenčena oblast frakcija koje su dalje korišćene

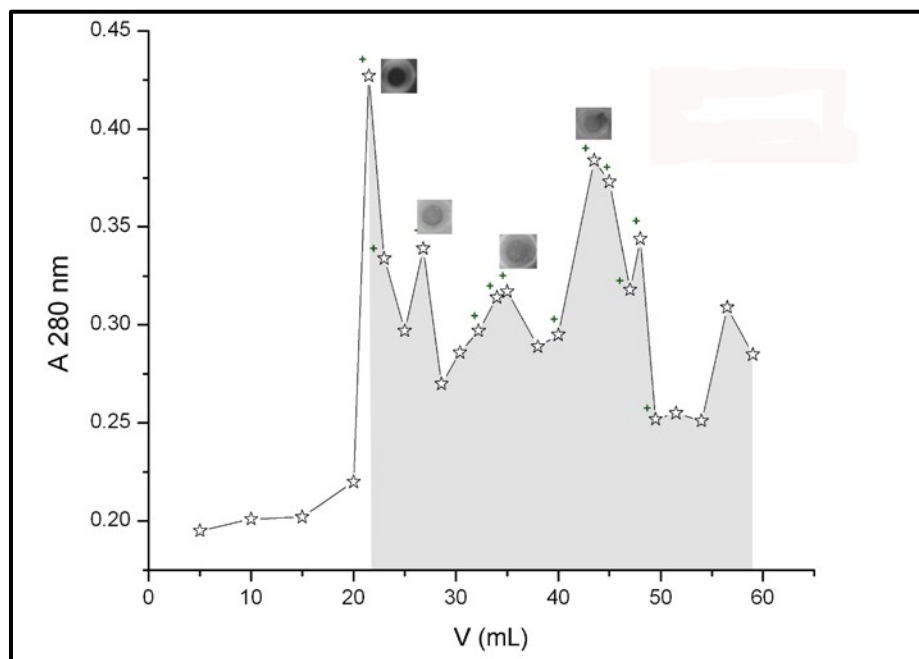
Dobijena kriva promene apsorbance odgovara literaturnim podacima (247), odnosno IGFBP-1 se eluira u očekivanoj zapremini, pod datim uslovima hromatografije. Frakcije, u kojima je dot blot metodom utvrđeno prisustvo IGFBP-1, su skupljene (270 mL) i nanete na kolonu sa fenil-agarozom. U frakcijama eluiranim sa kolone fenil-agaroze je, takođe, merena apsorbanca i imunoreaktivnost (Slika 10).



Slika 10. Izolovanje IGFBP-1 iz amniotske tečnosti na koloni fenil-agaroze – promena apsorbance i imunoreaktivnosti eluiranih frakcija. Dot blot analiza: krstići na grafiku označavaju prisustvo IGFBP-1. Na grafiku je osenčena oblast frakcija koje su dalje korišćene

Prema literaturnim podacima (247), najviše IGFBP-1 se eluira sa hidrofobne kolone destilovanom vodom, dok je mala količina prisutna u frakcijama koje sadrže 5% izopropanol. Ovo je potvrđeno i u našem eksperimentu, gde su najintenzivniji signali na dot blot-u dobijeni u vodenim frakcijama. Ove proteinske frakcije su sakupljene (70 mL) i koncentrovane do zapremine od 5 mL, primenom Amicon filtera koji zadržava proteine masa većih od 10 kDa.

Dalje je nastavljeno izolovanje IGFBP-1 gel-filtracijom na koloni sa Sephadex G-75 (Slika 11). Frakcije u kojima je prisutan IGFBP-1 su sakupljene i koncentrovane do 1 mL.



Slika 11. Izolovanje IGFBP-1 iz amnijske tečnosti gel filtracijom - promena apsorbanca i imunoreaktivnosti eluiranih frakcija. Dot blot analiza: krstići na grafiku označavaju prisustvo IGFBP-1. Na grafiku je osenčena oblast frakcija koje su koncentrovane

Koncentracija IGFBP-1 je određena u zbirnim frakcijama metodom ELISA posle svakog koraka u izolovanju, a rezultati su dati u Tabeli 2.

Tabela 2. Efikasnost izolovanja IGFBP-1 iz amnijske tečnosti

	Matriks			
	Ukupno naneto	DEAE-Sepharose	Fenil-agaroz	Gel-filtracija
Količina IGFBP-1	18,9 mg	1,8 mg	5,4 µg	1,8µg
Prinos (%)		9,5	0,03	0,01

Nakon poslednjeg koraka u izolovanju IGFBP-1 iz amnionske tečnosti, dobijen je uzorak u kome je koncentracija IGFBP-1 bila 1,8 µg/mL. Prinos je bio izuzetno mali, daleko od literaturnog podatka od oko 10% (247). Analizom rezultata se može zaključiti da je do najvećeg gubitka IGFBP-1 došlo tokom hidrofobne hromatografije, odnosno da je najveći deo IGFBP-1 ostao nevezan za fenil-agarozu. Pošto svaka fiziološka tečnost ima specifičan sadržaj proteina i ostalih sastojaka, isti postupak izolovanja je primenjen na citosol izdvojen iz ćelija placente, u nadi da će prinos IGFBP-1 biti veći.

4.1.2 Izolovanje IGFBP-1 iz citosola placente

Početni uzorak za izolovanje IGFBP-1 je bio zbirni uzorak citosola placente zapremine 140 mL, u kome je izmereno 153 µg IGFBP-1. Pre hromatografskog razdvajanja, uzorak citosola je podvrgnut taloženju proteina zasićenim rastvorom amonijum-sulfata. Dalji proces izolovanja IGFBP-1 je bio identičan kao što je opisano u poglavlju 4.1.1. Dobijeni rezultati su prikazani u Tabeli 3.

Tabela 3. Efikasnost izolovanja IGFBP-1 iz citosola

	Matriks				
	Ukupno naneto	Amonijum sulfat	DEAE-Sepharose	Fenil-agaroz	Gel-filtracija
Količina IGFBP-1	153 µg	122 µg	30 µg	0,8 µg	0,2 µg
Prinos (%)		80	20	0,5	0,1

Kao što se iz Tabele 3 može videti, ukupan prinos izolovanog IGFBP-1 iz citosola je bio veći nego iz amnionske tečnosti, ali i dalje mali. Zbog male količine IGFBP-1 izolovane iz fizioloških uzoraka, IGFBP-1 izolati su korišćeni samo u

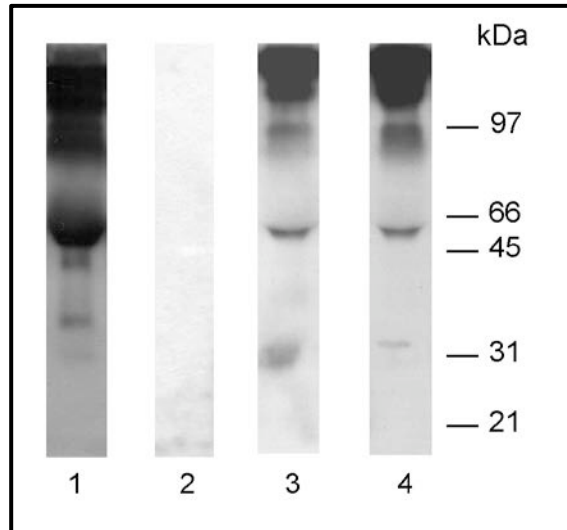
eksperimentima u kojima je utvrđivana specifičnost antitela, paralelno sa rhIGFBP-1. U ostalim ekperimentima korišćen je komercijalni rhIGFBP-1 protein, kao marker.

4.2 Specifičnost anti-IGFBP-1 antitela

U ovom radu korišćena su poliklonska anti-IGFBP-1 antitela, pošto je cilj eksperimenata bio proučavanje različitih molekulskih formi IGFBP-1. Proizvođači komercijalnih antitela naglašavaju u svojim deklaracijama da proizvod nema unakrsnu reaktivnost sa drugim srodnim molekulima (u ovom slučaju IGFBP-2 do -6), ali praksa je pokazala da to nije uvek slučaj, kao i da su moguće izvesne nespecifične interakcije sa sastojcima iz uzoraka. Pre nego što su započeta ispitivanja povezanosti IGFBP-1 i metabolizma glukoze, detaljno je analizirana specifičnost i unakrsna reaktivnost antitela. Primenjene su metode imunoblota i vezivanja liganda.

4.2.1 Ispitivanje specifičnosti anti-IGFBP-1 antitela metodom imunoblota

Da bi se izvršio izbor antitela koja najviše odgovaraju cilju ovog rada, testirana su četiri komercijalna preparata. Preparati 1 i 2 su antiserumi dobijeni imunizacijom sa rhIGFBP-1. Prvi je dobijen imunizacijom koze, a proizvođač je DSL. Drugi je dobijen imunizacijom kunića, a proizvođač je GroPep (poglavlje 3.4). Preparati 3 i 4 su, takođe, dobijeni imunizacijom životinja sa rhIGFBP-1, ali je dodatno izolovana IgG frakcija iz kozjeg antiseruma (Santa Cruz), odnosno kunićevog (AbD Serotec). Na Slici 12 prikazan je imunoblot sa ova četiri primarna anti-IGFBP-1 antitela koristeći serum kao uzorak.

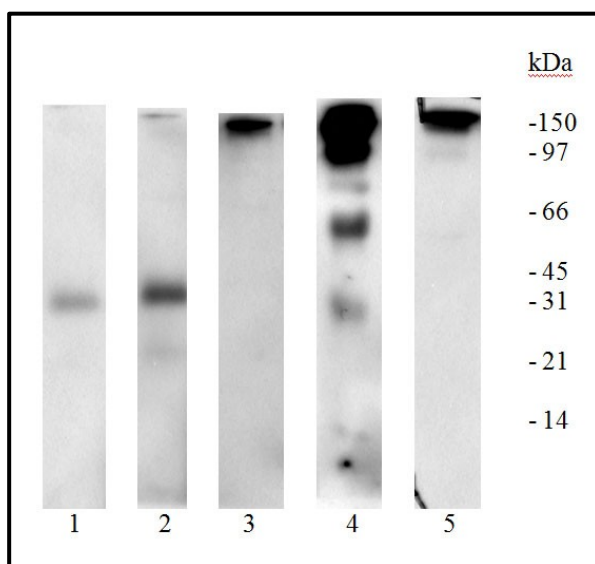


Slika 12. Ispitivanje specifičnosti anti-IGFBP-1 antitela sledećih proizvođača: DSL (1), GroPep (2), Santa Cruz (3) i AbD Serotec (4), na serumu kao uzorku

Imunoblot sa GroPep antitelima nije dao traku specifičnu za IGFBP-1, čak ni u razblaženju 1:50. DSL antitela su dala specifične trake, ali uz relativno veliki pozadinski signal, dok su Santa Cruz i AbD Serotec antitela dala jasne trake na očekivanim položajima. Ovaj rezultat potvrđuje da je IgG frakcija izolovana iz antiseruma bolji izbor antitela za imunodetekciju, pa je dalje pretežno s njom rađeno, koristeći i Santa Cruz i AbD Serotec preparate (254).

U sledećem koraku je ispitana potencijalna unakrsna reaktivnost anti-IGFBP-1 antitela (samo IgG preparata) sa ostalim IGFBP molekulima, takođe imunoblotom. Kao uzorci su korišćeni standardni rastvor rhIGFBP-1 (2,7 nM IGFBP-1), amnionska tečnost (5,4 μ M IGFBP-1, pozitivna kontrola), seminalna plazma (negativna kontrola; seminalna plazma sadrži IGFBP-2 i IGFBP-4) i serum (sadrži sve IGFBP). Rezultati su pokazali da anti-IGFBP-1 antitela (slično je dobijeno sa oba antitela) prepoznaju monomer IGFBP-1 u standardnom rastvoru rhIGFBP-1, monomer i fragment IGFBP-1 u amnionskoj tečnosti, ne reaguju sa IGFBP-2 i IGFBP-4 u seminalnoj plazmi, dok u serumu prepoznaju veći broj proteina (Slika 13). Signali dobijeni sa serumom kao uzorkom odgovaraju monomeru, fragmentu i oligomernim formama (trake na oko 60 i 90-100 kDa), o kojima će biti reči kasnije u ovom poglavlju. U posebnom eksperimentu

je izvršeno blokiranje anti-IGFBP-1 antitela rastvorom rhIGFBP-1 (poglavlje 3.9), a zatim je urađen imunoblot koristeći serum kao uzorak. Blokiranu antitela nisu prepoznavala ni jedan IGFBP iz seruma, potvrđujući specifičnost za IGFBP-1 (Slika 13).



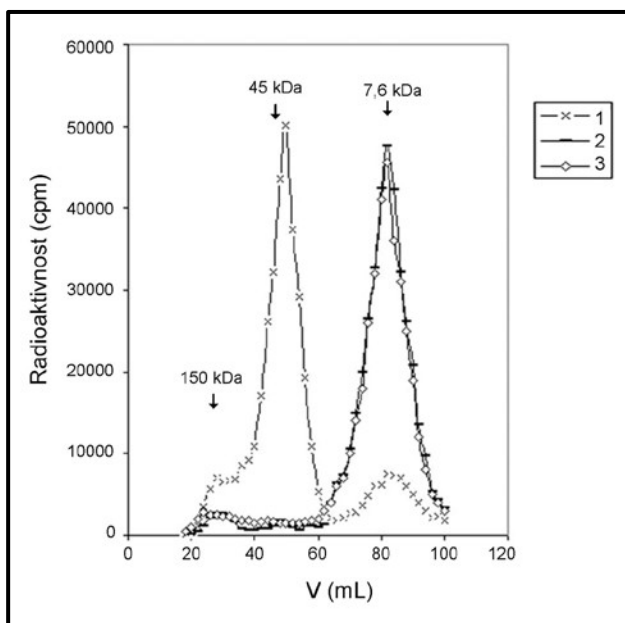
Slika 13. Ispitivanje specifičnosti anti-IGFBP-1 antitela imunoblotom koristeći uzorke: rhIGFBP-1 (1), amnionsku tečnost (2), seminalnu plazmu (3) i serum (4). U posebnom eksperimentu su anti-IGFBP-1 antitela blokirana sa rhIGFBP-1 i takva primenjena u imunoblotu koristeći serum kao uzorak (5)

Ovim eksperimentom utvrđena je specifičnost antitela, koja jasno prepoznaju različite molekulske forme IGFBP-1, a nemaju unakrsnu reaktivnost sa homologim IGFBP. Intenzitet signala na startu gela je umanjen u slučaju blokiranih anti-IGFBP-1 antitela, što ukazuje na moguće postojanje specifičnih i nespecifičnih interakcija antitela sa proteinima molekulskih masa iznad 150 kDa.

4.2.2 Ispitivanje specifičnosti anti-IGFBP-1 antitela metodom vezivanja liganda

Tri identična uzorka amnionske tečnosti su nezavisno inkubirana sa: a) rastvorom ^{125}I -IGF-I, b) rastvorom ^{125}I -IGF-I kome je dodato 100 puta više neobebeženog IGF-I i c) dvostepeno – prvo sa rastvorom anti-IGFBP-1 antitela (Santa Cruz) pa sa rastvorom ^{125}I -IGF-I. Nakon inkubacija, uzorci su analizirani gel-filtracijom, a rezultati su prikazani na Slici 14.

Na prikazanim graficima se vidi da ^{125}I -IGF-I učestvuje u formiranju dve vrste kompleksa sa proteinima iz amnionske tečnosti: najveći deo čini kompleks od oko 40 kDa, što odgovara ^{125}I -IGF-I/IGFBP-1, a manji deo čini kompleks čija je molekulska masa veća od 150 kDa. U prisustvu neobebeženog IGF-I, dolazi do potpune inhibicije vezivanja ^{125}I -IGF-I u binarni kompleks i do značajnog smanjenja interakcije sa proteinima većih molekulskih masa. U trećem eksperimentu, u kome je IGFBP-1 uklonjen iz amnionske tečnosti imunoprecipitacijom, pokazano je da se ^{125}I -IGF-I ne vezuje u binarni kompleks, a u tragu su prisutni kompleksi većih molekulskih masa.



Slika 14. Ispitivanje specifičnosti anti-IGFBP-1 antitela gel-filtracijom koristeći uzorke amnionske tečnosti inkubirane sa: ^{125}I -IGF-I (1), ^{125}I -IGF-I i I-IGF-I (u odnosu 1:100) (2) i ^{125}I -IGF-I nakon uklanjanja IGFBP-1 (3)

Razmatrajući rezultate svih navedenih eksperimenata, čiji je cilj bila procena kvaliteta anti-IGFBP-1 antitela, zaključeno je da su antitela proizvođača Santa Cruz i AbD Serotec visoko specifična za IGFBP-1 protein i da se mogu koristiti u daljim eksperimentima. Drugim rečima, antitela prepoznaju sve molekulske forme IGFBP-1, ne reaguju unakrsno sa homologim IGFBP, i nespecifične interakcije su minimalne.

4.3 Ispitivanje i razdvajanje molekulskih formi IGFBP-1 metodama afinitetne hromatografije

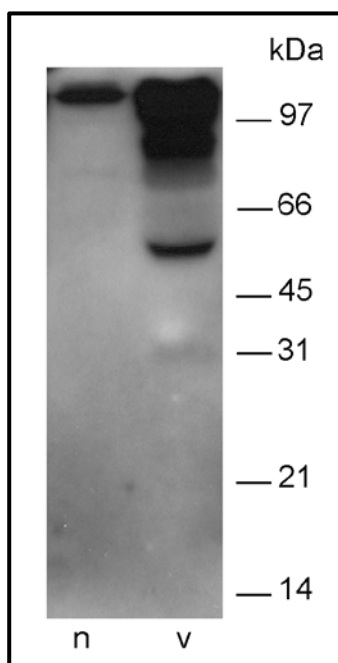
Zadatak ove teze je bilo proučavanje post-translacionih modifikacija i interakcija IGFBP-1, te se pristupilo ispitivanju analitičkih metoda koje bi se mogle koristiti u tu svrhu. Pošto IGFBP-1 postoji u nekoliko fosfoformi u serumu, a poznato je da se fosfoproteini mogu vezati za matrikse sa imobilizovanim jonima metala, metal-afinitetna hromatografija (IMAC) je bila prva analizirana metoda. Prema literaturi, IDA-agaroz sa imobilizovanim jonima metala, kao što su Fe^{3+} , Ga^{3+} i Ni^{2+} , je matriks koji se preporučuje za izolovanje fosfoproteina (248). Fosfatne grupe, kao dobri donori elektrona, su ligandi za stvaranje koordinacione veze sa jonima metala. Nevezana i vezana frakcija, dobijene pomoću IMAC, su analizirane imunoblotom nakon elektroforeze pod neredukujućim i redukujućim uslovima. Cilj je bio da se utvrdi da li se pojedine molekulske forme IGFBP-1 ponašaju različito i da li se mogu razdvojiti.

Pošto je deo IGFBP-1 u cirkulaciji vezan za $\alpha 2\text{M}$, primenom imunoafinitetne hromatografije (IAC), odnosno matriksa sa imobilizovanim anti- $\alpha 2\text{M}$ antitelima, ispitana je mogućnost izolovanja IGFBP-1/ $\alpha 2\text{M}$ kompleksa. Kao i u prethodnom eksperimentu, nevezana i vezana frakcija su analizirane imunoblotom.

Da bi se utvrdila jačina interakcije između IGFBP-1 i $\alpha 2\text{M}$ u kompleksu, imajući u vidu da je $\alpha 2\text{M}$ glikoprotein, uzorci seruma su ispitivani metodom lektinske afinitetne hromatografije (LAC). Ukoliko su veze ova dva molekula jake, očekivalo se prisustvo IGFBP-1 u vezanim frakcijama nakon LAC.

4.3.1 Ispitivanje formi IGFBP-1 metodom metal-afinitetne hromatografije

Za ispitivanje fosforilovanih oblika IGFBP-1 korišćena je metoda IMAC, sa IDA-agarozom kao matriksom i vezanim Fe^{3+} jonima. Proteini seruma u nevezanim i vezanim frakcijama, sakupljenim posle hromatografije, su razdvojeni SDS-PAGE elektroforezom, nakon čega je imunoblotom analiziran profil IGFBP-1 (Slika 15).

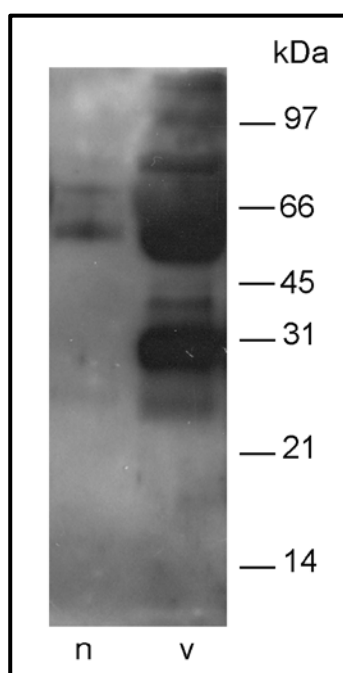


Slika 15. Neredukujuća elektroforeza i imunoblot sa anti-IGFBP-1 antitelima nevezane (n) i vezane (v) frakcije dobijene posle IMAC

Rezultati su pokazali da IDA kolona vezuje skoro celokupan IGFBP-1. U vezanoj frakciji su anti-IGFBP-1 antitela prepoznala forme velike molekulske mase (oko 100 kDa) kao široku traku, proteine na oko 60 kDa i proteinsku frakciju na startu. Traka na oko 30 kDa, koja odgovara monomeru IGFBP-1, je bila slabo uočljiva na blotu. Proteinska traka mase oko 60 kDa bi mogla odgovarati dimeru IGFBP-1. Trake iznad markera od 66 kDa bi mogle pripadati oligomerima IGFBP-1, dok bi traka na samom startu mogla poticati od viših multimerima i/ili kompleksa IGFBP-1/ α 2M. Kao što

se na Slici 15 vidi, proteinska traka na startu gela je znatno intenzivnija u vezanoj frakciji nego u nevezanoj, ali se deo ipak nalazi i u nevezanoj frakciji. Ovakav rezultat bi mogao biti posledica prevazilaženja vezujućeg kapaciteta matriksa, ili postojanja oligomerne forme i/ili kompleksa koji se ne vezuje za gel.

Postojanje dimera i oligomera IGFBP-1 u serumu je podatak koji do sada nije objavljen. Kao što je u uvodu rečeno, tkivna transglutaminaza katalizuje stvaranje kovalentnih veza između monomernih jedinica IGFBP-1 i potvrđeno je postojanje oligomera lokalno, u tkivima. Osim transglutaminacijom, oligomeri mogu nastati i oksidacijom, uz formiranje disulfidnih veza između monomera. Da bi se stekao uvid u prirodu veze u IGFBP-1 oligomerima, elektroforeza nevezane i vezane frakcije je ponovljena u redukujućim uslovima (uz prisustvo 2-merkaptoetanol), a rezultati su prikazani na Slici 16.

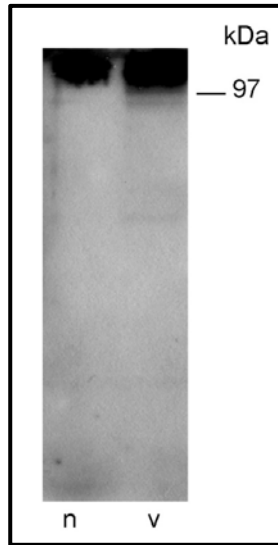


Slika 16. Redukujuća elektroforeza i imunoblot sa anti-IGFBP-1 antitelima nevezane (n) i vezane (v) frakcije dobijene posle IMAC

Imunoreaktivni protein, koji su se nalazili na startu gela nakon neredukujuće elektroforeze, su se skoro u potpunosti razgradili u redukujućim uslovima, kako u IDA

vezanoj, tako i IDA nevezanoj frakciji (Slika 16). U vezanoj frakciji, najintenzivnije trake su bile na 30 i 60 kDa, odgovarajući monomeru i dimeru IGFBP-1. Značajno smanjenje intenziteta signala na startu ukazuje na postojanje disulfidno vezanih multimera u serumu. Ipak, traka velike mase nije potpuno nestala u redukujućim uslovima mogla bi odgovarati kompleksu IGFBP-1/ α 2M koji se ne raskida. Drugim rečima, interakcija između IGFBP-1 i α 2M se ne zasniva samo na formiranju disulfidnih veza. Traka na 60 kDa u vezanoj frakciji je vrlo intenzivna, što bi značilo da deo dimera IGFBP-1 u serumu potiče od oksidacije, a deo od transglutaminacije. Redukcijom oligomera u nevezanoj frakciji nastaju samo dimeri, što bi značilo da oligomeri koji se vezuju za IDA-agarozu i koji se ne vezuju nisu identičnog sastava. Razlika bi mogla biti u stepenu fosforilovanja monomera.

Da bi se utvrdilo da li proteinske trake na samom startu gela sadrže komplekse IGFBP-1/ α 2M, urađena je elektroforeza i imunoblot sa anti- α 2M antitelima (Slika 17). Rezultati su pokazali da anti- α 2M antitela prepoznaju proteine velikih molekulskih masa na startu gela, u nevezanoj i vezanoj frakciji. Na osnovu toga bi se moglo pretpostaviti da se deo α 2M vezuje za IDA-agarozu, a deo ne, ili da je zbog velike koncentracije α 2M u serumu, prevaziđen kapacitet matriksa. Pošto se imunoreaktivne trake dobijene sa anti-IGFBP-1 i anti- α 2M antitelima u vezanoj frakciji nalaze na istim masama, pretpostavka je da se kompleks IGFBP-1/ α 2M skoro u potpunosti vezuje za matriks.

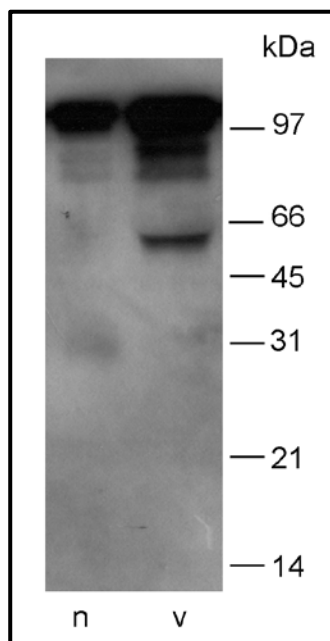


Slika 17. Neredukujuća elektroforeza i imunoblot sa anti- α 2M antitelima nevezane (n) i vezane (v) frakcije dobijene posle IMAC

Analizom podataka dobijenih primenom metode IMAC može se zaključiti da se sve molekulske forme IGFBP-1 vezuju za IDA-agarozu, da u serumu (cirkulaciji) postoje dimeri i viši oligomeri IGFBP-1, da deo oligomera nastaje putem transglutaminacije, a deo putem oksidacije i da je dimer otporan na redukciju podjednako zastupljen u serumu kao i monomer IGFBP-1. Nažalost, ovom metodom nije bilo moguće selektivno razdvajanje pojedinih formi IGFBP-1.

4.3.2 Ispitivanje formi IGFBP-1 metodom imunoafinitetne hromatografije

Imobilizovana anti- α 2M antitela su poslužila za izolovanje IGFBP-1 koji je vezan za α 2M. Posle hromatografskog razdvajanja i elektroforeze pod neredukujućim uslovima, imunoblotom je analiziran profil IGFBP-1, a rezultati su prikazani na Slici 18.



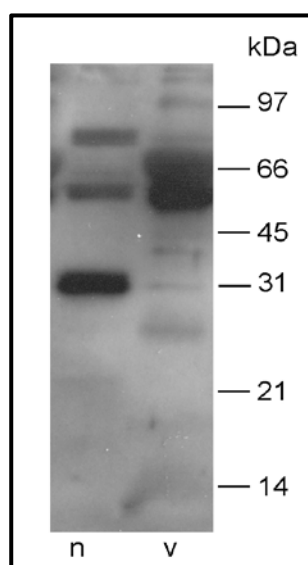
Slika 18. Neredukujuća elektroforeza i imunoblot sa anti-IGFBP-1 antitelima nevezane (n) i vezane (v) frakcije dobijene posle IAC

Imunoblot sa anti-IGFBP-1 antitelima bio je gotovo identičan blotu dobijenom posle IDA-agaroze. U vezanoj frakciji su jasno uočljivi imunoreaktivni proteini velikih molekularnih masa, kao i dimer na oko 60 kDa. Traka na 30 kDa je bila veoma slabog intenziteta, s tim da je bila nešto intenzivnija u nevezanoj frakciji. Proteini velike molekulske mase su bili prisutni i u nevezanoj frakciji.

Elektroforeza je ponovljena u redukujućim uslovima, a rezultati su prikazani na Slici 19. Nakon rSDS-PAGE, u vezanoj frakciji je bila dominantna razvučena traka na oko 60 kDa, dok su se u nevezanoj frakciji jasno razdvojile tri proteinske trake: na oko 80 kDa, na 60 kDa i na 30 kDa (Slika 19). Proteini velike molekulske mase su se u najvećoj meri razgradili do proteina mase 60 kDa u vezanoj frakciji, odnosno do monomera IGFBP-1 u nevezanoj frakciji. U vezanoj frakciji je zaostala u izvesnoj meri imunoreaktivna traka velike mase, koja bi mogla poticati od IGFBP-1/ α 2M kompleksa. Na osnovu ovih rezultata bi se moglo zaključiti da izolovani kompleksi nisu dovoljno stabilni u uslovima pripreme uzoraka za elektroforezu, odnosno da se u najvećoj meri

razlažu u redukujućim uslovima. Ovakav zaključak je potvrda prethodnog, do koga se došlo na osnovu rezultata rada sa IDA-agarozom.

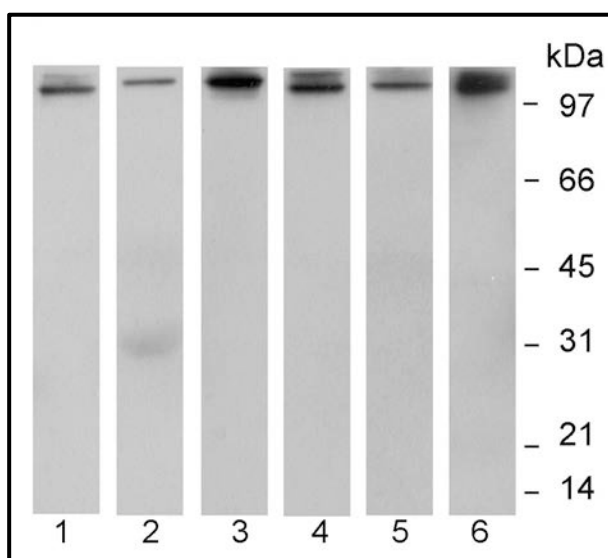
Posmatrajući Sliku 19, može se dalje zaključiti da se u IAC ne vezuje oligomer koji se u redukujućim uslovima u najvećoj meri razlaže do monomera, a u manjoj do dimera i, verovatno, trimera. IGFBP-1 koji se vezuje za $\alpha 2M$ se redukcijom pretežno oslobađa kao dimer, a monomer je prisutan u tragu. Nameće se zaključak da su različite izoforme IGFBP-1 partneri za interakciju sa $\alpha 2M$ od izoformi koje radije stvaraju samostalne oligomere. Na osnovu rezultata koji su dobijeni ispitivanjem izoformi koje učestvuju u građenju dimera u tkivu placente, pretpostavka je da nefosforilovana i manje fosforilovane izoforme IGFBP-1 lakše stvaraju dimere (255). O mogućem fiziološkom značaju ove pojave može se razmišljati iz ugla afiniteta IGFBP-1 prema IGF molekulima. Naime, odsustvo fosfatnih grupa smanjuje afinitet IGFBP-1 prema ligandima, a povećava lakoću dimerizacije. U ligand blot eksperimentima koji su ranije rađeni u našoj laboratoriji, koristeći ^{125}I -IGF-I, nikad nije detektovan signal koji bi bio na položaju dimera i/ili oligomera. Uzevši sve navedeno u obzir, dimerizacija (i možda oligomerizacija) je jedan od mogućih mehanizama za kontrolu biodostupnosti IGF molekula.



Slika 19. Redukujuća elektroforeza i imunoblot sa anti-IGFBP-1 antitelima nevezane (n) i vezane (v) frakcije dobijene posle IAC

4.3.3 Ispitivanje formi IGFBP-1 metodom lektinske afinitetne hromatografije

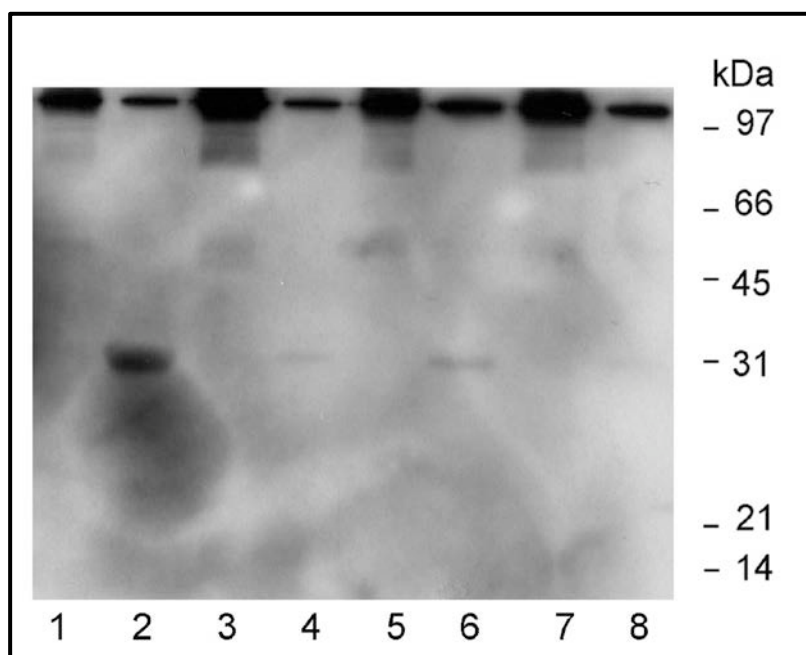
Pošto je traka u IGFBP-1 imunoblotu sa najvećom molekulskom masom postajala vrlo tanka i slabog intenziteta u redujućim uslovima elektroforeze, ideja je bila da se identitet te trake, odnosno IGFBP-1/ α 2M kompleksa potvrdi metodom LAC. α 2M je, naime, glikoprotein (a IGFBP-1 nije), te bi se očekivalo da se IGFBP-1/ α 2M kompleks može izdvojiti vezivanjem za lektine. Za tu svrhu je korišćeno nekoliko lektina, različite ugljenohidratne specifičnosti (Tabela 1, Materijal i metode). Eluiranje glikoproteina sa lektinskih kolona je rađeno na pH 7,0 i pH 3,0, a sakupljene frakcije su dalje analizirane elektroforezom i imunoblotom sa anti-IGFBP-1 antitelima (Slika 20, prikazani su samo rezultati za lektine koji su vezivali IGFBP-1/ α 2M kompleks).



Slika 20. Neredukujuća elektroforeza i imunoblot sa anti-IGFBP-1 antitelima vezanih frakcija dobijenih posle LAC - eluati sa Con A-agaroze pH 7,5 i 3,0 (1 i 2), SNA-agaroze pH 7,5 (3), RCA-I-agaroze pH 7,5 (4), PHA-E-agaroze pH 3,0 (5) i WGA-agaroze pH 7,5 (6)

Rezultati IGFBP-1 imunoblota nakon LAC su potvrdili postojanje IGFBP-1/ α 2M kompleksa i ujedno ukazali da bi metoda LAC bila dobra za razdvajanje kompleksa od IGFBP-1 multimerasličnih molekulskih masa (kao i dimera).

Iznenadjenje je predstavljala detekcija relativno jake trake monomera IGFBP-1 u eluatu pH 3,0 sa ConA-agaroze (Slika 20, uzorak 2), upućujući na moguću interakciju između Con A i samog IGFBP-1. U cilju daljeg ispitivanja prirode interakcije IGFBP-1/Con A, izvedena je serija eksperimenata u kojima su menjani radni uslovi (256), u smislu prisustva i odsustva jona neophodnih za aktivaciju Con A: Ca^{2+} , Mn^{2+} i Mg^{2+} (Slika 21). Ekspozicija membrane tokom autoradiografije je bila znatno duža od uobičajene, jer su trake koje su poticale od monomera IGFBP-1 bile vrlo blede u nekim slučajevima. Pod takvim uslovima su se detektovali i fragmenti IGFBP-1/ α 2M kompleksa, kao i dimeri IGFBP-1 oslobođeni iz kompleksa.



Slika 21. Neredukujuća elektroforeza i imunoblot sa anti-IGFBP-1 antitelima vezanih frakcije dobijenih posle LAC koristeći Con A-agarozu - u prisustvu Ca^{2+} , Mn^{2+} i Mg^{2+} , pH 7,5 i 3,0 (1 i 2), u prisustvu Ca^{2+} i Mg^{2+} , pH 7,5 i 3,0 (3 i 4), u prisustvu Ca^{2+} i Mn^{2+} , pH 7,5 i 3,0 (5 i 6) i u prisustvu Mn^{2+} i Mg^{2+} , pH 7,5 i 3,0 (7 i 8)

Proteinska traka za monomer IGFBP-1 je bila najintenzivnija u slučaju kada su bila prisutna sva tri jona (Slika 21, uzorak 2), dok je odsustvo nekog od ovih jona umanjilo ili čak potpuno sprečilo vezivanje IGFBP-1 za Con A (Slika 21, uzorak 8). Con A lektin je metaloprotein koji može postojati u obliku “otključane” i “zaključane” forme (257). “Otključana” forma slabo vezuje jone metala i saharidni ligand, dok zaključana forma vezuje dva jona metala po monomernoj jedinici, čime se postiže maksimalni kapacitet za vezivanje šećera. Iako Con A primarno vezuje α -D-manopiranozid i α -D-manozil-grupe, mogu se vezati i neki sintetisani peptidi (257). Ovi peptidi po svojoj tercijskoj strukturi podsećaju na saharidne ligande i nazivaju se mimeticima. Vezivanje IGFBP-1 za Con A bi se moglo objasniti konformacionim slaganjem lektina i liganda, pri čemu je jon Ca^{2+} neophodan za ostvarivanje veze. Interakcija je jaka, a eluiranje IGFBP-1 sa Con A matriksa se postiže samo puferom pH 3,0.

Da li IGFBP-1 u fiziološkim uslovima reaguje sa humanim lektinima koji vezuju manozu, poznatim i kao manozni receptori (258), i kakvo je značenje ove interakcije u metaboličkom i mitogenom smislu, ostaje otvoreno pitanje.

4.4 Ispitivanje povezanosti metabolizma glukoze i insulina sa promenama u IGFBP-1

Na sintezu IGFBP-1 u jetri, kao što je ranije rečeno, utiče insulin. Iako način regulacije povezanosti između insulina i IGFBP-1 nije do kraja poznat, kao ni način učešća IGFBP-1 u metabolizmu glukoze, zna se da IGF-I i IGF-II mogu ispoljiti efekte slične insulinu, pre svega vezivanjem za IR. Pretpostavlja se da IGFBP-1 ima dvojakulogu u regulaciji aktivnosti IGF molekula kod DM2. IGFBP-1 koji nije potpuno fosforilovan se povezuje sa koncentracijom glukoze u krvi, dok se visoko fosforilovan IGFBP-1 povezuje sa vaskularnim bolestima i hipertenzijom (259). Heald i saradnicisu pokazali da smanjenje ukupne koncentracije IGFBP-1 (pre svega visokofosforilovanog oblika) od 2,73 $\mu\text{g/L}$ dovodi do povećanja rizika razvoja makrovaskularne bolesti od 43%. Veća koncentracija visoko fosforilovanog IGFBP-1 je u korelaciji sa smanjenim

sistolnim/dijastolnim/arterijskim pritiskom pacijenata, dok nefosforilovani IGFBP-1 nije povezan sa krvnim pritiskom. Veća koncentracija fosforilovanog IGFBP-1 u cirkulaciji bi, dakle, mogla zaštititi organizam od hipertenzije i kardiovaskularnih bolesti, smanjujući mitogeni potencijal IGF molekula u krvnim sudovima.

Kako se koncentracija IGFBP-1 menja sa koncentracijom insulina, cilj narednog eksperimenta je bio da se utvrdi da li dolazi do promene i na nivou molekulskih formi kod osoba sa poremećenim metabolizmom glukoze, usled DM2 ili hipoglikemije. Za ispitivanje i upoređivanje molekulskih vrsta IGFBP-1 korišćeni su serumi ljudi sa vrlo velikim koncentracijama glukoze u krvi, preko 10 mmol/L i sa koncentracijama glukoze ispod 4,0 mmol/L. Primenjene su metode afinitetne hromatografije i imunoblota, opisane u prethodnom poglavlju, kao i metoda SELDI-TOF/MS. Dijagnoza je pacijentima postavljena nezavisno od ove studije, u kliničko-bolničkim centrima. Za potrebe ovog ispitivanja, u krvi i serumima (jutarnjim) izabranih osoba određivana je koncentracija glukoze, insulina, HbA1c i IGFBP-1 (Tabela 4). Statistički značajne razlike ($p < 0.05$) grupa pacijenata u odnosu na kontrolnu grupu su označene sa *.

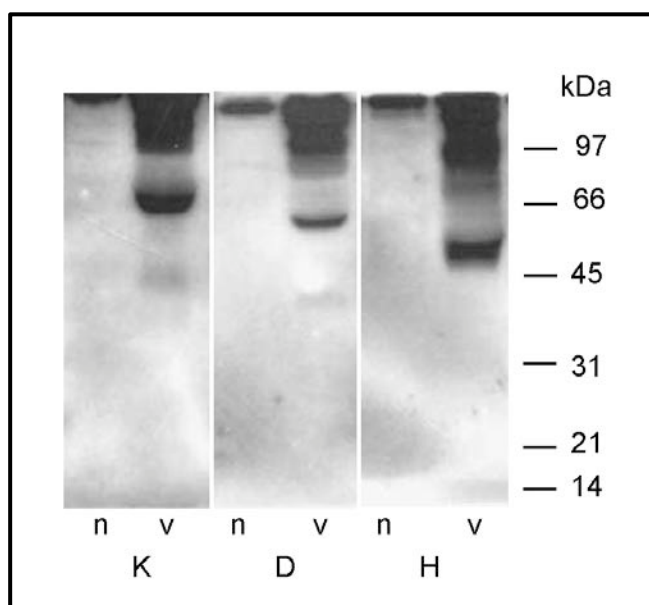
Tabela 4. Određivanje koncentracije glukoze, insulina, HbA1c i IGFBP-1 u uzorcima kontrolne grupe ljudi (K), pacijenata sa DM2 (D) ili hipoglikemijom (H)

	K (n=32)	D (n=32)	H (n=17)
Glukoza (mmol/L)	5,1 ± 0,64	11,3 ± 0,55*	3,9 ± 0,24*
Insulin (mU/L)	15 ± 4,40	22,8 ± 5,71*	10,5 ± 0,38*
HbA1c (%)	4,8 ± 0,61	11,1 ± 0,30*	4,0 ± 0,52
IGFBP-1 (nmol/L)	0,7 ± 0,46	0,38 ± 0,22*	1,17 ± 0,54*

Osobe uključene u ovaj eksperiment su imale očekivane vrednosti i odnose između ispitivanih parametara (260). Odnos insulina i IGFBP-1 je bio inverzan, odnosno njihove koncentracije su se menjale u suprotnom smeru (Tabela 4).

4.4.1 Ispitivanje formi IGFBP-1 metal-afinitetnom hromatografijom kod zdravih osoba i pacijenata sa DM2 ili hipoglikemijom

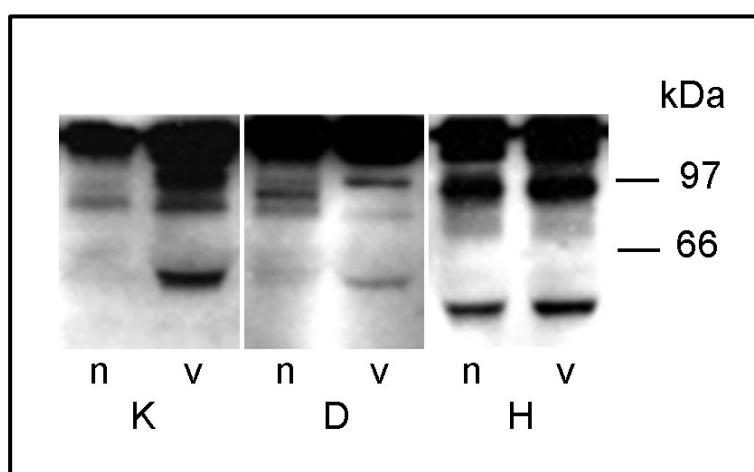
Serumi pacijenata sa DM2 ili hipoglikemijom, kao i kontrolni serumi propušteni su kroz IDA-agarozni gel. Posle elektroforetskog razdvajanja proteina u neredukujućim uslovima (da bi zaostali multimeri), urađen je IGFBP-1 imunoblot, a tipični rezultati su prikazani su na Slici 22. Kao što je ranije ustanovljeno, IDA-agarozna vezuje sve forme IGFBP-1, ali IGFBP-1 profil u tri vrste uzoraka nije bio identičan. Proteini velikih masa su se slično kretali u električnom polju, kao i dimeri kod zdravih i DM2 pacijenata, dok je dimer kod pacijenata sa hipoglikemijom putovao dalje duž gela, ukazujući na moguće prisustvo drugačijeg molekulskog oblika dimera. Takođe, razlika između IGFBP-1 profila je bila i u intenzitetu traka, što je očekivano uzevši u obzir koncentraciju IGFBP-1 (Tabela 4). Monomer IGFBP-1 od 30 kDa nije bio vidljiv ni kod jedne od ispitivanih grupa.



Slika 22. Neredukujuća elektroforeza i imunoblot sa anti-IGFBP-1 antitelima nevezanih (n) i vezanih (v) frakcija dobijenih posle IDA-agaroze seruma zdrave osobe (K), pacijenta sa DM2 (D) i pacijenta sa hipoglikemijom (H)

4.4.2 Ispitivanje formi IGFBP-1 imunoafinitetnom hromatografijom kod zdravih osoba i pacijenata sa DM2 ili hipoglikemijom

Za ispitivanje kompleksa IGFBP-1/ α 2M, korišćena je imunoafinitetna kolona, a reprezentativni rezultati IGFBP-1 imunoblota za sve tri grupe uzoraka prikazani su na Slici 23. Elektroforeza je rađena u neredukujućim uslovima u cilju analize multimeri, a u tom smislu je smanjena i umreženost gela.



Slika 23. Neredukujuća elektroforeza i imunoblot sa anti-IGFBP-1 antitelima nevezanih (n) i vezanih (v) frakcija dobijenih posle IAC seruma zdrave osobe (K), pacijenta sa DM2 (D) i pacijenta sa hipoglikemijom (H)

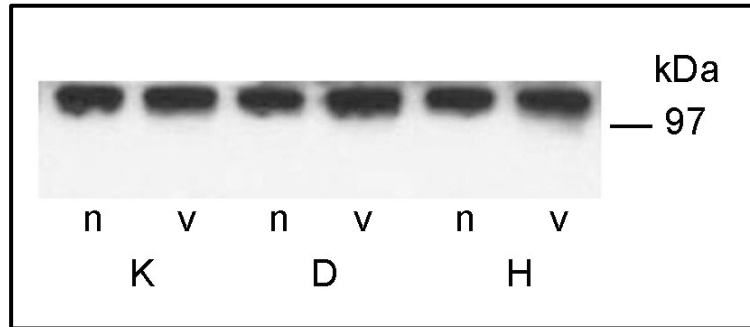
U ranijem eksperimentu (Slika 19) konstatovano je da nisu isti multimeri vezani u kompleksima sa α 2M i slobodni u serumu. To se potvrdilo i u ovom eksperimentu (Slika 23). Proteinski profil za IGFBP-1 kod sve tri grupe sadrži traku na oko 60 kDa, nekoliko traka u oblasti između 90 i 100 kDa, kao i traku na startu gela. Traka na oko 60 kDa je prisutna samo u vezanim frakcijama u uzorcima zdravih ljudi i pacijenata sa DM2, dok je u uzorcima osoba sa hipoglikemijom ona podjednako intenzivna i u vezanoj i u nevezanoj frakciji (Slika 23). Najznačajnija razlika između grupa javlja se u regionu 90-100 kDa. Kod zdravih osoba prisutne su dve trake na imunoblotu u vezanoj i nevezanoj frakciji, pri čemu su one mnogo većeg intenziteta u vezanoj frakciji, ali i u

različitoj proporciji. Kod pacijenata sa DM2, jasno se razlikuju tri proteinske trake: prva traka sa najvećom molekulskom masom prisutna je skoro u potpunosti u vezanoj frakciji, druga traka, nešto manje mase, javlja se isključivo u nevezanoj frakciji, dok se traka najmanje mase nalazi pretežno u nevezanoj frakciji i u tragu u vezanoj frakciji. U uzorcima osoba sa hipoglikemijom konstatovana je treća vrsta profila, naime prisutna je samo jedna proteinska traka, sličnog intenziteta i u vezanoj i u nevezanoj frakciji.

Karakteristični profil IGFBP-1 kod ispitivanih grupa bi se mogao objasniti kao posledica post-translacionih modifikacija IGFBP-1, koje bi uključivale fosforilovanje, minimalnu proteolizu i oksidaciju. Molekulske mase multimera u regionu 90-100 kDa se razlikuju samo u nekoliko kDa. Činjenica da se deo multimera nalazio u vezanoj frakciji posle IAC ukazuje na njihovu slabu interakciju sa $\alpha 2M$ (odvojili su se od $\alpha 2M$ prilikom pripreme uzoraka za elektroforezu). Kod pacijenata sa DM2, postoji jasno prisutan jedan oblik multimerasamo u nevezanoj frakciji, što ukazuje na njegov specifični sastav.

Ovaj eksperiment je dokazao postojanje veze između metabolizma glukoze i post-translacionih promena IGFBP-1, što se pokazalo najvidljivije kroz krajnju oligomerizaciju IGFBP-1 (261). Prisutnost najvećeg broja različitih multimernih oblika kod pacijenata sa DM2 može ukazati na eventualno veće učešće IGF sistema u regulaciji glukoze kod pacijenata sa DM2.

Na kraju, da bi se ispitale i moguće kvantitativne/kvalitativne razlike u samom $\alpha 2M$, što bi se moglo odraziti na komplekse IGFBP-1/ $\alpha 2M$, urađen je imunoblot sa anti- $\alpha 2M$ antitelima (Slika 24).

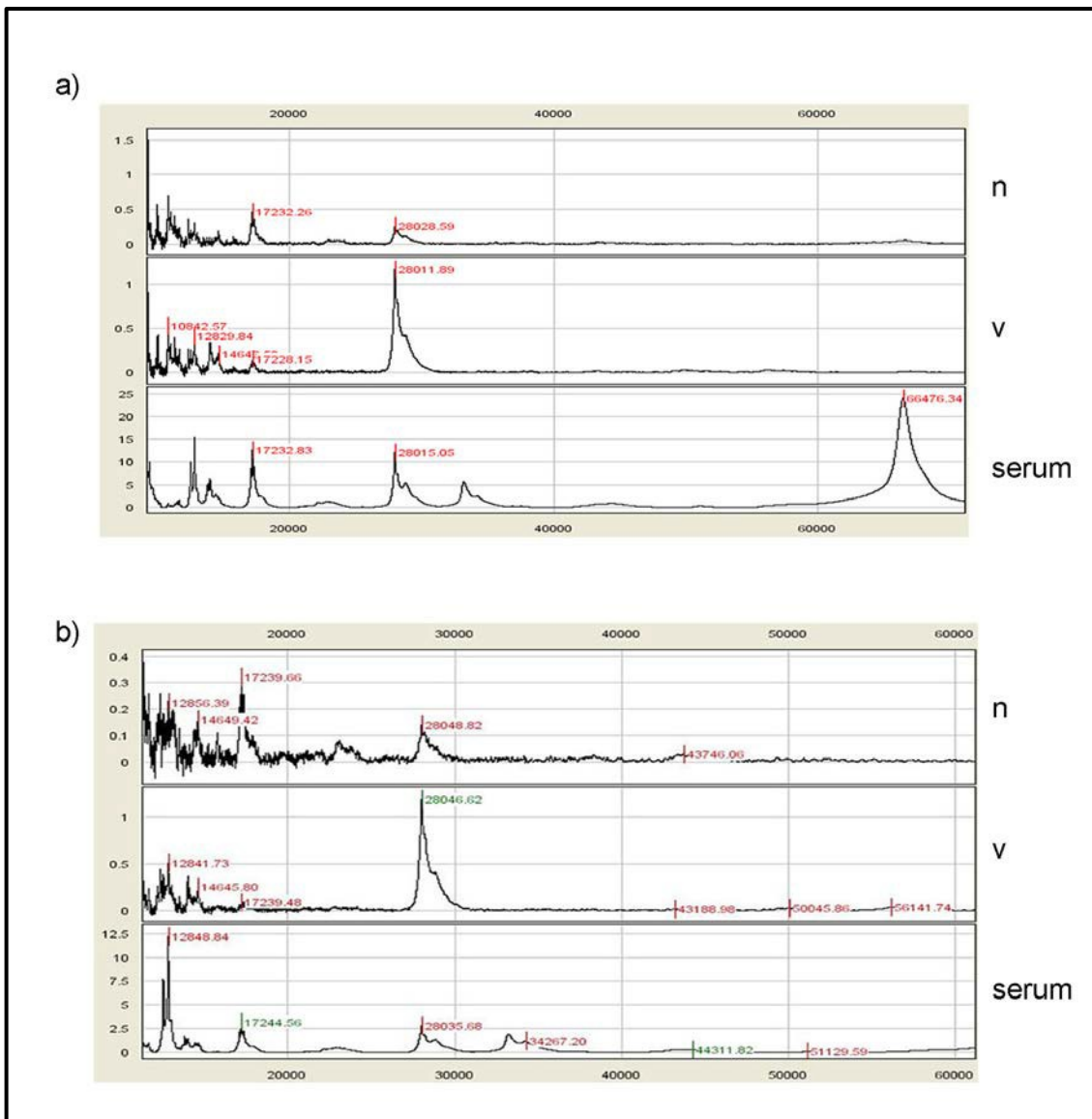


Slika 24. Neredukujuća elektroforeza i imunoblot sa anti- α 2M antitelima nevezanih (n) i vezanih (v) frakcija dobijenih posle IDA-agaroze seruma zdrave osobe (K), pacijenta sa DM2 (D) i pacijenta sa hipoglikemijom (H)

U sve tri ispitivane grupe se javila samo jedna proteinska traka na početku gela, koja se po intenzitetu nije razlikovala između uzoraka. Drugim rečima, α 2M nije činilac koji utiče na moguće razlike u IGFBP-1/ α 2M kompleksima kod osoba sa poremećajem u regulaciji metabolizma glukoze.

4.4.3 Analiza fragmenata IGFBP-1 metodom SELDI-TOF/MS kod zdravih osoba i pacijenata sa DM2 ili hipoglikemijom

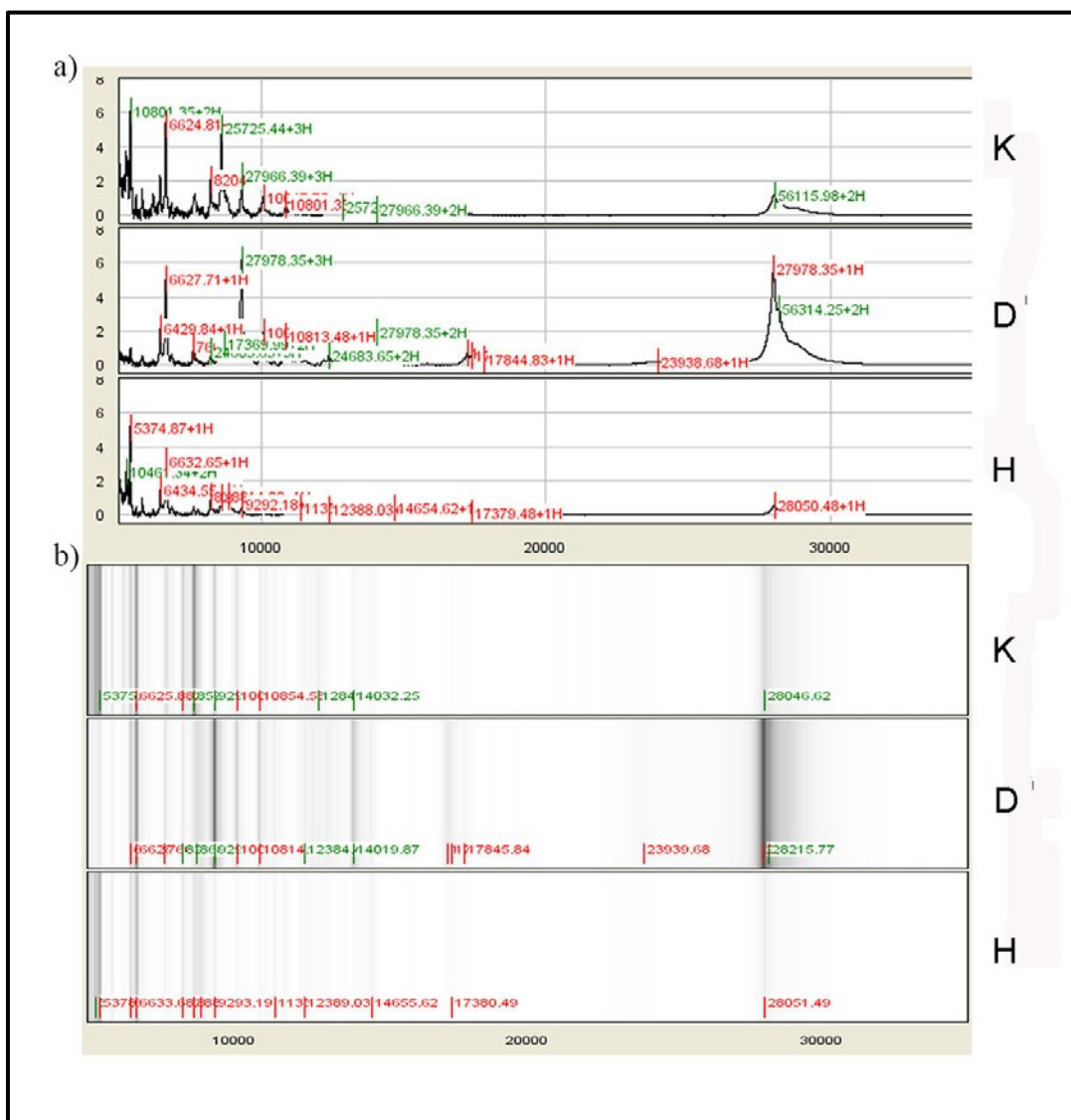
SELDI-TOF/MS je primenjena za detaljnije ispitivanje formi IGFBP-1 u vezanim frakcijama posle IAC, pošto su ove frakcije pokazale najveće razlike u profilima IGFBP-1 između grupa. Specifičnost metode je što se na reaktivnoj površini na čipu mogu imobilizovati proteini i dalje pratiti njihova interakcija sa ligandima iz ispitivanih uzoraka. Energija jonizacije je takva da, pored oslobađanja liganda, dovodi i do njegove fragmentacije. Na početku eksperimenta su isprobane dve vrste čipa, za čiju površinu su vezana anti-IGFBP-1 antitela: čip sa proteinom G i PS20 čip koji je sadržao površinske epoksi-grupe. Posle imobilizacije antitela nanete su nevezane i vezane frakcija posle IAC, kao i početni serum. SELDI-TOF maseni deo spektra u oblasti gde su detektovani signali prikazan je na Slici 25.



Slika 25. SELDI-TOF maseni spektri nevezanih (n) i vezanih (v) frakcija posle IAC, kao i početnog serumanačipu sa proteinom G (a) i na PS20 čipu (b), na kojima su imobilizovana anti-IGFBP-1 antitela

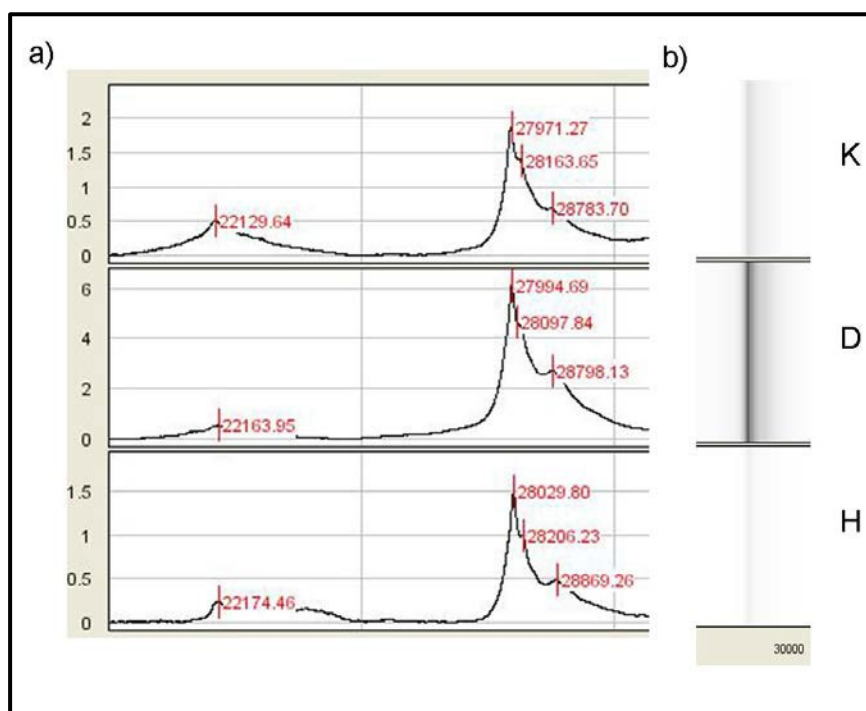
Dobijeni spektri za oba čipa su bili slični. Kao što se sa Slike 25 može videti, za IAC vezanu frakciju dobijen je signal istog intenziteta i oblika za nativni IGFBP-1 (m/z oko 28000). Ovakav rezultat je dao prostora da se koristi bilo koji od ova dva čipa. Odlučeno je da se dalje radi sa PS20 čipom, zbog brže procedure i cene samog čipa.

Tipični maseni spektri, prikazani kao standardni profili i denzitometrijske trake u opsegu m/z 1-30000, za sve tri grupe ispitanika, dati su na Slici 26.



Slika 26. SELDI-TOF maseni spektri vezanih frakcija posle IAC, na PS20 čipusa imobilizovanim anti-IGFBP-1 antitelima, prikazani kao standardni profil (a) i denzitometrijske trake (b) seruma zdrave osobe (K), pacijenta sa DM2 (D) i pacijenta sa hipoglikemijom (H)

Na masenim spektrima sve tri grupe uzoraka, maksimumi se javljaju u oblasti m/z 1-30000. Signali potiču od jednostruko, dvostruko ili trostruko protonovanih molekulskih vrsta. Inicijalni kompleksi i multimeri IGFBP-1 nisu dali signale na većim m/z, drugim rečima, došlo je do njihove degradacije u toku jonizacije. Maksimumi koji se vide na m/z oko 28000, odgovaraju fosfoformama monomera IGFBP-1 (Slika 27). Ovi signali su bili najintenzivniji kod pacijenata sa DM2 (iako je koncentracija ukupnog IGFBP-1 bila najmanja u ovoj grupi). U oblasti spektra m/z do 10000, javlja se mnogo maksimuma koji potiču od IGFBP-1 fragmenata. Upoređivanjem spektara, uočena je značajna razlika u intenzitetu maksimuma na m/z 6600 i 9200 između grupa, međutim zbog velikog broja bliskih fragmenata, nije se mogao precizno tumačiti taj deo spektra.



Slika 27. SELDI-TOF maseni spektri vezanih frakcija posle IAC, na PS20 čipu sa imobilizovanim anti-IGFBP-1 antitelima, prikazani kao standardni profil (a) i denzitometrijske trake (b) u oblasti m/z 20000-30000 seruma zdrave osobe (K), pacijenta sa DM2 (D) i pacijenta sa hipoglikemijom (H)

Ono što bi se moglo zaključiti iz dobijenih spektara je da odnos fosfoformi IGFBP-1 nije drastično različit između tri grupe uzoraka, ali da postoje razlike u stepenu i načinu fragmentacije IGFBP-1. IGFBP-1 kod pacijenata sa DM2 je u većoj meri očuvan kao monomer, nego kod druge dve grupe ispitanika, što verovatno odražava izvesne razlike u strukturi usled promena u metabolizmu glukoze.

4.5 Ispitivanje povezanosti intenzivne fizičke aktivnosti sa promenama IGFBP-1

Intenzivna fizička aktivnost je praćena ubrzanim metabolizmom glukoze, te je za očekivati da se to odrazi i na lučenje insulina i IGF-I/IGFBP-1 osu. Objavljeni su radovi u kojima je saopšteno da bavljenje sportom dovodi do povećanja koncentracije IGFBP-1 (77-79, 213), smanjenja (262), a prema nekim autorima nema razlike u odnosu na osobe koje ne vežbaju (217, 263). Očigledno je prisutna konfuzija u pogledu određenih koncentracija IGFBP-1 i cilj narednih eksperimenata je bio da analizira moguće razloge za ove kontradiktornosti. Potencijalni uzrok ove neusaglašenosti jesu različito formulisani ELISA testovi, pre svega kvalitet i specifičnost antitela koja ulaze u njihov sastav. Precizno i pouzdano određivanje koncentracije IGFBP-1, pored dobre standardizacije, prevashodno zavisi od antitela. Khosravi i saradnici (264) su razvili nekoliko ELISA testova za određivanje IGFBP-1, koristeći više različitih antitela. Koncentracije IGFBP-1 u testovima su se razlikovale i po nekoliko puta. Zaključak je bio da antitela disproporcionalno prepoznaju različite fosfoforme i da se, ustvari, mogu formulisati testovi koji omogućavaju određivanje nefosforilovanih, odnosno fosforilovanih IGFBP-1. Dodatni izvor varijacije može poticati od sposobnosti ELISA testa da detektuje ostale IGFBP-1 molekulske forme osim monomera, iako proizvođači komercijalnih ELISA testova to negiraju. U ovom radu je paralelno određena koncentracija IGFBP-1 komercijalnim ELISA testom i proteinski profil IGFBP-1 imunoreaktivnih molekula, kod profesionalnih sportista (fudbalera) i kod neaktivnih osoba (kontrola).

Serumi fudbalera (i kontrolne grupe) su uzeti rano ujutro, pre početka treninga i nakon noćnog odmora. Koncentracije biohemijskih parametara, IGF-I i procenat telesne

masnoće za sportiste i kontrolnu grupu dati su u Tabeli 5. Statistički značajne razlike između grupa ($p < 0.05$) su označene sa *.

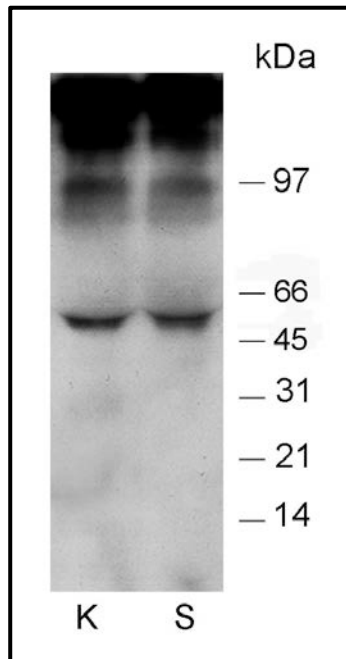
Tabela 5. Koncentracije i aktivnosti biohemijskih parametara, IGF-I i procenat telesne masnoće kod sportista (S) i kontrolne grupe (K)

	S (n=30)	K (n=25)
	Srednja vrednost \pm SD	
Starost (godine)	22 \pm 1,5	23 \pm 1,4
BMI (kg/m²)	22,3 \pm 1,35	22,8 \pm 2,54
Glukoza (mmol/L)	4,6 \pm 0,23	4,4 \pm 0,32
Trigliceridi (mmol/L)	0,7 \pm 0,35	0,7 \pm 0,35
Holesterol (mmol/L)	3,8 \pm 0,74	4,5 \pm 0,45
Procenat masnoće (%)	14,9 \pm 2,73	13,2 \pm 3,01
Hemoglobin (g/L)	145 \pm 8,3	159 \pm 6,5
Albumin (g/L)	48 \pm 5,3	47 \pm 2,2
Aspartat aminotransferaza, AST (U/L)	79 \pm 7,4*	17 \pm 4,5
Alanin aminotransferaza, ALT (U/L)	29 \pm 6,2	20 \pm 3,5
Kreatin kinaza, CK (U/L)	433 \pm 163,4*	84 \pm 25,5
Laktat dehidrogenaza, LDH (U/L)	348 \pm 56,1*	277 \pm 37,9
Gvožđe (μmol/L)	21,0 \pm 4,62	20,6 \pm 4,53
Ukupni kapacitet vezivanja gvožđa (μmol/L)	56,4 \pm 5,33	57,6 \pm 6,52
Feritin (pmol/L)	173 \pm 36,1	168 \pm 27,2
IGF-I (nmol/L)	48,5 \pm 16,20*	31,8 \pm 7,33

Statistički značajne razlike u aktivnostima enzima AST, CK i LDH su očekivane, zbog većeg rada i bržeg metabolizma u mišićnom tkivu sportista. I koncentracija IGF-I je, takođe, bila statistički značajno veća kod sportista.

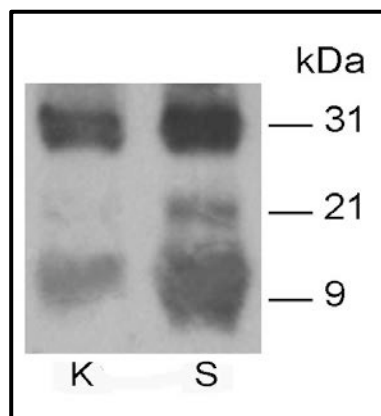
4.5.1 Ispitivanje formi IGFBP-1 kod sportista metodom imunoblota

Proteini seruma, razdvojeni elektroforetski pod neredukujućim uslovima, i podvrgnuti imunoblotu sa anti-IGFBP-1 antitelima, nisu pokazali razlike između sportista i kontrola. Reprezentativni rezultati su prikazani na Slici 28.



Slika 28. Neredukujuća elektroforeza i imunoblot sa anti-IGFBP-1 antitelima proteina seruma zdrave kontrolne osobe (K) i sportiste (S)

Kod obe grupe dobijene su proteinske trake slabog intenziteta na oko 30 kDa (monomer IGFBP-1), kao i intenzivne trake na oko 60,90 i iznad 100 kDa. U sledećem koraku urađena je elektroforeza u redukujućim uslovima, uz znatno dužu ekspoziciju tokom autoradiografije. Ponovila se molekulska promena kao u prethodnim eksperimentima – molekuli velikih masa su se u najvećoj meri redukovali do dimera i monomera. Novina u ovom slučaju je bila intenzivna fragmentacija IGFBP-1 kod sportista (Slika 29).



Slika 29. Redukujuća elektroforeza i imunoblot sa anti-IGFBP-1 antitelima proteina seruma zdrave kontrolne osobe (K) i sportiste (S), oblast do 30 kDa

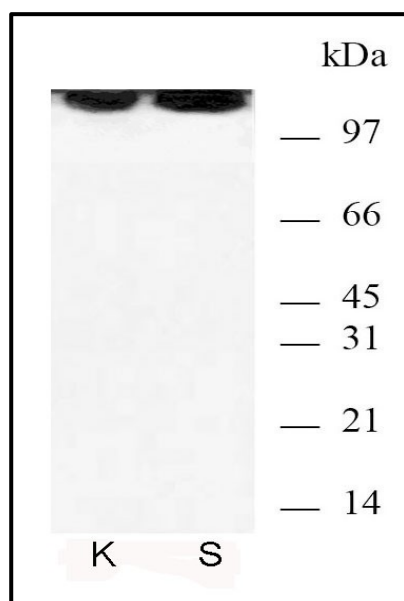
Kao što se sa Slike 29 vidi, prisutni su bili fragmenti oko 21 i 9 kDa. Statistička obrada denzitometrijskih podataka (DJ) je pokazala da je intenzitet traka koje potiču od fragmenata IGFBP-1 značajno veći kod sportista nego kod kontrola, dok su intenziteti traka koje potiču od monomera IGFBP-1 bili slični kod obe grupe (Tabela 6). U zbiru, ukupna količina IGFBP-1 (intaktni i fragmentisani molekuli) je bila značajno veća kod sportista nego kod kontrola. U Tabeli 6 su date i koncentracije IGFBP-1 određene ELISA testom, po kojima nije bilo razlike između grupa.

Tabela 6. Koncentracija IGFBP-1 i relativna količina monomera i fragmenata IGFBP-1u serumima sportista (S) i kontrolne grupe (K)

	S (n=30)	K (n=25)
Koncentracija IGFBP-1 (nmol/L)	0,3±0,16	0,2±0,13
IGFBP-1 monomer, 30 kDa (DJ)	71±9	73±3
IGFBP-1 fragment, 21kDa (DJ)	28±2*	3±1
IGFBP-1 fragment, 9 kDa (DJ)	119±4*	43±2
Ukupni IGFBP-1 (DJ)	218±14*	119±8

Zaključak koji se nameće je da je ukupna koncentracija IGFBP-1 zaista povećana kod sportista, ali je povećan i stepen njegove proteolize. Nastali fragmenti, po svojoj prilici nisu bili prepoznati u ELISA testu koji smo koristili. Ukoliko se uporede denzitometrijski podaci za pojedine forme IGFBP-1, vidi se da je intenzitet fragmenta od 9 kDa veći od intenziteta monomera od 30 kDa. To bi značilo da ELISA testovi, koji makar u maloj meri prepoznaju fragmente, mogu dati značajno različite rezultate od onih testova koji prepoznaju samo monomer.

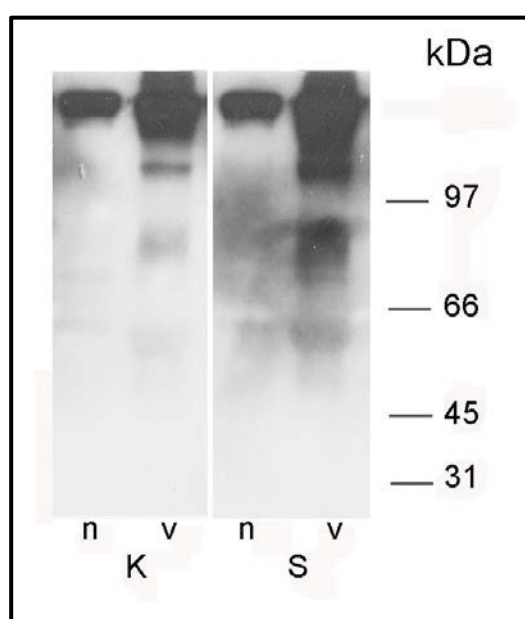
Kao i u prethodnom eksperimentu, urađen je imunoblotsa anti- α 2M antitelima (Slika 30). Prepoznati su samo proteini velike molekulske mase na startu gela, a denzitometrijska analiza nije ukazala na postojanje razlike između grupa. Drugim rečima, koncentracija α 2M u cirkulaciji sportista se nije značajno promenila usled napornih vežbi i treninga.



Slika 30. Neredukujuća elektroforeza i imunoblot sa anti- α 2M antitelima proteina seruma zdrave kontrolne osobe (K) i sportiste (S)

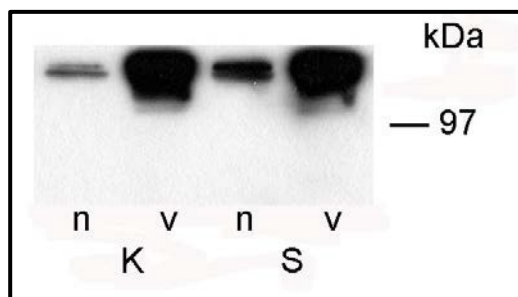
4.5.2 Ispitivanje formi IGFBP-1 kod sportista imunoafinitetnom hromatografijom

Iako u uzorcima seruma sportista nisu nađene razlike u koncentraciji $\alpha 2M$ u odnosu na kontrole, ipak su bile moguće razlike u kompleksima IGFBP-1/ $\alpha 2M$, što je dalje ispitano metodom IAC. Nakon elektroforeze u neredukujućim uslovima, urađen je imunoblot sa anti-IGFBP-1 i anti- $\alpha 2M$ antitelima (Slike 31 i 32).



Slika 31. Neredukujuća elektroforeza i imunoblot sa anti-IGFBP-1 antitelima nevezanih (n) i vezanih (v) frakcija dobijenih posle IAC seruma zdrave kontrolne osobe (K) i sportiste (S)

IGFBP-1 profili u IAC nevezanoj i vezanoj frakciji seruma sportista bilisu slični kao profili kontrolnih seruma, s tim da je intenzitet traka u vezanoj frakciji bio jači u uzorcima sportista (što je u skladu sa većom koncentracijom IGFBP-1).



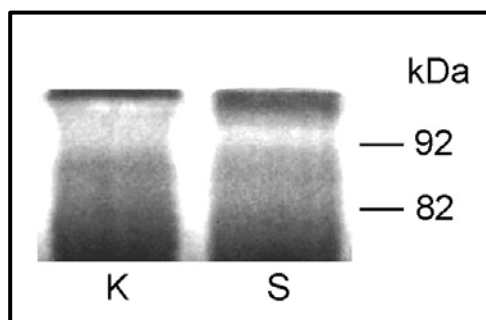
Slika 32. Neredukujuća elektroforeza i imunoblot sa anti- α 2M antitelima nevezanih (n) i vezanih (v) frakcija dobijenih posle IAC seruma zdrave kontrolne osobe (K) i sportiste (S)

Imunoblot sa anti- α 2M antitelima potvrdio je slično prisustvo α 2M u obe grupe uzoraka, te bi se moglo pretpostaviti da je i koncentracija IGFBP-1/ α 2M slična. Ako se uzme u obzir fiziološka koncentracija IGFBP-1, koja je u nmol/L i α 2M, koja je u μ mol/L (265), može se pretpostaviti da stvaranje kompleksa prevashodno zavisi od IGFBP-1. Kod sportista, razlike u IGFBP-1/ α 2M kompleksima ili nema u odnosu na neaktivne osobe, ili su one vrlo male i ne mogu se detektovati primenjenim metodama.

4.5.3 Ispitivanje aktivnosti MMP-9 metodom želatiniske zimografije

Pošto je već konstatovana intenzivna fragmentacija IGFBP-1 kod sportista, u nastavku eksperimenta smo želeli da indentifikujemo enzim koji bi mogao biti odgovoran za to. Poznato je da je povećana mišićna aktivnost praćena aktivacijom matriksnih metaloproteaza, koje učestvuju u degradaciji proteina u vanćelijskom matriksu (220). Naša pretpostavka je bila da bi do povećane fragmentacije IGFBP-1 kod sportista moglo doći usled dejstva neke od MMP. Različite MMP proteolizuju IGFBP-1 dajući fragmente različitih masa. Pošto su želatinaze kao podgrupa (MMP-2 i MMP-9) širokog spektra delovanja, urađena je želatiniska zimografija. Tipični rezultati su prikazani na Slici 33. Na zimogramu su uočene dve bistre oblasti na 82 i 92 kDa, koje

odgovaraju dvema formama MMP-9. Aktivnost obe forme MMP-9 je bila značajno veća kod sportista nego kod kontrola (Tabela 7).



Slika 33. Želatinska zimografija seruma kontrolne osobe (K) i sportiste (S)

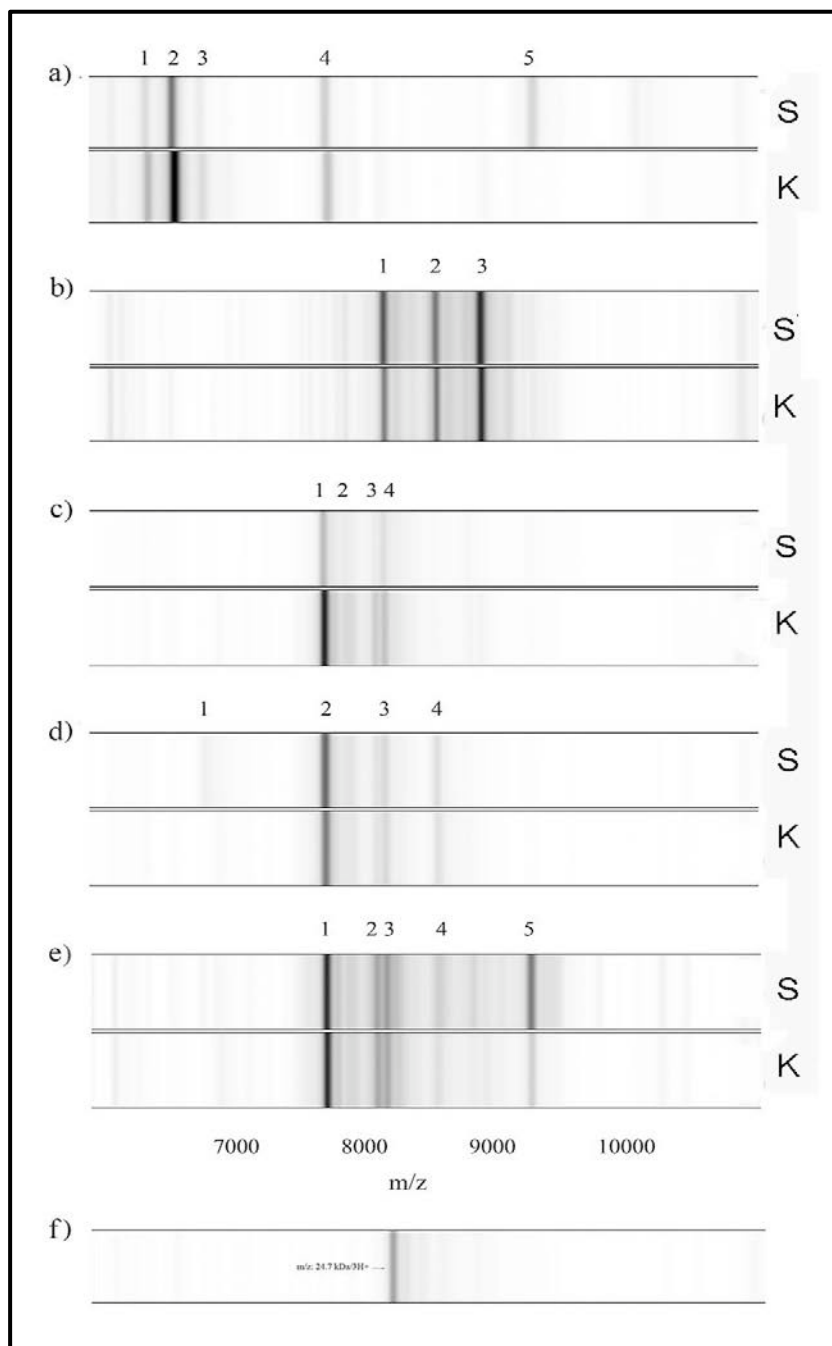
Tabela 7. Relativna enzimaska aktivnost MMP-9 u serumu sportista (S) i kontrola (K)

	S (n=30)	K (n=25)
MMP-9, 92 kDa (DJ)	55±4,1*	32±3,2
MMP-9, 82 kDa (DJ)	36±4,0*	12±2,9

Literaturnom pretragom je nađen podatak da MMP-9 proteolizuje IGFBP-1 na mestu Lys¹⁴⁵/Lys¹⁴⁶, dajući C-terminalni fragment mase 9 kDa (181). Pošto su rezultati imunoblota identifikovali fragment od 9 kDa kao glavni, može se sa velikom verovatnoćom smatrati da je MMP-9 (mada možda ne i jedina) proteaza odgovorna za povećanu degradaciju IGFBP-1 kod sportista (266).

4.5.4 Analiza fragmenata IGFBP-1 metodom SELDI-TOF/MS kod sportista i neaktivnih osoba

Intenzivno bavljenje sportom dovodi do promeneu aktivnosti kinaza i fosfataza koje regulišu stepen fosforilovanja proteina (267, 268). Takođe se povećava stvaranje reaktivnih jedinjenja kiseonika i drugih slobodnih radikala, koji izazivaju neenzimske modifikacije proteina, od kojih je oksidacija najznačajnija (269, 270). Male promene u strukturi proteina se teško mogu detektovati elektroforetskim metodama, te je MS metoda izbora (267). Kao što je ranije objašnjeno, SELDI-TOF/MS obuhvata interakciju uzorka sa reaktivnim čipom i jonizaciju/fragmentaciju. Ukoliko dođe do promene u strukturi proteina usled post-translacionih modifikacija, za očekivati je da će se promeniti fizičko-hemijske karakteristike molekula, uključujući reaktivnost. U ovom eksperimentu su postavljene sledeće kombinacije: a) PS20 čip sa imobilizovanim anti-IGFBP-1 antitelima – serum, b) PS20 čip sa imobilizovanim anti-IGFBP-1 antitelima – IAC vezana frakcija, c) čip Q10 anjonski izmenjivač – IGFBP-1 izolovan imunoprecipitacijom, d) CM10 katjonski izmenjivač – IGFBP-1 izolovan imunoprecipitacijom i e) IMAC30 čip sa vezanim Fe³⁺ jonima – IGFBP-1 izolovan imunoprecipitacijom. Najintenzivniji signali su bili u intervalu m/z 6000-10000. Reprezentativni rezultati su prikazani kao denzitometrijske trake na Slici 34.



Slika 34. SELDI-TOF maseni spektri seruma na PS20 čipu sa imobilizovanim anti-IGFBP-1 antitelima (a), IAC vezanih frakcija na PS20 čipu sa imobilizovanim anti-IGFBP-1 antitelima (b), kao i izolovanog IGFBP-1 na Q10 (c), IMAC30 (d) i CM10 čipu (e) – serumi zdrave kontrolne osobe (K) i sportiste (S). Negativna kontrola na PS20 čipu je prikazana na dnu slike (f). Brojevima su označeni najintenzivniji signali

PS20 čip sa imobilizovanim anti-IGFBP-1 antitelima je korišćen za direktno ispitivanje IGFBP-1 iz uzoraka seruma (Slika 34a). Trostruko protonovan oblik IGFBP-1 je bio prisutan u svim uzorcima na m/z 7800. Karakterističan triplet je uočen kao i u SELDI-TOF spektrima u prethodnom eksperimentu, na m/z 6400, 6600 i 6800. Maksimum na m/z 9300 viđen je samo u spektrima seruma sportista. U prethodnom eksperimentu, ovaj maksimum je uočen samo kod pacijenata sa DM2. Značajno smanjen intenzitet signala na m/z 6600 i 6800 potvrđen je statističkom analizom. Dodatno, svi signali u oblasti m/z 6000-8000 su bili pomereni ka nižim masa u spektrima seruma sportista.

Isti čip sa imobilizovanim anti-IGFBP-1 antitelima korišćen je za ispitivanje IGFBP-1/ α 2M kompleksa iz vezanih frakcija posle IAC (Slika 34b). U svim uzorcima su detektovana tri signala na m/z 8200, 8600 i 8900, čiji se intenziteti nisu razlikovali između sportista i kontrola.

Za ispitivanje hemijske reaktivnosti, IGFBP-1 je izolovan imunoprecipitacijom sa anti-IGFBP-1 antitelima i analiziran na čipovima sa različitim površinama. Q10 čip je korišćen da bi se ispitala interakcija negativno naelektrisanih grupa IGFBP-1 (Slika 34c). Najizraženiji signal je poticao od trostruko protonovanog IGFBP-1 na m/z 7800. Kod seruma sportista se javio još jedan signal na m/z 8200, dok su se kod kontrolnih uzoraka javili dodatni signali na m/z 7900, 8100 i 8200.

Maseni spektri dobijeni na IMAC30 čipu su bili vrlo slični za obe grupe i sadržali susignal za trostruko protonovani IGFBP-1, kao i dva signala za fragmente na m/z 8200 i 8600 (Slika 34d). Kod uzorka sportista javio se i dodatni slab signal na m/z 6800.

CM10 čip je korišćen za ispitivanje pozitivno naelektrisanih grupa IGFBP-1 (Slika 34e). U svim masenim spektrima subili prisutni signali na m/z 7800, 8100, 8200, 8600 i 9300, a signal na m/z 9300 je bio značajno jači kod uzoraka sportista u odnosu na kontrole.

Na osnovu dobijenih spektara ne može se sa sigurnošću znati koje su se strukturne promene IGFBP-1 dogodile kao posledica intenzivnog vežbanja, ali razlike između dve grupe uzoraka postoje. Berg i saradnici su objavili da se povećava udeo fosforilovanog IGFBP-1 tokom fizičke aktivnosti (213), mada je mehanizam regulacije odnosa izoformi IGFBP-1 kod sportista nepoznat. Ovo je, ujedno, jedini rad u kome se

spominju post-translacione modifikacije IGFBP-1 kao posledica profesionalnog bavljenja sportom (265). Najveća razlika u reaktivnosti IGFBP-1 uočena je na čipovima sa anjonskim i katjonskim aktivnim površinama, što bi moglo da ukaže na promenu u naelektrisanju jednog dela sekvence IGFBP-1 kod sportista u odnosu na kontrolnu grupu. Pošto negativno naelektrisane fosfatne grupe interaguju sa pozitivno naelektrisanom površinom, promene u spektru koje su uočene na Q10 čipu bi mogle biti posledica razlike u stepenu i/ili položaju fosforilovanja IGFBP-1 kod sportista.

Gotovo identični spektri IAC vezanih frakcija kod obe grupe ispitanika (Slika 34b), koji su ujedno različiti od ostalih spektara, mogli bi uputiti na hipotezu da se forme IGFBP-1 u kompleksu ipak razlikuju od slobodnih molekula, ali da nema razlike između uzoraka sportista i onih koji ne vežbaju.

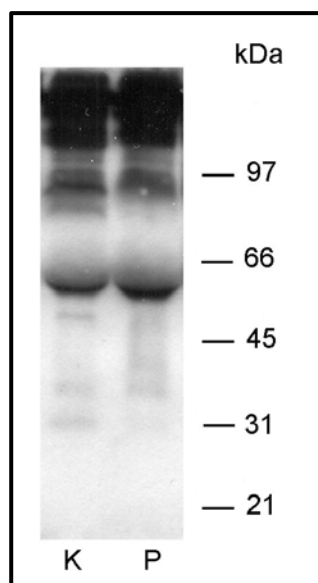
4.6 Ispitivanje povezanosti pušenja sa promenama IGFBP-1

Epidemiološke studije su pokazale da je pušenje dodatni faktor rizika od komplikacija kod pacijenata sa DM2, kao i da je kod pušača koncentracija slobodnih radikala povećana. Kako su slobodni radikali uzročnici oksidativnih promena u proteinima, a za IGFBP-1 smo konstatovali da je u normalnim fiziološkim uslovima podložan oksidativnoj oligomerizaciji, u ovom poslednjem eksperimentu smo želeli da ispitamo mogući uticaj pušenja na post-translacione promene IGFBP-1. Dodatni motiv za ovo istraživanje je podatak da se aktivnost transglutaminaze menja u stanju oksidativnog stresa. Pokazano je, naime, da inhibicija transglutaminaze ima zaštitnu ulogu u brojnim neurodegenerativnim poremećajima izazvanim oksidativnim stresom, jer se sprečava stvaranje polimera patogenih supstrata (271).

Za ispitivanje profila IGFBP-1 kod pušača uzeti su uzorci seruma osoba koje intenzivno konzumiraju cigarete duži niz godina, a kod kojih nisu do sada uočeni metabolički poremećaji. Podaci o osnovnim biohemijskim i hematološkim parametrima dati su u Tabeli 8.

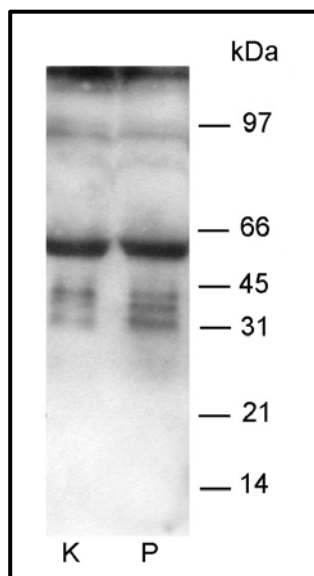
Tabela 8. Koncentracije i aktivnosti biokemijskih parametara kod kontrolne grupe nepušača (K) i pušača (P)

	K (n=15)	P (n=15)
Glukoza (mmol/L)	4,5 ± 0,27	4,7 ± 0,44
Trigliceridi (mmol/L)	1,5 ± 0,31	1,7 ± 0,78
Holesterol (mmol/L)	4,7 ± 0,21	4,8 ± 0,42
Hemoglobin (g/L)	146 ± 5,3	144 ± 6,9
Albumin (g/L)	48 ± 2,7	46 ± 2,5
Aspartat aminotransferaza, AST (U/L)	17 ± 5,1	18 ± 3,5
Alanin aminotransferaza, ALT (U/L)	21 ± 4,6	20 ± 4,5
Gvožđe (µmol/L)	22,0± 3,57	20,4± 3,51
Urea (mmol/L)	6,4 ± 1,11	6,6± 1,34
Kreatinin (µmol/L)	88 ± 6,6	90 ± 7,1
Proteini (g/L)	75 ± 3,4	73± 4,2
Eritrociti (10¹²/L)	5,6 ± 0,77	5,3 ± 0,85
IGFBP-1 (nmol/L)	0,7 ± 0,46	0,8 ± 0,53



Slika 35. Neredukujuća elektroforeza i imunoblot sa anti-IGFBP-1 antitelima seruma kontrolne osobe nepušača (K) i pušača (P)

U ovom eksperimentu su, pre svega, poređeni oligomeri IGFBP-1. Proteini su razdvojeni elektroforezom u neredukujućim i redukujućim uslovima i podvrgnuti imunoblotu sa anti-IGFBP-1 antitelima. Rezultati imunoblota su prikazani na Slikama 35 i 36.



Slika 36. Redukujuća elektroforeza i imunoblot sa anti-IGFBP-1 antitelima seruma zdrave kontrolne osobe nepušača (K) i pušača (P)

Rezultati su pokazali prisustvo istih formi IGFBP-1 kod nepušača i pušača, kako u pogledu molekulskih masa, tako i u pogledu njihove relativne zastupljenosti (intenzitet traka). Na osnovu ovih podataka, moglo bi se zaključiti da pušenje ne utiče na stvaranje IGFBP-1 oligomera, bilo oksidativnim putem ili posredstvom transglutaminaze.

5. ZAKLJUČCI

- Izolovanje IGFBP-1 iz amnionske tečnosti i citosola placentе, pomoću tri sukcesivne hromatografije, se pokazalo nedovoljno efikasnim. Veći prinos IGFBP-1 dobijen je iz uzorka citosola, nego iz uzorka amnionske tečnosti, ali i dalje nedovoljno (ispod 1%).
- Od četiri komercijalno dostupna anti-IGFBP-1 antitela (proizvođača DSL, GroPep, Santa Cruz, AbD Serotec), najboljim su se pokazala antitela proizvođača Santa Cruz i AbD Serotec. Antitela pomenutih proizvođača prepoznavala su sve molekulske forme IGFBP-1, nisu unakrsno reagovala sa drugim IGFBP molekulima i imala su minimalne nespecifične interakcije.
- Primenom metal-afinitetne hromatografije nisu se mogle razdvojiti različito fosforilovane forme IGFBP-1, pošto su se sve vezivale za matriks. Imunoafinitetnom hromatografijom sa imobilizovanim anti- $\alpha 2M$ antitelima postiglo se izvesno razdvajanje formi IGFBP-1. Kompleksi IGFBP-1/ $\alpha 2M$ su se vezivali za matriks, dok je monomer IGFBP-1 pretežno ostao nevezan. Pokazalo se da komplekse sa $\alpha 2M$ formiraju i monomer i multimeri IGFBP-1. Redukcijom veza u kompleksima, kao dominantna vrsta oslobodio se dimer IGFBP-1. Primenom lektinske hromatografije potvrđeno je da su serumske IGFBP-1 forme masa 60-100 kDa multimeri IGFBP-1. Za lektine su se vezali samo kompleksi IGFBP-1/ $\alpha 2M$. Izuzetak je uočen kod Con A hromatografije, u kojoj je IGFBP-1 reagovao sa lektinom. Interakcija je zavisila od prisustva jona Ca^{2+} , Mg^{2+} i Mn^{2+} . Ovaj rezultat upućuje na pretpostavku da bi IGFBP-1 mogao biti mimetik u fiziološkim uslovima za strukture koje prepoznaju manozne saharide.
- Dimerni i multimerni oblici IGFBP-1, osim u tkivima gde nastaju dejstvom transglutaminaze, postoje i u cirkulaciji, što je zaključak do koga se došlo u okviru ove doktorske teze. Deo ovih multimera je stabilan u redukujućoj sredini, a deo ne. Iz toga se može zaključiti da multimeri u cirkulaciji potiču iz dva procesa: oksidacije i transglutaminacije. Pošto oligomeri IGFBP-1 ne vezuju ili vezuju u tragu ligande, oligomerizacija bi se mogla smatrati jednim od mehanizama za kontrolu biodostupnosti IGF molekula.
- Postoji uska povezanost IGFBP-1 sa metabolizmom glukoze. Kod osoba sa poremećajem u metabolizmu glukoze, kao što su diabetes mellitus i hipoglikemija,

menjaju se koncentracije i strukturne karakteristike IGFBP-1. Najintenzivnije post-translacione promene IGFBP-1 se javljaju kod pacijenata sa dijabetesom tip 2, a najkarakterističnije su one na nivou multimerne masa oko 100 kDa. Prisutnost većeg broja različitih oblika IGFBP-1 kod ovih pacijenata ukazuje na potencijalno veće učešće IGF sistema u regulaciji koncentracije glukoze kod dijabetičara. Takođe, postoje izvesne razlike u odnosu fosfoformi IGFBP-1 kod zdravih osoba i ispitivanih grupa, kao i u načinu njihove fragmentacije. Dijabetes i hipoglikemija ne utiču značajno na udeo IGFBP-1 u kompleksima sa $\alpha 2M$.

- Profesionalno bavljenje sportom, takođe, dovodi do promene u koncentraciji i strukturi IGFBP-1. Koncentracija ukupnog IGFBP-1 raste kod sportista ali, usled povećane proteolize, ne menja se značajno udeo monomera, već IGFBP-1 fragmenata. Glavni fragment IGFBP-1 u serumu sportista je mase 9 kDa i, verovatno, nastaje kao posledica povećane aktivnosti matriksne metaloproteaze 9. U okviru ove teze je prvi put ukazano na MMP-9 kao IGFBP-1 proteazu kod sportista. Primenom masene spektrometrije detektovana je izmenjena reaktivnosti IGFBP-1 kod sportista na čipovima sa različitim jonoizmenjivačkim površinama, ukazujući na promenu u fizičko-hemijskim karakteristikama IGFBP-1.
- Pušenje, kao uzročnik stvaranja slobodnih radikala i dodatni faktor rizika od vaskularnih komplikacija kod dijabetičara, prema dobijenim rezultatima, nije od uticaja na oligomerizaciju (oksidaciju) IGFBP-1 u cirkulaciji.
- Na kraju, opšti zaključak bi bio da promene u metabolizmu glukoze, bez obzira da li su izazvane poremećajima ili povećanom potrebom za glukozom, dovode do promene u koncentraciji i strukturi IGFBP-1, što se u najvećoj meri iskazuje kroz izmenjenu oligomerizaciju i proteolizu IGFBP-1. Proces stvaranja kompleksa IGFBP-1 sa $\alpha 2M$ je najotporniji na uticaje. Pošto oligomeri i fragmenti IGFBP-1 uglavnom ne vezuju IGF, redistribucijom IGFBP-1 između više različitih molekulskih formi, u uslovima izmenjenog metabolizma glukoze, može se znatno uticati na stepen vezivanja/slobode IGF, odnosno na unutar-ćelijski transport i korišćenje glukoze.

6. LITERATURA

1. A. Denley, L. Cosgrove, G. Booker, J. Wallace, B. Forbes. *Cytokine Growth Factor Rev*, 16 (2005) 421–439.
2. A. Denley, E. Bonython, G. Booker, L. Cosgrove, B. Forbes, C. Ward, J. Wallace. *Mol Endocrinol*, 18 (2004) 2502-2512.
3. M. Bayne, J. Applebaum, G. Chicchi, N. Hayes, B. Green, M. Cascieri. *J Biol Chem*, 263 (1988) 6233-6239.
4. J. Brown, C. Delaine, O. Zaccheo, C. Siebold, R. Gilbert, G. van Boxel, A. Denley, J. Wallace, A. Bassim Hassan, B. Forbes, E. Yvonne Jones. *EMBO J*, 27 (2008) 265-276.
5. T. Adams, V. Epa, T. Garrett, C. Ward. *Cell Mol Life Sci*, 57 (2000) 1050–1093.
6. M. Czech. *Cell*, 31 (1982) 8–10.
7. B. Bhaumick, R. Bala, M. Hollenberg. *Proc Natl Acad Sci USA*, 78 (1981) 4279–4283.
8. S. Chernausek, S. Jacobs, J. Van Wyk. *Biochemistry*, 20 (1981) 7345–7350.
9. M. Keyhanfar, G. Booker, J. Whittaker, J. Wallace, B. Forbes. *Biochem J*, 401 (2007) 269-277.
10. N. Dahms, P. Rose, J. Molkentin, Y. Zhang, M. Brzycki. *J Biol Chem*, 15 (1993) 5457-5463.
11. S. Kornfeld. *Annu Rec Biochem*, 61 (1992) 307-330.
12. P.D.K. Lee, D. Hodges, R. Hintz, J. Wyche, R. Rosenfeld. *Biochem Biophys Res Commun*, 134 (1986) 585-600.
13. D. Ewton, S. Falen, J. Florini, *Endocrinology*, 120 (1987) 115-123.
14. P. Tong, S. Tollefsen, S. Kornfeld. *J Biol Chem*, 63 (1988) 2585-2588.
15. F. Garmroudi, R. MacDonald. *J Biol Chem*, 269 (1994) 26944-26952.
16. P. Tong, W. Gregory, S. Kornfeld. *J Biol Chem*, 264 (1989) 7962-7969.
17. B. Westlund, N. Dahms, S. Kornfeld. *J Biol Chem*, 266 (1991) 23233-23239.
18. G. Pandini, F. Frasca, R. Mineo, L. Sciacca, R. Vigneri, A. Belfiore. *J Biol Chem*, 277 (2002) 39684-39695.
19. S. Firth, R. Baxter, *Endocr Rev*, 23 (2002) 824-854.

20. L. Bach, S. Headey, R. Norton. *Trends Endocrin Met*, 16 (2005) 228-234.
21. W. Kalus, M. Zweckstetter, C. Renner, Y. Sanchez, J. Georgescu, M. Grol, D. Demuth, R. Schumacher, C. Dony, K. Lang, T. Holak. *EMBO J*, 17 (1998) 6558-6572.
22. F. Carrick, B. Forbes, J. Wallace. *J Biol Chem*, 276 (2001) 27120-27128.
23. M. Galanis, S. Firth, J. Bond, A. Nathanielsz, A. Kortt, P. Hudson, R. Baxter. *J Endocrinol*, 169 (2001) 123-133.
24. P. Ho, R. Baxter. *Endocrinology*, 138 (1997) 3811-3818.
25. R. Koistinen, N. Kalkkinen, M.L. Huhtala, M. Seppälä, H. Bohn, E.M. Rutanen. *Endocrinology*, 118 (1986) 1375-1378.
26. L. Dolcini, A. Sala, M. Campagnoli, S. Labò, M. Valli, L. Visai, L. Minchiotti, H. L. Monaco, M. Galliano. *FEBS J*, 276 (2009) 6033-6046.
27. S. Wheatcroft, M. Kearney. *Trends Endocrinol Met*, 20 (2009) 153-162.
28. J. Jones, W. Busby, G. Wright, C. Smith, N. Kimack, D. Clemmons. *J Biol Chem*, 268 (1993) 1125-1131.
29. M. Seferovic, R. Ali, H. Kamei, S. Liu, J. M. Khosravi, S. Nazarian, V. K. M. Han, C. Duan, M Gupta. *Endocrinology*, 150 (2009) 220-231.
30. S. Firth, R. Baxter. *J Endocrinol*, 160 (1999) 379-387.
31. W. Hoeck, V. Mukku. *J Cell Biochem*, 56 (1994) 262-273.
32. J. Coverley, J. Martin, R. Baxter, *Endocrinology*, 141 (2000) 564-570.
33. L. Katz, G. Rosenfeld, P. Cohen. *Endocrinologist*, 5 (1995) 36-43.
34. M. Rechler, D. Clemmons. *Trends Endo Metab*, 9 (1998) 176-183.
35. G. Neumann, J. Marinaro, L. Bach. *Biochemistry*, 5 (1998) 6572-6585.
36. J. Fowlkes, K. Suzuki, H. Nagase, K. Thrailkill. *Endocrinology*, 135 (1994) 2810-2813.
37. H. Birkedal-Hansen, W. Moore, M. Bodden, L. Windsor, B. Birkedal-Hansen, J. Engler. *Crit Rev Oral Biol Med*, 4 (1993) 197-250.
38. H. Yu, T. Rohan. *J Natl Cancer Inst*, 92 (2000) 1472-1489.
39. R. Verma, C. Hansch. *Bioog Med Chem*, 15 (2007) 2223-2268.
40. L. Murphy, G. Bell, H. Friesen. *Endocrinology*, 120 (1987) 1806-1812.
41. E. Chin, J. Zhou, J. Dai. *Endocrinology*, 134 (1994) 2498-2504.
42. P.D. K. Lee, C. Conover, D. Powell. *Proc Soc Exp Biol Med*, 204 (1993) 4-29.
43. S. Bradshaw, A. D'Ercole, V. Han. *Endocrinology*, 140 (1999) 575-584.

44. S. Shimasaki, F. Uchiyama, M. Shimonaka, N. Ling. *Mol Endocrinol*, 4 (1990) 1451-1458.
45. S. Mohan, Y. Nakao, Y. Honda, E. Landale, U. Leser, C. Dony, K. Lang, D. J. Baylink. *J Biol Chem*, 270 (1995) 20424-20431.
46. M. Schneider, E. Wolf, A. Hoeflich, H. Lahm. *J Endocrinol*, 172 (2002) 423-440.
47. L. Bach, N. Thotakura, M. Rechler. *Growth Regul*, 3 (1993) 59-62.
48. J. Leger, J. Oury, M. Noel, S. Baron, K. Benali, P. Blot, P. Czernichow. *Pediatr Res*, 40 (1996) 94-100.
49. M. Lewitt, K. Hall. GROWTH AND DEVELOPMENT: The IGF System and Nutrition in Adulthood and Aging: M. Houston, J. M. P. Holly, E. Feldman. IGF and Nutrition in Health and Disease. Human Press, 2005.
50. R. Baxter. *Adv Mol Cell Endocrinol*, 1 (1997) 123-159.
51. M. Lewitt, F. Scott, N. Clarke, T. Wu, M. Sinosich, R. Baxter. *J Endocrinol*, 159 (1998) 265-274.
52. P. Collett-Solberg, P. Cohen. *Endocrine*, 12 (2000) 121-136.
53. M. Bermann, C. Jaffe, W. Tsai, R. DeMott-Friberg, A. Barkan. *J Clin Invest*, 94 (1994) 138-145.
54. P. Rotwein. *Growth Factors*, 5 (1991) 3-18.
55. J. Thissen, J. Ketelslegers, L. Underwood. *Endocr Rev*, 15 (1994) 80-101.
56. D. Brick, A. Gerweck, E. Meenaghan, E. Lawson, M. Misra, P. Fazeli, W. Johnson, A. Klibanski, K. Miller. *Eur J Endocrinol*, 163 (2010) 185-191.
57. D. Le Roith, C. Roberts. *Cancer Lett*, 195 (2003) 127-137.
58. M. Adamo, L. Wang, L. Heron, D. Ben-Yosef, H. Zhao, D. Le Roith. OVERVIEW: IGF and Nutrition in Health and Disease. Human Press 2005.
59. J. Veldhuis, S. Anderson, A. Iranmanesh, C. Bowers. *J Clin Endocrinol Metab*, 90 (2005) 1613-1617.
60. J. Jones, D. Clemmons. *Endocr Rev*, 16 (1995) 3-34.
61. S. Yakar, C. Rosen, M. Bouxsein, H. Sun, W. Mejia, Y. Kawashima, Y. Wu, K. Emerton, V. Williams, K. Jepsen, M. Schaffler, R. Majeska, O. Gavrilova, M. Gutierrez, D. Hwang, P. Pennisi, J. Frystik, Y. Boisclair, J. Pintar, H. Jasper, H. Domene, P. Cohen, D. Clemmons, D. LeRoith. *FASEB J*, 23 (2009) 709-719.

62. K. Kelley, Y. Oh, S. Gargosky, Z. Gucey, T. Matsumoto, V. Hwa, L. Ng, D. Simpson, R. Rosenfeld. *Int J Biochem Cell Biol*, 28 (1996) 619-637.
63. P. Collett-Solberg, P. Cohen. *Endocrinol Metab Clin North Am*, 25 (1996) 591-614.
64. S. Rajaram, D. Baylink, S. Mohan. *Endocr Rev*, 6 (1997) 801-831.
65. M. Nuutila, V. Hiilesmaa, T. Kärkkäinen, O. Ylikorkala, E. Rutanen. *Obstet Gynecol*, 94 (1999) 243-249.
66. E. Rutanen, H. Bohn, M. Seppala. *Am J Obstet Gynecol*, 144 (1982) 460-463.
67. R. Baxter, C. Cowell. *J Clin Endocrinol Metab*, 65 (1987) 432-440.
68. K. Wolk, S. Larsson, B. Vessby, A. Wolk, K. Brismar. *J Clin Endocrinol Metab*, 89 (2004) 1879-1884.
69. J. Janssen, R. Stolck, H. Pols, D. Grobbee, S. Lamberts. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 18 (1998) 277-282.
70. C. Lemne, K. Brismar. *Blood Press*, 7 (1998) 89-95.
71. Y. Hong, N. Pedersen, K. Brismar, K. Hall, U. de Faire. *J Clin Endocrinol Metab*, 81 (1996) 1791-1797.
72. D. Powell, A. Suwanichkul, M. Cubbage, L. DePaolis, M. Snuggs, P. Lee. *J Biol Chem*, 266 (1991) 18868-18876.
73. A. Hilding, K. Brismar, M. Thoren, K. Hall. *J Clin Endocrinol Metab*, 77 (1993) 1142-1147.
74. L. Underwood, J. Thissen, S. Lemozy, J. Ketelslegers, D. Clemmons. *Horm Res*, 42 (1994) 145-151.
75. S. Lemozy, J. Pucilowska, L. Underwood. *Endocrinology*, 135 (1994) 617-623.
76. A. Cotterill, J. Holly, J. Wass. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 39 (1993) 357-362.
77. A. Suikkari, T. Sane, M. Seppala, H. Yki-Jarvinen, S. Karonen, V. Koivisto. *J Clin Endocrinol Metab*, 68 (1989) 141-144.
78. N. Hopkins, S. Jakeman, S. Hughes, J. Holly. *J Clin Endocrinol Metab*, 79 (1994) 1887-1890.
79. H. Koistinen, R. Koistinen, L. Selenius, O. Ylikorkala, M. Seppälä. *M.J Appl Physiol*, 80 (1996) 760-764.
80. S. Mehta, C. Livingstone, A. Borai, G. Ferns. *Br J Diabetes Vasc Dis*, 12 (2012) 17-25.

81. J. Jones, A. D'Ercole, C. Camacho-Hubner, D. Clemmons. *Proc Natl Acad Sci USA*, 88 (1991) 7481-7485.
82. P. D. K. Lee, L. Guidice, C. Conover, D. Powell. *Proc Soc Exp Biol*, 216 (1997) 319-357.
83. M. Gelato, R. Frost. *Endocrine*, 7 (1997) 81-85.
84. R. Baxter. *Horm Res*, 42 (1994) 140-144.
85. S. Mohan, J. Farley, D. Baylink. *Prog Growth Factor Res*, 6 (1995) 465-473.
86. L. Bach. *Horm Metab Res*, 31 (1999) 226-234.
87. R. Baxter. *Horm Res*, 55 (2001) 68-72.
88. L. Katz, M. Satin-Smith, P. Collett-Solberg, L. Baker, C. Stanley, P. Cohen. *J Clin Endocrinol Metab*, 83 (1998) 4426-4430.
89. T. Sandra, M. Boes, B. Dake J. Stokes, R. Bar. *Am J Physiol*, 275 (1998) E32-E37.
90. U. Hiden, E. Glitzner, M. Hartmann, G. Desoye. *J Anat*, 215 (2009) 60-68.
91. S. Greenall, J. Bentley, L. Pearce, J. Scoble, L. Sparrow, N. Bartone, X. Xiao, R. Baxter, L. Cosgrove, T. Adams. *J Biol Chem*, 288 (2013) 59-68.
92. E. Wolf, A. Hoefflich, H. Lahm. *Growth Horm IGF Res*, 8 (1998) 185-193.
93. L. Bach, M. Rechler. *Diabetes Rev*, 3 (1995) 38-61.
94. S. Mohan, D. Baylink. *J Endocrinol*, 175 (2002) 19-31.
95. J. Irving, P. Lala. *Exp Cell Res*, 217 (1995) 419-427.
96. J. Jones, A. Gockerman, W. Busby, G. Wright, D. Clemmons. *Proc Natl Acad Sci USA*, 90 (1993) 10553-10557.
97. A. Gockerman, T. Prevette, J. Jones, D. Clemmons. *Endocrinology*, 136 (1995) 4168-4173.
98. L. Gleeson, C. Chakraborty, T. McKinnon, P. Lala. *J Clin Endocrinol Metab*, 86 (2001) 2484-2493.
99. D. Fowler, K. Nicolaides, J. Miell. *Hum Reprod Update*, 6 (2000) 495-504.
100. M. Westwood, J. Gibson, A. Davies, R. Young, A. White. *J Clin Endocrinol Metab*, 79 (1994) 1735-1741.
101. M. Weber, G. Spötti, C. Gössl, D. Engelhardt. *J Clin Endocrinol Metab*, 84 (1999) 1679-1684.
102. A. D'Ercole, D. Hill, A. Strain, L. Underwood. *Pediatr Res*, 20 (1986) 253-255.

103. N. Jansson, A. Nilselfelt, M. Gellerstedt, M. Wennergren, L. Rossander-Hulthén, T. Powell, T. Jansson. *Am J Clin Nutr*, 87 (2008) 1743-1749.
104. J. Leu, D. George. *Genes Dev*, 21 (2007) 3095-3109.
105. C. Conover, J. Clarkson, S. Durham. Current Directions in Insulin-like Growth Factor Research. Edited by: D. LeRoith, M. Raizada. Plenum Press, New York, 1994.
106. R. Clark, D. Mortensen, D. Reifsynder. *Growth Reg*, 3 (1993) 50-52.
107. I. Baričević, R. Masnikosa, D. Lagundžin, V. Golubović, O. Nedić. *Clin Biochem*, 43 (2010) 725-731.
108. Z. Oh, H. Müller, G. Lamson, R. Rosenfeld. *J Biol Chem*, 268 (1993) 14964-14971.
109. J. Martin, S. Weenink, R. Baxter. *J Biol Chem*, 278 (2003) 2969-2976.
110. S. Weinzimer, T. Beers Gibson, P. Collett-Solberg, A. Khare, B. Liu, P. Cohen. *J Clin Endocrinol Metab*, 86 (2001) 1806-1813.
111. T. Nickerson, H. Huynh, M. Pollak. *Biochem Biophys Res Commun*, 237 (1997) 690-693.
112. R. Zhou, D. Diehl, A. Hoeflich, H. Lahm, E. Wolf. *J Endocrinol*, 178 (2003) 177-193.
113. S. Twigg, R. Baxter. *J Biol Chem*, 273 (1998) 6074-6079.
114. P. Campbell, D. Andress. *Am J Physiol*, 273 (1997) E1005-E1013.
115. D. Kiepe, D. Andress, S. Mohan, L. Ståndker, T. Ulinski, R. Himmele, O. Mehls, B. Tõnshoff. *J Am Soc Nephrol*, 12 (2001) 2400-2410.
116. S. Headey, K. Leeding, R. Norton, L. Bach. *J Mol Endocrinol*, 33 (2004) 377-386.
117. N. Srinivasan, D. Edwall, T. Linkhart, D. Baylink, S. Mohan. *J Endocrinol*, 194 (1996) 297-303.
118. H. Guler, J. Zapf, E. Froesch. *N Engl J Med*, 317 (1987) 137-140.
119. M. Binoux. *Diabete Metab*, 21 (1995) 330-337.
120. A. Bennett, D. Wilson, F. Liu, R. Nagashima, R. Rosenfeld, R. Hintz. *J Clin Endocrinol Metab*, 57 (1983) 609-612.
121. R. Baxter. *Metabolism*, 44 (1995) 12-17.
122. J. Beattie, K. Phillips, J. Shand, M. Szymanowska, D. Flint, G. Allan. *Mol Cell Biochem*, 307 (2008) 221-236.

123. E. Fernqvist-Forbes, A. Hilding, K. Ekberg, K. Brismar. *J Clin Endocrinol Metab*, 82 (1997) 2677-2680.
124. C. Conover, G. Divertie, P. D. K. Lee. *Acta Endocrinol (Copenh)*, 128 (1993) 140-143.
125. B. Samstein, M. Holmes, J. Fan, R. Frost, M. Gelato, C. Lang. *Biochem Biophys Res Commun*, 228 (1996) 611-615.
126. M. Lewitt. *Biochem Biophys Res Commun*, 282 (2001) 1126-1131.
127. M. Lewitt. *Diabetes Res Clin Pract*, 23 (1994) 3-15.
128. E. Schoenle, P. Zenobi, T. Torresani, E. Werder, M. Zachmann, E. Froesch. *Diabetologia*, 34 (1991) 675-679.
129. T. Cheetham, J. Jones, A. Taylor, J. Holly, D. Matthews, D. Dunger. *Diabetologia*, 36 (1993) 678-681.
130. R. Holt, H. Simpson, P. Sonksen. *Diabetes Med*, 20 (2003) 3-15.
131. V. Mohamed-Ali, J. Pinkney. *Treat Endocrinol*, 1 (2002) 399-410.
132. E. Rinderknecht, R. Humbel. *J Biol Chem*, 253 (1978) 2769-2776.
133. E. Rinderknecht, R. Humbel. *FEBS Lett*, 89 (1978) 283-286.
134. J. Nakae, Y. Kido, D. Accili. *Endocr Rev*, 22 (2001) 818-835.
135. A. Belfiore, G. Pandini, V. Vella, S. Squatrito, R. Vigneri. *Biochimie*, 81 (1999) 403-407.
136. G. Pandini, R. Vigneri, A. Constantino, F. Frasca, A. Ippolito, Y. Fujita-Yamaguchi, K. Siddle, I. Goldfine, A. Belfiore. *Clin Cancer Res*, 5 (1999) 1935-1944.
137. C. Conover, P. D. K. Lee. *J Clin Endocrinol Metab*, 70 (1990) 1062-1067.
138. M. Lewitt, R. Baxter. *J Clin Endocrinol Metab*, 69 (1989) 246-252.
139. A. Suikkari, V. Koivisto, E. Rutanen, H. Yki-Järvinen, S. Karonen, M. Seppälä. *J Clin Endocrinol Metab*, 66 (1988) 266-272.
140. K. Brismar, E. Fernqvist-Forbes, J. Wahren, K. Hall. *J Clin Endocrinol Metab*, 79 (1994) 872-878.
141. A. Hilding, K. Brismar, M. Degerblad, M. Thorén, K. Hall. *J Clin Endocrinol Metab*, 80 (1995) 2646-2652.
142. D. Mynarcik, R. Frost, C. Lang, K. DeCristofaro, M. McNurlan, P. Garlick, R. Steigbigel, J. Fuhrer, S. Ahnn, M. Gelato. *J Acquir Immune Defic Syndr*, 22 (1999) 49-55.

143. B. Lindgren, I. Odar-Cederlöf, F. Ericsson, K. Brismar. *Growth Regul*, 6 (1996) 137-143.
144. S. Attard-Montalto, C. Camacho-Hübner, A. Cotterill, L. D'Souza-Li, S. Daley, K. Bartlett, D. Halliday, O. Eden. *Acta Paediatr*, 87 (1998) 54-60.
145. M. Lewitt, H. Saunders, R. Baxter. *Endocrinology*, 131 (1992) 2357-2364.
146. K. Brismar, M. Gutniak, G. Póvoa, S. Warner, K. Hall. *J Endocrinol Invest*, 11 (1988) 599-602.
147. S. Rajpathak, A. McGinn , H. Strickler, T. Rohan, M. Pollak, A. Cappola, L. Kuller, X. Xue, A. Newman, E. Strotmeyer, B. Psaty, R. Kaplan. *Growth Horm IGF Res*, 18 (2008) 166-173.
148. A. Bereket, T. Wilson, S. Blethen, J. Fan, R. Frost, M. Gelato, C. Lang. *J Clin Endocrinol Metab*, 81 (1996) 4379-4384.
149. J. Frystyk, C. Skjærbæk, B. Dinesen, H. Ørskov. *FEBS Lett*, 348 (1994) 185-191.
150. B. Nyomba, L. Berard, L. Murphy. *J Clin Endocrinol Metab*, 82 (1997) 2177-2181.
151. J. Frystyk, K. Højlund, K. Rasmussen, S. Jørgensen, M. Wildner-Christensen, H. Ørskov. *J Clin Endocrinol Metab*, 84 (2002) 2324-2328.
152. C. Conover, P.D. K. Lee, J. Kanaley, J. Clarkson, M. Jensen. *J Clin Endocrinol Metab*, 74 (1992) 1355-1360.
153. M. Lewitt, G. Denyer, G. Cooney, R. Baxter. *Endocrinology*, 129 (1991) 2254-2256.
154. H. Guler, J. Zapf, C. Schmid, E. Froesch. *Acta Endocrinol (Copenh.)*, 121 (1989) 753-758.
155. J. Frystyk, M. Hussain, C. Skjærbæk, N. Pørksen, E. Froesch, H. Ørskov. *Growth Horm IGF Res*, 9 (1999) 150-156.
156. J. Frystyk. *Growth Horm IGF Res*, 14 (2004) 337-375.
157. M. Iwashita, K. Sakai, Y. Kudo, Y. Takeda. *Growth Horm IGF Res*, 8 (1998) 487-493.
158. K. Sakai, A. D'Ercole, L. Murphy, D. Clemmons. *Diabetes*, 50 (2001) 2-8.
159. M. Kabir-Slmani, Y. Shimizu, K. Sakai, M. Iwashita. *Mol Hum Reprod*, 11 (2005) 667-671.

160. W. Busby, P. Hossenlopp, M. Binoux, D. Clemmons. *Endocrinology*, 125 (1989) 773-777.
161. K. Sakai K, W. Busby, J. Clarke, D. Clemmons. *J Biol Chem*, 276 (2001) 8740-8745.
162. M. Westwood, J. Aplin, I. Collinge, A. Gill, A. White, J. Gibson. *J Biol Chem*, 276 (2001) 41668-41674.
163. C. Walsh, S. Garneau, G. Gatto. *Angew Chem Int Ed*, 44 (2005) 7342-7372.
164. R. Bunn, J. Fowlkes. *Trends Endo Metab*, 14 (2003) 176-181.
165. M. Davenport, W. Isley, J. Pucilowska, L. Pemberton, B. Lyman, L. Underwood, D. Clemmons. *J Clin Endocrinol Metab*, 75 (1992) 590-595.
166. Y. Li, X. Wang, Qi Li. Protein Thiol Modification and Thiol Proteomics, Integrative Proteomics, Dr. Hon-Chiu Leung (Ed.), InTech, 2012.
167. R. Elgin, W. Busby, D. Clemmons. *Proc Natl Acad Sci USA*, 84 (1987) 3254-3258.
168. W. Busby, D. Klapper, D. Clemmons. *J Biol Chem*, 263 (1988) 14203-14210.
169. A. Sala, S. Capaldi, M. Campagnoli, B. Faggion, S. Labò, M. Perduca, A. Romano, M. Carrizo, M. Valli, L. Visai, L. Minchiotti, M. Galliano, H. Monaco. *J Biol Chem*, 280 (2005) 29812-29819.
170. M. Rechsteiner, S. Rogers. *Trends Biochem Sci*, 21 (1996) 267-271.
171. J. Yu, M. Iwashita, Y. Kudo, Y. Takeda Y. *Growth Horm IGF Res*, 8 (1998) 65-70.
172. O. Ritvos, T. Ranta, J. Jalkanen, A. Suikkari, R. Voutilainen, H. Bohn, E. Rutanen. *Endocrinology*, 122 (1988) 2150-2157.
173. B. Peterkofsky, A. Gosiewska, S. Wilson, Y. Kim. *Arch Biochem Biophys*, 357 (1998) 101-110.
174. J. Gibson, J. Aplin, A. White, M. Westwood. *Mol Hum Reprod*, 7 (2001) 79-87.
175. M Gravett, M. Novy, R. Rosenfeld, A. Reddy, T. Jacob, M. Turner, A. McGormack, J. Lapidus, J. Hitti, D. Eschenbach, C. Roberts, S. Nagalla. *J Am Med Assoc*, 292 (2004) 462-469.
176. P. Campbell, J. Novak, T. Yanosick, J. McMaster. *Endocrinology*, 130 (1992) 1401-1412.
177. M. Claussen, B. Kubler, M. Wendland, K. Niefer, B. Schmidt, J. Zapf, T. Bräulke. *Endocrinology*, 138 (1997) 3797-3803.

178. L. Maile, J. Holly. *Growth Horm IGF Res*, 9 (1999) 85-95.
179. L. Salamonsen, J. Zhang, A. Hampton, L. Lathbury. *Hum Reprod*, 15 (2000) 112–119.
180. J. Aplin. Endometrial extracellular matrix: S. Glasser, J. Aplin, L. Giudice, S. Tabibzadeh, *The Endometrium*. Taylor& Francis, London, 2002.
181. H. Coppock, A. White, J. Aplin, M. Westwood. *Biol Reprod*, 71 (2004) 438-443.
182. S. Lee, B. Han, I. Park, R. Romero, B. Yoon. *J Perinat Med*, 36 (2008) 316-323.
183. J. Gibson, M. Westwood, K. Siddals, T. Shaikh, A. White. Proceedings of the Fourth International Symposium of Insulin-Like Growth Factors, Tokyo, Japan, October 21-24, 1997, p. 135.
184. S. Manes , E. Mira, M. del Mar Barbacid, A. Cipres, P. Fernandez-Resa, J. Buesa, I. Merida, M. Aracil, G. Marquez, A. Martinez. *J Biol Chem*, 272 (1997) 25706-25712.
185. J. Wang, J. Shafqat, K. Hall, M Ståhlberg, I. Wivall-Helleryd, K. Bouzakri, J. Zierath, K. Brismar, H. Jörnvall, M. Lewitt. *Cell Mol Life Sci*, 63 (2006) 2405-2414.
186. D. Aeschlimann, O. Kaupp, M. Paulsson. *J Cell Biol*, 129 (1995) 881-892.
187. K. Mehta, J. Fok, L. Mangala. *Front Biosci*, 11 (2006) 173-185.
188. A. Barrett, P. Starkey. *Biochem J*, 133 (1973) 709-724.
189. P. Dennis, O. Saksela, P. Harpel, D. Rifkin. *J Biol Chem*, 264 (1989) 7210-7216.
190. S. Soker, C. Svahn, G. Neufeld. *J Biol Chem*, 268 (1993) 7685-7691.
191. P. Gettins, B. Crews. *Biochemistry*, 32 (1993) 7916-7921.
192. A. Philip, M. O’Conner-McCourt. *J Biol Chem*, 266 (1991) 22290-22296.
193. J. Bonner, A. Badgett, A. Osornio-Vargas, M. Hoffman, A. Brody. *J Cell Physiol*, 145 (1990) 1-8.
194. R. Hynes, A. Lander. *Cell*, 68 (1992) 303-322.
195. K. Alberti, P. Zimmet. *Diabetic Med*, 15 (1998) 539-553.
196. J. Ekoé, M. Rewers, R. Williams, P. Zimmet. *The epidemiology of diabetes mellitus*. John Wiley & Sons, 2008.
197. J. Frystyk, T. Grøfte, C. Skjærbæk, H. Ørskov. *J Clin Endocrinol Metab*, 82 (1997) 3124-3127.
198. O. Nedić, R. Masnikosa. *Metabolism*, 57 (2008) 658-661.
199. U. Patersson, C. Östgren, L. Brudin, K. Brismar, P. Nilsson. *Diabetes Metab*, 35 (2009) 198-205.

200. H. Mogul, M. Marshall, M. Frey, H. Burke, P. Wynn, S. Wilker, A. Southern, S. Gambert. *J Clin Endocrinol Metab*, 81 (1996) 4492-4495.
201. C. Liew, S. Wise, K. Yeo, K. Lee. *J Clin Endocrinol Metab*, 90 (2005) 1483-1488.
202. M. Sandhu, A. Heald, J. Gibson, J. Cruickshank, D. Dunger, N. Wareham. *Lancet*, 359 (2002) 1740-1745.
203. K. Brismar, V. Grill, S. Efendic, K. Hall. *Metabolism*, 40 (1991) 728-732.
204. C. Qiu, S. Vadachkoria, L. Meryman, I. Frederick, M. Williams. *Am J Obstet Gynecol*, 193 (2005) 1691-1697.
205. M. Lewitt, A. Hilding, C. Östenson, S. Efendic, K. Brismar, K. Hall. *Diabetologia*, 51 (2008) 1135-1145.
206. M. Lehtihet, S. Efendic, K. Brismar. *Clin Sci*, 115 (2008) 117-125.
207. N. Wareham, C. Byrne, R. Williams, N. Day, C. Hales. *Diabetes Care*, 22 (1999) 262-270.
208. V. Mohamed-Ali, J. Pinkey, A. Panahloo, S. Cwyfan-Hughes, J. Holly, J. Yudkin. *Clin Endocrinol*, 50 (1999) 221-228.
209. T. Kamoda, H. Saitoh, M. Inudoh, K. Miyazaki, A. Matsui. *Diabetes Obes Metab*, 8 (2006) 192-196.
210. J. Quin, B. Fisher, A. MacCuish, G. Beastall, M. Small, J. Holly, A. Cotterill. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 41 (1994) 225-229.
211. S. Yeoh, R. Baxter. *Acta Endocrinol (Copenh)*, 119 (1988) 465-473.
212. A. Cotterill, C. Cowell, R. Baxter, D. McNeil, M. Silink. *J Clin Endocrinol Metab*, 67 (1988) 882-887.
213. U. Berg, T Gustafsson, C. Sundberg, C. Carlsson-Skwirut, K. Hall, P. Jakeman, P. Bang. *Growth Horm IGF Res*, 16 (2006) 217-223.
214. R. Dall, K. Lange, M. Kjaer, J. Jorgensen, J. Christiansen, H. Orskov, A. Flyvbjerg. *J Clin Endocrinol Metab*, 86 (2001) 669-674.
215. J. Kanaley, J. Frystyk, N. Moller, R. Dall, J. Chen, S. Nielsen, J. Christiansen, J. Jorgensen, A. Flyvbjerg. *Growth Horm IGF Res*, 15 (2005) 283-290.
216. J. Wallace, R. Cuneo, R. Baxter, H. Orskov, N. Keay, C. Pentecost, R. Dall, T. Rosen, J. Jorgensen, A. Cittadini, S. Longobardi, L. Sacca, J. Christiansen, B. Bengtsson, P. Sonksen. *J Clin Endocrinol Metab*, 84 (1999) 3591-3601.

217. L. Rosendal, H. Langberg, H. Flyvbjerg, J. Frystyk, H. Orskov, M. Kjaer. *J Appl Physiol*, 93 (2002) 1669-1675.
218. G. Jahreis, E. Kauf, G. Frohner, H. Schmidt. *Growth Regul*, 1 (1991) 95–99.
219. J. Manetta, J. Brun, C. Fedou, L. Maimoun, C. Prefeut, J. Mercier. *Metabolism*, 52 (2003) 821-826.
220. E. Carmeli, M. Moas, S. Lennon, S. Powers S. *Exp Physiol*, 90(2005) 613-619.
221. A. Ramin, M. Abbas, G. Ali, R. Asghar, L. Amir, S. Farshid, B. Hussein. *World J Sport Sci*, 4 (2011) 185-191.
222. C. Petibois, G. Cazorla, J. Poortmans, G. Déléris. *Sports Med*, 33 (2003) 83-94.
223. A. D’Ercole. *Growth Genet*, 8 (1992) 1-5.
224. T. Chard. *Growth Regul*, 4 (1994) 91-100.
225. D. Klauwer, W. Blum, S. Hanitsch, W. Rascher, P. D. K. Lee, W. Kiess. *Acta Paediatr*, 86 (1997) 826–833.
226. A. Efstratiadis. *Int J Dev Biol*, 42 (1998) 955–976.
227. M. Walenkam, H. van der Kamp, A. Pereira, S. Kant, H. van Duyvenvoorde, M. Kruithof, M. Breuning, J. Romijn, M. Karperien, J. Wit. *J Clin Endocrinol Metab*, 91 (2006) 3062–3070.
228. Z. Ergaz, M. Avgil, A. Ornoy. *Reprod Toxicol*, 3 (2005) 301–322.
229. A. D'Ercole, G. Applewhite, L. Underwood. *Dev Biol*, 75 (1980) 315–328.
230. D. Le Roith, C. Bondy, S. Yakar, J. Liu, A. Butler. *Endocr Rev*, 22 (2001) 53–74.
231. E. Pannier, J. Irwin, L. Giudice. *Am J Obstet Gynecol*, 171 (1994) 746-752.
232. D. Hill, D. Clemmons, C. Riley, N. Basset, J. Challis. *Placenta*, 14 (1993) 1-12.
233. R. Crawford, F. Hills, A. Farkas, T. Chard. *Br J Obstet Gynaecol*, 102 (1995) 538-540.
234. F. Hills, R. Crawford, S. Harding, A. Farkas, T Chard. *Am J Obstet Gynecol*, 171 (1994) 1292-1295.
235. E. Korgun, A. Ozmen, G. Unek, I. Mendilcioglu. Glucocorticoids - New Recognition of Our Familiar Friend. Edited by X. Qian. InTech, 2012.
236. A. Fowden, J. Li, A. Forehead. *Proc Nutr Soc*, 57 (1998) 113-122.
237. A. Malassine, L. Cronier. *Endocrine*, 19 (2002) 3-11.
238. M. Audette, S. Greenwood, C. Sibley, C. Jones, J. Challis, S. Matthews, R. Jones. *Placenta*, 31 (2010) 97-105.

239. A. Fowden, A. Forehead. *Exp Physiol*, 94 (2009) 607-625.
240. A. Fowden, A. Forehead, P. Coan, G. Burton. *J Neuroendocrinol*, 20 (2008) 439-450.
241. M. Westwood, J. Gibson, A. White. *Endocrinology*, 138 (1997) 1130-1136.
242. M. Nissum, M. Abu Shehab, U. Sukop, J. Khosravi, R. Wildgruber, C. Eckerskorn, V. Han, M. Gupta. *Mol Cell Proteomics*, 8 (2009) 1424-1435.
243. T. Hakala-Ala-Pietila, R. Koistinen, R. Salonen, M. Seppala. *Am J Obstet Gynecol*, 169 (1993) 35-39.
244. M. Abu Shehab, J. Khosravi, V. Han, B. Shilton, M. Gupta. *J Proteome Res*, 9 (2010) 1873-1881.
245. H. Gabius, S. Gabius. *Lectins and glycobiology*. Berlin-Heidelberg, Springer Verlag, 1993
246. P. Ey, S. Prowse, C. Jenkin. *Immunochemistry*, 15 (1978) 429-436.
247. H. Wang, L. Perry, J. Kanisius, R. Iles, J. Holly, T. Chard. *J Endocrinol*, 128 (1991) 161-168.
248. M. Machida, H. Kosako, K. Shirakabe, M. Kobayashi, M. Ushiyama, J. Inagawa, J. Hirano, T. Nakano, Y. Bando, E. Nishida, S. Hattori. *FEBS J*, 274 (2007) 1576-1587.
249. O. Nedić, R. Masnikosa. *J Chromatogr B*, 877 (2009) 743-746.
250. Co-immunoprecipitation (Co-IP) Kit INSTRUCTIONS, Pierce. <http://www.piercenet.com/instructions/2162181.pdf>
251. I. Baričević, D. Jones, J. A. Nikolić, O. Nedić. *Horm Metab Res*, 38 (2006) 22-27.
252. P. Snoek-van Beurden, J. Von den Hoff. *Biotechniques*, 38 (2005) 73-83.
253. ProteinChip SELDI System Applications Guide, Bio-Rad. <http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/10008221,%20App%20Guide%201.pdf>
254. R. Masnikosa, I. Baričević, D. Lagundžin, O. Nedić. *Turk J Vet Anim Sci*, 35 (2011) 443-452.
255. R. Masnikosa, B. Živković, O. Nedić. *J Serb Chem Soc*, 74 (2009) 707-716.
256. D. Lagundžin, R. Masnikosa, G. Miljuš, D. Robajac, O. Nedić. *J Serb Chem Soc*, 75 (2010) 1481-1489.
257. R. Brown, C. Brewer, S. Koenig. *Biochemistry-US*, 16(1977) 3883-3896.
258. L. Bouwman, B. Rop, A. Roos. *Hum Immunol*, 67 (2006) 247-256.

259. A. Heald, K. Siddals, W. Fraser, W. Taylor, K. Kaushal, J. Morris, R. Young, A. White, J. Gibson. *Diabetes*, 51 (2002) 2629-2636.
260. S. Rajpathak, A. McGinn, H. Strickler, T. Rohan, M. Pollak, A. Cappola, L. Kuller, X. Xue, A. Newman, E. Srtotmeyer, B. Psaty, R. Kaplan. *Growth Horm IGF Res*, 18 (2008) 166-173.
261. O. Nedić, R. Masnikosa, D. Lagundžin. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 119 (2011) 306-313.
262. S. Gregory, B. Spiering, J. Alemany, A. Tuckow, K. Rarick, J. Staab, D. Hatfield, W. Kraemer, C. Maresh, B. Nindl. *Med Sci Sports Exerc*, 45 (2013) 420-428.
263. A. Arikawa, M. Kurzer, W. Thomas, K. Schmitz. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 19 (2010) 2987-2990.
264. J. Khosravi, R. Krishna, U. Bodani, A. Diamandi, N. Khaja, B. Kalra, A. Kumar. *Clin Biochem*, 40 (2007) 86-93.
265. C. Petersen. *Dan Med Bull*, 40 (1993) 409-446.
266. D. Lagundžin, V. Vučić, M. Glibetić, O. Nedić. *Int J Sport Nutr Exerc Metab*, 23 (2013) 449-457.
267. J. Pettersson, U. Hindorf, P. Persson, T. Bengtsson, U. Malmqvist, V. Werkström, M. Ekelund. *Br J Clin Pharmacol*, 65 (2008) 253-259.
268. C. D'Ambrosio, A. Salzano, S. Arena, G. Renzone, A. Scaloni. *J Chromatogr B*, 849 (2007) 163-180.
269. S. Powers, M. Jackson. *Physiol Rev*, 88 (2008) 1243-1276.
270. S. Powers, A. Smuder, A. Kavazis, M. Hudson. *Int J Sport Nutr Exerc Metab*, 20 (2010) 2-14.
271. M. Basso, J. Berlin, L. Xia, S. Sleiman, B. Ko, R. Haskew-Layton, E. Kim, M. Antonyak, R. Cerione, S. Iismaa, D. Willis, S. Cho, R. Ratan. *J Neurosci*, 32 (2012) 6561-6569.

Изјава о ауторству

Потписани-а Драгана Б. Лагунцин

број уписа 23/2008

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Промена структуре и реактивности везујућег протеина 1 за факторе раста сличне

инсулину као последица метаболизма глукозе

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

Потпис докторанда

У Београду, 14.07.2014.



Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Драгана Лагунцин

Број уписа 23/2008

Студијски програм Доктор биохемијских наука

Наслов рада Промена структуре и реактивности везујућег протеина 1 за факторе раста сличне инсулину као последица метаболизма глукозе

Ментор др Љуба Мандић и др Олгица Недић

Потписани Драгана Лагунцин

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

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

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

Потпис докторанда

У Београду, 14.07.2014.



Изјава о коришћењу

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

Промена структуре и реактивности везујућег протеина 1 за факторе раста сличне

инсулину као последица метаболизма глукозе

која је моје ауторско дело.

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

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

①. Ауторство

2. Ауторство - некомерцијално

3. Ауторство – некомерцијално – без прераде

4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима

5. Ауторство – без прераде

6. Ауторство – делити под истим условима

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

Потпис докторанда

У Београду, 14.07.2014.



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

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

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

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

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

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

BIOGRAFIJA

Dragana Lagundžin je rođena 2. januara 1984. godine u Kikindi. Osnovnu školu „Žarko Zrenjanin” i Gimnaziju „Dušan Vasiljev” - prirodno-matematički smer, završila je u Kikindi sa odličnim uspehom. Na Prirodno-matematički fakultet, smer diplomirani hemičar-biohemija, Univerziteta u Novom Sadu, upisala se 2003. godine. gde je planom i programom predviđene ispite položila sa prosečnom ocenom 9,35 i odbranila diplomski rad 2008. godine sa ocenom 10. Iste godine upisala je doktorske studije na Hemijskom fakultetu Univerziteta u Beogradu, smer Biohemija.

U Institutu za primenu nuklearne energije (INEP) radi od 2008. godine, kao istraživač pripravnik na projektu pod nazivom: „Insulinu slični faktori rasta (IGF), njihovi vezujući proteini (IGFBP) i receptori (IGF-R) kod ljudi u različitim fiziološkim i patofiziološkim stanjima” (MNTR RS, broj projekta 143019). Od 2011. godine je angažovana na projektu „Strukturne karakteristike vezujućih proteina i receptora za insulinu slične faktore rasta (IGF), njihove interakcije sa drugim fiziološkim molekulima i promene kod poremećaja metabolizma” (MPN RS, broj projekta 173042). U zvanje istraživač saradnik je izabrana 2010. godine. Učesnik je u COST projektu „Chemistry of non-enzymatic protein modifications - modulation of protein structure and function” (broj projekta CM1001, 2011-2014).

Pohađala je „Letnju školu masene spektrometrije” u Nišu 2009. godine i praktični kurs „Proteome analysis by Mass Spectrometry: From samples to data analysis“, u Hajdelbergu, Nemačka, jula 2011.

Od 2008. godine član je Srpskog hemijskog društva, od kojeg je dobila specijalnu nagradu kao uspešni diplomirani student. Od 2010. godine je član evropskog društva „Society for Endocrinology”, a od 2011. godine Biohemijskog društva Srbije.

Dragana Lagundžin je koautor dvanaest radova, osam radova štampanih u časopisima međunarodnog značaja, tri saopštenja izložena na međunarodnim sastancima i jedan na domaćem skupu.