

PA 20983

Uj 3/118/10/15
1000 2

**UNIVERZITET U BEOGRADU
BIOLOŠKI FAKULTET**

**Funkcionalna analiza proteina
hAnkrd2: regulacija ekspresije i
aktivnosti**

DOKTORSKA TEZA

Ljiljana Rakićević

Beograd, 2010

УНИВЕРЗИТЕТСКА БИБЛИОТЕКА
СВ. САСИЈА НАЈДОВИЋ БЕОГРАД
И. Бр. 163761



Eksperimentalni deo doktorata urađen je u Laboratoriji za molekularnu biologiju, Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Univerziteta u Beogradu.

Komisija za pregled i ocenu teze:

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

dr Svetlana Radović, vanredni profesor, Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu; mentor

dr Gordana Matić, redovni profesor, Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu; član komisije

Ovaj doktorat je urađen u Laboratoriji za molekularnu biologiju, Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo Univerziteta u Beogradu. Izrada ove teze je bila podržana i od strane Internacionalnog centra za genetički inženjering i biotehnologiju. (International Centre of Genetic Engineering and Biotechnology - ICGEB, Trst, Italija), kroz naučni projekat „Uloga humanog proteina Ankrd2/Arpp u poprečno prugastim mišićnim ćelijama”.

Zahvaljujem se svima koji su mi na neposredan, ili bilo koji drugi način, pomogli u ostvarivanju zadataka koje je zahtevala izrada ove teze, a pre svega:

mentoru, dr Snežani Kojić zbog znanja koje mi je prenela i puta koji je sa mnom prošla od uvođenja problematike vezane za proteine familije MARP u našu naučnu praksu, do konca ovog doktorata;

profesorki dr Ani Savić, zbog šansi koje mi je pružila i poverenja koje mi je ukazala u naučnom istraživanju, a posebno zbog retke sposobnosti da dignitet i autoritet izrazi u vidu ljudske topline;

rukovodiocu Laboratorije za molekularnu biologiju, dr Dragici Radojković, zbog podrške i ukazanim smernicama za rad u nauci, koje ću uvek imati na umu;

članovima komisije prof. dr Svetlani Radović i prof. dr Gordani Matić, zbog njihove podrške koja me prati još od studentskih i ranih istraživačkih dana;

profesoru dr Vladimiru Glišinu, zbog optimizma i velikih istina koje je uspevao da mi prenese u razgovorima „u prolazu”;

Posebnu zahvalnost dugujem kolegama iz Laboratorije za molekularnu biologiju: Aleksandri Nestorović, Jeleni Kušić Tišma, Mariji Stanković, Valentini Đorđević, Aleksandri Divac, Aleksandri Nikolić, Mili Ljujić. Ivi Pruner, Branku Tomiću, Đorđu Francuskom, ne samo zbog pomoći u eksperimentalnom radu, već i zbog svake druge vrste pomoći i podrške - svake blage reči, tople kafe, korisnog saveta koji su stizali do mene u trenucima najveće obuzetosti poslom.

Želim da se zahvalim celom kolektivu i rukovodstvu Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo na podršci koju su ukazivali naučnoj problematici kojom sam se bavila, kao i meni lično.

Zahvaljujem se Internacionalnom centru za genetički inženjering i biotehnologiju u Trstu, zbog dugogodišnje kontinuirane podrške našoj naučnoj zajednici.

*I iznad svega:
tati, mami, Radivoju,*

Iki, Makiju, Kaći, Marini, Mileni, Milošu,

Nataši, Tanji, Ivani, Nataši,

jer je preko njih sva ljubav i snaga ovoga sveta usmerena ka meni.

ABSTRACT

The object of this study is human ankyrin repeat domain protein 2 (hAnkrd2/Arpp), a member of the muscle ankyrin repeat protein (MARF) family. MARFs are proposed to be involved in response pathways of striated muscle cells to mechanical stimuli, and are characterized by ankyrin repeats known to mediate protein-protein interactions.

The expression of *Ankrd2* gene in myoblasts is regulated by MyoD, and in myocytes, by NFκB, upon longitudinal stretch stimuli. In addition to these two transcription factors, *in silico* analysis of *Ankrd2* gene promoter, shows potential binding sites for p53 and Nkx2.5, but there are still no experimental evidences to support bioinformatic prediction. It has been reported that hAnkrd2 can interact with nuclear proteins PML (premyelocytic leukemia protein), p53 and YB1, as well as with sarcomeric proteins telethonin and titin. It is assumed that ankyrin repeat motifs are involved in physical interaction of Ankrd2 with protein partners, as demonstrated for titin, but so far, there are no experimental evidence regarding mapping of Ankrd2 domains involved in direct protein-protein interactions, with other binding partners.

The aim of this study was to analyze *Ankrd2* promoter activity under the influence of transcriptional factors selected by *in silico* analysis, and to map the region of Ankrd2 protein involved in protein-protein interactions.

Dual luciferase promoter reporter assays was used for investigation of regulatory potential of recombinant transcriptional factors MyoD, p53, Nkx2.5 and NFκB in myoblasts. The effect of MARF family member CARP as a potential transcriptional cofactor on *Ankrd2* promoter activity was also studied. In order to map the regions of Ankrd2 that interact with telethonin, p53, YB1 and PML, GST pull down assays were performed, using chimeric proteins comprised of GST linked to a protein of interest (Ankrd2 and its deletants) and target proteins (telethonin, p53, YB1 and PML) expressed in eukaryotic cell system.

The study has given evidence for regulatory potential of transcriptional factors MyoD, p53 and Nkx2.5, but not of NFκB. The results have also shown the ability of CARP to modulate MyoD and p53 dependent Ankrd2 promoter activity. It is evident that Ankrd2 interacts with proteins differing in function and localization within the cell through different motifs of Ankrd2 protein.

Our findings support hypothesis of Ankrd2 as a protein with a signal function in the striated muscle cell, which is achieved through intensive interaction with numerous protein partners. This study also suggests the role of Ankrd2 in striated muscle development and remodeling. These processes are controlled by a key regulators of tissue specific gene expression (MyoD in skeletal muscles and Nkx2.5 in heart) as well as by p53 involved in protective mechanisms in the cell.

APSTRAKT

Predmet ovog rada je humani protein Ankyrin repeat domain protein 2 (hAnkrd2/Arpp), koji pripada familiji proteina MARP (Muscle Ankyrin Repeat Proteins). Pretpostavlja se da proteini familije MARP imaju ulogu u molekularnom odgovoru poprečno–prugastih mišićnih ćelija na mehaničke stimuluse. Upečatljiva strukturna karakteristika ovih proteina je prisustvo ankirinskih ponovaka, motiva predodređenih za ostvarivanje proteinsko-proteinskih interakcija.

Poznato je, da je u mioblastima ekspresija gena *Ankrd2*, regulisana faktorom MyoD, ključnim faktorom diferencijacije skeletnih mišića, a u miocitima dijafragame, nakon longitudinalnog istezanja, faktorom NFκB. *In silico* analiza je pokazala da u promotoru gena *Ankrd2*, osim mesta za MyoD i NFκB, postoje potencijalna mesta za vezivanje transkripcionih faktora p53 i Nkx2.5, ali još uvek nema eksperimentalne potvrde bioinformatičkih podataka. Dosadašnje studije su pokazale da hAnkrd2 ostvaruje interakcije sa raznorodnim proteinima kao što su transkripcioni faktori YB1, p53 i PML (promyelocytic leukemia protein) i sarkomerni proteini teletonin i titin. Pretpostavlja se da interakcije sa proteinskim partnerima Ankrd2 ostvaruje posredstvom ankirinskih motiva, ali je ta pretpostavka potvrđena jedino u slučaju vezivanja hAnkrd2 i titina.

Cilj ove studije je bio ispitivanje uticaja transkripcionih faktora predviđenih bioinformatičkim analizama, na aktivnost promotora gena *Ankrd2* u nediferenciranim ćelijama skeletnih mišića, kao i mapiranje regiona posredstvom kojih Ankrd2 ostvaruje interakciju sa svojim proteinskim partnerima (YB1, p53, PML i teletonin).

Metodom dualnih luciferaznih promotorskih eseja ispitivan je regulatorni potencijal transkripcionih faktora MyoD, p53, Nkx2.5 i NFκB na aktivnost promotora gena *Ankrd2* u nediferenciranim ćelijama skeletnih mišića. Takođe, ispitivan je i potencijal proteina CARP da, kao kofaktor, modulira efekat transkripcionih faktora koji imaju uticaj na promotor *Ankrd2*. U cilju mapiranja regiona Ankrd2 posredstvom kojih se ostvaruju interakcije sa drugim proteinima, korišćenjem „GST pull down” eseja, analizirana je interakcija serije deletanata proteina Ankrd2 sa transkripcionim faktorima YB1, p53, PML i sarkomernim proteinom teletoninom.

Rezultati ove studije su ukazali na regulatorni potencijal transkripcionih faktora p53 i Nkx2.5, ali ne i NFκB u pogledu uticaja na aktivnost promotora *Ankrd2* u nediferenciranim mišićnim ćelijama. Takođe, potvrđen je uticaj faktora MyoD na aktivnost promotora *Ankrd2*. Osim toga, pokazano je da protein CARP može da modulira uticaj transkripcionih faktora MyoD i p53 na aktivnost promotora *Ankrd2*. Mapiranje regiona proteina Ankrd2 posredstvom kojih protein Ankrd2 ostvaruje interakciju sa svojim proteinskim partnerima, pokazalo je da se vezivanje za sarkomerne proteine i transkripcione faktore realizuje posredstvom različitih domena.

Dobijeni podaci idu u prilog pretpostavci da protein Ankrd2 ima ulogu signalnog molekula u mišićnoj ćeliji, koju ostvaruje kroz intenzivne interakcije sa raznorodnim proteinima. Osim toga, ova studija je ukazala da Ankrd2 može biti uključen u mehanizme razvoja i remodelovanja mišića koji su kontrolisani ključnim faktorima regulacije gena u ćelijama skeletnih mišića (MyoD) i srca (Nkx2.5), kao i u mehanizme zaštite ćelije od oštećenja (posredstvom p53).

SADRŽAJ

1. Uvod	1
1.1. Opšte fiziološke karakteristike mišića	1
1.2. Sarkomera	2
1.3. Proteini mišićne ćelije sa ankirinskim ponovcima (Muscle Ankyrin Repeat Proteins - MARPs)	5
1.4. Humani protein Ankrd2/Arpp/MARP2	7
1.4.1. Strukturne karakteristike proteina Ankrd2	8
1.4.2. Ekspresija Ankrd2 na nivou iRNK i proteina	8
1.4.3. Funkcija proteina Ankrd2	9
1.4.4. Protein Ankrd2 u patološkim stanjima	11
1.4.5. Regulacija ekspresije gena <i>Ankrd2</i>	12
1.4.6. Potencijalni faktori regulacije ekspresije gena <i>Ankrd2</i>	12
1.4.6.1. Transkripcioni faktor Nkx2.5	13
1.4.6.2. Transkripcioni faktor p53	13
2. Cilj	16
3. Materijal i metode	17
3.1. Materijal	17
3.1.1. Bakterijski sojevi	17
3.1.2. Ćelije u kulturi	17
3.1.3. Nekomercijalni ćelijski ekstrakti	17
3.1.3. Ekspresioni vektori	18
3.1.4. Nekomercijalni konstrukti	18
3.1.5. Antitela	19
3.1.6. Graničnici	19
3.2. Metode	20
3.2.1. Kultivacija bakterija	20
3.2.2. Izolovanje plazmidne DNK na velikoj skali	20
3.2.3. Izolovanje plazmidne DNK na maloj skali	20
3.2.4. Merenje koncentracije DNK	21

3.2.5. Analiza DNK na agaroznom gelu	21
3.2.6. Reakcija lančanog umnožavanja polimerazom (polymerase chain reaction -PCR)	22
3.2.7. RT –PCR (reverse transcription polymerase chain reaction)	22
3.2.8. Sekvenciranje DNK	23
3.2.9. Digestija DNK restrikcijom enzimima	24
3.2.10. Ekstrakcija fragmenata DNK iz agaroznog gela	24
3.2.11. Ligacija fragmenata DNK	24
3.2.12. Pripremanje kompetentnih bakterijskih ćelija za transformaciju toplotnim šokom	25
3.2.13. Transformacija kompetentnih bakterijskih ćelija toplotnim šokom	25
3.2.14. Analiza transformanata	26
3.2.15. Čuvanje transformanata	26
3.2.16. Kloniranje	27
3.2.17. Gajenje sisarskih ćelija u kulturi	28
3.2.18. Tranzientna transfekcija adherentnih ćelija	28
3.2.19. Pripremanje proteinskih ekstrakata ćelija u kulturi	29
3.2.20. Pripremanje citoplazmatičnih i jedarnih ekstrakata	29
3.2.21. Indukcija ekspresije rekombinantnih proteina fuzionisanih sa GST u <i>E.coli</i>	30
3.2.22. Ispitivanje rastvorljivosti rekombinantnih proteina fuzionisanih sa GST, ekspimiranih u <i>E.coli</i>	30
3.2.23. Prečišćavanje rekombinantnih proteina fuzionisanih za GST u nedenedurirajućim uslovima	31
3.2.24. Merenje koncentracije proteina	32
3.2.25. Elektroforeza proteina u denaturirajućem gelu	32
3.2.26. Bojenje poliakrilamidnih gelova (vizuelizacija proteina)	32
3.2.27. Prenos proteina na membranu (polusubi elektro-transfer)	33
3.2.28. „Western blot“	33
3.2.29. Detekcija proteina hemiluminiscencijom	33
3.2.30. „GST pull down“	34
3.2.31. Koimunoprecipitacija	35
3.2.32. Dualni luciferazni promotorski eseji	36
3.2.33. Statistička analiza	37

4. Rezultati	38
4.1. Ispitivanje uticaja transkripcionih faktora MyoD p53, Nkx2.5 i NFkB na aktivnost promotora gena <i>Ankrd2</i>	38
4.1.1. Ispitivanje uticaja transkripcionog faktora MyoD na aktivnost promotora gena <i>Ankrd2</i> u ćelijama C2C12	40
4.1.2. Ispitivanje uticaja transkripcionog faktora Nkx2.5 na aktivnost promotora gena <i>Ankrd2</i> u ćelijama C2C12	41
4.1.3. Ispitivanje uticaja transkripcionog faktora p53 na aktivnost promotora gena <i>Ankrd2</i> u ćelijama C2C12	42
4.1.4. Ispitivanje uticaja endogenog transkripcionog faktora NFkB na aktivnost promotora gena <i>Ankrd2</i> u ćelijama C2C12	43
4.1.5. Ispitivanje združenog efekta transkripcionih faktora Nkx2.5 i p53 na promotor gena <i>Ankrd2</i> u ćelijama C2C12	46
4.1.6. Ispitivanje interakcije proteina Nkx2.5 i p53	48
4.1.6.1. Ispitivanje interakcije proteina Nkx2.5 i p53 u in vitro uslovima metodom GST pull down	48
4.1.6.2. Ispitivanje Interakcije proteina Nkx2.5 i p53 in vivo uslovima metodom koimunoprecipitacije	49
4.2. Ispitivanje uticaja proteina CARP na aktivnost promotora gena <i>Ankrd2</i>	51
4.2.1. Ispitivanje uticaja proteina CARP na aktivnost promotora gena <i>Ankrd2</i> u prisustvu transkripcionog faktora MyoD	51
4.2.2. Ispitivanje uticaja proteina CARP na aktivnost promotora gena <i>Ankrd2</i> u prisustvu transkripcionog faktora Nkx2.5	53
4.2.3. Ispitivanje uticaja proteina CARP na aktivnost promotora gena <i>Ankrd2</i> u prisustvu transkripcionog faktora p53	54
4.3. Mapiranje regiona proteina <i>Ankrd2</i> neophodnih za interakciju sa transkripcionim faktorima p53, PML i YB-1 i sarkomernim proteinom teletoninom	55
5. Diskusija	61
5.1. Uticaj transkripcionih faktora MyoD, Nkx2.5, p53 i NF-kB na aktivnost promotora gena <i>Ankrd2</i>	61

5.2. Uticaj proteina CARP na aktivnost promotora gena <i>Ankrd2</i> u prisustvu faktora MyoD, p53 i Nkx2.5	68
5.3. Interakcija Ankrd2 sa sarkomernim proteinom teletoninom i transkripcionim faktorima (p53, YB1 i PML.) ostvaruje se učešćem različitih motiva	70
6. Zaključci	73
7. Literatura	75

1. UVOD

1.1. Opšte fiziološke karakteristike mišića

Mišići su kontraktilni organi predodređeni da proizvode snagu i izazivaju pokretanje kako pojedinačnih organa, tako i čitavog organizma. U odnosu na citološke karakteristike mišićnih ćelija (miocita), inervaciju i način kontrakcije, uspostavljena je podela mišićnog tkiva na skeletno, glatko i srčano. Za skeletne i srčane mišićne ćelije karakteristična je poprečno prugasta građa koja potiče od organizacije kontraktilnih elemenata u vidu *sarkomera*. U okviru skeletnih mišića, pojedinačna mišićna vlakna pokazuju dva osnovna fenotipa. Spora mišićna vlakna odlikuju se većom izdržljivošću, većim brojem mitohondrija i većim zahtevom aerobnih izvora energije. Brza mišićna vlakna predodređena su za efekte snage i koriste anaerobne izvore energije (McKoy *et al.*, 1998).

Diferencirana poprečno prugasta mišićna ćelija funkcioniše pod uticajem različitih stimulusa kao što su: nervni impulsi, mehanički nadražaji, metabolički stres, povrede, denervacija, dejstvo hormona, itd. Sposobnost mišića da odgovore na različite stimuluse je bazirana na dve osnovne fiziološke karakteristike: nadražljivost (sposobnost da ćelija brzo odgovori na stimulus) i kontraktilnost (sposobnost da se hemijska energija pretvori u mehanički rad). Osim toga, upečatljiva karakteristika mišića je mogućnost adaptabilnosti i remodelovanja, u cilju pružanja adekvatnog odgovora na fiziološke zadatke. Tako na primer, tokom treninga snage, spora mišićna vlakna menjaju sastav kontraktilnih proteina i metaboličkih enzima u smeru „brzog fenotipa” (Smerdu *et al.*, 2001). Jedan od adaptivnih odgovora mišića na ponovljene stimuluse je i hipertrofija, a zasnovana je na aktiviranju mehanizma koji omogućava redno i/ili serijsko dodavanje sarkomera (*hipertrofični odgovor*). Nizu morfoloških i fizioloških promena koje karakterišu remodelovanje mišića, prethode promene na molekularnom nivou, gde je najupečatljivija promena na nivou iRNK, a pre svega onih koje kodiraju proteine kontraktilne mašinerije (Flück i Hoppeler, 2003). Za adaptabilnost poprečno prugaste mišićne ćelije je od presudnog značaja postojanje mehanizama koji omogućavaju da se detektuju promene koje nastaju u ćeliji prilikom

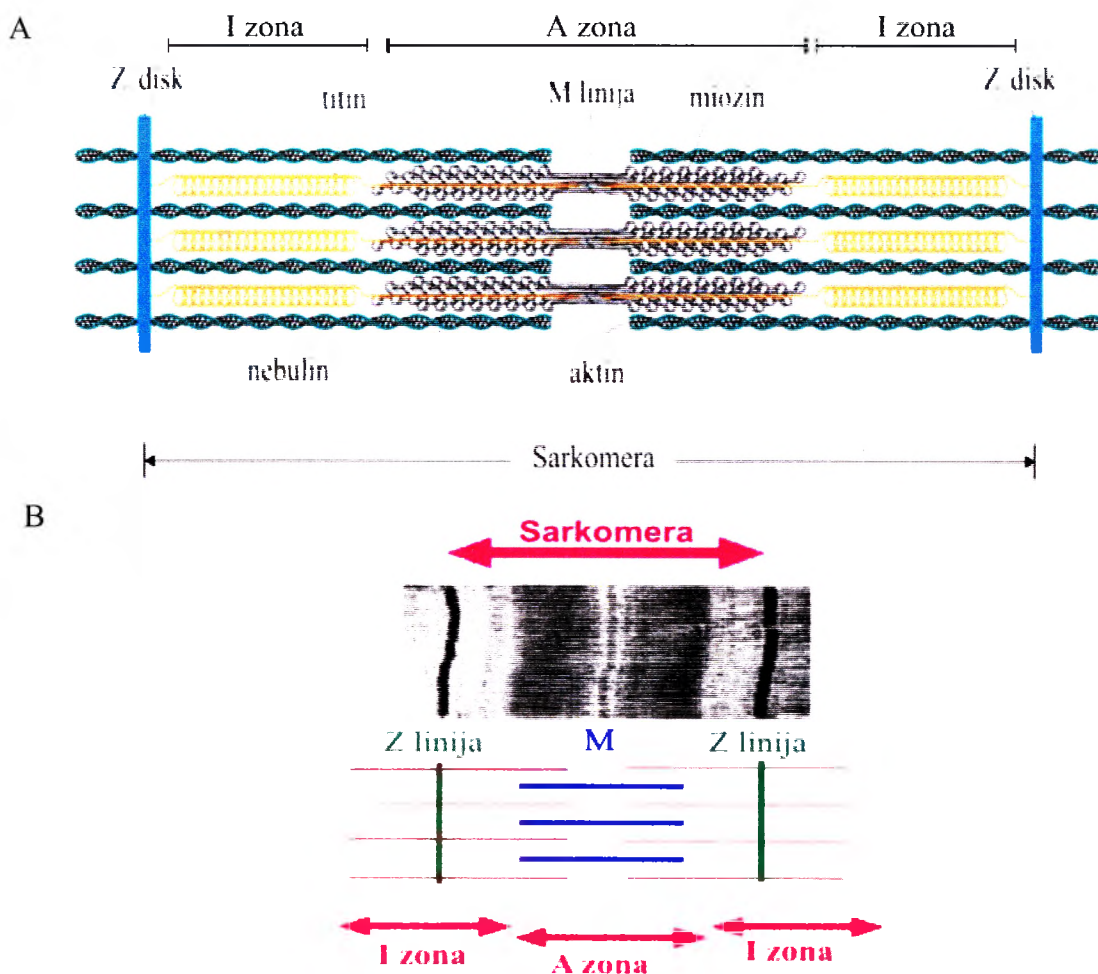
odgovora na adekvatne draži, kao i da se informacije o nastalim promenama prenesu u jedro, gde će se modulirati ekspresija odgovarajućih gena. U tom smislu, važna je uloga multiproteinskih kompleksa koji u sarkomeri funkcionišu kao *biomehanički senzori*, detektujući lokalne promene nastale u toku istezanja ili kontrahovanja mišića.

Današnja istraživanja u oblasti molekularne biologije mišićne ćelije dobrim delom su usmerena upravo na komponente biomehaničkih senzora i faktore koji omogućavaju prenos signala iz citoplazme u jedro, jer je njihovo poznavanje bitno kako za jasnije razumevanje funkcionisanja mišića, tako i za razumevanje patoloških procesa i unapređenje novih dijagnostičkih pristupa kod oboljenja mišićnog sistema (Karpati, 2001).

1.2. Sarkomera

Sarkomera je osnovna kontraktilna jedinica poprečno prugaste mišićne ćelije (Slika 1). Tradicionalni opis funkcije sarkomere podrazumeva da se kontrakcije odigravaju interakcijom dva filamentozna sistema. Prvi filamentozni sistem sadrži miozin i protein C vezan za miozin. Drugi sadrži aktin za koga su vezani nebulin, troponin i tropomiozin. Trećem filamentoznom sistemu sarkomere, koga čini najveći protein u prirodi - titin/konektin - pridavan je isključivo strukturni značaj, odnosno uloga u održavanju elastičnosti i pasivnom otporu sarkomere.

Istraživanja u toku poslednje decenije su pokazala da sarkomera nije samo kontraktilna jedinica, nego i sedište biomehaničkih senzora i signalnih molekula koji detektuju mehaničke promene u sarkomeri, a zatim informacije prosleđuju u druge odeljke ćelije. Tako se pokazalo da Z-disk, čiju strukturnu osnovu čini α -aktinin, nije samo čvorište gde se ukotvljuju elementi dve susedne sarkomere, nego i mesto delovanja nekoliko grupa proteina koji su u dinamičkoj interakciji sa ostalim elementima sarkomere, ali i sa drugim odeljcima ćelije. U takve proteine Z-diska spadaju teletonin, miotilin i njemu homologni paladin i miopaladin, kao i proteini familija FATZ (Filamin, Actinin and Telethonin binding proteins of the Z-disk), ZASP (Z-band Alternatively Spliced PDZ motif Proteins) i MLP (Muscle LIM Proteins).

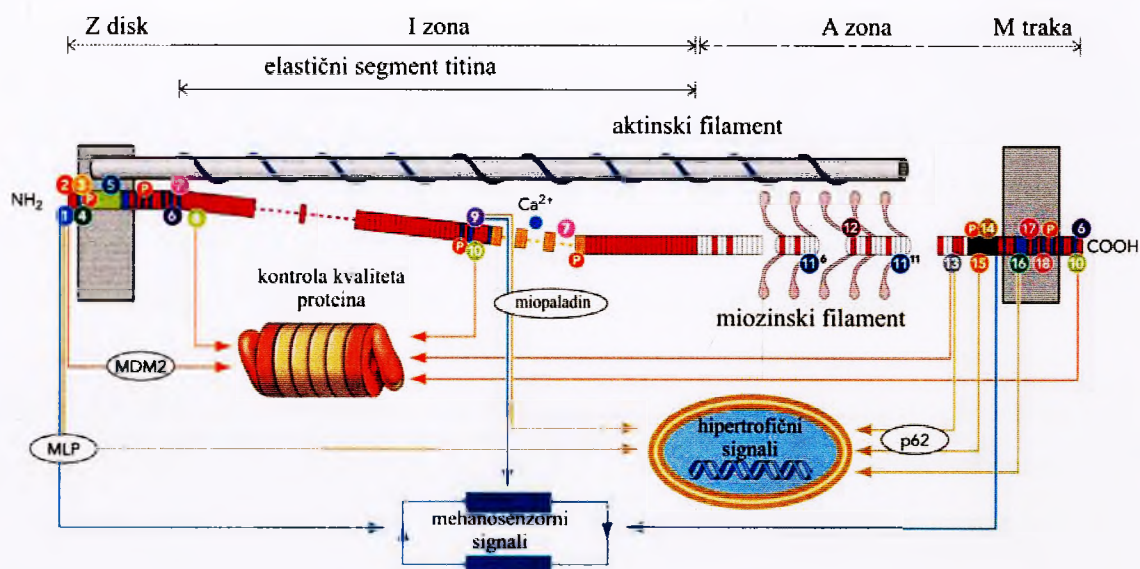


Slika 1. Građa sarkomere prikazana šematski prema Granzier i Labeit, 2004 (A) i elektronskom mikrografijom (B). Sarkomera se prostire između dve Z linije u kojoj se ukotvljuju filamenti susednih sarkomera. Anizotropna zona (A) je oblast interakcije aktina i miozina, dok je u izotropnoj zoni (I) miozin odsutan. Molekuli titina udruženi sa nebulinom prostiru se od Z do središnje M linije (M-Middle of the sarcomere, eng).

Pokazalo se da su pomenuti proteini Z-diska značajni, kako u strukturnoj organizaciji sarkomere, tako i u prenosu signala iz sarkomere u jedro, nakon konformacionih promena kontraktilnih vlakana (Faulkner *et al.*, 2000; Frank *et al.*, 2006; von Nandelstadh *et al.*, 2009). Takođe, proteini Z diska su u vezi sa *kostamerom*, složenom multiproteinskom strukturom, koja sarkomeru povezuje sa sarkolemom i ekstraćelijskim matriksom (Pardo *et al.*, 1983).

Titinski filamenti, nekada razmatrani isključivo kao elastična komponenta mišića, u okviru poslednjih istraživanja se predstavljaju kao integrator različitih signalnih puteva značajnih za funkciju sarkomere i celog mišićnog vlakna (Slika 2). Interakcija titina sa kalpain-proteazama, proteinima familije MuRF (Muscle-specific RING Finger Protein) i malim „heat-shock” proteinima kao što su $\alpha\beta$ -kristalin i HSP27,

čini ga delom sistema za kontrolu kvaliteta proteina. Osim toga, nekoliko grupa proteina sa pojedinim domenima titinskog molekula formira mehano-senzorne centre i generatore signala za hipertrofični odgovor, koji se aktiviraju nakon što se sarkomera izloži mehaničkom stresu (Linke *et al.*, 2010).



Slika 2. Šematski prikaz dela molekula titina u interakciji sa drugim komponentama sarkomere. Adaptirano prema Linke *et al.*, 2010. 1- teletonin, 2-mali ankirin 1, 3- γ -filamin, 4-nebulin, 5- α -aktinin, 6-obskurin, 7-aktin, 8-kalpain 1, 9-familija MARP (CARP, Ankrd2, DARP), 10-kalpain 3, 11-MyHC, 12-MyBP-C, 13-familija MURF (MURF1, MURF2), 14-kalmodulin, 15-Nbr1, 16-FHL2, 17-miomezin, 18-Bin1, MLP–Muscle LIM Protein, MDM2–mouse double–minute 2 protein.

U toku kontrakcije, dolazi do vezivanja teletonina za NH₂-kraj titina u oblasti Z-diska, što dovodi do regrutovanja proteina familije MLP. Ova familija proteina je pretežno lokalizovana u oblasti Z-diska, mada se može detektovati i u okviru I zone sarkomere, u oblasti kostamere, citosola, kao i u jedru gde funkcionišu kao regulatori transkripcije. Proteini familije MLP, učestvuju u indukciji hipertrofije vezujući se za kalcineurin koji aktivira NFAT (Nuclear Factor of Activated T-cells) - transkripcioni faktor koji u jedru direktno aktivira gene odgovorne za pokretanje hipertrofičnog odgovora (Boateng *et al.*, 2009). S druge strane, proteini familije MLP su uključeni i u inhibiciju hipertrofije, regulišući aktivnost proteina PICOT (Protein Kinase C-Interacting Cousin of Thioredoxin), koji inhibira signalni put kalcineurin – NFAT, značajan za hipertrofični odgovor (Jeong *et al.*, 2008; Samarel, 2008).

Članovi familije MuRF, koji se vezuju za titin u zoni M sarkomere, osim što učestvuju u proveri kvaliteta proteina, regulišu i hipertrofični odgovor inhibirajući ovaj proces. Ova grupa proteina svoje dejstvo ostvaruje migrirajući u jedro gde direktno

regulišu gensku ekspresiju mišićno-specifičnih gena. Osim toga, MuRF proteini mogu i direktno da modulišu proces hipertrofije, inhibirajući aktivnost enzima SRF (Serum Response Factor) (Lange *et al.*, 2005; Witt *et al.*, 2008; Willis *et al.*, 2007).

U zoni M sarkomere, titin poseduje domen sa kinaznom aktivnošću. Konformacione promene molekula titina koje su posledica mehaničkog stresa, omogućavaju interakciju kinaznog domena sa proteinom nbr1 (neighbor of BRACA1), a preko njega i sa p62, koji intereaguje sa MuRF2 proteinom (Lange *et al.*, 2005).

U okviru I zone sarkomere, N2A domen titina formira još jedan mehano-senzorni sistem, ostvarujući interakciju sa grupom proteina koji pripadaju familiji MARP (Muscle Ankyrin Repeat Proteins). Proteini ove familije ostvaruju interakcije i sa drugim proteinima sarkomere kao što su teletonin, miopaladin i kalpain proteaza p94. Pokazano je da članovi familije MARP, mogu da interaguju sa pojedinim transkripcionim faktorima, kao i da funkcionišu kao kofaktori u regulaciji ekspresije gena, pa se pretpostavlja da se posredstvom ovih proteina uspostavlja veza između titinskog kompleksa i jedra, nakon što sarkomerni elementi pretrpe konformacione promene (Miller *et al.*, 2003).

Uzimajući u obzir raznovrsnost i aktivnost pojedinačnih proteinskih faktora sarkomere, njihovu dinamičku lokalizaciju i interakciju sa elementima drugih odeljaka ćelije, očigledno je da sarkomera nije samo uređen skup kontraktilnih elemenata, nego i sedište biomehaničkih senzora značajnih za registrovanje lokalnih mehaničkih promena u mišićnoj ćeliji i prenos informacija u druge odeljke ćelije. U tom smislu, elementi sarkomere koji naročito privlače pažnju su proteini koji se vezuju za molekule titina, sa kojim sačinjavaju svojevrsan mehanosenzorni, tenziometrijski i signalni kompleks, značajan za registrovanje lokalnih promena u sarkomeri i transmisiju signala u druge odeljke ćelije. Većina tih signalnih proteina sarkomere otkrivena je u toku poslednje decenije, tako da će tek naredna istraživanja, rasvetliti njihove funkcije i međusobne relacije.

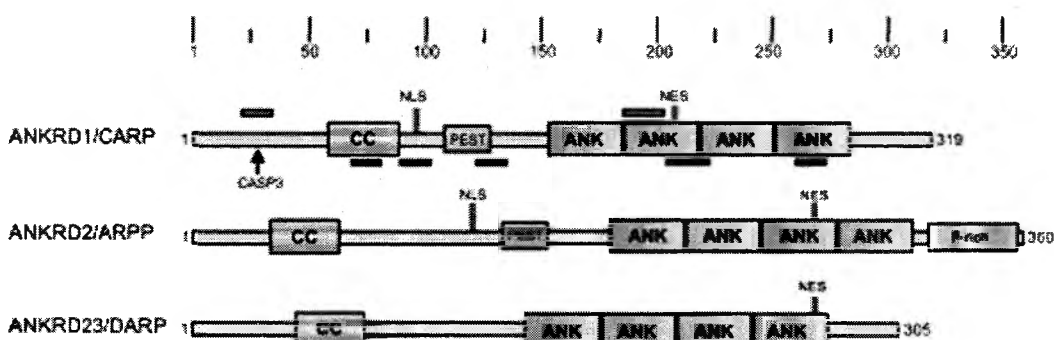
1.3. Proteini mišićne ćelije sa ankirinskim ponovcima (Muscle Ankyrin Repeat Proteins - MARPs)

U kontekstu definisanja faktora koji učestvuju u prenošenju signala nakon nadražaja mišićne ćelije, u novijim istraživanjima, posebna pažnja se pridaje članovima proteinske familije MARP (Muscle Ankyrin Repeat Proteins). Karakterističnost ovih

proteina je specifična ekspresija u poprečno prugastom mišićnom tkivu (skeletnim mišićima i srcu), kao i prisustvo ankirinskih ponovaka.

Ankirinski ponovci su konzervisani motivi koji se sastoje od 33 aminokiseline i predodređeni su za posredovanje u proteinsko–proteinskim interakcijama. Ove strukture su među najzastupljenijim motivima u proteinima i javljaju se kako kod prokariota tako i kod eukariota. Najveći broj ankirinskih ponovaka u jednom proteinu je 33, mada većina proteina ima 6 i manje ankirinskih ponovaka. Proteini koje karakteriše prisustvo ankirinskih motiva imaju različite funkcije kao što su transport jona, regulacija ćelijskog ciklusa, inicijacija transkripcije, formiranje citoskeleta, učešće u transdukciji signala, itd (Mosavi *et al.*, 2004). U ćelijama mišića, osim proteina iz familije MARP, postoji i niz drugih proteina koji poseduju ankirinske motive, kao što su miotrofin, Notch i proteini familije ASB (Ankyrin repeat and SOCS box containing proteins). Neki autori smatraju da upravo u mišićnoj ćeliji proteini sa ankirinskim ponovcima imaju poseban značaj zbog intenzivnog metabolizma, dinamike signalne transdukcije i ćelijskih odgovora na različite stimulse, koji su u osnovi bazirani na intenzivnoj „komunikaciji” među proteinima (Tee i Peppelenbosch, 2010).

Članovi familije MARP međusobno imaju 50% homologije (Slika 3) u primarnoj sekvenci, istu intracelularnu distribuciju i zajedničke partnere u proteinsko – proteinskim interakcijama. Zavisno od faze razvića i stimulusa kojim su ćelije izložene, ovi proteini se mogu detektovati kako u zoni I sarkomere tako i u jedru. Većina autora danas smatra da MARP proteini imaju ulogu u primarnom odgovoru mišićne ćelije na mehanički stres (Miller *et al.*, 2003).



Slika 3. Uporedni prikaz osnovnih strukturnih karakteristika proteina familije MARP, prema Mikhailov i Torrado, 2008. CC- Coiled-coil motivi odgovorni za dimerizaciju molekula, NLS (nuclear localization signal)-signal za lokalizaciju u jedru, PEST – signal za brzu degradaciju, ANK - ankirinski ponovci.

Do sada su identifikovana i okarakterisana 3 člana familije MARP: CARP/Ankrd1/MARP1 (Cardiac Ankyrin Repeat Protein), Ankrd2/Arpp/MARP2 (Ankyrin repeat domain 2) i DARP/MARP3 (Diabetes-associated Ankyrin Repeat Protein).

Protein CARP/Ankrd1/MARP1 je prvi opisani član familije MARP (Chu *et al.*, 1995). Prvobitno je okarakterisan kao protein koji se specifično eksprimira u miokardu (Zou *et al.*, 1997; Ishiguro *et al.*, 2002), ali su kasnija istraživanja pokazala da različiti stimuli, kao što su ekscentrične kontrakcije i denervacija, mogu indukovati njegovu ekspresiju i u skeletnim mišićima (Barash *et al.*, 2004; Tsukamoto *et al.*, 2002). Ekspresija proteina CARP je značajno povećana tokom hipertrofije i oštećenja miokarda (Aihara *et al.*, 2000), a postoje dokazi da ovaj protein može da bude u vezi i sa kongenitalnim bolestima srca (Cinquetti *et al.*, 2008, Moulik *et al.*, 2009). Osim što je učesnik signalne transdukcije u sarkomeri kardiomiocita (Miller *et al.*, 2003), pokazano je da protein CARP ima ulogu transkripcionog kofaktora u srcu, delujući inhibitory na ekspresiju gena za srčani troponin C, atrijski natriuretički faktor i laki lanac miozina komora (Jeyasseelan *et al.*, 1997; Zou *et al.*, 1997). Zbog toga neki autori pretpostavljaju da CARP ima ulogu lokalnog regulatora ekspresije gena specifično ekspimiranih u srcu (Zou *et al.*, 1997).

Protein DARP/MARP3 povezan je sa energetskeg metabolizmom u ćeliji, a ekspimiran je kako u skeletnim mišićima, tako i u miokardu (Ikeda *et al.*, 2003). Interesantno je da je ovaj protein osim u poprečno prugastim mišićnim ćelijama, u istoj meri, ekspimiran i u mrkom masnom tkivu (Ikeda *et al.*, 2003), što je podatak koji govori u prilog novije hipoteze o zajedničkom poreklu poprečno prugastog i mrkog masnog tkiva (Timmons *et al.*, 2007; Seale *et al.*, 2008).

1.4. Humani protein Ankrd2/Arpp/MARP2

Humani protein Ankrd2/Arpp/MARP2 (u daljem tekstu Ankrd2) je opisan tokom istraživanja dizajniranih u cilju identifikacije novih informativnih molekula koji su specifični za ćelije poprečno prugastih mišića (Pallavicini *et al.*, 2001). U literaturi se ovaj protein može naći i pod imenom Arpp (Ankyrin repeat, PEST sequence proline rich), koji su dali Moriyama i koautori opisavši ga u ćelijama kancera ezofagusa u isto vreme kad i prethodna grupa autora (Moriyama *et al.*, 2001).



1.4.1. Strukturne karakteristike proteina Ankrd2

Gen za Ankrd2 mapira u regionu 10q23.31-23.32 i ima 9 egzona od kojih egzoni 5, 6, 7 i 8 kodiraju po jedan ankirinski ponovak. Otvoreni okvir čitanja je 999 bp i kodira protein od 333 amino kiseline molekulske mase 37.150 kDa, koji u denaturišućem poliakrilamidnom gelu pokazuje pokretljivost koja odgovara proteinu od 42 kDa (Pallavicini *et al.*, 2001).

Aminokiselinski sastav proteina Ankrd2 čoveka pokazuje 52% sličnosti sa proteinom Ankrd2 miša i 89% sličnosti sa humanim proteinom CARP. U primarnoj sekvenci, osim ankirinskih ponovaka, prisutni su i drugi funkcionalni motivi: signal za lokalizaciju u jedru (NLS-Nuclear Localization Signal), PEST sekvence odgovorne za brzu degradaciju proteina, mesta za fosforilaciju protein kinazom C i kazein kinazom II kao i motivi za dimerizaciju (CC-Coiled-coil). Za razliku od drugih proteina familije MARP, Ankrd2 poseduje deo bogat prolinom u C-terminalnom kraju (Moriyama *et al.*, 2001). Program *Pfam* za analizu proteinske sekvence, predviđa četiri ankirinska ponovka u humanom proteinu Ankrd2, dok program *SMART* ukazuje na pet (Pallavicini *et al.*, 2001).

1.4.2. Ekspresija Ankrd2 na nivou iRNK i proteina

Dosadašnja istraživanja pokazuju da je ekspresija proteina Ankrd2 dominantna u poprečno prugastom mišićnom tkivu, kao i da je zavisna od stepena diferenciranosti mišićne ćelije i faze razvića organizma.

Analize biopsija različitih tkiva humanog porekla, primenom Northern blot-a i reverzne amplifikacije (RT-PCR), pokazale su da je iRNK za Ankrd2 eksprimirana specifično u skeletnim mišićima i srcu adulta, a u fetalnom stadijumu samo u skeletnim mišićima (Pallavicini *et al.*, 2001; Moriyama *et al.*, 2001). Međutim treba naglasiti da su Pallavicini i saradnici povećanjem broja ciklusa u toku RT-PCR-a, detektovali specifičnu iRNK i u prostati i bubrezima (Pallavicini *et al.*, 2001).

U skeletnim mišićima protein Ankrd2 je detektovan kako kod adulta, tako i u embrionalnoj fazi razvića. U adultnom srcu protein Ankrd2 nađen je samo u pojedinim odeljcima - kardiomiocitima komora, međukomornoj pregradi i apeksu (Moriyama *et al.*, 2001), dok u fetalnom srcu nije detektovan (Moriyama *et al.*, 2001; Ishiguro *et al.*, 2002). Poređenje različitih tipova mišićnih vlakana pokazalo je preferencijalno prisustvo ovog proteina u vlaknima sporog tipa (Ishiguro *et al.*, 2002), mada su McKoy

i saradnici pokazali da se kod miša ekspresija *Ankrd2* može indukovati i u brzim mišićnim vlaknima nakon dužeg izlaganja pasivnom istezanju (McKoy *et al.*, 2005). Interesantno je da je ekspresija *Ankrd2* kod miša detektovana ne samo u skeletnim mišićima i srcu, nego i u drugim organima kao što su mozak, pankreas i ezofagus (Tsukamoto *et al.*, 2002). Na modelu miša dobijen je i niz drugih podataka o načinu indukovanja ekspresije ovog proteina. Tako je pokazano da se ekspresija *Ankrd2* indukuje u mišićima nakon 7 dana imobilizacije u istegnutom stanju (Kemp *et al.*, 2000), a udruženo sa ekspresijom proteina CARP, nakon pojedinačnih ekscentričnih kontrakcija (Barash *et al.*, 2004) i nakon denervacije mišića (Tsukamoto *et al.*, 2002).

U eksperimentima Hentzen-a i saradnika analizirana je ekspresija mišićno-specifičnih gena u zavisnosti od tipa kontrakcije i nivoa stresa koji ćelija trpi izraženog kroz frekvenciju električnih stimulusa kojima su izazivane kontrakcije. Pokazano je da, za razliku od drugih analiziranih gena, ekspresija *Ankrd2* zavisi isključivo od tipa kontrakcije, nezavisno od nivoa stresa kojem je ćelija izložena (Hentzen *et al.*, 2006). Mohamed i saradnici su ispitivali ekspresiju proteina *Ankrd2* u zavisnosti od vektora istezanja mišića. Rezultati ove grupe autora su pokazali da se ekspresija *Ankrd2* indukuje bez obzira da li istezanje deluje u transferzalnem ili longitudinalnom pravcu u odnosu na pravac pružanja mišićnih vlakana, ali da se indukcija ekspresije *Ankrd2* tokom ova dva tipa istezanja ostvaruje različitim mehanizmima, tj po anizotropnom principu (Mohamed *et al.*, 2010).

McKoy i koautori su analizirali ekspresiju *Ankrd2* koristeći kao model miševe „kyphoscoliosis – mutant“, za koje je karakteristično odsustvo mehanizma koji dovodi do hipertrofije. Pasivno istezanje brzih mišićnih vlakana ovih mutanata, takođe je dovelo do indukcije ekspresije *Ankrd2* proteina, na osnovu čega je zaključeno da je ekspresija *Ankrd2* vezana za odgovor na istezanje i fenotip sporih mišićnih vlakana, a ne za hipertrofiju (McKoy *et al.*, 2005).

1.4.3. Funkcija proteina *Ankrd2*

Uloga *Ankrd2* u mišićnoj ćeliji nije u potpunosti jasna. Konkretniji podaci koji ukazuju na funkciju ovog proteina dobijeni su u eksperimentima koji su imali za cilj da preciziraju njegovu lokalizaciju unutar mišićne ćelije i detektuju njegove partnere u proteinsko-proteinskim interakcijama.

U diferenciranim mišićnim ćelijama Ankrd2 je lokalizovan u citoplazmi, dok je u proliferišućim mioblastima detektovan u jedru (Pallavicini *et al.*, 2001, Bean *et al.*, 2008), što ukazuje da je njegova distribucija, između ostalog, diktirana procesima razvića i diferencijacije. Osim toga, Tsukamoto i saradnici su pokazali da u miocitima, u kojima je oštećenje sarkomera izazivano kardiotoksinom ili suvim ledom, dolazi do migracije Ankrd2 iz sarkomere u jedro i to u oblast euhromatina (Tsukamoto *et al.*, 2008). Navedeni rezultati ukazuju da Ankrd2 ima ulogu signalnog molekula u mehanizmima koji se aktiviraju u odgovoru na stres i da može imati učešća u regulaciji transkripcije. Dodatne dokaze o regulatornoj ulozi proteina Ankrd2 dali su Bean i saradnici, pokazavši da „overekspresija“ Ankrd2 dovodi do inhibicije ekspresije glavnih regulatora transkripcije u mišićnoj ćeliji - faktora MyoD i miogenina (Bean *et al.*, 2008).

Najveći broj do sada dobijenih podataka ukazuje da Ankrd2 ima ulogu signalnog molekula koji je uključen u primarni odgovor na mehanički stres. U tom smislu posebno se naglašava da ovaj protein najverovatnije ostvaruje informacionu vezu između sarkomere i jedra. Poseban dokaz ovakve uloge je podatak da Ankrd2 ostvaruje interakcije sa proteinima raznorodne lokalizacije i funkcije. Naime, pokazano je da Ankrd2 interaguje sa sarkomernim proteinima teletoninom, titinom, miopaladinom i kalpain proteazom p94 (Kojić *et al.*, 2004; Miller *et al.*, 2003). S druge strane, Ankrd2 ostvaruje interakcije i sa transkripcionim faktorima kao što su p53, YB1 i PML (Kojić *et al.*, 2004).

Eksperimenti Miller-a i saradnika pokazuju da Ankrd2, kao i ostali članovi familije MARP, zajedno sa drugim proteinima sarkomere, učestvuje u formiranju biomehaničkog senzora. Prema modelu koji je dala ova grupa istraživača, centar ovog senzora je N2A domen titina koji ostvaruje interakcije sa kalpain proteazom p94 i proteinima familije MARP, a indirektno preko MARP-a i sa miopaladinom. Sva tri proteinska liganda organizovana oko N2A domena titina, mogu se detektovati i u jedru, pa je pretpostavka da su molekularna veza između sarkomere i jedra, te da MARP proteini, učestvujući u tom senzornom putu, mogu regulisati i svoju sopstvenu ekspresiju (Miller *et al.*, 2003).

Osim što razmatraju učešće Ankrd2 u prenosu signala, pojedini autori skreću pažnju na ulogu ovog proteina u održavanju mehaničke stabilnosti sarkomere. Barash i saradnici su, proučavajući efekat odsustva MARP proteina kod „knock-out“ miševa, pokazali da tek istovremeno odsustvo sva tri proteina ima morfološki i fiziološki merljiv

efekat. Naime, kontraktilni fibrili trostrukih „knock-out” miševa bili su opušteniji, a *dužina sarkomere u odmoru* bila je veća. *Dužina sarkomere u odmoru* je parametar specifičan za svaki mišić, a direktno je zavisna od dužine eksprimirane izoforme titina. Na osnovu toga, zaključuje se da proteini familije MARP utiču na konstrukciju sarkomere tako što regulišu ekspresiju titina ili direktnim učešćem u održavanju intergriteta strukture I zone. Činjenica da kod „knock-out” miševa za pojedinačne članove familije MARP nema efekta na morfološkom i fiziološkom nivou, i da su ti efekti uočljivi jedino kod trostrukih deletanata, ide u prilog pretpostavci da se ovi proteini, konzervisane strukture i funkcije, mogu funkcionalno dopunjavati i dodatno ističe važnost njihove uloge u ćelijskim procesima (Barash *et al.*, 2007).

1.4.4. Protein Ankrd2 u patološkim stanjima

Uloga proteina Ankrd2 razmatrana je i u patološkim procesima s ciljem da se promene u njegovoj ekspresiji povežu sa određenim poremećajima i dobiju podaci koji bi omogućili jasniji uvid u njegovu funkciju.

Tkivno specifična ekspresija proteina Ankrd2 je inhibirana kod pacijenata sa mišićnom distrofijom, a pojačana kod kongenitalnih miopatija. Ekspresija Ankrd2 kod spinalne mišićne atrofije je pojačana kod težih oblika bolesti u odnosu na blaže, dok Ankrd2-pozitivna vlakna imaju tendenciju grupisanja (Nakada *et al.*, 2004). U skeletnim mišićima obolelih od amiotrofične lateralne skleroze (ALS), dolazi do promene obrazca ekspresije Ankrd2. Kod ovog poremećaja, ekspresija u jedrima se pojačava, a za razliku od zdravih mišića gde su Ankrd2-pozitivna vlakna raspoređena nalik šahovskoj tabli, kod obolelih od ALS-a Ankrd2 ima uniformnu raspodelu (Nakamura *et al.*, 2003). Ankrd2 je detektovan u ćelijama kancera ezofagusa gde su ga Moriyama i saradnici opisali prvi put (Moriyama *et al.*, 2001). Povećana ekspresija Ankrd2 opisana je u ćelijama randomiosarkoma, (Ishiguro, *et al.*, 2002; Ishiguro, *et al.*, 2005) i u onkocitomima bubrega (Shomori *et al.*, 2007).

Mada je promenjen obrazac ekspresije Ankrd2 pronađen u više patoloških stanja, ne postoji dovoljno objašnjenja na koji način bi ovaj protein mogao biti u vezi sa patogenezom, ili da li bi mogao da se koristi kao dijagnostički i prognostički marker određene bolesti. Međutim, detaljnije studije, koje obuhvataju analizu većeg broja pacijenata, mogle bi dati odgovor na ova pitanja.

1.4.5. Regulacija ekspresije gena *Ankrd2*

O regulaciji ekspresije gena za *Ankrd2* zna se veoma malo. Bioinformatičkom analizom u promotoru gena *Ankrd2* detektovana su potencijalna mesta vezivanja transkripcionih faktora MyoD, Nkx2.5, p53 i NF- κ B (Pallavicini *et al.*, 2001).

Bean i koautori su pokazali da je ekspresija gena *Ankrd2* u proliferišućim mioblastima pod kontrolom faktora MyoD (Bean *et al.*, 2005). MyoD pripada familiji transkripcionih faktora bHLH (basic Helix-Loop-Helix) i smatra se ključnim faktorom u procesu diferencijacije skeletnih mišića (Choi *et al.*, 1990). Ovaj faktor reguliše dva važna događaja u miogenezi - pokretanje ekspresije gena specifičnih za ćelije skeletnih mišića i inhibiciju proliferacije u terminalnoj fazi diferencijacije miocita (Maione i Amati, 1997). Kao i ostali transkripcioni faktori familije bHLH, MyoD se aktivira veoma rano u procesu embriogeneze i diriguje ekspresijom kaskade gena koji su odgovorni za uspostavljanje mišićnog fenotipa (Olson, 1993).

Mohamed i saradnici su dali dokaze da se u diferenciranoj mišićnoj ćeliji indukcija ekspresije gena *Ankrd2* reguliše u zavisnosti od tipa stimulusa. Longitudinalnim istežanjem mišića, ekspresija gena *Ankrd2* se indukuje posredstvom transkripcionog faktora NF- κ B (Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells). Transferzalno istežanje mišića dovodi do indukcije ekspresije *Ankrd2* na drugi način, preko proteina AP1 (Activator Protein 1) (Mohamed *et al.*, 2010). Transkripcioni faktori NF- κ B i AP1 su važni kao induktori ekspresije gena koji se aktiviraju u imunom i inflamatornom odgovoru ćelije. Aktivaciju ovih transkripcionih faktora izaziva prisustvo različitih agenasa kao što su zračenja, slobodni radikali, citokini, virusni ili bakterijski antigeni (Baldwin, 1996; Hess *et al.*, 2004; Kuryłowicz i Nauman, 2008). Regulacija posredstvom faktora NF- κ B i AP1, ekspresiju gena za *Ankrd2* dovodi u vezu sa opštim mehanizmima koje ćelija aktivira u odgovoru na stres. Međutim, do sada nema dokaza da li se uticaj ovih transkripcionih faktora uspostavlja i u nediferenciranim mišićnim ćelijama, ili u toku odgovora mišićne ćelije na druge vrste stimulusa (dejstvo hormona, denervacija, hipoksija, itd).

1.4.6. Potencijalni faktori regulacije ekspresije gena *Ankrd2*

Kada su u pitanju faktori p53 i Nkx2.5, ne postoje eksperimentalni dokazi o njihovom učešću u regulaciji ekspresije gena za *Ankrd2*. Pored rezultata

bioinformatičkih analiza, mnogi podaci iz literature ukazuju, da bi učešće p53 i Nkx2.5 u regulaciji aktivnosti gena *Ankrd2* bila opravdana pretpostavka.

1.4.6.1. Transkripcioni faktor Nkx2.5

Nkx2.5 pripada porodici transkripcionih faktora Nk-2 sa homeodomenom. Ovaj protein je od suštinskog značaja za razvoj srca i konzervisan je kod svih kičmenjaka, mada ima svoje analoge i kod beskičmenjaka (Jamali *et al.*, 2001). Odsustvo faktora Nkx2.5 kod „knock-out” miševa je letalno. Kod čoveka, mutacije u genu za faktor Nkx2.5 su opisane kod različitih anomalija srca (Benson *et al.*, 1999; Reamon-Buettner i Borlak 2004; Reamon-Buettner i Borlak, 2010). Nkx2.5 se aktivira rano, u embrionalnom razviću posredstvom proteina BMP-2 (Bone Morphogenetic Protein 2) koji proizvode endodermalne ćelije. Kasnije, faktor Nkx2.5 aktivira gene koji se specifično eksprimiraju u srcu kao što su ANP (Atrial Natriuretic Peptid), srčani alfa aktin, i MEF 2C (Myocyte Enhancer Factor 2C) (Akazawa i Komuro, 2005). Pored toga, Nkx2.5 deluje i kao koaktivator transkripcionog faktora GATA-4 koji stimuliše ekspresiju gena uključenih u regulaciju razvića srca, kao što su srčani troponin C i alfa forma teškog lanca miozina (Durocher *et al.*, 1997; Harvey *et al.*, 2002). Među proteinima srca čija se ekspresija odvija pod kontrolom faktora Nkx2.5 je i CARP, član porodice MARP, koji pokazuje najviše homologije sa proteinom *Ankrd2* (Zou *et al.*, 1997). Osim što učestvuje u procesu razvića srca, transkripcioni faktor Nkx2.5 je i u adultnom srcu uključen u odgovor na inicijatore hipertrofije kao što su povišen pritisak, isoproterenol i fenilefrin (Thompson *et al.*, 1998; Saadane *et al.*, 1999).

Uzimajući u obzir da je protein *Ankrd2* eksprimiran u adultnom srcu, i da se njegova uloga povezuje sa procesima plastičnosti i hipertrofije poprečno prugaste mišićne ćelije, može se pretpostaviti da je i ekspresija gena *Ankrd2* u miokardu regulisana transkripcionim faktorom Nkx2.5.

1.4.6.2. Transkripcioni faktor p53

Od vremena kada je otkriven (Lane i Crawford, 1979) protein p53 postao je jedan od najviše proučavanih proteina živog sveta. Zbog uloge koju ima u odgovoru ćelije na genotoksične agense i učesća u procesima koji su presudni za očuvanje integriteta genoma, ovaj protein nazvan je *čuvarom genoma*. Svoju ulogu p53 ostvaruje

utičući na procese kao što su programirana ćelijska smrt (apoptoza), popravka oštećenog molekula DNK i ćelijski ciklus (Lane, 1992; Levine, 1997; Vogelstein *et al.*, 2000).

U odsustvu stresa, protein p53 se u citoplazmi nalazi u kompleksu sa proteinom Mdm2 (mouse double-minute 2 protein) (Momand *et al.*, 1992) koji posreduje u njegovoj degradaciji zavisnoj od ubikvitina, pa je u normalnim uslovima količina proteina p53 neznatna (Li *et al.*, 2003). Osim toga, regulacija nivoa p53 ostvaruje se i tako što p53 aktivira transkripciju gena za Mdm2, tako da smanjenje nivoa p53 dovodi i do smanjenja nivoa njegovog prirodnog inhibitora (Wu *et al.*, 1993). Različiti stimuli kao što su zračenja, prisustvo virusa, onkogena ili druge vrste stresa dovode do aktivacije enzima koji vrše posttranslacione modifikacije kako p53, tako i Mdm2. Najvažnije od tih modifikacija su fosforilacija, acetilacija i glikozilacija (Brooks *et al.*, 2003). Ove promene omogućavaju odvajanje p53 iz kompleksa sa Mdm2 i predstavljaju signal za dalje angažovanje p53 u odgovoru na stres. Svoj efekat p53 ostvaruje regulacijom ekspresije gena na transkripcionom nivou (Farmer *et al.*, 1992; Kern *et al.*, 1991; Levine *et al.*, 1997). Identifikovano je više gena koji funkcionišu nizvodno od p53 u toku odgovora ćelije na oštećenja DNK. Neki od tih gena su GADD45, p21/Waf/Cip1, ciklin G, i bax. Modulišući ekspresiju ovih gena, p53 može da zaustavi progresiju ćelijskog ciklusa ili usmeri ćeliju ka procesu apoptoze (Kastan *et al.*, 1992; El-Deiry *et al.*, 1993; Okamoto i Beach, 1994; Miyashita i Reed, 1995).

Osim uloge u procesima suštinskim za odbranu ćelije od stresa, pokazano je da p53 ima ulogu i u finoj regulaciji procesa razvića i diferencijacije (Kastan *et al.*, 1991, Almon *et al.*, 1993; Soddu *et al.*, 1996; Almong i Rotter, 1997; Choi i Donehower 1999).

Što se tiče poprečno prugastog mišićnog tkiva, ne postoji dovoljan broj podataka na osnovu kojih bi se mogla uvideti jasna tkivno specifična funkcija p53. Eksperimenti sa „p53^{-/-} knock-out” miševima su pokazali da ovaj protein nije neophodan za normalan razvoja mišića, mada su mišići takvih životinja bili podložni tumorima (Donehower *et al.*, 1992). S druge strane, veliki broj podataka ukazuje na potrebu za angažovanjem p53 u procesima koji karakterišu mišićnu ćeliju. Tako je pokazano da ekspresija i aktivnost proteina p53 rastu u toku diferencijacije mišićnih ćelija (Tamir i Bengal, 1998). Protein p53 je uključen u regulaciju diferencijacije mioblasta posredstvom proteina pRb (retinoblastoma protein), regulišući ekspresiju gena za ovaj protein (Porrello *et al.*, 2000). Povećanje sadržaja jedarne (ali ne i citoplazmatične) frakcije p53 evidentirano je u skeletnim mišićima kod kojih je hipertrofija izazvana dugotrajnim istezanjem (Siu i

Alway, 2005 B). Povećavanje količine sadržaja p53 u jedru registrovano je i u izolovanim mišićima koji su podvrgnuti seriji tetaničkih (izdužujućih) kontrakcija (Chen *et al.*, 2002). Za razliku od hipertrofije, kod atrofičnih stanja, izazvanih rasterećenjem prethodno hipertrofiranih mišića, detektovano je povećanje i jedarnog i citoplazmatskog sadržaja proteina p53 (Siu i Alway 2005 A).

Funkcija p53 je proučavana i u kontekstu hipertrofije srca. Tako je pokazano da u srčanom mišiću, prilikom istežanja komora u fazi dijastole, sekrecija angiotenzina II može dovesti do translokacije protein kinaze C koja fosforiliše i aktivira p53. Aktivirani p53, osim što pokreće apoptozu aktiviranjem proapoptotskog gena bax, stimuliše ekspresiju gena za angiotenzin i gena za receptor AT₁ (Leri *et al.*, 1998; Leri *et al.*, 2000).

Pretpostavka o potencijalnoj ulozi proteina p53 u procesima značajnim za mišićnu ćeliju, potkrepljena je podatkom da on intereaguje sa proteinima Ankrd2, (Kojić *et al.*, 2004) i CARP (Kojić *et al.*, 2010), čija se ekspresija u poprečno prugastoj mišićnoj ćeliji indukuje kao odgovor na mehanički stres. U kontekstu razmatranja p53 kao potencijalnog regulatora ekspresije gena *Ankrd2*, od posebnog je značaja podatak da je aktivnost promotora gena za CARP pozitivno regulisana transkripcionim faktorom p53 (Kojić *et al.*, 2010).

2. CILJ RADA

Podaci iz literature ukazuju da protein Ankrd2 ima ulogu u procesima značajnim za odgovor poprečno prugastih mišićnih ćelija na mehaničke nadražaje. Iako bi poznavanje mehanizama regulacije ekspresije gena *Ankrd2* moglo da doprinese boljem razumevanju uloge ovog proteina u mišićnoj ćeliji, o mehanizmima regulacije njegove ekspresije postoje vrlo oskudni podaci. S obzirom na rezultate bioinformatičkih analiza, kao i podatke iz literature, postavljeni su sledeći ciljevi:

- ispitivanje uticaja faktora MyoD na aktivnost promotora gena *Ankrd2*,
 - ispitivanje uticaja faktora Nkx2.5 na aktivnost promotora gena *Ankrd2*,
 - ispitivanje uticaja faktora p53 na aktivnost promotora gena *Ankrd2*,
 - ispitivanje uticaja faktora NF-κB na aktivnost promotora gena *Ankrd2*.
- Pokazano je da protein CARP igra ulogu kofaktora u regulaciji ekspresije gena. Takođe, postoje pretpostavke da bi proteini familije MARP mogli biti funkcionalno povezani. Ovo je bio motiv da se u ciljeve istraživanja uključi i ispitivanje potencijala proteina CARP da reguliše ekspresiju gena *Ankrd2* modulisanjem aktivnosti transkripcionih faktora koji imaju uticaj na aktivnost promotora *Ankrd2*.
- Strukturu proteina Ankrd2 karakteriše prisustvo ankirinskih ponovaka, motiva predodređenih za ostvarivanje proteinsko-proteinskih interakcija. Pokazano je da Ankrd2 interaguje sa sarkomernim proteinima (titinom, teletoninom i kalpain proteazom p94) i transkripcionim faktorima (YB1, p53 i PML). Pretpostavlja se da interakcije sa proteinskim partnerima Ankrd2 ostvaruje posredstvom ankirinskih motiva, ali je ta pretpostavka potvrđena jedino u slučaju vezivanja Ankrd2 i titina. Zato je jedan od ciljeva ovog istraživanja bio da se ispita udeo pojedinih domena proteina Ankrd2 u tim interakcijama, odnosno odgovori na pitanja:
- da li su ankirinski ponovci funkcionalni i dovoljni za proteinsko-proteinske interakcije koje ostvaruje Ankrd2,
 - da li pored ankirinskih ponovaka, postoje dodatni elementi koji posreduju u interakciji Ankrd2 sa drugim proteinima i eventualno regulišu specifičnost ovih interakcija.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. MATERIJAL

3.1.1. Bakterijski sojevi

U ovom radu korišćeni su različiti sojevi *E. coli*. Za propagaciju konstrukata i izolovanje plazmidne DNK korišćen je soj DH5 α (supE44, Δ lacU169, (Φ 80 lacZ M15 Δ), hsdR17, recA1, endA1, gyrA96, thi-1, relA1). Rekombinantni proteini fuzionisani sa proteinom GST (glutation-S-transferaza) su eksprimirani u soju M15 [pREP4], (Nal^s, Str^s, Rif^s, Lav⁻, Ara⁻, Gal⁻, Mtl⁻, F⁻, RecA⁺ Uvr⁺) ili BL21 pLysS (F, ompT, hsdS_B, (r_B m_B), dcm, gal, (DE3), pLysS, Cm).

3.1.2. Čelije u kulturi

Za potrebe eksperimenata sa sisarskim ćelijama u kulturi, korišćene su mišje mišićne ćelije C2C12 i fibroblasti poreklom iz bubrega afričkih zelenih majmuna - cos7.

3.1.3. Nekomercijalni ćelijski ekstrakti

U ovom radu korišćeni su ekstrakti ćelija U2OS u kojima je eksprimiran rekombinantni humani protein teletonin, ustupljeni od strane ICGEB-a (International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology, Trst, Italija), u okviru saradnje sa IMGGI (Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Beograd, Srbija).

3.1.4. Ekspresioni vektori

Vektor **pGEM-T-Easy** komercijalnog kita The pGEM[®]-T Easy Vector System (Promega) je korišćen za kloniranje fragmenata DNK koji su dobijeni metodom PCR ili RT-PCR. Ovaj sistem sadrži linearizovan vektor pGEM-T-Easy sa po tri nesparena timidina na oba kraja, što omogućava kloniranje produkata reakcije lančanog umnožavanja polimerazom, s obzirom da ovi produkti imaju slobodne adenine koje ostavlja polimeraza.

Vektor **pGEX-6P-3** (Amersham Pharmacia Biotech) je korišćen u cilju ekspresije proteina fuzionisanih sa proteinom GST u bakterijskim sistemima.

Vektor **pCDNA3** (Invitrogen) je korišćen za ekspresiju proteina u eukariotskim ćelijama.

Vektor **pCMVTag 2B** (Stratagene, Agilent Technologies) je korišćen za ekspresiju proteina fuzionisanih sa dodatkom FLAG (niz od 8 aminokiselina DYKDDDDK) u eukariotskim ćelijama.

Vektor **pEGFP-C1** (Clontech) je korišćen za ekspresiju proteina fuzionisanih sa proteinom GFP (Green Fluorescent Protein) u eukariotskim ćelijama.

Vektor **pGL4.1** (Promega) je korišćen za kloniranje promotorskog regiona. Ovaj vektor sadrži repoterski gen za luciferazu organizma *Photinus pyralis* (svitac), koji se eksprimira pod uticajem ispitivanog promotora.

Vektor **pRL-TK** (Promega) sadrži reporterski gen za luciferazu morskog organizma *Renilla reniformis*, korišćen je u dualnim luciferaznim promotorskim esejima kao kontrolni reporterski vektor.

3.1.5. Nekomercijalni konstrukti

U ovom radu korišćeni su konstrukti ustupljeni od strane ICGEB-a, a u okviru saradnje sa IMGGI. To su konstrukti koji su formirani kloniranjem različitih regiona cDNK za hAnkrd2 u vektor pGEX-6P-3 (Ankrd2-pGEX-6P-3, N-pGEX-6P-3, NA-pGEX-6P-3, AC-pGEX-6P-3, C-pGEX-6P-3), kao i konstrukti p53-pCDNA3, YB1-FLAG-pCDNA3 i PML HA-pCDNA3.

3.1.6. Antitela

Antitela korišćena u ovom radu data su u Tabeli 1.

Antitelo	Poreklo /tip antitela	Proizvođač
Anti p53	mišje monoklonalno	Abcam
Anti p50	mišje monoklonalno	Santa Cruz Biotechnology
Anti p65	mišje monoklonalno	Santa Cruz Biotechnology
Anti FLAG	mišje monoklonalno	Sigma
Anti H3	zečje poliklonalno	Millipore
Anti teletonin	mišje monoklonalno	Proizvedeno u ICGEB-u Dr Faulkner
Anti mouse HRP*	kozje poliklonalno	Sigma
Anti rabbit HRP*	kozje poliklonalno	Pierce

Tabela 1. Pregled korišćenih antitela. *Antitelo konjugovano sa peroksidazom biljke ren (*Armoracia rusticana*, Horseradish peroxidase).

3.1.7. Graničnici

Graničnici, korišćeni u reakcijama lančanog umnožavanja polimerazom (PCR) i reverzne transkripcije praćene lančanim umnožavanjem polimerazom (RT-PCR) dati su u Tabeli 2.

Umnožavani region	Sekvenca graničnika	Restrikcioni enzimi korišćeni za kloniranje
Promotorski region gena za hAnkrd2 (-439/+7)	For: GCGACTCGAGGTACAGAACTGTCCTG Rev: ATATAAGCTTCGCTCTGCAGGCC	<i>Xho</i> I <i>Hind</i> III
hMyoD (cDNK)	For: CTATGGATCCCATGGAGCTACTG Rev: ATATCTCGAGTCAGAGCACCTGGTA	<i>Bam</i> HI <i>Xho</i> I
hNkx2.5 (cDNK)	For: ATGGATCCAATGTTCCCCAGCCCTGCTCT Rev: TGCTACCAGGCTCGGATACCATGCAGCGT	<i>Bam</i> HI <i>Xho</i> I
hCARP (cDNK)	For: GCTGCAGCGATGATGGTACTGAAAGTA Rev: TAGGATCCTCAGAATGTAGCTATGCG	<i>Bam</i> HI <i>Xho</i> I
SA (hAnkrd2, 97 - 333 ak)	For: ATGGATCCCAGAAGAAGCGGCAC Rev: TCGGACACGGTCGGGTCCTCTTAAGCG	<i>Bam</i> HI <i>Eco</i> RI

Tabela 2. Sekvence graničnika korišćenih za umnožavanje fragmenata DNK metodama PCR i RT-PCR.

3.2. METODE

3.2.1. Kultivacija bakterija

Bakterije sojeva *E. coli* su gajene na 37 °C ili 28 °C, na čvrstim podlogama, ili u tečnim medijumima uz aeraciju (Maniatis, 1982). Za gajenje bakterija *E. coli* korišćeni su sledeći tipovi hranljivih medijuma:

LB (Luria Broth) medijum koji sadrži 1 % baktotripton, 0,5 % kvašćev ekstrakt i 1 % NaCl. Čvrsta podloga u medijumu LB sadrži i 1,5 % agar.

TB (Terrific Broth) medijum koji sadrži 1,2 % baktotripton, 2,4 % kvašćev ekstrakt, 0,4 % glicerol, 72 mM K₂HPO₄ i 17 mM KH₂PO₄.

SOB (Super Optimal Broth) medijum koji sadrži 2 % baktotripton, 0,5 % kvašćev ekstrakt i 0,05 % NaCl.

Bakterije su gajene na selektivnim podlogama (čvrstim ili tečnim) u prisustvu odgovarajućih antibiotika. Koncentracije antibiotika korišćenih za gajenje bakterija iznosile su 100 µg/mL za ampicilin, 25 µg/mL za hloramfenikol i 30 µg/mL za kanamicin.

3.2.2. Izolovanje plazmidne DNK na velikoj skali

Za izolovanje plazmidne DNK, visokog kvaliteta i prinosa, oslobođene endotoksina, korišćen je Endofree plasmid Maxi/Mega Prep Kit (QIAGEN), po uputstvu proizvođača. DNK izolovana na ovaj način je korišćena za transfekciju eukariotskih ćelija u kulturi.

3.2.3. Izolovanje plazmidne DNK na maloj skali

Za izolovanje plazmidne DNK na maloj skali, korišćen je Mini Prep Kit (Qiagen), po uputstvu proizvođača, ili standardna *Mini prep* metoda za izolovanje plazmidne DNK na maloj skali (Maniatis, 1982).

U cilju izolovanja plazmidne DNK metodom *Mini prep*, bakterijske ćelije sa sveže Petri šolje ili glicerolskog stoka zasejavane su u 5 mL medijuma LB sa

odgovarajućim antibioticima. Bakterijska kultura je gajena preko noći na 37 °C, uz intenzivno mućkanje, a zatim su ćelije iz 1,5 mL prekončne kulture istaložene kratkim centrifugiranjem (10 s). Talog je resuspendovan u 50 -100 µL zaostalog supernatanta, nakon čega je liza ćelija izazivana dodavanjem 300 µL pufera TENS [TE pufer (10 mM Tris-HCl, 1 mM Na₂EDTA, pH 8,0), 0,1 N NaOH, 0,5 % SDS]. Precipitacija ostataka ćelija i hromozomske DNK vršena je dodavanjem 150 µL 5M natrijum acetata (pH 5,2) i centrifugiranjem (2 min) u mikrofugi na maksimalnom broju obrtaja. Plazmidna DNK iz supernatanta taložena je dodavanjem 900 µL apsolutnog etanola i centrifugiranjem (2 minuta) na maksimalnom broju obrtaja u mikrofugi. Talog je ispiran dva puta korišćenjem 70% etanola, osušen pod vakumom, a potom rastvoren u 20-40 µL sterilne vode ili TE pufera. Zaostala RNK je eliminisana RNA-zom.

3.2.4. Merenje koncentracije DNK

Za merenje koncentracije DNK korišćen je spektrofotometar NanoVue (GE Healthcare, Life Sciences), po uputstvu za rad sa aparatom.

3.2.5. Analiza DNK na agaroznom gelu

Analiza DNK je vršena elektroforezom u agaroznom gelu odgovarajuće koncentracije (0,8 – 2 %), u zavisnosti od veličine fragmenata DNK. U gelove je pre polimerizacije dodavan etidijum bromid (5 µg/ml). Elektroforeza je tekla u puferu TAE (Tris-acetate-EDTA, 40 mM Tris, 20 mM Na-acetat, 1 mM Na₂EDTA), pri voltaži od 4-7 V/cm. DNK je vizuelizovana izlaganjem gela svetlu talasne dužine 266 nm (UV). Nakon elektroforeze gelovi su dokumentovani kamerom CCD sa BioDocAnalyze sistemom. Veličina fragmenata DNK određivana je poređenjem sa dužinama fragmenata DNK komercijalnih markera.

3.2.6. Reakcija lančanog umnožavanja polimerazom (polymerase chain reaction - PCR)

Reakcija lančanog umnožavanja polimerazom (PCR) je korišćena za umnožavanje dela promotorskog regiona gena *Ankrd2*, kao i za umnožavanje cDNK koja kodira protein Ankrd2, deletiran za prvih 96 aminokiselina. Umnožavanje fragmenata DNK je vršeno korišćenjem Taq DNA Polymerase (Qiagen) i graničnika datih u Tabeli 2. Reakciona smeša od 50 μ L sadržala je pufer za polimerazu (Qiagen), 2,5 mM $MgCl_2$, 0,2 mM dNTP (smeša), po 10 pmol svakog graničnika, 2,5 U polimeraze i 500 ng DNK. Kao matrica, korišćena je genomska DNK humanog porekla, odnosno DNK konstrukta Ankrd2-pGEX-6P-3P. Program za umnožavanje sastojao se od početne denaturacije na 94 °C u trajanju od 5 minuta koju je pratilo 30 ciklusa od kojih je svaki sadržavao denaturaciju na 94 °C u trajanju 30 s, hibridizaciju na 60 °C u trajanju 30 s i elongaciju na 72 °C u trajanju 30 s. Program je završen elongacijom na 72 °C u trajanju 10 minuta.

3.2.7. RT-PCR (reverse transcription polymerase chain reaction)

Za umnožavanje cDNK koje kodiraju humane forme proteina MyoD, Nkx2.5 i CARP, metodom RT-PCR, korišćen je One Step RT-PCR Kit (Qiagen) i graničnici navedeni u Tabeli 2. Kao matrica za MyoD korišćena je komercijalna iRNK izolovana iz humanih skeletnih mišića (Ambion), a u slučaju Nkx2.5 i CARP, korišćena je komercijalna iRNK izolovana iz humanog srca (Ambion). U ovom radu primenjen je „One-step RT-PCR“, što podrazumeva da se reakcije reverzne transkripcije i lančanog umnožavanja polimerazom odvijaju jedna za drugom, u istoj epruveti. U obe reakcije koriste se isti graničnici specifični za gen, čime se postiže veća osetljivost RT-PCR reakcije. Sastav reakcione smeše je dat u Tabeli 3.

Temperaturni profil RT-PCR reakcije prikazan je u Tabeli 4. U fazi lančanog umnožavanja polimerazom, primenjen je program „touchdown“ koji povećava senzitivnost reakcije. Temperatura hibridizacije u početnom ciklusu reakcije je 64 °C. U narednim ciklusima temperatura hibridizacije se smanjuje za po 1 °C, dok se ne postigne temperatura topljenja (T_m) graničnika (50 °C), koja se održava u narednih 29 ciklusa. Na kraju reakcije je finalna elongacija na 72 °C u trajanju od 10 minuta.

Komponenta	Volumen	Finalna koncentracija
Matrica RNK	Varijabilno	100-500 ng iRNK
H ₂ O, „RNase free“	Varijabilno	-
5 x Qiagen OneStep RT-PCR pufer	10 µl	1 x
dNTP Mix (10 mM)	2 µl	400 µM svaki
5 x Q-rastvor	10 µl	1 x
Graničnici specifični za gen	Varijabilno	0,6 µM
Inhibitor RNA-ze	Varijabilno	5-10 U
Qiagen OneStep RT-PCR Enzyme Mix	2 µl	
Finalni volumen	50 µl	

Tabela 3. Komponente reakcione smeše za RT-PCR. Dati su volumeni i finalne koncentracije pojedinačnih komponenti.

Faze reakcije RT-PCR	T / t
Reverzna transkripcija	50 °C / 30 min
Aktivacija polimeraze HotStarTaq i inaktivacija reverzne transkriptaze Omniscript i Sensiscript	95 °C / 15 min
Denaturacija	94 °C / 30 s
Hibridizacija (početna temperatura)	64 °C / 1 min
Hibridizacija (T _m graničnika)	50 °C / 1 min
Elongacija	72 °C / 1 min

Tabela 4. Temperaturni profil ciklusa tokom RT-PCR.

Kao pozitivna kontrola reverzne transkripcije služilo je umnožavanje „housekeeping“ gena ABL (Abelson Murine Leukemia). Produkti reakcije RT-PCR su prečišćeni korišćenjem kita QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen).

3.2.8. Sekvenciranje DNK

Za sekvenciranje DNK je korišćen BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems). Kao matrica u reakciji sekvenciranja korišćena je prečišćena plazmidna DNK. Reakciona smeša za sekvenciranje zapremine 8 µL sadržavala je 150-300 ng prečišćenog plazmida, 3,2 pmol graničnika, i 3 µL BigDye Terminator v3.1 Ready Reaction Mix-a (Applied Biosystems). Reakcija sekvenciranja odvijala se po programu koji se sastojao od inicijalne denaturacije fragmenta od 1 min na 96 °C i 25 ciklusa umnožavanja: 10 s na 96 °C, 5 s na 50 °C i 4 min na 60 °C. Produkti reakcije su taloženi tako što je u 8 µL smeše u kojoj je vršena reakcija sekvenciranja dodavano 40

μ L rastvora A (0,1M Na-acetat pH5,2 rastvoren u etanolu). Talog dobijen nakon 10 minuta centrifugiranja na 13000 obr/min je dva puta ispiran sa 200 μ L hladnog 70 % etanola, a zatim osušen i rastvoren u 20 μ L Hi-Di Formamide (Applied Biosystems). Produkti reakcije sekvenciranja su analizirani kapilarnom elektroforezom na aparatu 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) u komercijalnom polimeru POP-7 Polymer (Applied Biosystems). Za analizu dobijenih sekvenci korišćen je *Sequencing Analysis Software v5.3.1 with KB Basecaller v1.4* (Applied Biosystems).

3.2.9. Digestija DNK restrikcionim enzimima

Vektori su, pre ligacije, sečeni odgovarajućim restrikcionim enzimima proizvođača New England BioLabs ili Fermentas, prema uputstvu proizvođača. Reakcije su se odvijale u odgovarajućim puferima (New England BioLabs ili Fermentas), na temperaturi od 37 °C, tokom 2 h.

Uspešnost kloniranja i prisustvo odgovarajućih fragmenata u konstruktima, je takođe, proveravano digestijom odgovarajućim restrikcionim enzimima.

Sprečavanje samoligacije vektora vršeno je uklanjanjem 5' fosfatnih grupa sa krajeva fragmenata DNK. Nakon završetka digestije vektora, u digestionu smešu je dodavano 10 U alkalne fosfataze CIAP (Calf Intestinal Alkaline Phosphatase), a zatim je uzorak dodatno inkubiran 30 minuta na 37 °C.

3.2.10. Ekstrakcija fragmenata DNK iz agaroznog gela

Fragmenti DNK dobijeni digestijom restrikcionim enzimima ili u reakciji lančane polimerizacije razdvajani su na agaroznim gelovima u puferu TAE. Fragmenti DNK odgovarajuće veličine su isecani iz agaroznog gela i eluirani korišćenjem komercijalnog kita QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen), prema uputstvu proizvođača.

3.2.11. Ligacija fragmenata DNK

Ligacija prečišćenih fragmenata DNK, dobijenih kao produkt reakcije PCR, sa vektorom pGEM-T Easy je vršena pomoću komercijalnog kita pGEM-T Easy Vector System (Promega). Reakciona smeša, ukupne zapremine 10 μ L, je sadržala linearizovani vektor pGEM-T Easy (Promega) i insert u molarnom odnosu 1:3, pufer za

ligazu (Promega) i 1 μL ligaze (10 U/ μL , Promega). Reakcija se odvijala preko noći na 4 °C.

Ligacija prečišćenih fragmenata, dobijenih isecanjem inserta iz vektora pGEM-T Easy, sa vektorima pGEX-6P-3, pCDNA3, pCMVTag 2B i pGL4.1 vršena je pomoću ligaze T4 (New England BioLabs). Reakcija ligacije ukupne zapremine 20 μL sadržala je pufer za ligazu (New England BioLabs), 10 U ligaze T4 (New England BioLabs) i odgovarajući linearizovani vektor i insert u molarnom odnosu 1:3. Reakcija se odvijala preko noći na 16 °C.

3.2.12. Pripremanje kompetentnih bakterijskih ćelija za transformaciju toplotnim šokom

Bakterijske kolonije sa sveže Petri šolje su resuspendovane u 1 mL medijuma SOB. Resuspendovane bakterije su zasejane u 100 mL medijuma SOB koji je sadržavao odgovarajući antibiotik i gajene na 37 °C, na 180 obr/min, dok optička gustina nije dostigla vrednosti $0,3 < \text{OD}_{600} < 0,5$, nakon čega su inkubirane 15 min na ledu. Taloženje ćelija je vršeno centrifugiranjem na 3000 obr/min, 15 min, na 4 °C. Dobijeni talog je resuspendovan u 100 mL hladnog 0,05 M CaCl_2 i inkubiran na ledu 15 min, nakon čega je suspenzija centrifugirana na 3000 obr/min, 15 min, na 4 °C. Dobijen talog je resuspendovan u 4 mL pufera RF2 (10 mM MOPS, 10 mM RbCl, 75 mM CaCl_2 , 15 % glicerol, pH 6,8 (puferisano sa KOH)). Po 200 μL smeše je alikvotirano hladnim nastavcima u hladne tube, inkubirano na ledu 15 min i zamrzavano na -80 °C.

3.2.13. Transformacija kompetentnih bakterijskih ćelija toplotnim šokom

U suspenziju kompetentnih ćelija (200 μL) je dodavana celokupna ligaciona smeša, nakon čega je transformaciona smeša inkubirana 1 h na ledu, 2 minuta na 42 °C, a potom 5 min na ledu. Oporavak ćelija se odvijao 30 minuta na 37 °C, nakon dodavanja 400 μL medijuma LB. Na selektivnu podlogu je zatim nanošeno svih 600 μL smeše, nakon čega su Petri šolje inkubirane na 37 °C.

3.2.14. Analiza transformanata

Uspešnost kloniranja je proveravana na nivou ekspresije proteina, analizom fragmenata DNK nakon digestije i sekvenciranjem.

Nekoliko kolonija transformanata sa Petri šolja je zasejavano u 2 mL medijuma TB sa odgovarajućim antibiotikom. Kulture su gajene preko noći na 37 °C uz intenzivno mućkanje. Sledećeg dana, 0.5 mL prekonocne kulture je dodavano u 1,5 mL svežeg medijuma TB koji je sadržavao odgovarajuće antibiotike. Razblažena kultura je inkubirana 30 minuta na 37 °C, a zatim su bakterije taložene centrifugiranjem 1 minut na 13000 obr/min. Talog bakterija je resuspendovan u 100 µL pufera B (100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris-HCl, 8 M urea, pH 6.3), a onda pomešan sa 2 puta koncentrovanim puferom za uzorak (50 mM Tris-HCl, pH 6,8, 4 % SDS, 20 % glicerol, 5 % β-merkaptotanol, boja bromfenolplavo) i inkubiran 5 min na 95 °C. Proteini su analizirani na SDS poliakrilamidnim gelovima. Nakon elektroforeze, gelovi su bojani po proceduri opisanoj u odeljku 3.2.26.

Iz uzoraka kod kojih je detektovan protein odgovarajuće veličine, vršeno je prečišćavanje na maloj skali (u malim zapreminama) eksprimiranog proteina radi utvrđivanja optimalnih uslova za prečišćavanje i eluciju.

Ispravnost konstrukata na nivou nukleotidne sekvence proveravana je automatskim sekvenciranjem.

3.2.15. Čuvanje transformanata

Dobijeni transformanti su vijabilni na čvrstim LB podlogama svega nekoliko nedelja, tako da su za duže čuvanje pripremani i zamrzavani glicerolski stokovi. U mikro tubu sa 150 µL sterilnog 100 % glicerola dodavano je po 850 µL tečne prekonocne bakterijske kulture i smeša je zamrzavana u tečnom azotu. Glicerolski stokovi su vijabilni duži niz godina na -80 °C.

3.2.16. Kloniranje

Konstrukti MyoD-pCDNA3, CARP-pCDNA3, Nkx2.5-pCDNA3, Nkx2.5-pCMVTag 2B. Kloniranje cDNK za humane forme proteina MyoD, Nkx2.5 i CARP je vršeno tako što su regioni od interesa amplifikovani metodom RT-PCR korišćenjem graničnika prikazanih u Tabeli 2 i komercijalne iRNK. Za kloniranje cDNK za MyoD kao matrica, korišćena je iRNK izolovana iz humanih mišića (Ambion), a za Nkx2.5 i CARP korišćena je iRNK humanog srca (Ambion). Umnoženi fragmenti su prečišćeni kitom (QIAquick PCR Purification Kit, Qiagen) i uklonirani u pGEM-T-Easy vektor (Promega), odakle su isecani enzimima *Bam*HI i *Xho*I. Izbačeni fragmenti su elektroforezom na agaroznom gelu razdvojeni od linearizovanog plazmida i prečišćeni (QIAquick Gel Extraction Kit, Qiagen), a potom ligacijom ubačeni u vektor pCDNA3 koji je obrađen restrikcijom enzimima - *Bam*HI i *Xho*I. Korišćenjem istih restrikcijom enzima (*Bam*HI i *Xho*I), izvršeno je i kloniranje cDNK za Nkx2.5 iz vektora pGEM-T-Easy u vektor pCMVTag 2B.

Konstrukt PromA-pGL4.1 Deo promotorskog regiona gena *Ankrd2*, amplifikovan je metodom PCR, korišćenjem graničnika prikazanim u Tabeli 2. Kao matrica u reakciji, korišćena je humana genomska DNK. Umnoženi fragmenti DNK su prečišćeni (QIAquick PCR Purification Kit, Qiagen) i uklonirani u pGEM-T-Easy vektor (Promega), a iz ovog vektora je fragment DNK od interesa isecan restrikcijom enzimima *Xho*I i *Hind*III. Izbačeni fragment je elektroforezom na agaroznom gelu razdvojen od linearizovanog plazmida i prečišćen (QIAquick Gel Extraction Kit Qiagen), a potom ligacijom ubačen u vektor pGL4.1, koji je obrađen istim restrikcijom enzimima - *Xho*I i *Hind*III.

Konstrukt PML-pCMVTag 2B. Rekombinantni gen za humani PML kloniran je u pCMVTag 2B, prebacivanjem inserta iz konstrukta PML-HA-pCDNA3 u vektor pCMVTag 2B, korišćenjem restrikcijom enzima *Bam*HI i *Eco*RI.

Konstrukt SA-pGEX-6P-3. U cilju formiranja konstrukta koji je omogućio ekspresiju proteina *Ankrd2* deletiranog za prvih 96 aa, odgovarajući fragment DNK umnožen je reakcijom lančane polimerizacije polimerizacije (PCR), korišćenjem graničnika prikazanim u Tabeli 2. Kao matrica, korišćen je konstrukt *Ankrd2*-pGEX-6P-3 koji sadrži ukloniranu cDNK za kompletni humani protein *Ankrd2*. Umnoženi fragment je prečišćen i ukloniran u vektor pGEM-T-Easy, a iz ovog vektora je isecan restrikcijom enzimima *Bam*HI i *Eco*RI. Fragment od interesa je prečišćen

komercijalnim kitom, a zatim ligacijom ubačen u vektor pGEX-6P-3, predhodno obrađen restrikcionim enzimima *Bam*HI i *Eco*RI.

3.2.17. Gajenje sisarskih ćelija u kulturi

Ćelijske linije su održavane prema opštim smernicama koje se preporučuju za rad sa ćelijskom kulturom, uz respektovanje specifičnosti koje karakterišu svaku ćelijsku liniju (Davis, 2002).

Ćelije cos7 i C2C12 su gajene u medijumu koji je sadržavao DMEM sa L-glutaminom i glukozom u koncentraciji 4,5 g/L (PAA Laboratories), 10 % FBS (Fetal Bovine Serum, PAA Laboratories) i gentamicin u finalnoj koncentraciji 50 µg/mL. Pasažiranje je vršeno kada je konfluentnost ćelija bila približno 80 %, tako što im je nakon ispiranja puferom PBS (137 mM NaCl, 3,4 mM KCl, 1,8 mM KH₂PO₄, 10 mM Na₂HPO₄) dodavan rastvor tripsina i EDTA [0,05 % tripsin, 0,02 % EDTA u D-PBS (Dulbecco's phosphate-buffered saline), (PAA Laboratories)]. Nakon kratkotrajnog delovanja tripsina (2 min), aktivnost enzima je zaustavljena dodavanjem medijuma sa serumom. Ćelije su resuspendovane, izbrojane, a zatim zasejavane u odgovarajućem razblaženju ili pripremane za zamrzavanje.

U cilju zamrzavanja, suspenzija ćelija je centrifugirana 5 minuta na 1500 obr/min u kliničkoj centrifugi (Biosan LMC 3000), nakon čega je talog resuspendovan u puferu za zamrzavanje – 10 % DMSO (Dimetil sulfoksid) u FBS. Suspenzija ćelija je razdeljena u kriotube i zamrzavana postupno, do temperature tečnog azota (-198 °C).

Zasejavanje ćelija vršeno je brzim odmrzavanjem alikvota ćelija i resuspendovanjem u zagrejanom kompletnom medijumu.

3.2.18. Tranzientna transfekcija adherentnih ćelija

Transfekcija ćelija u kulturi vršena je 24 h nakon što su ćelije pasažirane i zasejane u Petri šolje ili „12 well plates”. U momentu transfekcije, konfluentnost ćelija je dostizala 40-60 %. Nakon ispiranja u puferu PBS, vršena je transfekcija po uputstvu proizvođača reagensa za transfekciju.

Za transfekciju ćelija cos7 konstruktima YB1-FLAG-pCDNA3, PML-pCMVTag2B, p53-pEGFP-C1 i Nkx2.5-pCMVTag2B korišćen je reagens PolyFect (Qiagen). Za poterbe promotorskih eseja, kotransfekcija ćelija C2C12 konstruktima

PromA-pGL4.1, pRL-TK, MyoD-pCDNA3, Nkx2.5-pCDNA3, p53-pCDNA3 i CARP-pCDNA3 vršena je korišćenjem reagensa SuperFect (Qiagen).

3.2.19. Pripremanje proteinskih ekstrakata ćelija u kulturi

Proteinski ekstrakti ćelija cos7 su pripremani kako iz netransfekovanih ćelija tako i iz ćelija transfekovanih konstruktima YB1-FLAG-pCDNA3, PML-pCMVTag2B, p53-pEGFP-C1 i Nkx2.5-pCMVTag2B. Ekstrakti netransfekovanih ćelija su pripremani 24 časa nakon zasejavanja, a u slučaju transfekovanih, 24 časa nakon transfekcije. Za lizu netransfekovanih ćelija kao i ćelija koje su transfekovane konstruktima YB1-FLAG-pCDNA3, PML-pCMVTag2B korišćen je pufer E1a [250 mM NaCl, 50 mM Hepes, pH 8,0, 0,1 % NP40 sa inhibitorima proteaza (Complete EDTA free, ROCHE)], dok su ćelije cos7 transfekovane konstruktima p53-pEGFP-C1 i Nkx2.5-pCMVTag2B, lizirane u puferu EBC [50 mM TrisHCl pH 7,5, 120 mM NaCl, 0,5 % NP40, inhibitori proteaza (Complete EDTA free, ROCHE)]. Pre izlaganja litičkom puferu, ćelije su oprane dva puta kompletnim puferom PBS (137 mM NaCl, 3,4 mM KCl, 1,8 mM KH_2PO_4 , 10 mM Na_2HPO_4 , 1 mM CaCl_2 , 1 mM MgCl_2). Nakon poslednjeg ispiranja, dodavano je po 1 mL kompletnog pufera PBS u svaku šolju, pa su ćelije „scraper”-om skinute sa šolje. Suspenzija ćelija je centrifugirana 1 minut u kliničkoj centrifugi na 1500 obr/min, nakon čega je talog resuspendovan u 200 μL pufera za lizu. Ukoliko je za lizu korišćen EBC pufer, uzorak je inkubiran na ledu 20 minuta, nakon čega su lizati centrifugirani u mikrofugi, 10 min, na maksimalnom broju obrtaja, na 4 °C. Lizati ćelija u puferu E1a, podvrgavani su sonikaciji u dva pulsa u trajanju po 5 s, nakon čega su centrifugirani 10 min, u mikrofugi na maksimalnom broju obrtaja, na 4 °C. Supernatanti su do upotrebe čuvani na -80 °C.

3.2.20. Pripremanje citoplazmatskih i jedarnih ekstrakata

Citoplazmatski i jedarni ekstrakti su dobijani iz ćelija C2C12 koje su tretirane citokinom TNF- α , u cilju aktivacije transkripcionog faktora NF κ B. Ćelije su tretirane rastvorom TNF- α , 24 časa nakon pasažiranja, u finalnim koncentracijama 1 ng/mL i 20 ng/mL, a 24 časa nakon tretmana, ćelije su ispirane kompletnim puferom PBS, resuspendovane u 500 μL istog pufera i centrifugirane 5 minuta na 9000 obr/min na 4 °C. Talog je resuspendovan u 150-200 μL pufera A [10 mM Hepes-KOH pH 7,8, 1,5

mM MgCl₂, 10 mM KCl, 0,5 mM DTT, inhibitori proteaza (Complete EDTA free, ROCHE)] i inkubiran na ledu 10 minuta, posle čega je dodavan 10 % Triton X-100 u količini koja odgovara 1/30 od volumena pufera A dodatog u prethodnom koraku. Uzorak je vorteksovan 30 s, a zatim centrifugiran 1 min na 11000 obr/min, na 4 °C. U citoplazmatski ekstrakt u vidu supernatanta dodavan je pufera B [0,3 mM Hepes-KOH, pH 7,8, 30 mM MgCl₂, 1,4 mM KCl, inhibitori proteaza (Complete EDTA free, ROCHE)] u zapremini koja čini 11 % volumena pufera A prethodno dodatog u uzorak. Jedarni talog je resuspendovan u puferu C [20 mM Hepes-KOH, pH 7,8, 1,5 mM MgCl₂, 0,42M NaCl, 25 % glicerol, 0,2 mM EDTA, 0,5 mM DTT, inhibitori proteaza (Complete EDTA free, ROCHE)] u zapremini koja odgovara 1/5 zapremine pufera A. Jedarni i citoplazmatski ekstrakti su zatim centrifugirani na 14 000 obr/min, na 4 °C, nakon čega su supernatanti deponovani na -80 °C, gde su čuvani do upotrebe.

3.2.21. Indukcija ekspresije rekombinantnih proteina fuzionisanih sa GST u *E. coli*

Sa sveže Petri šolje ili glicerolskog stoka odgovarajućeg bakterijskog klona sterilnom ezom zasejavane su bakterije u 10 mL medijuma TB sa odgovarajućim antibioticima. Kultura je inkubirana preko noći na 27 °C, a zatim je razblaživana 10 puta (do 100 mL) medijumom TB koji sadrži odgovarajuće antibiotike. Kultura je inkubirana na 27 °C uz povremeno merenje optičke gustine. U logaritamskoj fazi rasta, pri optičkoj gustini OD=0,4-0,6 dodavan je IPTG (izopropil-β-D-tiogalaktopiranozid) do finalne koncentracije 0,5 mM, nakon čega je kultura dodatno inkubirana 3 h na 27 °C. Bakterijske ćelije su taložene centrifugiranjem 20 minuta na 4000 obr/min u stonog centrifugi (Eppendorf 5804R) na 4 °C. Talozni bakterija su zamrzavani na -20 °C, gde su čuvani do sledeće faze rada.

3.2.22. Ispitivanje rastvorljivosti rekombinantnih proteina fuzionisanih sa GST, eksprimiranih u *E. coli*

Talog bakterija dobijen centrifugiranjem 10 mL bakterijske kulture je resuspendovan u 2 mL pufera za lizu koji sadrži inhibitore proteaza. Resuspendovane bakterijske ćelije su sonifikovane sa tri pulsa, amplitude 70, u trajanju od 10 sekundi, na ledu (Sonikator Fisher 300), a zatim centrifugirane 15 min na 13000 obr/min, na 4 °C. Nakon centrifugiranja, 10 μL supernatanta koji je sadržavao rastvorljivi rekombinantni

protein je odvajano za analizu elektroforezom na denaturišućem poliakrilamidnom gelu. Talog sa nerastvorljivom frakcijom proteina je resuspendovan u 100 μ L denaturišućeg pufera B, a 10 μ L je odvajano za analizu na denaturišućem poliakrilamidnom gelu.

Nakon elektroforeze u denaturišućim poliakrilamidnim gelovima, proteini su vizuelizovani bojenjem gelova kako je opisano u poglavlju 3.2.26.

Upoređivana je količina rekombinantnog proteina u solubilnoj i nesolubilnoj frakciji za različite puferne u kojima je vršena liza bakterija. Za prečišćavanje proteina u daljem radu, korišćen je pufer koji je omogućio najveći prinos rekombinantnog proteina u solubilnoj frakciji.

3.2.23. Prečišćavanje rekombinantnih proteina fuzionisanih sa GST u nedenaturišućim uslovima

Talog bakterija dobijen centrifugiranjem 50 mL bakterijske kulture je resuspendovan u 10 mL pufera za lizu koji sadrži inhibitore proteaza (Complete EDTA free, ROCHE). Za prečišćavanje proteina Ankrd2-GST, i njegovih deletanata korišćen je pufer sastava 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 5 % glicerol, 1 % Triton X-100, 2 mM DTT, dok je u slučaju proteina Nkx2.5-GST za lizu korišćen pufer sastava 1 % Triton X-100, 0,2 % SDS, 0,5 % Nonidet P40, 0,1 % Tween 20, PBS-ECL (80 mM Na_2HPO_4 , 20 mM NaH_2PO_4 , 100 mM NaCl, pH 7,5). Nakon resuspendovanja, ćelije su sonifikovane sa tri pulsa, amplitude 70, u trajanju 10 sekundi (Sonikator Fisher 300), na ledu. Sonikat je zatim centrifugiran 10 min na 13000 obr/min, na 4 °C u stonjoj centrifugi (Eppendorf, 5417R). U ćelijski lizat oslobođen nerastvorljivog materijala dodavano je 0,5 mL pripremljenog matriksa. Matriks je pripreman tako što je 1 mL suspenzije glutation sefaroze 4B (GE Healthcare), istaložen kratkim centrifugiranjem, nakon čega je glutation sefaroza oprana dva puta u 10 mL pufera PBS-ECL. Vezivanje proteina za matriks se odvijalo 1 h na 4 °C, uz konstantno mešanje na rotacionom točku. Nespecifično vezani proteini su uklanjani pranjem matriksa puferom PBS-ECL koji je sadržavao i inhibitore proteaza (Complete EDTA free, ROCHE), tri puta po pet minuta na 4 °C. Za dalji rad su korišćeni rekombinantni proteini vezani za matriks, tako što je glutation sefaroza 4B sa vezanim rekombinantnim proteinima resuspendovana u 200 μ L pufera PBS-ECL sa proteaznim inhibitorima.

3.2.24. Merenje koncentracije proteina

Koncentracija ukupnih proteina u uzorku je merena korišćenjem komercijalnog reagensa Bradford Reagent ready-to-use (Fermentas), po uputstvu proizvođača.

3.2.25. Elektroforeza proteina u denaturišućem gelu

Elektroforeza proteina u denaturišućem gelu se uvek vrši u diskontinualnom sistemu gelova. Gel za koncentrovanje (*stacking gel*) omogućava homogenizaciju uzoraka i sadrži 6 % poliakrilamid, 0,12 M Tris-HCl, pH 6,8, 0,1 % SDS, 1,4 % amonijumpersulfat i 0,14 % TEMED. Gel za razdvajanje (*running gel*) u kome se proteini uzorka razdvajaju na osnovu molekulske mase, sadrži odgovarajuću koncentraciju poliakrilamida (10-15 %), 428 mM Tris-HCl pH 8,8, 0,1 % SDS, 0,7 % amonijumpersulfat i 0,04 % TEMED. Uzorci se pripremaju tako da pufer za uzorak finalno bude 25 mM Tris-HCl, pH 6,8, 2 % SDS, 10 % glicerol, 0,250 mM β merkaptotanol, 0,1 % boja bromfenolplavo, a zatim se denaturišu kuvanjem 5 min na 95 °C, posle čega se nanose na gel. Elektroforeza se odvija u TG (Tris-Glycine) puferu (25 mM Tris-HCl, pH 8,8, 250 mM glicin, 0,1 % SDS), pod konstantnim naponom od 100 V u gelu za koncentrovanje i 180 V u gelu za razdvajanje. Zajedno sa uzorcima, na gel se nanosi marker odgovarajućih molekulskih masa.

Posle elektroforeze, gelovi su bojani, ili je vršen prenos proteina na membranu u cilju njihove detekcije metodom Western blot.

3.2.26. Bojenje poliakrilamidnih gelova (vizuelizacija proteina)

Bojenje poliakrilamidnih gelova u cilju vizuelizacije proteina, vršeno je na dva načina :

-bojenjem komasi plavim (0,4 % komasi plavo, 10 % sirćetna kiselina i 40 % metanol), nakon čega su odbojavani u rastvoru 7 % sirćetne kiseline i 25 % metanola;

-komercijalnim preparatom PageBlue Protein Staining Solution (Fermentas), po uputstvu proizvođača.

3.2.27. Prenos proteina na membranu (polusuvi elektro-transfer)

Prenos proteina sa denaturišućih poliakrilamidnih gelova na membrane vršen je polusuvim elektro-transferom korišćenjem aparata Fastblot B43 (Whatman, Biometra).

Nakon razdvajanja proteina elektroforezom, gel je inkubiran u katodnom puferu (25 mM Tris-HCl pH 9,4, 40 mM glicin, 20 % metanol). Membrana od polivinilidinafluorida (Imobilion-P, Millipore), je aktivirana potapanjem u metanol 1-2 s, ispirana u vodi 5 min, i inkubirana u anodnom puferu II (25 mM Tris-HCl pH 10,4, 20 % metanol) 5 minuta. Nakon toga formiran je "sendvič" po sledećem rasporedu: na donju, anodnu ploču aparata za transfer, koja je nakvašena anodnim puferom I (300 mM Tris-HCl pH 10,4, 20 % metanol) stavljana su 2 sloja 3 MM papira potopljenih u anodni pufer I; preko ovoga, stavljan je jedan 3MM papir natopljen u anodni pufer II; zatim je stavljana aktivirana membrana, a preko nje gel; kao poslednji sloj stavljana su 3 3MM papira natopljena u katodni pufer. Transfer je trajao 35-40 minuta (u zavisnosti od veličine proteina) pri maksimalnoj struji od 5 mA po 1 cm² membrane.

3.2.28. „Western blot”

Posle transfera, membrana je inkubirana u puferu PBS-ECL sa 5 % bezmasnim mlekom i 0,1 % Tween 20, preko noći, nakon čega je ispirana rastvorom PBS-ECL, 0,1% Tween 20. Inkubacija sa primarnim antitelom se odvijala 1-1,5 h u puferu PBS-ECL koji sadrži 5 % bezmasno mleko i 0,1 % Tween 20, na sobnoj temperaturi, uz blago mućkanje. Nespecifično vezana primarna antitela su uklanjana pranjem membrane 4 puta po 15 minuta u puferu PBS-ECL, 0,1 % Tween 20. Membrana je zatim inkubirana 1 h sa sekundarnim antitelom koje je konjugovano sa peroksidazom rena. Nespecifično vezana sekundarna antitela su uklanjana pranjem membrane 4 puta po 15 minuta u puferu PBS-ECL, 0,1 % Tween 20, nakon čega je vršena detekcija signala.

3.2.29. Detekcija proteina hemiluminiscencijom

Detekcija proteina hemiluminiscencijom predstavlja neradioaktivnu metodu za detekciju imobilizovanih antigena konjugovanih za antitela za koja je vezana peroksidaza rena (engl. HRP, Horseradish Peroxidase). Ovaj enzim katalizuje reakciju u kojoj se supstrat (Lumigen PS-3 akridan) prevodi u jedinjenje koji emituje svetlost, tj. daje hemiluminiscentni signal sa maksimalnom emisijom na talasnoj dužini od 430 nm.

Signal je vizuelizovan izlaganjem filmova za radiografije na membrane koje su prethodno tretirane reagensima za izazivanje hemiluminiscencije.

U ovom radu, za izazivanje hemiluminiscencije korišćeni su komercijalni reagensi Immobilion™ Western Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore) ili ECL Plus Western Blotting Detection System (GE Healthcare), po uputstvu proizvođača.

Korišćena antitela prikazana su u Tabeli 1.

3.2.30. „GST pull down”

Metoda „GST pull down” koristi se za ispitivanje proteinsko–proteinskih interakcija u *in vitro* uslovima. Protein od interesa, koji je preko proteina GST vezan za matriks od glutation-sefaroze se inkubira sa proteinskim ekstraktima. Proteini koji interaguju sa proteinom od interesa stvaraju kompleks koji se zadržava na matriksu. Nespecifično vezani proteini se uklanjaju pranjem matriksa u prisustvu blagog deterdženta, nakon čega se proteini zaostali na matriksu analiziraju elektroforezom na denaturišućem poliakrilamidnom gelu i detektiju „Western blot” metodom (Haian, 2004).

Interakcije deletanata proteina Ankrd2 sa proteinima p53, YB1, PML i teletoninom. Za glutation sefarozu 4B (GE Healthcare) vezani su rekombinantni proteini Ankrd2-GST, N-GST, NA-GST, AC-GST, C-GST i SA-GST, kao i sam GST kao negativna kontrola. Kao izvor proteina koji se vezuju za Ankrd2 korišćeni su ekstrakti netransfekovanih cos7 ćelija (u slučaju p53), ćelija cos7 transfekovanih odgovarajućim ekspresionim vektorima (u slučaju YB1 i PML), kao i ekstrakti ćelija U2OS u kojima je eksprimiran rekombinantni protein teletonin. Reakcije vezivanja su se odvijale u puferu E1a, u finalnoj zapremini od 200 μ L, uz blago mešanje na rotacionom točku 1 h, na 4 °C. Nakon vezivanja, kompleksi su taloženi centrifugiranjem 1 min na 1500 obr/min, na 4 °C. Proteini nespecifično vezani za matriks su uklanjani pranjem matriksa u 500 μ L pufera E1a sa inhibitorima proteaza. Sefaroza sa imobilisanim kompleksima je resuspendovana u puferu za uzorak i inkubirana 5 min na 95 °C. Proteini u uzorcima su razdvajani elektroforezom na denaturišućim poliakrilamidnim gelovima, nakon čega je vršen njihov transfer na membranu i detekcija proteina p53, YB1, PML i teletonina metodom Western-blot.

Interakcija rekombinantnih proteina p53-GFP i Nkx2.5-GST. Nkx2.5-GST je imobilisan na glutation sefarozu 4B i inkubiran sa ekstraktom ćelija cos7

transfekovanih konstruktom p53-pEGFP u puferu EBC u ukupnoj zapremini od 500 μ L. Vezivanje se odvijalo 12 h na 4 $^{\circ}$ C, uz blago mešanje na rotacionom točku. Nakon vezivanja kompleks je taložen centrifugiranjem od 1 min na 1500 obr/min, na 4 $^{\circ}$ C. Nespecifično vezani proteini su uklanjani pranjem matriksa u 800 μ L EBC pufera sa proteaznim inhibitorima. Matriks je resuspendovan u puferu za uzorak i inkubiran 5 minuta na 95 $^{\circ}$ C. Proteini u uzorcima su razdvajani elektroforezom u denaturišućim poliakrilamidnim gelovima, nakon čega je vršen njihov transfer na membranu i detekcija proteina p53 antitelom na ovaj protein.

3.2.31. Koimunoprecipitacija

Koimunoprecipitacija je metoda koja se koristi za ispitivanje proteinsko-proteinskih interakcija u *in vivo* uslovima. Po principu ove metode, ako dva proteina međusobno interaguju, imunoprecipitacija jednog od njih dovešće do ko-precipitacije drugog, što se može potvrditi antitelom na drugi protein (Haian, 2004).

Interakcija proteina p53-GFP i Nkx2.5-FLAG. Proteinski ekstrakt ćelija C2C12 u kojima su eksprimirani proteini p53-GFP i Nkx2.5-FLAG, inkubiran je sa matriksom za koji je vezano antitelo na FLAG (Ezview Red ANTI-FLAG M2 Affinity Gel, Sigma). Vezivanje se odvijalo u puferu EBC, u ukupnoj zapremini od 500 μ L, 1 h, na 4 $^{\circ}$ C, uz blago mešanje na rotacionom točku. Nakon vezivanja kompleks je taložen centrifugiranjem 1 min na 1500 obr/min, na 4 $^{\circ}$ C. Nespecifično vezani proteini su uklanjani pranjem matriksa u 800 μ L pufera EBC sa proteaznim inhibitorima. Istaloženi matriks je resuspendovan u puferu za uzorak (125 mM Tris-HCl, pH 6,8, 4 % SDS, 20 % glicerol, 100 mM DTT, BPP) i inkubiran 5 min na 95 $^{\circ}$ C. Proteini u uzorcima su razdvajani elektroforezom na denaturišućim poliakrilamidnim gelovima, nakon čega je vršen njihov transfer na membranu i detekcija p53, korišćenjem antitela na p53.

3.2.32. Dualni luciferazni promotorski eseji

Promotorski eseji omogućavaju analizu aktivnosti promotora od interesa, pod uticajem različitih faktora (Avison, 2007). Jedan tip ovakvih eseja je luciferazni esej gde je promotor od interesa ukloniran u vektor pGL4.1 (Promega) koji kao reporterski protein eksprimira luciferazu svica (*Photinus pyralis*). U dualnim luciferaznim promotorskim esejima, osim luciferaze *P. pyralis*, kao drugi reporter, se koristi luciferaza morskog organizma *Renilla reniformis*, koja se eksprimira sa vektora pRL-TK (Promega) i služi za normalizaciju aktivnosti reporterskog proteina *P. pyralis*, odnosno za praćenje efikasnosti transfekcije ćelija.

Ćelije C2C12 su kotransfekovane sa 500 ng konstrukta PromA-pGL4.1, 50 ng vektora pRL-TK, i rastućim koncentracijama odabranih konstrukata: MyoD-pCDNA3, Nkx2.5-pCDNA3, p53-pCDNA3 i CARP-pCDNA3. Količina DNK kojom su transfekovane ćelije je održavana konstantnom uz pomoć plazmida pCDNA3. Nakon 24 h od transfekcije, ćelije su ispirane dva puta u po 1 mL kompletnog pufera PBS. Nakon dodavanja 200 μ L pufera za lizu (Passive Lysis Buffer, Promega) ćelije su inkubirane 30 min na ledu. Nakon inkubacije, dobijeni ćelijski ekstrakti su centrifugirani 30 s na 13000 obr/min, a supernatanti koji sadrže proteine ćelijskih ekstrakata deponovani na -80 °C.

Aktivnosti luciferaze *P. pyralis* i luciferaze *R. reniformis* u lizatima ekstrakata ćelija je merena pomoću komercijalnog kita DualGlo Luciferase Assay (Promega) na aparatu GloMax 20/20 Luminometer (Promega). Metoda se zasniva na merenju aktivnosti luciferaze *P. pyralis* i luciferaze *R. reniformis* u istom uzorku. Aktivnost navedenih enzima dovodi do hemijskih reakcija u kojima se emituje svetlost, čiji se intenzitet meri pomoću luminometra. Prvo se meri aktivnost luciferaze *P. pyralis* dodavanjem reagensa LAR II (Luciferase Assay Reagent II), u kome se nalazi luciferin koji luciferaza *P. pyralis* prevodi u oksiluciferin uz emitovanje svetlosti, čime se generiše stabilan luminescentni signal. Ovaj signal se gasi dodavanjem reagensa STOP & Glo Reagent, u kome se nalazi celenterazin koji luciferaza *R. reniformis* prevodi u celenteramid uz emitovanje svetlosti, čime se ujedno generiše signal za merenje aktivnosti luciferaze *R. reniformis* koji se sam postepeno gasi tokom merenja. Analiza se vrši na uzorku od 10 μ L ćelijskih ekstrakata pripremljenih u Passive Lysis Buffer, a za merenje se koristi po 50 μ L reagenasa LAR II i STOP & Glo Reagent.

3.2.33. Statistička analiza

Za statističku analizu podataka, korišćen je Studentov t-test, sa nivoom statističke značajnosti od 0,05.

4. REZULTATI

4.1. Ispitivanje uticaja transkripcionih faktora MyoD, p53, Nkx2.5 i NF-kB na aktivnost promotora gena *Ankrd2*

U ovoj studiji ispitivan je uticaj transkripcionih faktora MyoD, p53, Nkx2.5 i NF-kB na aktivnost promotora gena za humanu formu proteina *Ankrd2*. Za analizu je odabran deo promotora gena *Ankrd2* od 446 bp (-439/+7) u okviru kojeg je identifikovan minimalni promotorski region koji obezbedjuje prostornu i vremensku specifičnost ekspresije gena *Ankrd2* u skeletnim mišićnim ćelijama (Pallavicini *et al.*, 2001). Bioinformatička analiza ovog regiona je pokazala postojanje potencijalnih mesta za vezivanje transkripcionih faktora MyoD, Nkx2.5, p53, i NF-kB (Slika 4). Podaci iz literature pokazuju da su pomenuti transkripcioni faktori važni za diferencijaciju i plastičnost poprečno prugaste mišićne ćelije (MyoD, Nkx2.5), kao i za odgovor mišićne ćelije na različite vrste stresa (p53, NF-kB), pa je ispitivanje njihovog uticaja na aktivnost promotora gena *Ankrd2* bilo naučno relevantno.

Kao metoda za analizu uticaja odabranih transkripcionih faktora na aktivnost promotora gena *Ankrd2* korišćeni su dualni luciferazni promotorski eseji, a kao eksperimentalni model izabrane su mišje nediferencirane mišićne ćelije C2C12. Proksimalni region promotora gena *Ankrd2* dužine 446 bp (-439 do +7) kloniran je u reporterski vektor pGL4.1 ispred gena za luciferazu *Photinus pyralis* (PromA-pGL4.1), čija je aktivnost direktno uslovljena aktivnošću ukloniranog promotora. Drugi reporterski protein je bila luciferaza *Renilla reniformis*, koja se iskprimira sa drugog konstrukta (pRL-TK) i služi za normalizaciju aktivnosti prvog reporterskog proteina, odnosno za praćenje efikasnosti transfekcije ćelija. Odnos aktivnosti luciferaze *P. pyralis* i aktivnosti luciferaze *R. reniformis* izražen je kao relativna aktivnost luciferaze i ova vrednost je korišćena za poređenje promotorske aktivnosti u različitim uzorcima. Aktivnost promotora gena *Ankrd2* je ispitivana u prisustvu rekombinantnih humanih formi faktora MyoD, Nkx2.5 i p53, kao i endogenog faktora NF-kB ćelija C2C12.

cDNK koje kodiraju transkripcione faktore MyoD, Nkx2.5 i p53 su uklonirane u ekspresioni vektor pCDNA3 koji obezbeduje visoku i efikasnu ekspresiju u

eukariotskim ćelijama. Formirani konstrukti (MyoD-pCDNA3, Nkx2.5-pCDNA3, p53-pCDNA3 i PromA-pGL4.1), kao i komercijalni pRL-TK, su propagirani u ćelijama DH5 α i izolovani po protoklu koji obezbeđuje visok kvalitet i prinos plazmidne DNK, oslobodjene endotoksina bakterija koji negativno utiču na efikasnost transfekcije. Koncentracija DNK je precizno merena na spektrofotometru.



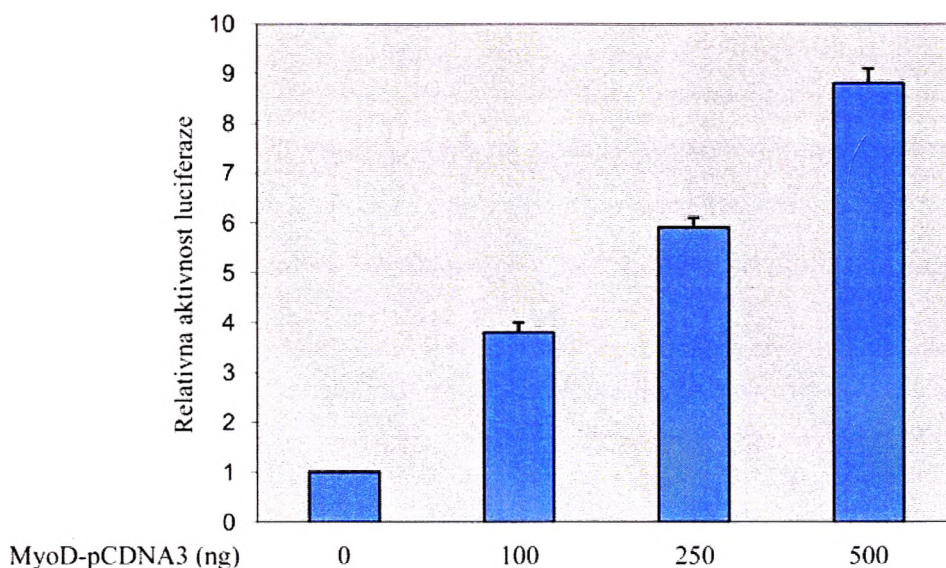
Slika 4. Rezultat analize promotorskog regiona (-439/+7) gena *Ankrd2* programom TF Bind. Označena su potencijalna mesta za vezivanje transkripcionih faktora MyoD, Nkx2.5, p53 i NFkB, kao i CAAT boks, start transkripcije (+1) i translacije (ATG).

Mišje mišićne ćelije C2C12 su kotransfekovane reporterskim konstruktima PromA-pGL4.1 i pRL-TK, u kombinaciji sa konstruktima koji kodiraju proteine čiji je uticaj na promotor analiziran (MyoD-pCDNA3, Nkx2.5-pCDNA3, p53-pCDNA3). Aktiviranje konstitutivno eksprimiranog transkripcionog faktora NF-kB vršeno je tretiranjem transfekovanih ćelija citokinom TNF α . U svakom eksperimentu ukupna količina DNK kojom je vršena transfekcija, održavana je konstantnom pomoću DNK ekspresionog vektora pCDNA3. Dvadeset četiri časa nakon transfekcije, ćelije su lizirane i merena je aktivnost luciferaza (*P. pyralis* i *R. reniformis*). Eksperimenti su izvođeni u tehničkom triplicatu, a rezultati su prikazani kao srednja vrednost najmanje tri nezavisna eksperimenta sa standardnom greškom srednje vrednosti (\pm SEM, standard error of mean). Vrednosti relativne aktivnosti luciferaze različitih uzoraka su poređene statistički, Studentovim t-testom.

4.1.1. Ispitivanje uticaja transkripcionog faktora MyoD na aktivnost promotora gena *Ankrd2* u ćelijama C2C12

Iako je jedna grupa autora dala dokaze da je gen *Ankrd2* pod kontrolom transkripcionog faktora MyoD (Bean *et al.*, 2005), potvrda ove relacije drugim metodološkim pristupom je bila opravdana, kako zbog naučnog značaja, tako i zbog optimizacije dualnog luciferaznog promotorskog eseja za dalja istraživanja.

Eksperimenti su dizajnirani tako što su nediferencirane mišje mišićne ćelije C2C12 transfekovane sa 500 ng PromA-pGL4.1, 50 ng pRL-TK i rastućim količinama MyoD-pCDNA3, kako je prikazano na Slici 5. Uticaj faktora MyoD na aktivnost ispitivanog promotora analiziran je u rasponu količina DNK konstrukta MyoD-pCDNA3 od 100 ng do 500 ng. Aktivnost luciferaza je merena u ekstraktima ćelija, 24 h nakon transfekcije. Relativna aktivnost luciferaze izmerena u ekstraktima ćelija u kojima nije eksprimiran MyoD, uzeta je kao jedinična/referentna vrednost (Slika 5, 1. stubac). Vrednost relativne aktivnosti luciferaze ekstrakata ćelija u kojima je eksprimiran rekombinantni MyoD je pokazivala dozno zavisno povećanje u odnosu na referentni uzorak (Slika 5). Sve vrednosti relativne aktivnosti luciferaze ekstrakata sa rekombinantnim MyoD u odnosu na referentni uzorak, pokazivale su statistički značajnu ($p < 0,05$) razliku.



Slika 5. Stimulišući uticaj transkripcionog faktora MyoD na aktivnost promotora *Ankrd2*. Ćelije C2C12 su transfekovane sa 500 ng PromA-pGL4.1, 50 ng pRL-TK i rastućim količinama MyoD-pCDNA3. Nakon transfekcije ćelije su lizirane i merena je aktivnost luciferaza. Rezultati su izraženi kao odnos aktivnosti luciferaze *P. pyralis* i luciferaze *R. reniformis*.

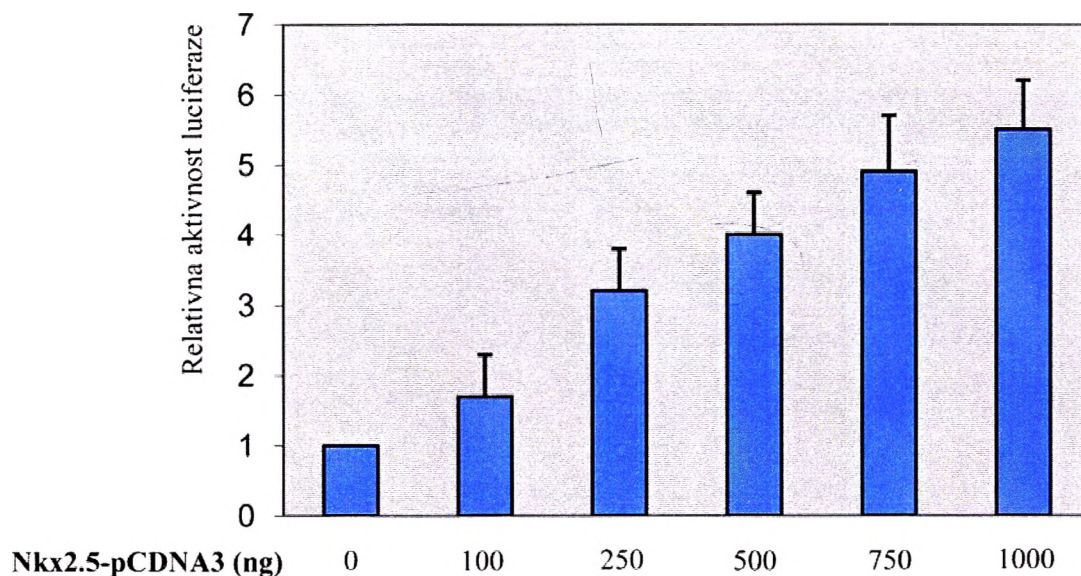
Dobijeni rezultati su potvrdili da MyoD ima pozitivan efekat i aktivira promotor gena *Ankrd2*. Ovim eksperimentima je, takođe, optimizovan dualni luciferazni promotorski esej u ćelijama C2C12, kao eksperimentalnom modelu.

4.1.2. Ispitivanje uticaja transkripcionog faktora Nkx2.5 na aktivnost promotora gena *Ankrd2* u ćelijama C2C12

Osim u skeletnim mišićima, protein *Ankrd2* je eksprimiran i u pojedinim odeljcima srca adulta (Moriyama *et al.*, 2001; Ishiguro *et al.*, 2002), ali je mehanizam regulacije ekspresije gena *Ankrd2* u miokardu potpuno neispitan. Osim što je *in silico* analizom predviđen kao potencijalni regulator gena *Ankrd2*, transkripcioni faktor Nkx2.5 je poznat kao regulator ekspresije gena specifično eksprimiranih u srcu (Jamali *et al.*, 2001) uključujući tu i gen za protein CARP (Zou *et al.*, 1997), što je dalo dodatno opravdanje za ispitivanje njegovog uticaja na aktivnost promotora *Ankrd2*.

Eksperimenti su dizajnirani tako što su nediferencirane mišje mišićne ćelije C2C12 transfekovane sa 500 ng PromA-pGL4.1, 50 ng pRL-TK i rastućim količinama konstrukta Nkx2.5-pCDNA3 u opsegu od 100 ng do 1000 ng. Relativna aktivnost luciferaze je merena u ekstraktima ćelija, 24 h nakon transfekcije. Vrednost dobijena za ekstrakt ćelija u kojima nije eksprimiran rekombinantni transkripcioni faktor Nkx2.5 je uzeta kao jedinična vrednost (Slika 6, 1. stubac). Rezultati prikazani na Slici 6 pokazuju dozno zavisno povećanje relativne aktivnosti luciferaze u odnosu na referentni uzorak. Sve vrednosti relativne aktivnosti luciferaze ekstrakata sa rekombinantnim Nkx2.5 u odnosu na referentni uzorak, pokazivale su statistički značajnu ($p < 0,05$) razliku.

Dobijeni rezultati ukazuju da bi transkripcioni faktor Nkx2.5 mogao biti jedan od regulatora promotorske aktivnosti gena *Ankrd2*.

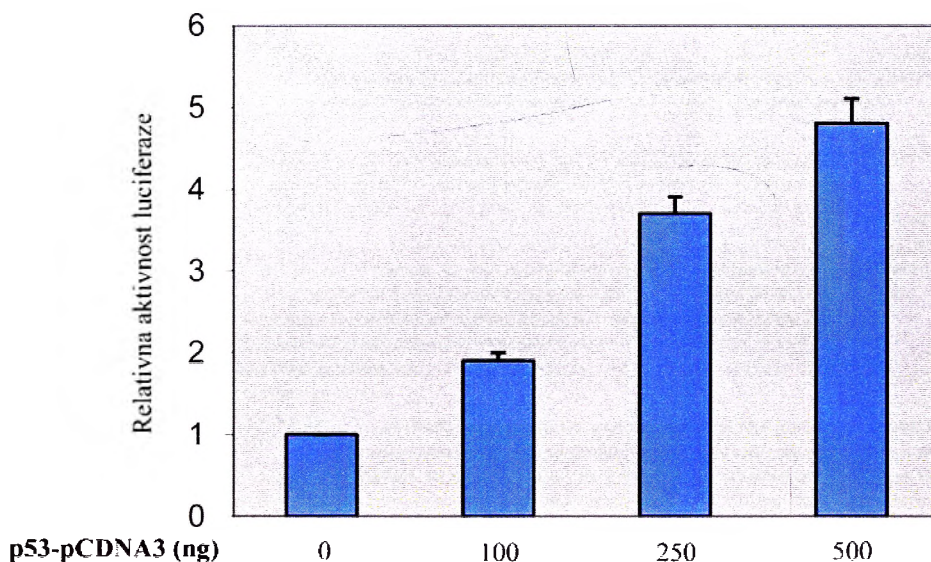


Slika 6. Stimulišući uticaj transkripcionog faktora Nkx2.5 na aktivnost promotora *Ankrd2*. Čelije C2C12 su transfekovane sa 500 ng PromA-pGL4.1, 50 ng pRL-TK i rastućim količinama Nkx2.5-pCDNA3. Nakon transfekcije ćelije su lizirane i merena je aktivnost luciferaza. Rezultati su izraženi kao odnos aktivnosti luciferaze *P. pyralis* i luciferaze *R. reniformis*.

4.1.3. Ispitivanje uticaja transkripcionog faktora p53 na aktivnost promotora gena *Ankrd2* u ćelijama C2C12

Razmatranje uticaja p53 na ekspresiju gena *Ankrd2* je bilo značajno jer protein p53 osim „klasične” uloge tumor supresora, regulatora ćelijskog ciklusa i induktora apoptoze, učestvuje i u procesima karakterističnim za mišićine ćelije kao što su diferencijacija (Porrello *et al.*, 2000), hipertrofija (Siu i Alway, 2005 B, Chen *et al.*, 2002) i atrofija (Siu i Alway, 2005A).

Potencijal transkripcionog faktora p53 da reguliše ekspresiju gena *Ankrd2*, ispitivan je korišćenjem dualnih luciferaznih promotorskih eseja, tako što su ćelije C2C12 transfekovane sa 500 ng PromA-pGL4.1, 50 ng pRL-TK i rastućim količinama ekspresionog konstrukta p53-pCDNA3. Dvadeset četiri časa nakon transfekcije pripremani su ćelijski ekstrakti pasivnom lizom ćelija i merena je aktivnost luciferaza *P. pyralis* i *R. reniformis*. Relativna aktivnost luciferaze izmerena u ekstraktima ćelija u kojima nije ekspimiran rekombinantni p53 je predstavljala jediničnu vrednost (Slika 7, 1. stubac).



Slika 7. Stimulišući uticaj transkripcionog faktora p53 na aktivnost promotora *Ankrd2*. Čelije C2C12 su transfektovane sa 500 ng PromA-pGL4.1, 50 ng pRL-TK i rastućim količinama p53-pCDNA3. Nakon transfekcije ćelije su lizirane i merena je aktivnost luciferaza. Rezultati su izraženi kao odnos aktivnosti luciferaze *P. pyralis* i luciferaze *R. reniformis*.

Kao što je prikazano na Slici 7 povećavanjem količine eksprimiranog p53 (od 100 ng do 1000 ng konstrukta p53-pCDNA3), vrednost relativne aktivnosti luciferaze je rasla zavisno od doze. Sve vrednosti relativne aktivnosti luciferaze ekstrakata sa rekombinantnim p53 u odnosu na referentni uzorak, pokazivale su statistički značajnu ($p < 0,05$) razliku. Ovaj rezultat sugerise da transkripcioni faktor p53 može regulisati ekspresiju gena *Ankrd2*.

4.1.4. Ispitivanje uticaja endogenog transkripcionog faktora NF-kB na aktivnost promotora gena *Ankrd2* u ćelijama C2C12

Mohamed i saradnici su dali dokaze da je aktivnost gena *Ankrd2*, tokom longitudinalnog istezanja mišića, regulisana faktorom NF-kB (Mohamed *et al.*, 2010). Međutim, nema podataka koji bi ukazivali da ovaj transkripcioni faktor reguliše aktivnost gena *Ankrd2* i u nediferenciranim mišićnim ćelijama. Zato je jedan od ciljeva ovog rada bio da se ispita da li bi transkripcioni faktor NF-kB mogao imati uticaj na aktivnost promotora gena *Ankrd2* i u nediferenciranom stadijumu mišićnih ćelija.

Za ispitivanje uticaja endogenog NF- κ B na aktivnost odabranog regiona promotora *Ankrd2*, iskorišćene su neke osobnosti dinamike i načina aktivacije ovog transkripcionog faktora.

Transkripcioni faktor NF- κ B sastoji se od različitih subjedinica (p50, p52, p65, c-Rel, RelB) koje na ciljnom promotoru formiraju hetero- ili homodimere. Ove subjedinice su, u odsustvu stimulišućih agenasa, lokalizovane u citoplazmi, u kompleksu sa inhibitorima familije I κ B. U prisustvu određenih stimulusa (citokini, zračenje, slobodni radikali, virusni ili bakterijski antigeni, itd.), dolazi do oslobađanja subjedinica NF- κ B iz kompleksa sa inhibitorima, a zatim i do njihove migracije u jedro, gde uzimaju učešće u regulaciji ekspresije ciljnih gena (Kuryłowicz i Nauman, 2008).

Prva faza ispitivanja imala je za cilj da pokaže, da se u ćelijama C2C12 koje su korišćene kao model i pri eksperimentalnim uslovima primenjenim u ovom radu, aktivacija i migracija subjedinica p50 i p65 faktora NF- κ B u jedro, može izazvati tretiranjem ćelija citokinom TNF α .

Ćelije C2C12 su pasażirane i nakon dostizanja 40–60 % konfluentnosti, tretirane citokinom TNF α u finalnoj koncentraciji od 1 ng/mL i 20 ng/mL. 24 časa nakon tretmana citokinom, pripremani su jedarni i citoplazmatski ekstrakti. Jednake količine jedarnih i citoplazmatskih ekstrakata su nanete na 12 % denaturišući poliakrilamidni gel i proteini su razdvojeni elektroforezom. Nakon prenosa sa gela na membranu, proteini su detektovani korišćenjem odgovarajućih antitela i detekcijom hemiluminiscentnih signala.

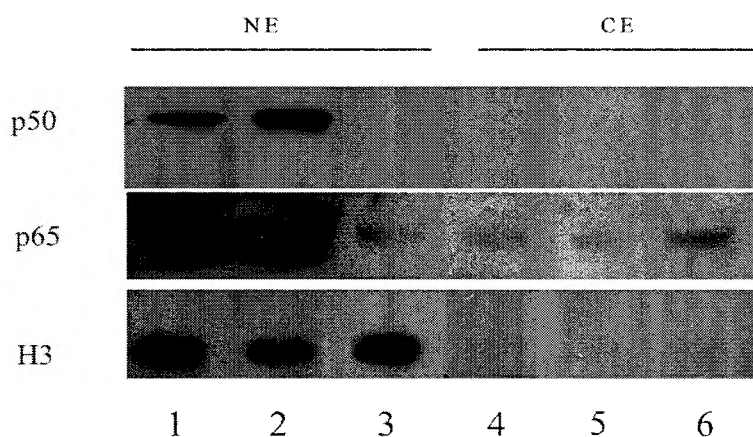
Za detekciju subjedinica p50 i p65 kao primarno, korišćeno je antitelo na humane forme ovih proteina u razblaženju 1:1000. Kao sekundarno, korišćeno je antitelo na mišje imunoglobuline konjugovano sa peroksidazom rena, razblaženo 80000 puta.

U cilju ocene uspešnosti fracionisanja, jedarni i citoplazmatski ekstrakti su testirani na prisustvo histona H3. Za detekciju je korišćeno antitelo na H3 u razblaženju 1:500. Kao sekundarno, korišćeno je antitelo na zečje imunoglobuline konjugovano sa peroksidazom rena (u razblaženju 1:4000).

Prisustvo subjedinica transkripcionog faktora NF- κ B, p50 i p65 pokazano je samo u jedrima tretiranih ćelija (Slika 8, kolone 1 i 2). U jedrima netretiranih ćelija (Slika 8, kolona 3) nije detektovano prisustvo ni jedne od analiziranih subjedinica. U ekstraktima citoplazme kako tretiranih (Slika 8, kolone 4 i 5), tako i netretiranih (Slika 8, kolona 6) ćelija nije detektovan p50, dok je p65 detektovan samo u citoplazmi

netretiranih ćelija, ali u mnogo manjoj meri nego u jedru tretiranih ćelija. Histon H3 je detektovan u jedrima, kako tretiranih, tako i netretiranih ćelija (Slika 8, kolone 1, 2 i 3), ali ne i u citoplazmatičnim ekstraktima (Slika 8, kolone 4, 5 i 6) što je bio dokaz uspešnog frakcionisanja ćelijskih ekstrakata.

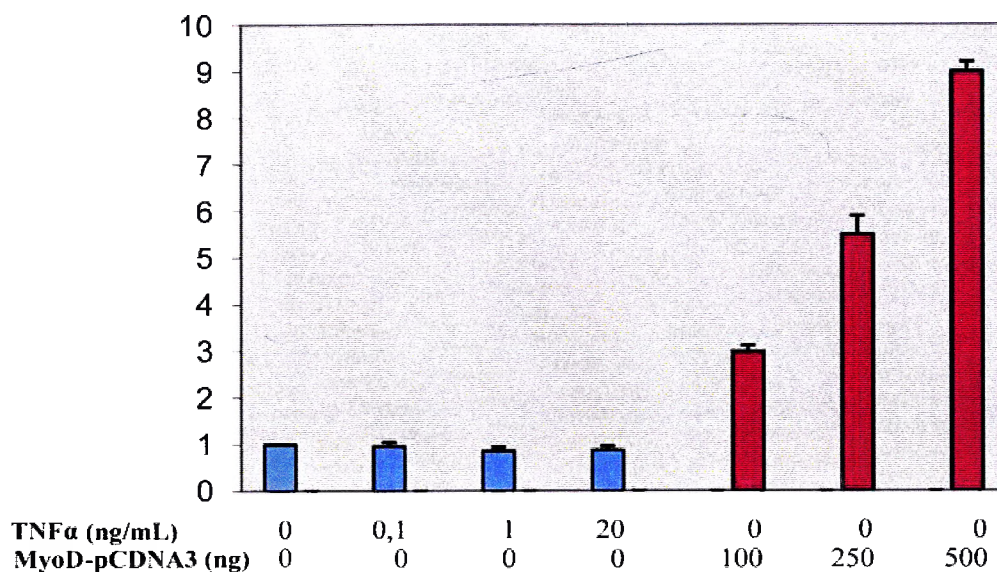
Uticao endogenog transkripcionog faktora NF- κ B ćelija C2C12 (aktiviranog citokinom TNF α), na promotor gena *Ankrd2*, ispitan je promotorskim esejima dizajniranim na sledeći način: ćelije C2C12 su transfekovane sa 500 ng PromA-pGL4.1 i 50 ng pRL-TK, a pet časova nakon transfekcije su tretirane citokinom TNF α u koncentracijama od 0,1, 1 i 20 ng/mL. Kao pozitivna kontrola, u istom eksperimentu, ćelije su transfekovane sa 500 ng PromA-pGL4.1, 50 ng pRL-TK i rastućim količinama konstrukta MyoD-pCDNA3 (u rasponu od 100 ng - 500 ng). 24 h nakon indukcije merena je aktivnost luciferaze *P. pyralis* i luciferaze *R. reniformis*, i rezultati su izraženi kao relativna aktivnost luciferaze. Vrednost relativne aktivnosti luciferaze dobijena u ekstraktu ćelija koje nisu tretirane citokinom TNF α , uzeta je kao jedinična vrednost (Slika 9, 1. stubac).



Slika 8. Detekcija proteina p50 i p65 u jedarnim (NE) i citoplazmatičnim (CE) ekstraktima ćelija C2C12 tretiranih citokinom TNF α . Translokacija NF- κ B iz citoplazme u jedro izazvana je tretiranjem ćelija C2C12 citokinom TNF α u koncentraciji od 1 ng/mL (1 i 4) i 20 ng/mL (2 i 5). Kao kontrola korišćeni su jedarni i citoplazmatični ekstrakti netretiranih ćelija (3 i 6). Proteini p50, p65 i H3 su detektovani metodom Western blot.

Kao što se vidi na Slici 9, aktiviranje endogenog faktora NF- κ B nije dovelo do promene relativne aktivnosti luciferaze merene u lizatima transfekovanih ćelija tretiranih citokinom, u odnosu na referentni uzorak. Povećanje luciferazne aktivnosti izazvano

uticajem transkripcionog faktora MyoD na analizirani promotor (Slika 9, 5., 6. i 7. stubac) je potvrdilo tehničku uspešnost izvedenog eksperimenta.



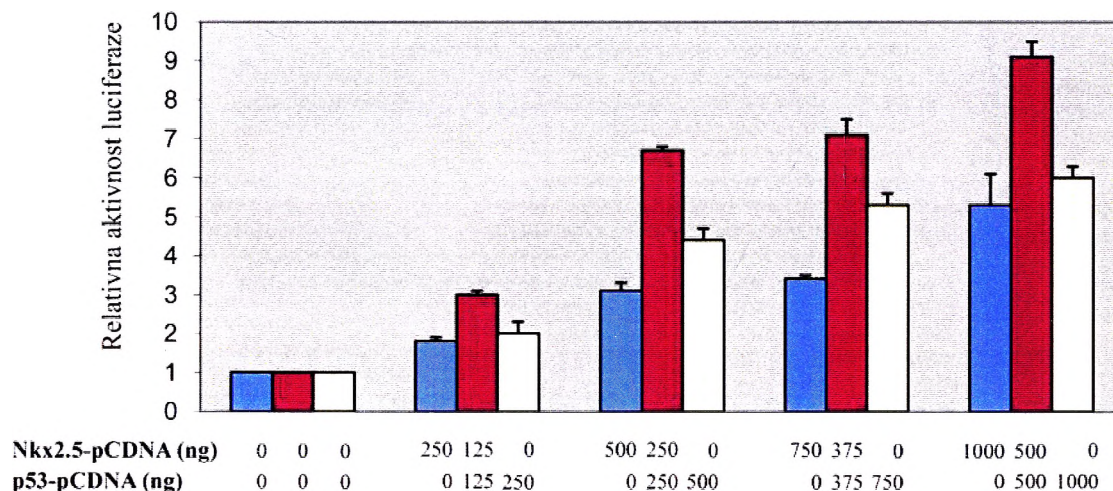
Slika 9. Aktivirani endogeni transkripcioni faktor NF- κ B nema uticaj na aktivnost promotora *Ankrd2*. Ćelije C2C12 su transfekovane sa 500 ng PromA-pGL4.1 i 50 ng pRL-TK, a 5 Ćasova nakon transfekcije tretirane rastućim koncentracijama TNF α . U kontrolnim uzorcima ćelije su transfekovane reporterskim konstruktima i rastućim koncentracijama konstrukta MyoD-pCDNA3 (5. 6. i 7. stubac). Rezultati su izrađeni kao odnos aktivnosti luciferaze *P. pyralis* i luciferaze *R. reniformis*.

Dobijeni rezultati pokazuju da endogeni faktor NF- κ B u nediferenciranim mišićnim ćelijama C2C12, nakon indukcije ćelija citokinom TNF α , nema uticaj na aktivnost ispitivanog promotora gena *Ankrd2*.

4.1.5. Ispitivanje združenog efekta transkripcionih faktora Nkx2.5 i p53 na promotor gena *Ankrd2* u ćelijama C2C12

In silico analiza ispitivanog promotorskog regiona gena *Ankrd2* u programu TF Bind (Slika 4) je pokazala da se potencijalna mesta za vezivanje transkripcionih faktora Nkx2.5 i p53 nalaze jedno uz drugo. Zbog toga se nametnulo pitanje da li istovremeno prisustvo oba transkripciona faktora ima različit efekat od efekta koji svaki od njih pojedinačno ima na promotor gena *Ankrd2*. U ovom radu je analizirano združeno dejstvo Nkx2.5 i p53 na ispitivani promotor, tj u uslovima kada su oba faktora eksprimirana. U tom cilju, ćelije C2C12 su transfekovane reporterskim konstruktima (500 ng PromA-pGL4.1 i 50 ng pRL-TK) i rastućim količinama vektora Nkx2.5-pCDNA3 i p53-pCDNA3, pojedinačno ili zajedno (Slika 10). Aktivnost luciferaza je

merena u ekstraktima ćelija, 24 časa nakon transfekcije. Relativna aktivnost luciferaze ćelijskih ekstrakata u kojima nisu eksprimirani transkripcioni faktori Nkx2.5 i p53, uzeta je kao jedinična vrednost (Slika 10, prva tri stubca). Eksperiment je bio dizajniran tako da su količine vektora Nkx2.5-pCDNA3 i p53-pCDNA3 u pojedinačnim transfekcijama bile uvek duplo veće od onih u udruženoj varijanti. Dobijeni rezultati su grafički predstavljeni na Slici 10.



Slika 10. Združeno dejstvo transkripcionih faktora Nkx2.5 i p53 na aktivnost promotora *Ankrd2*. Ćelije C2C12 su transfekovane sa 500 ng PromA-pGL4.1, 50 ng pRL-TK i rastućim količinama Nkx2.5-pCDNA3 i p53-pCDNA3 (pojedinačno ili kombinovano). Vrednosti relativne aktivnosti luciferaza pri kombinovanoj transfekciji sa ekspresionim konstruktima Nkx2.5-pCDNA3 i p53-pCDNA3 su statistički značajno veće ($p < 0.05$) od vrednosti dobijenih u lizatima ćelija transfekovanih pojedinačnim vektorima.

Može se uočiti da su vrednosti relativne aktivnosti luciferaze dobijenih pri merenju njihove aktivnosti u lizatima ćelija transfekovanih pojedinačnim transkripcionim faktorima, Nkx2.5 ili p53, bile uvek niže od vrednosti dobijenih u lizatima ćelija u kojima su p53 i Nkx2.5 bili koeksprimirani. Dobijene razlike su bile statistički značajne ($p < 0,05$).

Na osnovu dobijenih rezultata se može zaključiti da faktor Nkx2.5, ključni regulator ekspresije gena specifično eksprimiranih u srcu i opšti transkripcioni faktor p53 ostvaruju sinergističko dejstvo na promotor gena *Ankrd2*, što može imati za posledicu tkivno specifičnu regulaciju ekspresije gena *Ankrd2* u ćelijama srca.

4.1.6. Ispitivanje interakcije proteina Nkx2.5 i p53

Promotorskim esejima je pokazano da transkripcioni faktori p53 i Nkx2.5 imaju sinergističko dejstvo na promotor gena *Ankrd2*. *In silico* analiza ispitivanog promotorskog regiona gena *Ankrd2* je pokazala da se potencijalna mesta za vezivanje transkripcionih faktora p53 i Nkx2.5 nalaze jedno uz drugo, što bi pre ukazalo na kompetitivno, nego na sinergističko dejstvo. Stoga smo pretpostavili da njihov sinergistički efekat može biti posledica fizičke interakcije, pa je deo ovog istraživanja bio posvećen ispitivanju da li ova dva transkripciona faktora međusobno interaguju. Pretpostavljena interakcija proteina Nkx2.5 i p53 je ispitivana u *in vitro* uslovima metodom „GST pull-down” i *in vivo* uslovima, metodom koimunoprecipitacije.

4.1.6.1. Ispitivanje interakcije proteina Nkx2.5 i p53 u *in vitro* uslovima metodom „GST pull down”

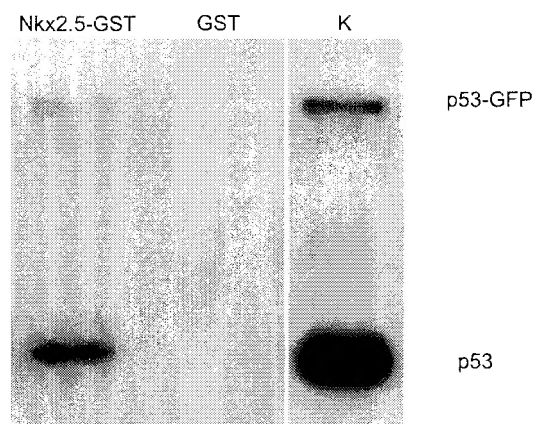
Za potrebe eseja „GST pull-down”, cDNK gena za humani Nkx2.5 je uklonirana u vektor pGEX-6P-3 što je omogućilo da se ovaj protein, fuzionisan sa proteinom GST, eksprimira u bakterijskim ćelijama. Da bi se u sisarskim ćelijama omogućila ekspresija p53 fuzionisanog sa GFP, cDNK gena za humani p53 je uklonirana u vektor pEGFP-C1.

Nkx2.5-GST je eksprimiran u soju *E. coli* BL21 i iz bakterijskog lizata prečišćen afinitativnom hromatografijom na glutation-sefarozi 4B.

Protein p53 je eksprimiran u ćelijama *cos7* u fuziji sa GFP (p53-GFP), nakon transfekcije ćelija *cos7* konstruktom p53-pEGFP-C1. 24 časa nakon transfekcije pripremljeni su proteinski ekstrakti u puferu EBC.

Ujednačene količine proteina Nkx2.5-GST i GST (koji je korišćen kao negativna kontrola), imobilisanih na matriksu od glutation sefaroze su inkubirane sa ekstraktom ćelija *cos7* u kojima je eksprimiran p53-GFP. Nakon uklanjanja nespecifično vezanih proteina, proteini kompleksa su razdvajani elektroforezom na 12% denaturišućim poliakrilamidnim gelovima i analizirani Western blot metodom. Protein p53-GFP je detektovan monoklonskim antitelom na humani p53 (razblaženim u odnosu 1:4000). Kao sekundarno, korišćeno je antitelo na mišje imunoglobuline konjugovano sa peroksidazom rena, razblaženo 80000 puta. Hemiluminiscentni signal je detektovan eksponiranjem filma za radiografije. Rezultati „GST pull down” eksperimenta su

prikazani na Slici 11. Protein p53-GFP je detektovan u kompleksu sa proteinom Nkx2.5-GST. Specifičnost interakcije je pokazana odsustvom signala u koloni GST koja odgovara uzorku u kome su inkubirani imobilisani GST i ekstrakt ćelija cos7 u kojima je eksprimiran p53-GFP. Pošto se u ćelijama cos7 protein p53 eksprimira endogeno, detektovana je i endogena forma proteina p53 u kompleksu sa Nkx2.5-GST, što predstavlja dodatnu potvrdu interakcije ova dva transkripciona faktora u *in vitro* uslovima.



Slika 11. Ispitivanje interakcije proteina Nkx2.5 i p53 u *in vitro* uslovima metodom „GST pull-down“. Imobilisani proteini Nkx2.5-GST i GST su inkubirani sa ekstraktom ćelija cos7 u kojima je eksprimiran p53-GFP. Nakon inkubiranja i uklanjanja nespecifično vezanih proteina, proteini kompleksa su razdvojeni elektroforezom i analizirani Western blot metodom. Lizat transfekovanih ćelija cos7 korišćen je kao pozitivna kontrola (K). U kompleksu sa Nkx2.5-GST, kao i u pozitivnoj kontroli detektovan je i endogeni p53.

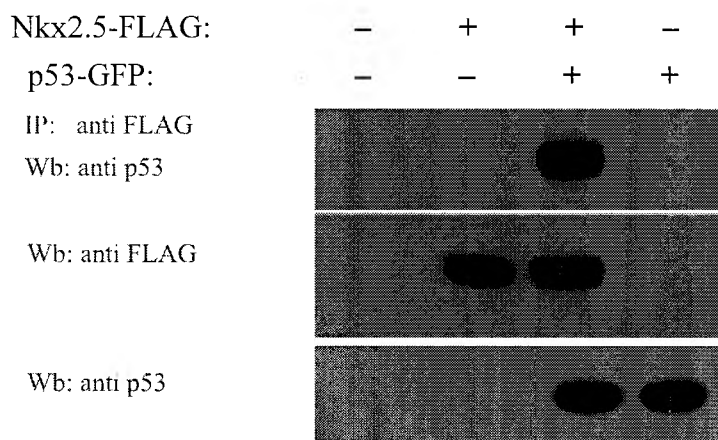
4.1.6.2. Ispitivanje interakcije proteina Nkx2.5 i p53 u *in vivo* uslovima metodom koimunoprecipitacije

U cilju ispitivanja interakcije proteina Nkx2.5 i p53 metodom koimunoprecipitacije, proteini Nkx2.5 i p53 su eksprimirani u ćelijama cos7 u fuziji sa različitim dodacima (tag-ovima). cDNK gena za Nkx2.5 je uklonirana u eukariotski ekspresioni vektor pCMVTag2B, što je omogućilo da se u eukariotskim ćelijama protein Nkx2.5 eksprimira sa tag-om FLAG (Nkx2.5-FLAG). cDNK gena za p53 je uklonirana u vektor pEGFP-C1, što je omogućilo da se protein p53 eksprimira u fuziji sa proteinom GFP (p53-GFP). Ćelije cos7 su transfekovane ekspresionim vektorima u sledećim kombinacijama:

1. pCMVTag2B i pEGFP-C1
2. Nkx2.5-pCMVTag2B i pEGFP-C1
3. Nkx2.5-pCMVTag2B i p53-pEGFP-C1
4. pCMVTag2B i p53-pEGFP-C1

Dvadeset četiri časa nakon transfekcija, napravljeni su proteinski ekstrakti u puferu EBC. Ekstrakti su inkubirani sa antitelom anti-FLAG koje je imobilisano na agarozu CL-4B. Nakon uklanjanja nespecifično vezanih proteina pranjem imobilisanih kompleksa puferom u kome je vršeno vezivanje, proteini kompleksa su eluirani sa matriksa i razdvajani elektroforezom na 12% denaturišućem poliakrilamidnom gelu. Proteini kompleksa su analizirani metodom Western blot. Za detekciju proteina p53 GFP, kao primarno, korišćeno je monoklonsko antitelo na p53, razblaženo 4000 puta, a kao sekundarno, antitelo na mišje imunoglobuline konjugovano sa peroksidazom rena, u razblaženju 1:80000. Protein Nkx2.5-FLAG je detektovan antitelom na FLAG razblaženim 2000 puta. i antitelom na mišje imunoglobuline konjugovanim sa peroksidazom rena, u razblaženju 1: 80000.

Kao što je pokazano na Slici 12, protein p53-GFP je detektovan samo u kompleksu sa proteinom Nkx2.5-FLAG nakon imunoprecipitacije proteina Nkx2.5-FLAG antitelom na FLAG. Protein p53 nije detektovan u kontrolnim reakcijama. Metodom koimunoprecipitacije potvrđena je interakcija proteina Nkx2.5 i p53 prethodno detektovana metodom „GST pull down“.



Slika 12. Ispitivanje interakcije proteina Nkx2.5 i p53 u *in vivo* uslovima metodom koimunoprecipitacije. Proteinski ekstrakti ćelija cos7 u kojima su eksprimirani proteini Nkx2.5-FLAG i p53-GFP pojedinačno ili u kombinaciji, su inkubirani sa imobilisanim anti-FLAG antitelom. Proteini formiranih kompleksa su razdvojeni elektroforezom i analizirani metodom Western blot. Koprecipitirani protein p53-GST je detektovan monoklonskim antitelom na p53 (prvi panel). Prisustvo eksprimiranih proteina Nkx2.5-FLAG i p53-GFP u ekstraktima transfekovanih ćelija detektovano je Western blot analizom (drugi i treći panel).

Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da transkripcioni faktori p53 i Nkx2.5 ostvaruju fizičku interakciju, kako je pokazano u *in vitro* i u *in vivo* uslovima.

4.2. Ispitivanje uticaja proteina CARP na aktivnost promotora gena *Ankrd2*

Protein CARP, kao i analizirani protein *Ankrd2*, pripada familiji proteina MARP koji se specifično eksprimiraju u ćelijama skeletnih mišića i srca i odlikuju prisustvom ankirinskih ponovaka. Pokazano je da CARP deluje kao kofaktor, tj. kao negativni regulator ekspresije gena specifično eksprimiranih u srcu, čija je ekspresija pod kontrolom faktora Nkx2.5 (Jeyasseelan, *et al.*, 1997; Zou *et al.*, 1997). Osim toga, postoje pretpostavke da bi članovi familije MARP, međusobno, mogli biti u funkcionalnoj vezi (Barash *et al.*, 2007). Stoga je analiza regulacije aktivnosti promotora gena *Ankrd2* obuhvatila i ispitivanje uticaja proteina CARP na aktivnost promotora gena *Ankrd2*, u prisustvu transkripcionih faktora MyoD, Nkx2.5 i p53, za koje je pokazano da imaju potencijal da regulišu ekspresiju gena *Ankrd2*. Za analize su korišćeni dualni luciferazni promotorski eseji u nediferenciranim mišjim mišićnim ćelijama C2C12. cDNK gena za humanu formu proteina CARP je uklonirana u ekspresioni vektor pCDNA3. Dobijeni konstrukt CARP-pCDNA3 je propagiran u ćelijama DH5 α , odakle je izolovan metodom koja obezbeđuje visok kvalitet i prinos plazmidne DNK, oslobodjene endotoksina bakterija.

Ćelije C2C12 su transfekovane konstruktom CARP-pCDNA3 u odgovarajućoj kombinaciji sa reporterskim konstruktima (PromA-pGL4.1 i pRL-TK) i konstruktima koji obezbeđuju ekspresiju rekombinantnih faktora MyoD, Nkx2.5 i p53. Transfekcija ćelija C2C12 reporterskim konstruktima i konstruktom CARP-pCDNA3 (1000 ng) u odsustvu rekombinantnih proteina MyoD, Nkx2.5 i p53, poslužila je za analizu neposrednog uticaja proteina CARP na aktivnost promotora *Ankrd2*.

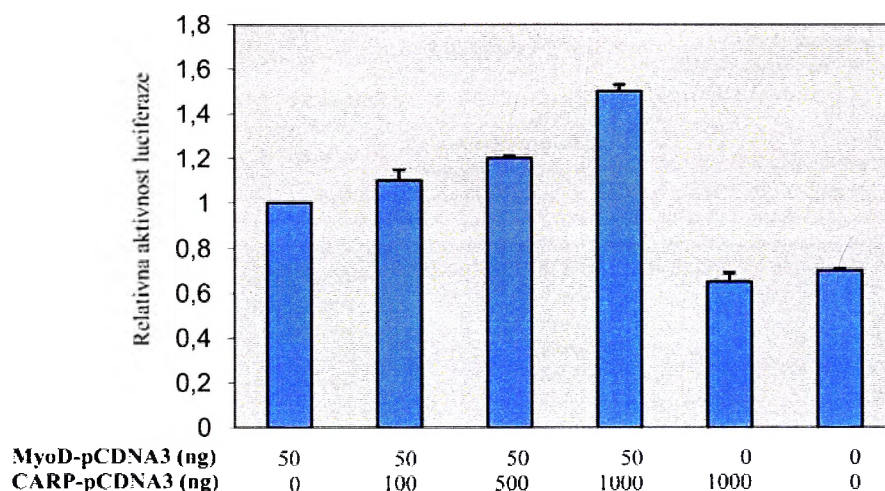
4.2.1. Ispitivanje uticaja proteina CARP na aktivnost promotora gena *Ankrd2* u prisustvu transkripcionog faktora MyoD

U cilju ispitivanja uticaja proteina CARP na aktivnost promotora gena *Ankrd2* u prisustvu transkripcionog faktora MyoD, ćelije C2C12 su transfekovane reporterskim

vektorima (500 ng PromA-pGL4.1 i 50 ng pRL-TK), 50 ng MyoD-pCDNA3 i rastućim količinama konstrukta CARP-pCDNA3 (100 ng, 500 ng i 1000 ng). Relativna aktivnost luciferaze izmerena u ekstraktima ćelija u kojima je eksprimiran faktor MyoD u odsustvu proteina CARP (Slika 13, 1. stubac) je uzeta kao jedinična vrednost. Kao što je prikazano na Slici 13, prisustvo proteina CARP dovelo je do pojačanja efekta faktora MyoD na promotor gena *Ankrd2*, za maksimalno 50 %. Rezultati su takođe, pokazali da CARP u odsustvu transkripcionog faktora MyoD nema uticaja na aktivnost promotora gena *Ankrd2* (Slika 13, 5. i 6. stubac).

Statistička značajnost ($p < 0,05$) razlike relativne aktivnosti luciferaze u odnosu na referentni uzorak, potvrđena je za sve uzorke u kojima je eksprimiran rekombinantni protein CARP (Slika 13, 2., 3. i 4. stubac).

Prikazani rezultati ukazuju da protein CARP, može imati stimulišući efekat na aktivnost transkripcionog faktora MyoD, tj. da može indirektno učestvovati u regulaciji ekspresije gena *Ankrd2*.

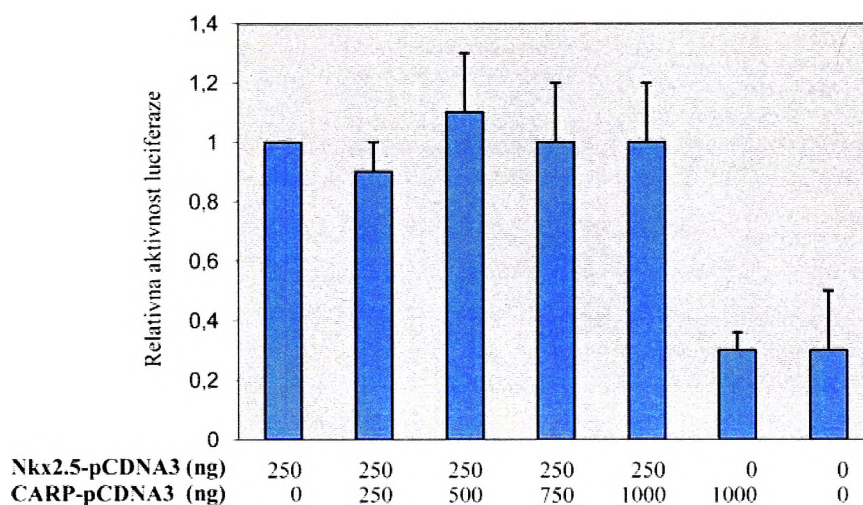


Slika 13. Protein CARP moduliše stimulišući efekat transkripcionog faktora MyoD na promotor gena *Ankrd2*. Ćelije C2C12 su transfekovane reporterskim vektorima (500 ng PromA-pGL4.1 i 50 ng pRL-TK), 50 ng MyoD-pCDNA3 i rastućim količinama CARP-pCDNA3. Relativna aktivnost luciferaze izmerena u ekstraktima ćelija bez rekombinantnog CARP-a (prvi stubac), uzeta je kao jedinična vrednost u odnosu na koju su normalizovane ostale vrednosti .

4.2.2. Ispitivanje uticaja proteina CARP na aktivnost promotora gena *Ankrd2* u prisustvu transkripcionog faktora Nkx2.5

U jedru, protein CARP ima ulogu transkripcionog kofaktora, delujući inhibitory na ekspresiju gena koji su pod kontrolom Nkx2.5 (Zou *et al.*, 1997). Pošto su rezultati prethodnih eksperimenata pokazali da Nkx2.5 ima stimulišući uticaj na aktivnost promotora gena *Ankrd2*, ispitan je i potencijalni modulacioni efekat proteina CARP na aktivnost faktora Nkx2.5. Eksperimenti su dizajnirani tako što su ćelije C2C12 transfekovane sa 500 ng PromA-pGL4.1, 50 ng pRL-TK, 250 ng Nkx2.5-pCDNA3 i rastućim količinama konstrukta CARP-pCDNA3 (od 250 ng – 1000 ng). Aktivnost luciferaza *P. pyralis* i *R. reniformis* merena je u lizatima ćelija 24 h nakon transfekcije. Vrednost relativne aktivnosti luciferaze izmerene u ekstraktima ćelija u kojima je eksprimiran Nkx2.5, u odsustvu proteina CARP (Slika 14, 1. stubac), uzeta je kao jedinična vrednost. Relativne aktivnosti luciferaze u ekstraktima ćelija u kojima je eksprimiran CARP nisu pokazivale statistički značajnu razliku u odnosu na jediničnu vrednost (Slika 14, 2., 3., 4. i 5. stubac).

Prikazani rezultati pokazuju da protein CARP ne utiče na efekat transkripcionog faktora Nkx2.5 na promotor *Ankrd2* u opsegu od 250 ng do 1000 ng. I u ovom eksperimentu je potvrđeno da protein CARP, u odsustvu transkripcionog faktora, nema uticaja na ispitivani promotor (Slika 14, 6. i 7. stubac).

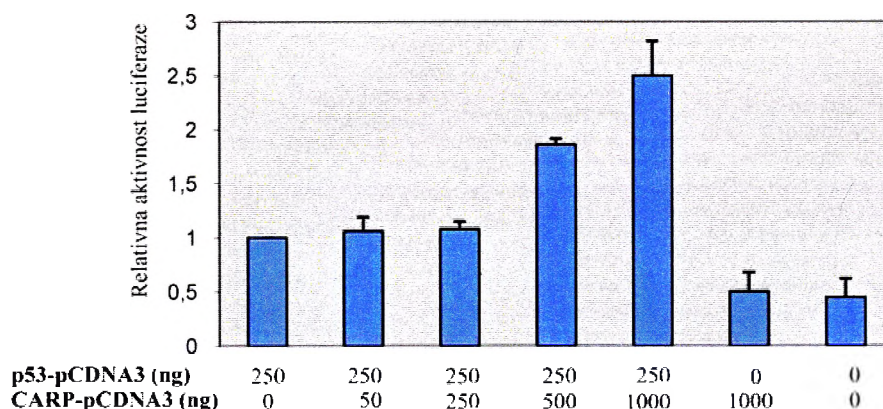


Slika 14. Protein CARP ne menja stimulišući efekat transkripcionog faktora Nkx2.5 na promotor *Ankrd2*. Ćelije C2C12 su transfekovane sa 500 ng PromA-pGL4.1, 50 ng pRL-TK, 250 ng Nkx2.5-pCDNA3 i rastućim količinama CARP-pCDNA3. Relativna aktivnost luciferaze izmerena u ekstraktima ćelija bez rekombinantnog CARP-a (prvi stubac), uzeta je kao jedinična vrednost u odnosu na koju su normalizovane ostale vrednosti.

4.2.3. Ispitivanje uticaja proteina CARP na aktivnost promotora gena *Ankrd2* u prisustvu transkripcionog faktora p53

U cilju analize uticaja proteina CARP na regulatornu aktivnost transkripcionog faktora p53 koju ostvaruje na promotor gena *Ankrd2*, ćelije C2C12 su transfekovane sa 500 ng PromA-pGL4.1, 50 ng pRL-TK, 250 ng p53-pCDNA3 i rastućim količinama CARP-pCDNA3. Aktivnost luciferaze *P. pyralis* i luciferaze *R. reniformis* merena je u lizatima ćelija 24 h nakon transfekcije. Vrednost relativne aktivnosti luciferaze izmerene u ekstraktima ćelija u kojima je eksprimiran protein p53, u odsustvu proteina CARP (Slika 15, 1. stubac), uzeta je kao jedinična vrednost.

Kao što se vidi na Slici 15, pri porastu količine vektora CARP-pCDNA3 od 50 ng do 1000 ng, vrednosti relativne aktivnosti luciferaze se povećavaju. Statistički značajno ($p < 0,05$) povećanje postignuto je sa 500 ng odnosno 1000 ng konstrukta CARP-pCDNA3 (Slika 15, 4. i 5. stubac), gde je relativna aktivnost luciferaze povećana 2 odnosno 2,5 puta u odnosu na referentni uzorak. Rezultati su takođe pokazali da CARP nema uticaja na ispitivani promotor u odsustvu transkripcionog faktora (Slika 15, 6. i 7. stubac).



Slika 15. CARP modulira dejstvo p53 na promotor gena *Ankrd2*. Ćelije C2C12 su transfekovane sa 500 ng PromA-pGL4.1, 50 ng pRL-TK, 250 ng p53-pCDNA3 i rastućim količinama CARP-pCDNA3. Relativna aktivnost luciferaze izmerena u ekstraktima ćelija bez rekombinantnog CARP-a (prvi stubac), uzeta je kao jedinična vrednost u odnosu na koju su normalizovane ostale vrednosti.

Dobijeni rezultati pokazuju da protein CARP moduliše aktivnost transkripcionog faktora p53, tj potencira njegovu aktivnost na promotoru gena *Ankrd2*.

Opisanim panelom eksperimenata je pokazano da protein CARP može delovati kao modulator aktivnosti promotora *Ankrd2* u prisustvu transkripcionih faktora MyoD i

p53. Ujedno su identifikovana dva nova transkripciona faktora (MyoD i p53) čiju aktivnost modulira protein CARP. Takođe, prvi put je pokazano da CARP može da deluje i kao pozitivan kofaktor u regulaciji ekspresije gena.

4.3. Mapiranje regiona proteina Ankrd2 neophodnih za interakciju sa transkripcionim faktorima p53, PML i YB-1 i sarkomernim proteinom teletoninom

U ranijim istraživanjima je pokazano da protein Ankrd2 interaguje sa transkripcionim faktorima p53, YB1 i PML (Kojic *et al.*, 2004), i sa proteinima sarkomere kao što su teletonin, titin, miopaladin i kalpain proteaza p94 (Miller *et al.*, 2003; Kojic *et al.*, 2004). Pretpostavlja se da interakcije sa proteinskim partnerima Ankrd2 ostvaruje posredstvom ankirinskih motiva, ali je ta pretpostavka potvrđena jedino u slučaju vezivanja Ankrd2 i titina (Hayashi *et al.*, 2008). S obzirom da su ankirinski ponovci konzervisane strukture velikog broja proteina, i ne pokazuju visoku specifičnost u prepoznavanju peptidnih struktura, postavlja se pitanje, da li su za proteinsko-proteinske interakcije koje ostvaruje Ankrd2 dovoljni ankirinski ponovci (kao u slučaju titina), ili su potrebni i dodatni elementi. Metodom „GST pull-down“ analizirali smo interakciju serije deletanata Ankrd2 sa proteinima p53, YB1, PML i teletoninom u cilju mapiranja regiona proteina Ankrd2 neophodnih za interakciju sa proteinskim partnerima.

U „GST pull-down“ eksperimentima korišćena je serija deletanata dobijenih kloniranjem različitih regiona cDNK za Ankrd2 u vektor pGEX-6P-3. Korišćeni konstrukti su kodirali sledeće varijante proteina Ankrd2 (Slika 16):

Ankrd2-GST, protein Ankrd2, od 5 do 333 ak, (A);

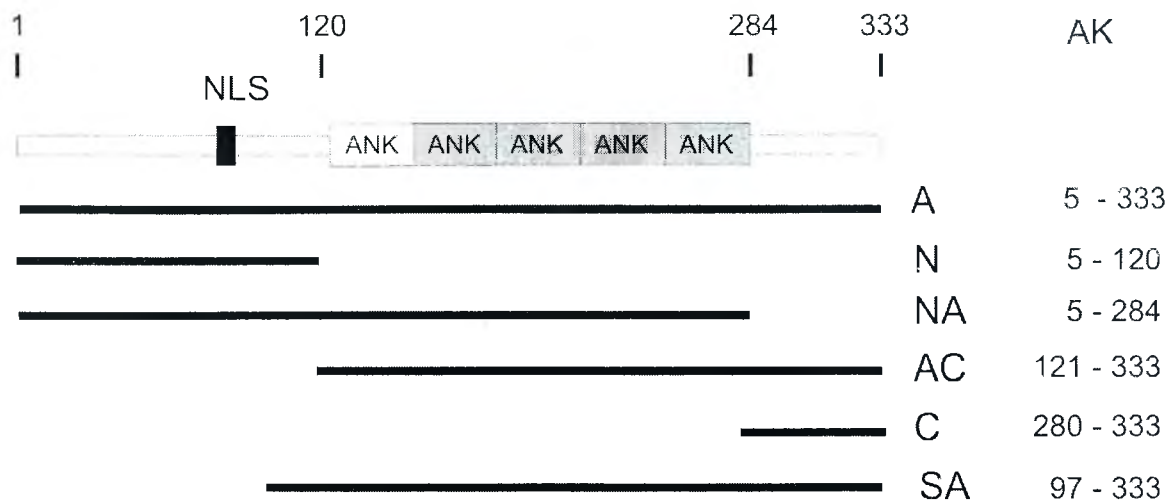
N-GST, N terminus proteina Ankrd2, od 5 do 120 ak, (N);

NA-GST, N terminus proteina Ankrd2 sa ankirinskim ponovcima, od 5 do 284 ak, (NA);

AC-GST, C terminus proteina Ankrd2 sa ankirinskim ponovcima, od 121 do 333 ak, (AC) i

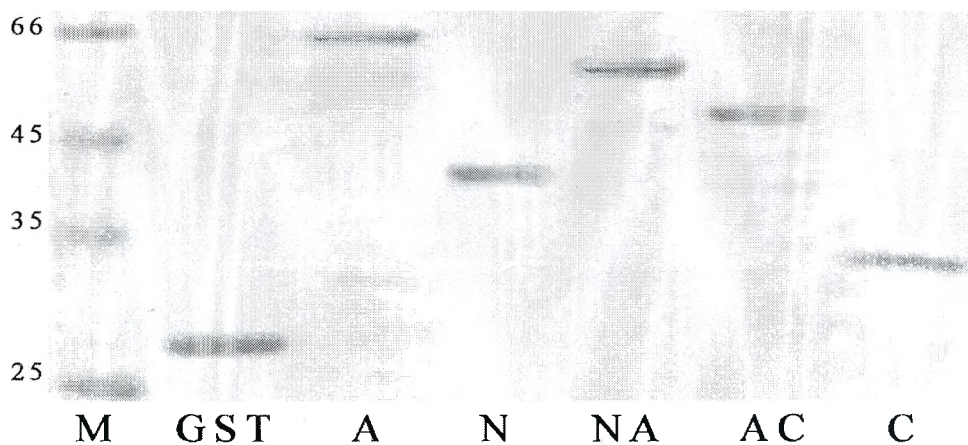
C-GST, C terminus proteina Ankrd2, od 280 do 333 ak (C).

Opisani konstrukti su korišćeni za ekspresiju proteina fuzionisanih sa proteinom GST u bakterijskom sistemu.



Slika 16. Šematski prikaz deletanata proteina Ankrd2 korišćenih u eksperimentima GST pull down. NLS (Nuclear localization signal)-signal za lokalizaciju u jedru, AK- aminokiseline, ANK- ankirinski motiv. Jedan od ankirinskih motiva na šemi predstavljen je belom bojom zbog razlika u broju ankirinskih motiva dobijenih analizom primarne aminokiselinske strukture proteina Ankrd2 u različitim programima za analizu proteinskih motiva (Pfam i SMART).

Eksprimirani rekombinantni proteini su prečišćeni i imobilisani na matriksu od glutation sefaroze. Imobilisani proteini su potom, analizirani na denaturišućim poliakrilamidnim gelovima u cilju provere kvaliteta i procene količina koje će se koristiti u „GST pull down” esejima (Slika 17).



Slika 17. Analiza kvaliteta proteina imobilisanih na glutation sefarozi Rekombinantni proteini GST, Ankrd2-GST (A) i deletanti N-GST (N), NA-GST (NA), AC-GST (AC) i C-GST (C), eksprimirani u bakterijama i imobilisani na glutation sefarozi su analizirani elektroforezom na poliakrilamidnom gelu. Proteini su vizuelizovani bojenjem komasi plavim. M –marker molekulske mase. Brojevi označavaju molekulske mase proteina markera u kDa.

Proteini čija je interakcija sa Ankrd2 ispitivana, eksprimirani su u eukariotskim ćelijama u kulturi (cos7 i U2OS). Pošto ćelije cos7 eksprimiraju protein p53 endogeno,

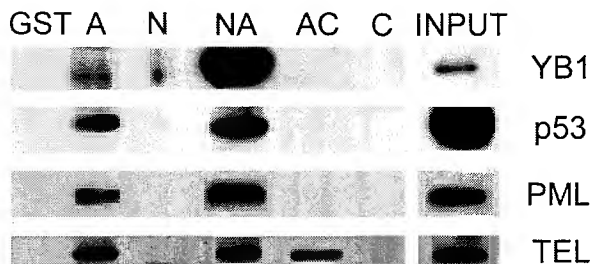
kao izvor proteina p53 korišćen je ekstrakt ćelija cos7 koje su lizirane u puferu E1a. Proteini YB1 i PML fuzionisani sa dodatkom FLAG su eksprimirani u ćelijama cos7 koje su prethodno transfekovane konstruktima PML-pCMVTag2B i YB1-FLAG-pCDNA3. Ćelije su lizirane 24 časa nakon transfekcije u puferu E1a. Kao izvor teletonina korišćen je ekstrakt ćelija U2OS u kojima je eksprimirana rekombinantna forma ovog proteina.

Jednake količine proteina Ankrd2 i deletanata fuzionisanih sa GST, imobilisanih na glutation sefarozi (Slika 17) su inkubirane 12 h, u puferu E1a, sa po 300 µg ekstrakata ćelija u kojima su eksprimirani proteini p53, YB1-FLAG, PML-FLAG i teletonin. Nakon uklanjanja nespecifično vezanih proteina, zaostali proteini kompleksa su razdvajani elektroforezom na denaturišućim poliakrilamidnim gelovima i analizirani metodom Western blot. Protein p53 je detektovan monoklonskim antitelom na humani p53 (razblaženje 1:4000), proteini YB1-FLAG i PML-FLAG su detektovani monoklonskim antitelom na polipeptid FLAG (1:2000), dok je teletonin detektovan mišjim poliklonskim antitelom na humani teletonin (1:500). Kao sekundarno, korišćeno je antitelo na mišje imunoglobuline konjugovano sa peroksidazom rena, razblaženo 80000 puta.

Dobijeni rezultati su prikazani na Slici 18. Teletonin je, osim sa proteinom Ankrd2 (A), interagovao i sa deletantima NA i CA koji osim amino ili karboksi terminusa sadrže i ankirinske ponovke. Do interakcije nije došlo između teletonina i deletanata koji sadrže samo amino i karboksi terminus proteina, kao i sa samim proteinom GST koji je korišćen kao negativna kontrola. Može se zaključiti da su za interakciju Ankrd2 i teletonina potrebni samo ankirinski ponovci.

S druge strane, proteini p53, YB1 i PML su detektovani u kompleksu sa proteinom Ankrd2 i deletantom NA koji sadrži aminoterminalni i ankirinske ponovke. Interakcija proteina p53, YB1 i PML i deletanata N, AC i C nije detektovana, kao ni interakcija sa GST. Dobijeni rezultati su ukazali da za interakciju između proteina Ankrd2 i proteina p53, YB1 i PML nisu dovoljni ankirinski ponovci već i N-terminus.

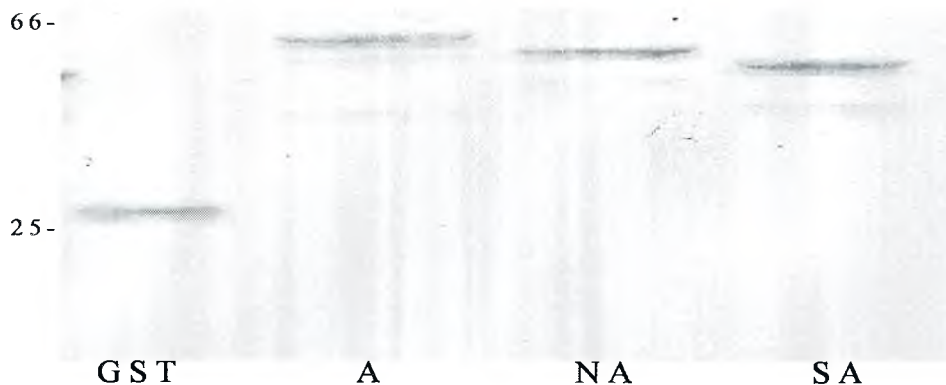
Može se zaključiti da se interakcija Ankrd2 i proteina sarkomere ostvaruje učešćem ankirinskih ponovaka, dok je za vezivanje proteina Ankrd2 i transkripcionih faktora p53, YB1 i PML, osim ankirinskih ponovaka, neophodno i učešće N terminusa proteina Ankrd2.



Slika 18. Mapiranje regiona proteina Ankrd2 koji učestvuju u interakciji sa proteinima YB1, p53, PML i teletoninom. Protein Ankrd2-GST (A) i deletanti N-GST (N), NA-GST (NA), AC-GST (AC) i C-GST (C), kao i negativna kontrola (GST), imobilisani na glutation-sefarozi, su inkubirani sa ekstraktima ćelija u kojima su eksprimirani YB1-FLAG, p53, PML-FLAG i teletonin. Proteini kompleksa su analizirani Western blot metodom. Kao pozitivna kontrola (INPUT) korišćeni su ekstrakti ćelija (1 μ g) u kojima su eksprimirani YB1-FLAG (YB1), p53, PML-FLAG (PML) i teletonin (TEL).

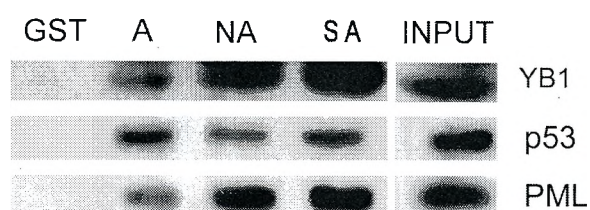
U cilju definisanja struktura u okviru N terminusa proteina Ankrd2 potrebnih za njegovu interakciju sa transkripcionim faktorima pripremljen je deletant proteina Ankrd2 (SA), kome je nedostajalo 96 aminokiselina na N terminusu, tj sadržavao je 23 aminokiselinska ostatka proksimalno uz ankirinske ponovke. Odgovarajuća cDNK je uklonirana u vektor pGEX-6P-3 pri čemu je dobijen konstrukt SA-pGEX-6P-3. Protein SA-GST je eksprimiran u bakterijskom soju BL21, prečišćen i imobilisan na glutation sefarozi, a njegova interakcija sa proteinima p53, YB1 i PML je ispitivana metodom „GST pull down”.

Jednake količine proteina Ankrd2-GST, NA-GST, SA-GST i GST, imobilisanih na glutation sefarozi (Slika 19) inkubirane su sa po 300 μ g ekstrakata ćelija u kojima su eksprimirani YB1-FLAG, p53 i PML-FLAG. Proteini kompleksa su razdvajani elektroforezom u denaturišućim poliakrilamidnim gelovima i analizirani metodom Western blot.



Slika 19. Analiza kvaliteta proteina imobilisanih na glutation sefarozi. Rekombinantni proteini Ankrd2-GST (A), NA-GST (NA) i SA-GST (SA), kao i negativna kontrola (GST), eksprimirani u bakterijama i imobilisani na glutation sefarozi analizirani su elektroforezom na poliakrilamidnom gelu. Proteini su vizuelizovani bojenjem komasi plavim. Brojevi predstavljaju molekulske mase u kDa.

Protein p53 je detektovan monoklonskim antitelom na humani p53 (razblaženje 1:4000), a proteini YB1-FLAG i PML-FLAG su detektovani monoklonskim antitelom na polipeptid FLAG (1:2000). Kao sekundarno, korišćeno je antitelo na mišje imunoglobuline konjugovano sa peroksidazom rena razblaženo 80000 puta. Kao što je prikazano na Slici 20, proteini p53, YB1 i PML su detektovani u kompleksu sa deletantom SA-GST, kao i sa pozitivnim kontrolama Ankrd2-GST (A) i NA-GST (NA). Vezivanje sa negativnom kontrolom, proteinom GST je izostalo.



Slika 20. Mapiranje regiona N terminusa proteina Ankrd2 koji je pored ankirinskih ponovaka potreban za interakciju Ankrd2 sa proteinima YB1, p53 i PML. Protein Ankrd2-GST (A) i deletanti NA-GST (NA) i SA-GST (SA) kao i negativna kontrola (protein GST), imobilisani na glutation-sefarozi, su inkubirani sa ekstraktima ćelija u kojima su eksprimirani YB1-FLAG, p53 i PML-FLAG. Proteini kompleksa su analizirani Western blot metodom. Kao pozitivna kontrola (INPUT) korišćeni su ekstrakti ćelija (1 μ g) u kojima su eksprimirani YB1-FLAG (YB1), p53 i PML-FLAG (PML).

Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da su za interakciju proteina Ankrd2 sa partnerima različite funkcije neophodni ankirinski ponovci. Za fizičku

interakciju sa sarkomernim proteinima kao što je teletonin ankirinski ponovci su i dovoljni, dok je vezivanje proteina Ankrd2 i transkripcionih faktora uslovljeno i dodatnim regionom od najviše 23 aminokiseline proksimalno uz ankirinske ponovke u okviru N terminusa (97-120 ak).

5. DISKUSIJA

I pored intenzivnih istraživanja koja se odnose kako na *Ankrd2*, tako i na celu familiju MARP, veliki broj pitanja u vezi ovog proteina još uvek ostaje otvoren, uključujući tu i mehanizam regulacije ekspresije, kao i biološki smisao mnogobrojnih interakcija sa drugim proteinima.

U ovom radu, jedan deo istraživanja se odnosio na ispitivanje regulacije promotorske aktivnosti gena *Ankrd2*. Zbog malobrojnih podataka u literaturi, koji se odnose na regulaciju ekspresije gena *Ankrd2*, bilo je značajno ispitati uticaj odabranih transkripcionih faktora (MyoD, p53, Nkx2.5 i NF- κ B) na promotor ovog gena i to onih za koje su bioinformatičke analize, zajedno sa podacima iz literature, dale opravdanje. Uzimajući u obzir procese koji su regulisani ispitivanim transkripcionim faktorima, mogli bi se izvesti i zaključci kako o načinu regulacije gena *Ankrd2*, tako i o procesima u kojima je produkt ovog gena uključen.

Pokazano je da protein CARP igra ulogu kofaktora u regulaciji ekspresije gena. Osim toga, postoje pretpostavke da bi proteini familije MARP mogli biti funkcionalno povezani (Barash *et al.*, 2007). Zbog toga je ova studija obuhvatila i ispitivanje potencijala proteina CARP da moduliše aktivnost transkripcionih faktora koji imaju uticaj na aktivnost promotora *Ankrd2*.

Deo istraživanja ove studije je bio posvećen i analizi proteinsko-proteinskih interakcija koje *Ankrd2* ostvaruje sa drugim proteinima (YB1, p53, PML i teletonin) i obuhvatio je mapiranje regiona posredstvom kojih protein *Ankrd2* ostvaruje interakcije sa svojim partnerima.

5.1. Uticaj transkripcionih faktora MyoD, Nkx2.5, p53 i NF- κ B na aktivnost promotora gena *Ankrd2*

Bioinformatička analiza proksimalnog regiona promotora gena *Ankrd2*, dužine 446 bp (-439 do +7), je pokazala postojanje potencijalnih mesta za vezivanje transkripcionih faktora MyoD, Nkx2.5, p53, i NF- κ B (Pallavicini *et al.*, 2001). Pomenuti transkripcioni faktori su važni za diferencijaciju i plastičnost skeletnih mišića

(MyoD) i srca (Nkx2.5), kao i za odgovor ćelije na različite vrste stresogenih faktora (p53 i NF-kB). Osim toga, podaci iz literature pokazuju da opšti transkripcioni faktori p53 i NF-kB uzimaju učešća i u procesima karakterističnim za mišićnu ćeliju.

Iako je jedna grupa autora pružila dokaze da je ekspresija gena *Ankrd2* pod kontrolom transkripcionog faktora MyoD (Bean *et al.*, 2005), bilo je značajno da se ova relacija potvrdi i drugim metodološkim pristupom. Mohamed i saradnici, su pokazali da se longitudinalnim istezanjem mišića dijafragme ekspresija *Ankrd2* indukuje posredstvom transkripcionog faktora NF-kB (Mohamed *et al.*, 2010). Međutim, u literaturi, do sada nema podataka o uticaju NF-kB na ekspresiju gena *Ankrd2* u nediferenciranim mišićnim ćelijama, ili tokom odgovora mišićne ćelije na neke druge vrste stimulusa, pa je ispitivanje uticaja NF-kB na aktivnost promotora gena *Ankrd2* u mioblastima, bilo naučno opravdano.

Promotorska aktivnost gena *Ankrd2* ispitivana je korišćenjem dualnih luciferaznih promotorskih eseja, kojima je testiran efekat rekombinantnih transkripcionih faktora MyoD, Nkx2.5, p53 i endogenog NF-kB u nediferenciranim mišjim mišićnim ćelijama C2C12.

Transkripcioni faktor MyoD u mioblastima stimuliše aktivnost promotora gena *Ankrd2*

Ova studija je potvrdila rezultate Bean i saradnika (Bean *et al.*, 2005) koji su pokazali da je gen *Ankrd2* pod kontrolom transkripcionog faktora MyoD. Pomenuta grupa istraživača je do ovog zaključka došla drugačijim metodološkim pristupom u odnosu na onaj koji je korišćen u ovom istraživanju tj. prateći efekte odsustva ekspresije MyoD u ćelijama C2C12 u kojima je gen za MyoD bio „utišan”. Efekte „utišavanja” MyoD pratili su koristeći „micro array” tehnologiju. Na istom eksperimentalnom modelu, ispitivali su i aktivnost reporterskog enzima pod uticajem promotora *Ankrd2* (Bean *et al.*, 2005). U ovoj studiji je ispitivan efekat „overekspresije” proteina MyoD u ćelijama C2C12, na aktivnost reporterskog proteina luciferaze, koji se ekspimirao pod uticajem promotora *Ankrd2*. Aktivnost luciferaze je pokazivala značajno povećanje, sa povećanjem količine rekombinantnog MyoD.

Transkripcioni faktor MyoD ima centralnu ulogu u razviću skeletnih mišića. Prisustvo ovog faktora u mioblastima, dovodi do obustavljanja njihove proliferacije, pokretanja ekspresije mišićno specifičnih gena i fuzije mioblasta u višejedarne miotube

(miocite) (Maione i Amati, 1997). Smatra se, da je grupa gena koji su direktno regulisani faktorom MyoD značajna za uspostavljanje i održavanje fenotipa mišićne ćelije (Bean *et al.*, 2005). Na osnovu rezultata ove studije i podataka koji su objavili Bean i saradnici, protein Ankrd2 se može svrstati u faktore preko kojih MyoD reguliše tok diferencijacije mišića. Na značaj proteina Ankrd2 u miogenezi, ukazali su kasniji eksperimenti Bean i saradnika, pokazavši da promene u nivou ekspresije Ankrd2 značajno utiču na uspostavljanje mišićno specifičnog fenotipa. Osim toga, ova grupa autora je pokazala da „overekspresija” Ankrd2 dovodi do inhibicije ekspresije glavnih regulatora transkripcije u ćelijama skeletnih mišića - faktora MyoD i miogenina (Bean *et al.*, 2008). S obzirom na dokaze o relaciji ova dva proteina, postoji mogućnost da MyoD, utičući na ekspresiju Ankrd2, reguliše svoju sopstvenu ekspresiju.

Kao i drugi miogeni transkripcioni faktori, MyoD je aktivan i kod adulta. U ovom periodu MyoD je regulisan neuralnim i humoralnim faktorima, i učestvuje u održavanju plastičnosti mišićnog tkiva (Hughes *et al.*, 1993). Shodno tome, može se pretpostaviti da MyoD reguliše ekspresiju Ankrd2 u toku remodelovanja diferenciranih mišića.

Dugo se smatralo da su MyoD i drugi proteini familije bHLH aktivni samo u skeletnim mišićima, mada su bili poznati proteini miokarda koji u promotoru svojih gena imaju vezivna mesta za pojedine članove ove familije (Olson *et al.*, 1993). Međutim, istraživanja u toku poslednje decenije su pokazala da je MyoD aktivan i u ćelijama srca, u Purkinjeovom snopu (Takebayashi-Suzuki *et al.*, 2001; Harris *et al.*, 2004). Ćelije ovog provodničkog snopa se prostiru kroz unutrašnji zid srčanih komora i imaju različit program genske ekspresije u odnosu na okolne ćelije miokarda. S obzirom da se Ankrd2 eksprimira u istom odeljku srca (Moriyama *et al.*, 2001) postoji mogućnost da MyoD reguliše ekspresiju Ankrd2 i u srcu.

Transkripcioni faktor Nkx2.5 u mioblastima stimuliše aktivnost promotora gena *Ankrd2*

U ovom radu, promotorskim esejima je pokazano da u proliferišućim mioblastima faktor Nkx2.5 dovodi do pojačane aktivnosti promotora *Ankrd2*. Iako su u eksperimentima korišćeni mioblasti, srodnost ćelija srca i skeletnih mišića, kao i činjenica da je Ankrd2 eksprimiran i u srcu, daje nam mogućnost za pretpostavku da je u miokardu ekspresija gena *Ankrd2* regulisana transkripcionim faktorom Nkx2.5.

Ujedno, rezultati ove studije su prvi podaci koji sugeriraju jedan od mogućih mehanizama regulacije ekspresije gena *Ankrd2* u srcu.

Transkripcioni faktor Nkx2.5 je od suštinskog značaja za razvoj srca kod svih kičmenjaka i aktivira se veoma rano tokom razvića u primordijalnim ćelijama srca (Jamali *et al.*, 2001). U neonatalnom i adultnom srcu, Nkx2.5 je takođe eksprimiran (Toko *et al.*, 2002). Uzimajući u obzir da je tokom pojedinih faza razvića Nkx2.5 prisutan i u drugim organima (tiroidea, jezik, slezina), smatra se da ovaj transkripcioni faktor svoju ulogu ostvaruje preko „lokalnih” nuklearnih kofaktora. U tom smislu, Zou i saradnici su pokazali da Nkx2.5 reguliše ekspresiju proteina CARP, koji bi mogao da ima ulogu lokalnog regulatora transkripcije u srcu (Zou *et al.*, 1997). Rezultati ove studije ukazuju da *Ankrd2* može biti još jedan kandidat preko koga Nkx2.5 ostvaruje svoj tkivno-specifični efekat. Ova pretpostavka je u korelaciji sa dokazima da *Ankrd2*, kao kofaktor, može da moduliše ekspresiju proteina kao što su MyoD, miogenin, Myh1 (myosin heavy chain 1), Cdkn1 (cyclin-dependent kinase inhibitor 1), Gadd45 (Growth Arrest and DNA Damage 45), Bax (Bcl-2-associated X protein) i p21 (Bean *et al.*, 2008; Kojić *et al.*, 2004).

Tokom embrionalnog razvića protein *Ankrd2* nije eksprimiran u srcu, dok je kod adulta eksprimiran u komorama, međukomornim pregradama i apeksu (Moriyama *et al.*, 2001; Ishiguro *et al.*, 2002), što sugriše da se uticaj Nkx2.5 na ekspresiju *Ankrd2* uspostavlja u adultnom stadijumu. U ranijim istraživanjima je pokazano da je ekspresija Nkx2.5 u adultnom srcu indukovana različitim inicijatorima hipertrofije kao što su povišen pritisak, isoproterenol, fenilefrin (Thompson *et al.*, 1998; Saadane *et al.*, 1999), pa se može očekivati da signalni putevi koji se aktiviraju navedenim stimulusima uključuju i aktivaciju gena *Ankrd2*. Uzimajući u obzir ulogu Nkx2.5 i njegov uticaj na ekspresiju *Ankrd2*, može se pretpostaviti da biološki smisao funkcionalne sprege ova dva proteina u adultnom srcu verovatno leži u angažovanju *Ankrd2* u signalnim putevima koji se aktiviraju nakon različitih vrsta stresa, uključujući i one koji dovode do hipertrofije.

Transkripcioni faktor p53 u mioblastima stimuliše aktivnost promotora *Ankrd2*

Ispitivanje uticaja rekombinantnog proteina p53 u mioblastima, pokazalo je potencijal transkripcionog faktora p53 da reguliše ekspresiju gena *Ankrd2*, što ukazuje

da bi Ankrd2, posredstvom p53 mogao biti uključen u opšte mehanizme zaštite ćelije od oštećenja.

Pitanje funkcionalne povezanosti proteina p53 i Ankrd2, do sada je razmatralo nekoliko grupa autora i očigledno je da su ova dva proteina u uzajamnoj vezi na više nivoa. Tako su Kojić i saradnici ustanovili da p53 i Ankrd2 međusobno interaguju (Kojić *et al.*, 2004). Pokazano je takođe, da je ekspresija gena Cdkn1, Gadd45, Bax i p21, preko kojih p53 ostvaruje svoj apoptotski efekat, modulirana proteinom Ankrd2 (Bean *et al.*, 2008). „Overekspresija” proteina Ankrd2 u ćelijama C2C12, dovodi do ometanja diferencijacije i indukovanja apoptoze. Kao objašnjenje ovog efekta, pretpostavlja se da Ankrd2 ometa diferencijaciju, podstičući ekspresiju proapoptotskih gena, kao kofaktor p53 (Bean *et al.*, 2008).

Rezultati ovog istraživanja ukazuju da funkcionalna veza između Ankrd2 i p53 postoji na još jednom nivou - na relaciji protein-gen. Naime, promotorskim esejima je pokazano da prisustvo p53 pojačava aktivnost promotora gena *Ankrd2*. Sa ovim rezultatima u korelaciji je i činjenica da se tokom procesa diferencijacije poprečno prugastih mišićnih ćelija, ekspresija oba proteina – p53 i Ankrd2 - povećava (Tamir i Bengal, 1998; Palavicini *et al.*, 2001), pa je verovatno da se putem p53 ostvaruje jedan od načina aktivacije gena *Ankrd2*.

Porast nivoa jedarne frakcije p53 u mišićima koji su podvrgnuti ekscentričnim kontrakcijama ili istezanju, navodi na zaključak da aktivacija p53 predstavlja potencijalni mehanizam odbrane mišićne ćelije, od mehaničkog, oksidativnog i termalnog stresa koji se javlja pri mišićnoj kontrakciji (Chen *et al.*, 2002). U skladu sa ovakvom pretpostavkom je i mogućnost p53 da indukuje ekspresiju proteina Ankrd2, s obzirom da je Ankrd2 okarakterisan kao protein čija se ekspresija indukuje kao odgovor na različite vrste stresa u mišićnoj ćeliji. Pošto pojedini autori navode dokaze da su proteini familije MARP povezani sa mehaničkom stabilnošću sarkomere (Barash *et al.*, 2007), može se pretpostaviti da p53 aktiviranjem ekspresije Ankrd2, pokreće i mehanizme koji omogućavaju očuvanje integriteta kontraktilne mašinerije.

Posredstvom p53, protein Ankrd2 bi mogao biti angažovan i u mehanizmima hipertrofije miokarda, s obzirom da istezanje komora između ostalog, dovodi i do aktiviranja protein kinaze C koja fosforilacijom aktivira p53 (Leri *et al.*, 1998; Leri *et al.*, 2000).

Još jedan važan aspekt koji ne treba zanemariti, odnosi se na suštinsku ulogu p53 i činjenicu da, decenijama unazad, mnogi proteini dobijaju epitet po tome što

funkcionišu „nizvodno od p53”. Uloga proteina p53 je vezana za odbranu ćelije, a pre svega genoma, od stresogenih faktora, kao što su jonizujuća zračenja, virusi, hemijski agensi itd. U prisustvu ovih agenasa p53 biva aktiviran i angažovan u jedru kao aktivator gena čiji produkti učestvuju u odbrani ćelije od stresa. Rezultati ove studije ukazuju da i *Ankrd2* pripada grupi gena regulisanih faktorom p53. Na osnovu toga može se pretpostaviti da ekspresija *Ankrd2* može biti indukovana stresogenim faktorima, kao što su zračenja, onkogeni i virusi, a koji nisu u vezi sa kontraktilnim statusom mišićne ćelije. Takođe, moguće je da aktivacijom ekspresije *Ankrd2*, faktor p53 obezbeđuje sopstveni kofaktor za aktivaciju proapoptotskih gena - Cdkn1, Gadd45, Bax i p21 (Bean *et al.*, 2008; Kojić *et al.*, 2004).

Sinergističko dejstvo transkripcionih faktora p53 i Nkx2.5 na aktivnost promotora gena *Ankrd2*

Uzimajući u obzir da se u promotoru gena *Ankrd2* pretpostavljena mesta za vezivanje transkripcionih faktora Nkx2.5 i p53 nalaze jedno uz drugo, nametnulo se pitanje da li istovremeno prisustvo oba transkripciona faktora ima različit efekat od efekta koji svaki od njih pojedinačno ima na promotor gena *Ankrd2*. Rezultati ove studije su pokazali da između Nkx2.5 i p53 postoji sinergistički efekat u pogledu dejstva na promotor gena *Ankrd2*, što navodi na pretpostavku da između ovih transkripcionih faktora postoji i fizička interakcija. Ova pretpostavka je potvrđena u *in vitro*, kao i u *in vivo* uslovima. Potvrda interakcije Nkx2.5 i p53 je novi podatak koji se odnosi na značajne regulatore transkripcije, ali za definisanje njenog šireg smisla potrebna su dalja istraživanja. U pogledu regulacije ekspresije gena *Ankrd2*, najverovatnije je da interakcija između Nkx2.5 i p53, u fiziološkim uslovima, postaje značajna u kardiomiocitima adulta, tokom stanja koja dovode do remodelovanja komora. U tom smislu, može se pretpostaviti da pojedina stanja zahtevaju *ekstremno* angažovanje *Ankrd2*, što bi se ostvarivalo delovanjem oba transkripciona faktora na promotor gena ovog proteina.

Sinergističko delovanje ova dva transkripciona faktora, ne samo da ukazuje na mogući način regulacije ekspresije gena *Ankrd2* u srcu, već naglašava važnost prisustva *Ankrd2* u ovom organu. Za sada, ne postoje studije koje se odnose na definisanje uloge *Ankrd2* u miokardu, kako u normalnim fiziološkim uslovima, tako i u patološkim stanjima. Međutim, Moriyama i saradnici su uočili da se region hromozoma 10 u okviru

koga je mapiran gen *Ankrd2*, preklapa sa regionom u okviru kojeg su mapirani geni asocirani sa dilatiranim kardiomiopatijama (Moriyama *et al.*, 2001). Rezultati ove studije, mogli bi biti dodatni podsticaj za istraživanja koja bi ukazala na značaj proteina *Ankrd2* u srcu.

Endogeni transkripcioni faktor NF-kB u mioblastima nema uticaja na aktivnost promotora *Ankrd2*

Rezultati ove studije su pokazali da transkripcioni faktor NF-kB u nediferenciranim mišićnim ćelijama, nema uticaja na ispitivani region promotora gena *Ankrd2*. Podaci iz literature pokazuju da NF-kB utiče na različite procese koji su karakteristični za mišiće, kao i da u dijafragmi miša reguliše ekspresiju gena *Ankrd2*. Tako je pokazano da faktor NF-kB može biti aktiviran kontrakcijama (Hollander *et al.*, 2001), mehaničkim istezanjem (Kumar *et al.*, 2003), ili kao posledica mitohondrijalnog stresa u ćelijama skeletnih mišića (Biswas *et al.*, 2003). U mioblastima koji su podvrgnuti mehaničkom stresu, dolazi do aktivacije transkripcionog faktora NF-kB, kao i proteina FAK (Focal Adhesion Kinase), Rac-1 i GTP-aze, što za posledicu ima podsticanje dalje proliferacije mioblasta i ometanje diferencijacije mioblasta u miotube (Kumar *et al.*, 2004). Mohamed i saradnici su pokazali da faktor NF-kB uzima učešća u regulaciji gena *Ankrd2* tokom longitudinalnog istezanja (Mohamed *et al.*, 2010). Međutim, nema podataka da li bi faktori familije NF-kB mogli uticati na ekspresiju *Ankrd2* u prisustvu drugih vrsta stresa ili u nediferenciranim mišićnim ćelijama. Zbog toga je bilo značajno da se uticaj faktora NF-kB na promotor gena *Ankrd2* ispita i na modelu koji je korišćen u ovoj studiji - proliferišućim mioblastima.

Primenom dualnih luciferaznih promotorskih eseja, nije evidentiran uticaj NF-kB na aktivnost promotora gena *Ankrd2* u nediferenciranim mišjim mišićnim ćelijama. Međutim, negativni rezultati eksperimenata u ovom radu, nisu u suprotnosti sa do sada objavljenim rezultatima. Mohamed i saradnici su objavili dokaze da longitudinalno istezanje dijafragme miša dovodi do aktivacije subjedinica p50 i p65 familije NF-kB koje se nakon migracije u jedro vezuju za promotor gena *Ankrd2* i intenziviraju njegovu ekspresiju. S druge strane, transferzalno istezanje dijafragme dovodilo je do indukcije ekspresije gena *Ankrd2* na drugi način -- preko proteina AP1 (Mohamed *et al.*, 2010). Na osnovu rezultata pomenute grupe autora kao i rezultata ove studije, može se pretpostaviti da je ekspresija gena *Ankrd2* pod kontrolom NF-kB, ali se taj mehanizam

regulacije uspostavlja, nakon diferencijacije mišićne ćelije i uspostavljanja njene funkcije.

U ovom radu je potvrđen jedan (mišićno specifični transkripcioni faktor MyoD) i identifikovana su dva (srčano-specifični transkripcioni faktor Nkx2.5 i opšti transkripcioni faktor p53) transkripciona faktora, koja imaju pozitivan (stimulišući) efekat na promotor gena *Ankrd2*. Takođe, eksperimenti u ovoj studiji su pokazali da MyoD deluje snažnije na promotor gena *Ankrd2* od faktora Nkx2.5 i p53, ali za potvrdu ovih relacija potrebna su dalja i detaljnija istraživanja. Konačna potvrda uticaja pomenutih transkripcionih faktora na aktivnost promotora gena *Ankrd2* zahteva korišćenje i drugih eksperimentalnih modela, kao i potvrdu direktne fizičke interakcije transkripcionih faktora i specifičnih nukleotidnih sekvenci analiziranog promotora.

5.2. Uticaj proteina CARP na aktivnost promotora gena *Ankrd2* u prisustvu faktora MyoD, p53 i Nkx2.5

Rezultati ove studije su pokazali da protein CARP može, indirektno, modulišući aktivnost transkripcionih faktora MyoD i p53, da utiče na promotor gena *Ankrd2* (Kojić *et al.*, 2010). Na taj način, identifikovana su dva nova transkripciona faktora - MyoD i p53 - čija je aktivnost modulirana proteinom CARP. Istovremeno, rezultati su ukazali na novu funkciju proteina CARP – ulogu pozitivnog modulatora ekspresije gena.

Protein CARP, kao i *Ankrd2*, pripada familiji proteina koji se specifično ekspimiraju u poprečno prugastim mišićnim ćelijama i odlikuju prisustvom ankirinskih ponovaka. Dosadašnja istraživanja su pokazala da CARP deluje kao negativni regulator transkripcije gena kao što su srčani troponin C, ANF (atrial natriuretic factor) i laki lanac miozina komora, čija je ekspresija inače regulisana transkripcionim faktorom Nkx2.5 (Jeyasseelan, *et al.*, 1997; Zou *et al.*, 1997). Takođe, postoje pretpostavke da bi proteini familije MARP mogli biti funkcionalno povezani (Barash *et al.*, 2007). Stoga je analiza regulacije aktivnosti promotora gena *Ankrd2* obuhvatila i ispitivanje uticaja proteina CARP, kako samostalno, tako i kao modulatora aktivnosti transkripcionih faktora koji pokazuju uticaj na promotor *Ankrd2*.

Za razliku od prethodnih istraživanja koja su pokazala da CARP ima ulogu negativnog modulatora aktivnosti transkripcionog faktora Nkx2.5, rezultati ove studije pokazuju da protein CARP ne modulira uticaj Nkx2.5 na promotor *Ankrd2*. Osim toga,

protein CARP se pokazao kao pozitivan modulator aktivnosti transkripcionih faktora MyoD i p53. U odsustvu transkripcionih faktora MyoD i p53, efekat pojačavanja ekspresije je izostao.

U prisustvu proteina CARP, efekat transkripcionog faktora MyoD na promotor gena *Ankrd2* bio je intenziviran za maksimalno 50 %, dok je efekat p53 bio pojačan maksimalno 2,5 puta. Ovaj nivo pojačanja efekta faktora MyoD i p53 na promotor gena *Ankrd2*, u prisustvu proteina CARP, mogao bi biti značajan u fiziološkim uslovima, ali tek eksperimenti sa intaktnim mišićima kao eksperimentalnim modelom, mogli bi da potvrde te relacije.

Mogući značaj uticaja proteina CARP na promotor gena *Ankrd2*, u fiziološkim uslovima može se razmatrati u više konteksta. Tokom razvića, ekspresija proteina *Ankrd2* i CARP se vremenski i prostorno u potpunosti ne preklapaju. Protein CARP je pre svega eksprimiran u srcu, kako u toku embrionalnog razvića, tako i kod adulta (Tsukamoto *et al.*, 2002), a njegova intenzivirana ekspresija je jedan od prvih pokazatelja hipertrofije srca (Aihara *et al.*, 2000). *Ankrd2* je eksprimiran u kardiomiocitima adultnog srca i to samo u pojedinim odeljcima, gde je mehanizam regulacije njegove ekspresije potpuno nepoznat (Moriyama *et al.*, 2001; Ishiguro *et al.*, 2002). Kao što je već pomenuto, p53 se aktivira tokom istezanja miokarda i hipertrofije srca, pa se može pretpostaviti da su upravo uslovi stresa i hipertrofije miokarda, faze kada je potrebno da se uticaj p53 na *Ankrd2* dodatno podstakne i preko CARP-a.

U skeletnim mišićima fetusa se sintetišu oba proteina (Ishiguro *et al.*, 2002). U eksperimentima sa „knock-out“ miševima kod kojih proteini familije MARP odsustvuju pojedinačno ili u međusobnoj kombinaciji, pokazano je da je prisustvo proteina familije MARP u periodu diferencijacije, bitno za pravilno formiranje mišićnog fenotipa (Barash, *et al.*, 2007). S obzirom na relacije pokazane u ovom radu, verovatno je, da je u periodu embriogeneze, ekspresija *Ankrd2* posredstvom MyoD i p53 regulisana dodatno i preko proteina CARP. Za skeletne mišiće adulta nije karakteristično prisustvo proteina CARP (Ishiguro *et al.*, 2002). Međutim, pokazano je da pojedini stimulusi ili patološka stanja, mogu da indukuju ekspresiju ovog proteina i u miocitima adulta (Barash *et al.*, 2003; Tsukamoto *et al.*, 2002). To ukazuje na mogućnosti da se ekspresija *Ankrd2* posredstvom MyoD i p53, može modulirati uticajem proteina CARP i u adultnom stadijumu.

Uticaj proteina CARP na ekspresiju *Ankrd2*, verovatno nije od vitalnog značaja, ali bi mogao biti značajan za finu regulaciju ekspresije ovog gena tokom značajnih

rearanžmana u ćeliji koji su regulisani faktorima MyoD i p53. Takođe, interesantan aspekt je mogućnost jednog od proteina da utiče na ekspresiju srodnog proteina, što baca svetlo na značaj njihove funkcionalne povezanosti.

5.3. Interakcija Ankrd2 sa sarkomernim proteinom teletoninom i transkripcionim faktorima p53, YB1 i PML ostvaruje se učesćem različitih motiva

Jedan deo istraživanja u ovom radu se odnosio na ispitivanje interakcija koje Ankrd2 ostvaruje sa drugim proteinima. Pokazano je da Ankrd2, ima raznorodne proteinske partnere. Ovaj protein ostvaruje interakciju sa transkripcionim faktorima p53, YB1 i PML, dok u sarkomeri, ostvaruje kontakte sa teletoninom titinom, miopaladinom i kalpain proteazom p94, formirajući tako jedan od mehanosenzornih sistema vezanih za titin (Miller *et al.*, 2003; Kojić *et al.*, 2004). Shodno funkciji, koja podrazumeva proteinsko-proteinske kontakte, primarna struktura proteina Ankrd2 je „opremljena“ ankirinskim ponovcima, motivima koji su predodređeni za ostvarivanje interakcija sa drugim proteinima. Ankirinski motivi su organizovani u vidu alfa spirala koje su međusobno razdvojene petljama. Način pakovanja ovih spirala u peptidnoj strukturi formira idealnu površinu za interakciju sa drugim proteinima, nezavisno od njihove sekvence ili strukture (Mosavi *et al.*, 2004). Međutim, nameće se pitanje da li su za intezivne proteinske interakcije, koje ostvaruje protein Ankrd2 osim ovih konzervisanih motiva, potrebne još neke strukture. Da bi se dao odgovor na ovo pitanje, analizirana je interakcija deletanata Ankrd2 sa proteinima čija je interakcija sa Ankrd2 potvrđena ranije. Rezultati su pokazali da se interakcije Ankrd2 sa transkripcionim faktorima i sa sarkomernim proteinima, ostvaruju na različite načine.

Za interakciju Ankrd2 sa sarkomernim proteinom teletoninom, potrebni su samo ankirinski ponovci. Ovi rezultati su u korelaciji sa rezultatima koje su dobili Hayashi i saradnici, pokazavši da za interakciju Ankrd2 sa sarkomernim proteinom titinom, nije potreban N-terminalni deo proteina Ankrd2 (Hayashi *et al.*, 2008). Ista grupa autora je pokazala da je Ankrd2 supstrat kalpain proteaze p94, koja na mestu Arg 77 vrši proteolizu i na taj način odstranjuje deo N terminusa, što dodatno stabilise interakciju ostatka proteina Ankrd2 i titina. Takođe, najnovija istraživanja pokazuju, da su za

interakciju Ankrd2 sa sarkomernim proteinom ZASP dovoljni samo ankirinski ponovci (G Faulkner, razmena podataka u okviru kolaborativnog projekta).

S druge strane, vezivanje Ankrd2 sa proteinima p53, YB1 i PML, pored ankirinskih ponovaka zahteva i N terminus. Ovi rezultati sugerišu da bi se Ankrd2 mogao vezivati na različite načine za proteine jedra i citoplazme/sarkomere. Ovakvo „ponašanje” moglo bi se objasniti pretpostavkom da ankirinski ponovci, kao nedovoljno selektivne strukture, nisu dovoljni za ostvarivanje interakcija između Ankrd2 i proteina p53, YB1 i PML. Očigledno je, da je za ostvarivanje intenzivnih proteinsko-proteinskih kontakata, osim ankirinskih motiva, potrebno angažovanje i dodatnih struktura koje bi stabilisale proteinske komplekse ili obezbedile specifičnost u prepoznavanju proteina.

U cilju bližeg definisanja dodatnih struktura potrebnih za interakciju Ankrd2 sa proteinima p53, YB1 i PML analizirane su interakcije ovih proteina sa proteinom Ankrd2 kod kojeg je deletiran jedan deo N terminusa (prvih 96 amino kiselina). Rezultati ovih analiza su pokazali da je preostali deo N terminusa (između NLS signala i ankirinskih ponovaka) dovoljan da, sa ankirinskim ponovcima, omogući vezivanje proteina Ankrd2 sa p53, YB1 i PML.

Jedno od objašnjenja na koji način sekvenca- između NLS signala i ankirinskih ponovaka – učestvuje u ostvarivanju fizičke interakcije između Ankrd2 i jedarnih proteina, jeste mogućnost da ovaj deo peptida stabilizuje trodimenzionalnu strukturu koja se preko ankirinskih ponovaka stvara prilikom kontakta Ankrd2 i proteina p53, YB1 i PML. Na ovaj način povećava se i mogućnost proteina Ankrd2 da interaguje sa većim brojem proteinskih partnera.

Sumarno, rezultati ove studije, sugerišu da protein Ankrd2 može biti uključen ne samo u primarni odgovor poprečno prugaste mišićne ćelije na adekvatne stimulse, nego i u procese na kojima se zasniva adaptacija mišića na dugoročne fiziološke zahteve. Rezultati ispitivanja regulacije ekspresije gena *Ankrd2*, pokazuju da se regulacija aktivnosti ovog gena odvija pod uticajem važnih faktora koji se u mišićima aktiviraju rano, još u toku embrionalnog razvića. Osim toga, transkripcioni faktori, ključni za diferencijaciju i razvoj skeletnih mišića (MyoD), i srca (Nkx2.5), postaju značajni i u diferenciranim mišićnim ćelijama, tokom odgovora na stimulse koji zahtevaju značajne rearanžmane tj. remodelovanje mišića. Na taj način, protein Ankrd2 je verovatno angažovan, kako u procesu razvoja i diferencijacije, tako i u održavanju plastičnosti poprečno-prugastog mišićnog tkiva.

Rezultati o potencijalnoj ulozi transkripcionog faktora Nkx2.5 u regulaciji ekspresije gena *Ankrd2*, su prvi podaci koji sugeriraju način regulacije ekspresije gena *Ankrd2* u srcu, a na taj način i moguću ulogu proteina Ankrd2 u miokardu.

Dokazi o uticaju proteina p53, kao transkripcionog faktora, na ekspresiju gena *Ankrd2*, dati u ovoj studiji, kao i mogućnost proteina Ankrd2 da moduliše ekspresiju proapoptotskih gena regulisanih faktorom p53 (Bean *et al.*, 2008), ukazuje da Ankrd2 uzima učešće u mehanizmima na kojima se zasniva očuvanje integriteta ćelije, kao i to da verovatno predstavlja jednu vrstu spone između mišićno-specifičnog programa ekspresije i opštih mehanizama zaštite ćelije od oštećenja.

Ispitivanje aktivnosti promotora gena *Ankrd2* pod uticajem proteina CARP, ukazalo je ne samo na postojanje fine regulacije analiziranog promotora nego i na novu ulogu proteina CARP kao pozitivnog regulatora ekspresije gena. Posebno interesantan aspekt je pitanje uzajamnog odnosa međusobno homologih proteina, kako su u svom radu nagovestili Barash i saradnici (Barash *et al.*, 2007), što bi mogao biti predmet daljih istraživanja.

Dokazi o učešću faktora značajnih za razvoj poprečno prugastih mišićnih ćelija kao što su MyoD i Nkx2.5 u regulaciji promotora gena *Ankrd2*, nisu dovoljni da objasne lokalizovanu ekspresiju Ankrd2, s obzirom da je u poprečno prugastim mišićima ovaj protein zastupljen preferencijalno u sporim mišićnim vlaknima, a u srcu samo u pojedinim odeljcima. To sugeriraju na učešće lokalnih ili epigenetskih faktora koji bi mogli dodatno regulisati ekspresiju ovog gena.

Postojanje dodatnih struktura koje pored ankirinskih ponovaka učestvuju u vezivanjima Ankrd2 za druge proteine je svojstvo koje povećava „kapacitet“ vezivanja Ankrd2 za druge proteine. Ovakva osobina je potpuno u skladu sa njegovom pretpostavljenom ulogom u signalnim putevima, odnosno dinamičkom lokalizacijom i intenzivnim interakcijama koje ostvaruje sa drugim proteinima. Signalnu ulogu proteina Ankrd2 sugeriraju ne samo postojeći podaci iz literature, već i najnovija istraživanja u okviru kojih je identifikovano preko 20 novih proteinskih partnera Ankrd2. Među tim novootkrivenim partnerima su različiti transkripcioni faktori, proteini sa PDZ motivima i proteini sa SH3 domenom (G Faulkner, razmena podataka u okviru kolaborativnog projekta). Buduća istraživanja trebalo bi da objasne dinamiku i način vezivanja Ankrd2 sa mnogobrojnim partnerima, kao i biološki smisao tih interakcija.

6. ZAKLJUČCI

- Ekspresija rekombinantnog transkripcionog faktora MyoD, ključnog faktora diferencijacije skeletnih mišića, stimuliše aktivnost promotora gena *Ankrd2* u nediferenciranim mišjim mišićnim ćelijama C2C12.
- Ekspresija rekombinantnog transkripcionog faktora Nkx2.5, ključnog faktora razvića srca, stimuliše aktivnost promotora gena *Ankrd2* u nediferenciranim mišjim mišićnim ćelijama C2C12, što je prvi rezultat koji ukazuje na mehanizam regulacije ekspresije proteina Ankrd2 u srcu.
- Ekspresija rekombinantnog transkripcionog faktora p53 stimuliše aktivnost promotora gena *Ankrd2* u nediferenciranim mišjim mišićnim ćelijama C2C12, što protein Ankrd2 povezuje sa opštim mehanizmima zaštite integriteta ćelije.
- Endogeni transkripcioni faktor NF- κ B, aktiviran citokinom TNF α , nema uticaja na aktivnost promotora gena *Ankrd2* u nediferenciranim mišjim mišićnim ćelijama C2C12.
- Rekombinantni transkripcioni faktori Nkx2.5 i p53, eksprimirani u nediferenciranim mišjim mišićnim ćelijama C2C12, pokazuju sinergističko dejstvo na aktivnost promotora gena *Ankrd2*.
- Proteini Nkx2.5 i p53, međusobno interaguju, što je pokazano u *in vivo* (metodom koimunoprecipitacije) i u *in vitro* (metodom „GST pull down“) uslovima.

- Rekombinantni protein CARP, eksprimiran u nediferenciranim mišjim mišićnim ćelijama stimuliše efekat transkripcionih faktora MyoD i p53 na aktivnost promotora gena *Ankrd2*, što je prvi rezultat koji ukazuje na ulogu proteina CARP kao pozitivnog modulatora ekspresije gena .
- Rekombinantni protein CARP, eksprimiran u nediferenciranim mišjim mišićnim ćelijama C2C12 ne modulira uticaj transkripcionog faktora Nkx2.5 na promotor gena *Ankrd2*.
- Ankirinski ponovci su neophodni i dovoljni za interakciju proteina Ankrd2 sa sarkomernim proteinom teletininom.
- Interakcija proteina Ankrd2 sa proteinima p53, YB1 i PML, osim ankirinskih motiva, zahteva prisustvo regiona od 97. do 120. aminokiseline u okviru N terminusa

7. LITERATURA

Aihara Y, Kurabayashi M, Saito Y, Ohyama Y, Tanaka T, Takeda S, Tomaru K, Sekiguchi K, Arai M, Nakamura T, Nagai R. Cardiac ankyrin repeat protein is a novel marker of cardiac hypertrophy: role of M-CAT element within the promoter. *Hypertension*. 2000;36:48-53.

Akazawa H, Komuro I. Cardiac transcription factor Csx/Nkx2-5: Its role in cardiac development and diseases. *Pharmacol Ther*. 2005;107:252-268.

Almon EN, Goldfinger N, Kapon A, Schwarts D, Levine AJ, and Rotter V. Testicular tissue-specific expression of the p53 suppressor gene. *Dev Biol*. 1993;156:107-116

Almong N and Rotterr V. Involvement of p53 in cell differentiation and development. *Biochim Biophys Acta*. 1997;1333:F1-F27.

Avison BM. *Measuring Gene Expresion*. Taylor and Francis Group. New York, 2007.

Baldwin AS Jr. The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol*. 1996;14:649-83.

Barash IA, Bang ML, Mathew L, Greaser ML, Chen J, Lieber RL. Structural and regulatory roles of the muscle ankyrin repeat protein family in skeletal muscle. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2007;293:C218-C227.

Barash IA, Mathew L, Ryan AF, Chen J, Lieber RL. Rapid muscle-specific gene expression changes after a single bout of eccentric contractions in the mouse. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2004;286:C355-C364.

Bean C, Facchinello N, Faulkner G, Lanfranchi G. The effects of Ankrd2 alteration indicate its involvement in cell cycle regulation during muscle differentiation. *Biochim Biophys Acta*. 2008;1783:1023-1035.

Bean C, Salamon M, Raffaello A, Campanaro S, Pallavicini A, Lanfranchi. The Ankrd2, Cdkn1c and calcyclin genes are under the control of MyoD during myogenic differentiation. *J Mol Biol*. 2005;349:349-366.

Bottinelli R, Reggiani C. Human skeletal muscle fibres: molecular and functional diversity. *Prog Biophys Mol Biol*. 2000;73:195-262.

Benson DW, Silberbach GM, Kavanaugh-McHugh A, Cottrill C, Zhang Y, Riggs S, Smalls O, Johnson MC, Watson MS, Seidman JG, Seidman CE, Plowden J, Kugler JD. Mutations in the cardiac transcription factor NKX2.5 affect diverse cardiac developmental pathways. *J Clin Invest*. 1999;104:1567-1573.

Biswas G, Anandatheerthavarada HK, Zaidi M, Avadhani NG. Mitochondria to nucleus stress signaling: a distinctive mechanism of NFkappaB/Rel activation through calcineurin-mediated inactivation of IkappaBbeta. *Cell Biol*. 2003;61:507-519.

Boateng SY, Senyo SE, Qi L, Goldspink PH, Russell B. Myocyte remodeling in response to hypertrophic stimuli requires nucleocytoplasmic shuttling of muscle LIM protein. *J Mol Cell Cardiol*. 2009;47:426–435.

Brooks CL, Gu W. Ubiquitination, phosphorylation and acetylation: the molecular basis for p53 regulation. *Curr Opin Cell Biol*. 2003;15:164–171.

Chen YW, Nader GA, Baar KR, Fedele MJ, Hoffman EP, Esser KA. Response of rat muscle to acute resistance exercise defined by transcriptional and translational profiling. *J Physiol*. 2002;545:27-41.

Choi J, Donehower LA. p53 in embrionic development: maintaining a fine balance. *Cell Mol Life Sci*. 1999;55:38-47.

Choi J, Costa ML, Mermelsten CS, Chagas C, Holtzer S, Holtzer H. MyoD converts primary dermal fibroblasts, chondroblasts, smooth muscle, and retinal pigmented epithelial cells into striated mononucleated myoblasts and multinucleated myotubes. *Proc Natl Acad USA*. 1990;87:7988-7992.

Chu W, Burns DK, Swerlick RA, Presky DH. Identification and characterization of a novel cytokine-inducible nuclear protein from human endothelial cells. *J Biol Chem*. 1995;270:10236-10245.

Cinquetti R, Badi I, Camoione M, Bortoletto E, Chiesa G, Parolini C, Camesasca C, Russo A, Taramelli R, Acquati F. Transcriptional deregulation and missense mutation define ANKRD1 as candidate gene for total anomalous pulmonary venous return. *Hum Mut*. 2008;29:468-474.

Davis JM. *Basic cell culture*, Oxford University Press, 2002, second edition.

Donehower LA, Harvey M, Slagle BL, McArthur MJ, Montgomery CA, Butel JS, Bradley A. Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. *Nature*. 1992;356:215-221.

Durocher D, Charron F, Warren R, Schwartz RJ, Nemer M. The cardiac transcription factors Nkx2-5 and GATA-4 are mutual cofactors. *EMBO*. 1997;16:5687-5696.

El-Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE, Levy DB, Parsons R, Trent JM, Lin D, Mercer WE, Kinzler KW, Vogelstein B. WAF1, a potential mediator of the p53 tumor suppression. *Cell*. 1993;75:817-825.

Farmer G, Bargonetti J, Zhu H, Friedman P, Prywes R, Prives C. Wild-type p53 activates transcription in vitro. *Nature*. 1992;358:83-86.

Faulkner G, Pallavicini A, Comelli A, Salamon M, Bortoletto G, Ievolella C, Trevisan S, Kojić S, Dalla Vecchia F, Laveder P, Valle G, Lanfranchi G. FATZ, a filamin-, actinin-, and telethonin-binding protein of the Z-disc of skeletal muscle. *J Biol Chem.* 2000;275:41234-41242.

Flück M and Hoppeler H. Molecular basis of skeletal muscle plasticity-from gene to form and function. *Rev Physiol Biochem Pharmacol.* 2003;146:159-216.

Frank D, Kuhn C, Katus AH, Frey N. The sarcomeric Z-disc: a nodal point in signaling and disease. *J Mol Med.* 2006;84:446-468.

Haian F. Protein-Protein interactions. Methods and applications. Humana Press, Totova, New Jersey, 2004.

Harris SB, JayYP, Rackley SM, Iyumo S, O'Brien X. Terrence, Gourdie GR. Transcriptional regulation of cardiac conduction system development: FASEB Cardiac Conduction System Minimeeting, Washington, DC, *The Anatomical record* 2004;280A:1036-1045.

Harvey RP, Lai D, Elliott D, Biben C, Solloway M, Prall O, Stennard F, Schindeler A, Groves N, Lavulo L, Hyun C, Yeoh T, Costa M, Furtado M, Kirk E. Homeodomain factor Nkx2-5 in heart development and disease. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 2002;67:107-114.

Hayashi C, Ono Y, Doi N, Kitamura F, Tagami M, Mineki R, Arai T, Taguchi H, Yanagida M, Hirner S, Labeit D, Labeit S, Sorimachi H. Multiple molecular interactions implicate the connectin/titin N2A region as a modulating scaffold for p94/calpain 3 activity in skeletal muscle. *Biol Chem.* 2008;283:14801-14814.

Hentzen ER, Lahey M, Peters D, Mathew L, Barash IA, Frid J, Lieber RL. Stress-dependent and -independent expression of the myogenic regulatory factors and the MARP genes after eccentric contractions in rats. *J Physiol.* 2006;570:157-167.

Hess J, Angel P, Schorpp-Kistner M. AP-1 subunits: quarrel and harmony among siblings. *J Cell Sci.* 2004;117:5965–5973.

Hollander J, Fiebig R, Gore M, Ookawara T, Ohno H, Ji LL. Superoxide dismutase gene expression is activated by a single bout of exercise in rat skeletal muscle. *Pflugers Arch.* 2001;442:426-434.

Hughes SM, Taylor JM, Tapscott SJ, Gurley CM, Carter WJ, Peterson CA. Selective accumulation of MyoD and myogenin mRNAs in fast and slow adult skeletal muscle is controlled by innervation and hormones. *Development.* 1993;118:1137-1147.

Ikeda K, Emoto N, Matsuo M, Yokoyama M. Molecular identification and characterization of a novel nuclear protein whose expression is up-regulated in insulin-resistant animals. *J Biol Chem.* 2003;278:3514-3520.

Ishiguro N, Baba T, Ishida T, Takeuchi K, Osaki M, Araki N, Okada E, Takahashi S, Saito M, Watanabe M, Nakada C, Tsukamoto Y, Sato K, Ito K, Fukayama M, Mori S, Ito H, Moriyama M. Carp, a cardiac ankyrin-repeated protein, and its new homologue, Arpp, are differentially expressed in heart, skeletal muscle, and rhabdomyosarcomas. *Am J Pathol.* 2002;160:1767-1778.

Ishiguro N, Motoi T, Osaki M, Araki N, Minamizaki T, Moriyama M, Ito H, Yoshida H. Immunohistochemical analysis of a muscle ankyrin-repeat protein, Arpp, in paraffin-embedded tumors: evaluation of Arpp as a tumor marker for rhabdomyosarcoma. *Hum Pathol.* 2005;36:620-625.

Jamali M, Rogerson JP, Wilton S, Skerjanec I. Nkx2.5 activity is essential for cardiomyogenesis. *J Biol Chem.* 2001;76:42252-42258.

Jeong D, Kim JM, Cha H, Oh JG, Park J, Yun SH, Ju ES, Jeon ES, Hajjar RJ, Park WJ. PICOT attenuates cardiac hypertrophy by disrupting calcineurin-NFAT signaling. *Circ Res.* 2008;102:711–719.

Jeyaseelan R, Poizat C, Baker RK, Abdishoo S, Isterabadi LB, Lyons GE, Kedes L. A novel cardiac-restricted target for doxorubicin. Ankrd1/CARP, a nuclear modulator of gene expression in cardiac progenitor cells and cardiomyocytes. *J Biol Chem.* 1997;272:22800–22808.

Karpati G, Hilton-Jones D and Griggs CR. Disorders of voluntary muscle. 2001, 7th edition. Cambridge University Press.

Kastan MB, Zhan Q, El-Deiry WS, Carrier, Jacks T, Walsh WV, Plunkett BS, Vogelstein B, Fornace JR. A mammalian cell cycle checkpoint pathway utilizing p53 and GADD45 is defective in ataxia-telangiectasia. *Cell.* 1992;71:587-597.

Kastan MB, Radin AI, Kuerbitz SJ, Onyekwere O, Wolkow CA, Civin CI, Stone KD, Woo T, Ravindranath Y, Craig RW. Levels of p53 protein increase with maturation in human hematopoietic cells. *Cancer Res.* 1991;51:4279-4286.

Kemp TJ, Sadusky TJ, Saltisi F, Carey N, Moss J, Yang SY, Sassoon DA, Goldspink G, Coulton GR. Identification of Ankrd2, a novel skeletal muscle gene coding for a stretch-responsive ankyrin-repeat protein. *Genomics.* 2000;66:229-241.

Kern SE, Kinzler KW, Bruskin A, Jarosz D, Friedman P, Prives C, Vogelstein B. Identification of p53 as a sequence-specific DNA-binding protein. *Science (Wash. DC).* 1991;252:1708-1711.

Kojic S, Medeot E, Guccione E, Krmac H, Zara I, Martinelli V, Valle G, Faulkner G. The Ankrd2 protein, a link between the sarcomere and the nucleus in skeletal muscle. *J Mol Biol.* 2004;339:313-325.

Kojic S, Nestorovic A, Rakicevic L, Belgrano A, Stankovic M, Divac A, Faulkner G. A novel role for cardiac ankyrin repeat protein Ankrd1/CARP as a co-activator of the p53 tumor suppressor protein. *Arch Biochem Biophys.* 2010;502:60-67.

Kumar A, Boriek AM. Mechanical stress activates the nuclear factor-kappaB pathway in skeletal muscle fibers: a possible role in Duchenne muscular dystrophy FASEB J. 2003;17:386-396.

Kumar A, Murphy R, Robinson P, Wei L, Boriek AM. Cyclic mechanical strain inhibits skeletal myogenesis through activation of focal adhesion kinase, Rac-1 GTPase, and NF-kappaB. FASEB J. 2004;18:1524-1535.

Kuryłowicz A, Nauman J. The role of nuclear factor-kappaB in the development of autoimmune diseases: a link between genes and environment. Acta Biochim Pol. 2008;55:629-647.

Lane DP. Cancer. p53, guardian of the genome. Nature. 1992;358:15–16.

Lane DP, Crawford, LV. T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. Nature. 1979;278:261-263.

Lange S, Xiang F, Yakovenko A, Vihola A, Hackman P, Rostkova E, Kristensen J, Brandmeier B, Franzen G, Hedberg B, Gunnarsson LG, Hughes SM, Marchand S, Sejersen T, Richard I, Edstrom L, Ehler E, Udd B, Gautel M. The kinase domain of titin controls muscle gene expression and protein turnover. Science. 2005;308:1599–1603.

Leri A, Claudio PP, Li Q, Wang X, Reiss K, Wang S, Malhotra A, Kajstura J, Anversa P. Stretch-mediated release of angiotensin II induces myocyte apoptosis by activating p53 that enhances the local renin-angiotensin system and decreases the Bcl-2-to-Bax protein ratio in the cell. J Clin Invest. 1998;101:1326-1342.

Leri A, Fiordaliso F, Setoguchi M, Limana F, Bishopric NH, Kajstura J, Webster K, Anversa P. Inhibition of p53 function prevents renin-angiotensin system ctivation and stretch-mediated myocyte apoptosis. Am J Pathol. 2000;157:843-857.

Levine A.J. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. Cell. 1997;88:323–331.

Li M, Brooks CL, Wu-Baer F, Chen D, Baer GuW. Mono- versus polyubiquitination: differential control of p53 fate by Mdm2. *Science*. 2003;302:1972–1975.

Linke WA, Krüger M. The giant protein titin as an integrator of myocyte signaling pathways. *Physiology*. 2010;25:186-198.

Maione R, Amati P. Interdependence between muscle differentiation and cell-cycle control. *Biochim Biophys Acta*. 1997;1332:M19-M30.

Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 1982. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.

McKoy G, Léger ME, Bacou F, Goldspink G. Differential expression of myosin heavy chain mRNA and protein isoforms in four functionally diverse rabbit skeletal muscles during pre- and postnatal development. *G Dev Dyn*. 1998;211:193-203.

Mckoy G, Hou Y, Yang SY, Vega Avelaira D, Degens H, Goldspink G, Coulton GR. Expression of Ankrd2 in fast and slow muscles and its response to stretch are consistent with a role in slow muscle function. *J Appl Physiol*. 2005;98:2337-2343.

Mikhailov AT, Torrado M. The enigmatic role of the ankyrin repeat domain 1 gene in heart development and disease. *Int. J Dev Biol*. 2008; 52:811-821.

Miller MK, Bang ML, Witt CC, Labeit D, Trombitas C, Watanabe K, Granzier H, McElhinny AS, Gregorio CC, Labeit S. The muscle ankyrin repeat proteins: CARP, Ankrd2/Arpp and DARP as a family of titin filament-based stress response molecules. *J. Mol. Biol*. 2003;333:951-964.

Miyashita T, Reed JC. Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell*. 1995;80:293-299.

Mohamed JS, Lopez MA, Cox GA, Boriek AM. Anisotropic regulation of Ankrd2 gene expression in skeletal muscle by mechanical stretch. *FASEB J*. 2010;24:3330-3340.

Momand J, Zambatti GP, Olson DC, George D, Levine A. The *mdm-2* oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation. *Cell*. 1992; 69:1237-1245.

Moriyama M, Tsukamoto Y, Fujiwara M, Kondo G, Nakada C, Baba T, Ishiguro N, Miyazaki A, Nakamura K, Hori N, Sato K, Shomori K, Takeuchi K, Satoh H, Mori S, Ito H. Identification of a novel human ankyrin-repeated protein homologous to CARP. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001;285:715-723.

Mosavi L, Cammett JT, Desrosiers CD, Peng YZ. The Ankyrin repeat as molecular architecture for protein recognition. *Protein Science*. 2004;13:1435-1448.

Moulik M, Vatta M, Witt SH, Arola AM, Murphy RT, McKenna WJ, Boriek AM, Oka K, Labeit S, Bowles NE, Arimura T, Kimura A, Towbin JA. ANKRD1, the gene encoding cardiac ankyrin repeat protein, is a novel dilated cardiomyopathy gene. *J Am Coll Cardiol*. 2009;54:325-333.

Nakada C, Tsukamoto Y, Oka A, Nonaka I, Sato K, Mori S, Ito H, Moriyama M. Altered Expression of ARPP Protein in skeletal muscles of patients with muscular dystrophy, congenital myopathy and spinal muscular atrophy. *Pathology*. 2004;71:43-51.

Nakamura K, Nakada C, Tekeuchi K, Osaki M, Shomori K, Kato S, Ohama E, Sato K, Fukayama M, Mori S, Ito H, Moriyama M. Altered expression of cardiac ankyrin repeat protein and its homologue ankyrin repeat protein with PEST and proline-rich region in atrophic muscles in amyotrophic lateral sclerosis. *Pathology*. 2003;70:197-203.

Okamoto K, Beach D. Cyclin G is a transcriptional target of the p53 tumor suppressor protein. *EMBOJ*. 1994;13:4816-4822.

Olson EN. Regulation of muscle transcription by the MyoD family. The heart of the matter. *Circ Res*. 1993;72:1-6.

Pallavicini A, Kojić S, Bean C, Vainzof M, Salamon M, Ievolella C, Bortoletto G, Pacchioni B, Zatz M, Lanfranchi G, Faulkner G, Valle G. Characterization of human skeletal muscle Ankrd2. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001;285:378-386.

Pardo JV, Siliciano JD, Craig SW. A vinculin-containing cortical lattice in skeletal muscle: transverse lattice elements (costameres) mark sites of attachment between myofibrils and sarcolemma. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1983;80:1008-1012.

Timmons JA, Wennmalm K, Larsson O, Walden TB, Lassmann T, Petrovic N, Hamilton DL, Gimeno RE, Wahlestedt C, Baar K, Nedergaard J, Cannon B. Myogenic gene expression signature establishes that brown and white adipocytes originate from distinct cell lineages. *Proc Natl Acad Sci.* 2007;104:4401-4406.

Porrello A, Cerone MA, Coen S, Gurtner A, Fontemaggi G, Cimino L, Piaggio G, Sacchi A, Soddu S. p53 regulates myogenesis by triggering the differentiation activity of pRb. *J Cell Biol.* 2000;151:1295-1304.

Reamon-Buettner SM, Borlak J. NKX2-5: an update on this hypermutable homeodomain protein and its role in human congenital heart disease (CHD). *Hum Mutat.* 2010; Epub ahead of print, PMID: 20725931.

Reamon-Buettner SM, Borlak J. Somatic NKX2-5 mutations as a novel mechanism of disease in complex congenital heart disease. *J Med Genet.* 2004;41:684-690.

Saadane N, Alpert L, Chalifour LE. Expression of immediate early genes, GATA-4, and Nkx-2.5 in adrenergic-induced cardiac hypertrophy and during regression in adult. *Br J Pharmacol.* 1999;127:1165-1176.

Samarel AM. PICOT: a multidomain scaffolding inhibitor of hypertrophic signal transduction. *Circ Res.* 2008;102:625-627.

Shomori K, Nagashima Y, Kuroda N, Honjo A, Tsukamoto Y, Tokuyasu N, Maeta N, Matsuura K, Hijiya N, Yano S, Yokoyama S, Ito H, Moriyama M. ARPP protein is

selectively expressed in renal oncocytoma, but rarely in renal cell carcinomas. *Mod Pathol.* 2007;20:199-207.

Seale P, Bjork B, Yang W, Kajimura S, Chin S, Kuang S, Scimè A, Devarakonda S, Conroe HM, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Rudnicki MA, Beier DR, Spiegelman BM. PRDM16 controls a brown fat/skeletal muscle switch. *Nature.* 2008;454:961-967.

Siu PM, Alway SE. Id2 and p53 participate in apoptosis during unloading-induced muscle atrophy. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2005;288:C1058- C1073 (A).

Siu PM, Alway SE. Subcellular responses of p53 and Id2 in fast and slow skeletal muscle in response to stretch-induced overload. *J Appl Physiol.* 2005;99:1897-1904 (B).

Smerdu V, Erzen I.J. Dynamic nature of fibre-type specific expression of myosin heavy chain transcripts in 14 different human skeletal muscles. *Muscle Res Cell Motil.* 2001;22:647-655.

Soddu S, Blandino G, Scardigli R, Coen S, Marchetti A, Rizzo MG, Bossi G, Cimino L, Crescenzi M, Sacchi A. Interference with p53 protein inhibits hematopoietic and muscle differentiation. *J Cell Biol.* 1996;134:193-204.

Takebayashi-Suzuki K, Pauliks LB, Eltsefon Y, Mikawa T. Purkinje fibers of the avian heart express a miogeic transcription factor program distinct from cardiac and skeletal muscle. *Dev Biol.* 2001;234:390-401.

Tamir Y, Bengal E. p53 protein is activated during muscle differentiation and participates with MyoD in the transcription of muscle creatine kinase gene. *Oncogene.* 1998;17:347-356.

Tee JM and Peppelenbosch MP. Anchoring skeletal muscle development and disease: the role of ankyrin repeat domain containing proteins in muscle physiology. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 2010;45:318-330.

Thompson JT, Rackley MS, O'Brien TX. Upregulation of the cardiac homeobox gene Nkx2-5 (CSX) in feline right ventricular pressure overload. *Am J Physiol*. 1998;274:H1569-H1573.

Toko H, Zhu W, Takimoto E, Shiojima I, Hiroi Y, Zou Y, Oka T, Akazawa H, Mizukami M, Sakamoto M, Terasaki F, Kitaura Y, Takano H, Nagai T, Nagai R, Komuro I. Csx/Nkx2-5 is required for homeostasis and survival of cardiac myocytes in the adult heart. *J. Biol Chem*. 2002;277:24735–24743.

Tsukamoto Y, Hijiya N, Yano S, Yokoyama S, Nakada C, Uchida T, Matsuura K, Moriyama M. Arpp/Ankrd2, a member of the muscle ankyrin repeat proteins (MARPs), translocates from the I-band to the nucleus after muscle injury. *Histochem Cell Biol*. 2008;129:55-64.

Tsukamoto Y, Senda T, Nakano T, Nakada C, Hida T, Ishiguro N, Kondo G, Baba T, Sato K, Osaki M, Mori S, Ito H, Moriyama M. Arpp, a new homolog of carp, is preferentially expressed in type 1 skeletal muscle fibers and is markedly induced by denervation. *Lab Invest*. 2002;82:645-655.

Tsunoda T, Takagi T. Estimating Transcription Factor Bindability on DNA. *Bioinformatics*. 1999;15:622-630.

Vogelstein B, Lane D, Levine AJ. Surfing the p53 network. *Nature*. 2000;408:307–310.

von Nandelstadh P, Ismail M, Gardin C, Suila H, Zara I, Belgrano A, Valle G, Carpen O, Faulkner G. A class III PDZ binding motif in the myotilin and FATZ families binds enigma family proteins: a common link for Z-disc myopathies. *Mol Cell Biol*. 2009;29:822-834 .

Willis MS, Ike C, Li L, Wang DZ, Glass DJ, Patterson C. Muscle-ring-finger-1, but not musclering- finger-2, regulates cardiac hypertrophy *in vivo*. *Circ Res*. 2007;100:456–459.



Witt CC, Witt SH, Lerche S, Labeit D, Back W, Labeit S. Cooperative control of striated muscle mass and metabolism by MuRF1 and MuRF2. *EMBO J.* 2008;27:350–360.

Wu X, Bayle JH, Olson D, Levine AJ. The p53-mdm-2 autoregulatory feedback loop. *Genes Dev.* 1993;7:1126–1132.

Zou Y, Evans S, Chen J, Kuo HC, Harvey RP, Chien KR. Ankrd1/CARP, a cardiac ankyrin repeat protein is downstream in the Nkx2-5 homeobox gene pathway. *Development.* 1997;124:793–804.