

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Jelena D. Marković

MOLEKULARNI MEHANIZMI
REGULACIJE EKSPRESIJE GENA ZA
CXCL12 U BETA ĆELIJAMA PANKREASA
PACOVA

doktorska disertacija

Beograd, 2013

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Jelena D. Marković

MOLECULAR MECHANISMS
RESPONSIBLE FOR THE REGULATION
OF CXCL12 GENE EXPRESSION IN
PANCREATIC BETA CELLS

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2013

MENTORI

dr Melita Vidaković, naučni savetnik

Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“,

Univerzitet u Beogradu

dr Gordana Matić, redovni profesor

Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

KOMISIJA

dr Melita Vidaković, naučni savetnik

Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“,

Univerzitet u Beogradu

dr Gordana Matić, redovni profesor

Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

dr Aleksandra Uskoković, naučni saradnik

Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“,

Univerzitet u Beogradu

dr Jelena Arambašić Jovanović, naučni saradnik

Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“,

Univerzitet u Beogradu

Eksperimentalni deo ove doktorske disertacije urađen je na Odeljenju za molekularnu biologiju, Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“, Univerziteta u Beogradu u okviru projekta „Signalni molekuli u dijabetesu: identifikacija potencijalnih bioloških markera uključenih u modifikaciju i integraciju signalnih puteva u cilju predikcije i intervencije u dijabetesu“ (br. 173020) finansiranog od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.

Zahvaljujem se,

dr Meliti Vidaković, mojoj mentorki, za sveobuhvatnu pomoć, stručne i prijateljske savete i podršku koju mi je nesebično pružala u svim fazama izrade ove doktorske teze. Njena neiscrpna pokretačka energija, veliki entuzijazam i optimizam motivisali su me da uvek težim ka boljem i pomagali su mi da prebrodim i najteže periode tokom rada na doktorskoj disertaciji. Zahvaljujući njenom velikom angažovanju u nabavci sredstava za rad, uspeali su da se realizuju svi ciljevi u ovom istraživanju.

dr Aleksandri Uskoković, pod čijim rukovodstvom je urađen deo istraživanja vezan za izučavanje uticaja međuproteinskih interakcija transkripcionih faktora na ekspresiju gena za CXCL12 u beta ćelijama pankreasa. Hvala na velikoj posvećenosti, strpljenju i neizmernoj pomoći u izvođenju tehnika za manipulaciju proteinskim uzorcima (elektroforetsko razdvajanje proteina, imunoblot, ko-immunoprecipitacije proteina i analiza formiranih kompleksa), bez kojih ne bi bilo moguće na ovaj način realizovati doktorsku tezu.

dr Neveni Grdović i dr Svetlani Dinić na podršci, na dugim naučnim diskusijama, na nesebično pruženim savetima u toku izrade doktorske disertacije i na velikoj pomoći u radu u ćelijskoj kulturi, u izvođenju eseja za određivanje ćelijske vijabilnosti i u eksperimentima lančane reakcije polimeraze u realnom vremenu.

dr Mirjani Mihailović na korisnim sugestijama tokom pisanja doktorske teze i na velikoj pomoći u izvođenju komet eseja.

dr Jeleni Arambašić Jovanović za nesebično pruženu pomoć u statističkoj obradi podataka.

dr Goranu Poznanoviću na strpljenju i na korisnim savetima u toku pisanja teze.

dr Goradni Matić na ukazanoj pažnji i na korisnim sugestijama tokom izrade doktorske disertacije.

dr Teodori Karan-Đurašević i dr Sonji Pavlović na velikoj pomoći i upornosti prilikom izvođenja eksperimenata kloniranja koji su realizovani u laboratoriji za Molekularnu hematologiju, Instituta za molekularnu genetiku i genetsko inženjerstvo.

Tatjani Živić za pomoć u laboratorijskom radu.

dr Mariji Mojić na velikoj podršci i pomoći tokom izrade doktorske disertacije.

mojim roditeljima, sestri Stanislavi i mom Zoranu za bezgranično razumevanje, poverenje, emotivnu i moralnu podršku kojom su mi omogućili da uspešno završim rad na ovoj doktorskoj tezi.

Molekularni mehanizmi regulacije ekspresije gena za CXCL12 u beta ćelijama pankreasa pacova

REZIME

Dijabetes tip 1 nastaje kao posledica autoimune destrukcije beta ćelija pankreasa, dok se u osnovi dijabetesa tip 2 nalazi nefunkcionalnost beta ćelija i rezistencija na insulin. S obzirom da je gubitak beta ćelija prisutan u oba tipa dijabetesa, potrebno je pronaći načine za očuvanje funkcionalnih beta ćelija. Rasvetljavanje molekularnih mehanizama regulacije ekspresije gena čiji proteinski produkti imaju ključnu ulogu u normalnom funkcionisanju i preživljavanju beta ćelija, može doprineti razvoju novih strategija za prevenciju i lečenje dijabetesa. Jedan od tih proteina je hemokin CXCL12, koji doprinosi očuvanju funkcionalnih beta ćelija tako što pospešuje njihovo preživljavanje i učestvuje u transdiferencijaciji alfa u beta ćelije.

U okviru ove teze je pokazano da CXCL12 doprinosi očuvanju DNK integriteta i pospešuje preživljavanje beta ćelija pankreasa nakon primene dijabetogenog agensa, streptozotocina (STZ). Pošto je utvrđeno protektivno dejstvo CXCL12 na beta ćelije, sledeći korak je bio da se ispituju molekularni mehanizmi transkripcione regulacije pacovskog gena za CXCL12 (*Cxcl12*) u beta ćelijama. Uopšteno, transkripciona regulacija gena se zasniva na interakciji *trans*-delujućih proteina i *cis*-regulatornih DNK sekvenci. Serijom eksperimenata potvrđena je *in vitro* i *in vivo* interakcija između poli(ADP-ribozil) polimeraze-1 (PARP-1) i RAM 4 elementa, koji se nalazi uzvodno od promotora *Cxcl12*, na poziciji -1725/-1592 bp. Pored toga, pokazano je da u bazalnim uslovima PARP-1, YY1, C/EBP β , C/EBP α , STAT3, p53, FOXO3a, Sp1 i HMG I/Y vezuju promotor *Cxcl12*, na osnovu čega je zaključeno da su pomenuti transkripcioni faktori uključeni u transkripcionu regulaciju *Cxcl12* u beta ćelijama. Metodom koimunoprecipitacije proteina ustanovljeno da u beta ćelijama pojedini transkripcioni regulatori *Cxcl12* stupaju u međuproteinske interakcije (detektovane se sledeće interakcije: YY1 - PARP-1, FOXO3a - PARP-1, Sp1 - PARP-1, p53 - PARP-1, C/EBP β - PARP-1, YY1 - p53, YY1 - FOXO3a, p53 - FOXO3a, Sp1 - FOXO3a,

C/EBP β - FOXO3a, C/EBP α - FOXO3a i Sp1 – STAT3). Uočene međuproteinske interakcije ukazuju na činjenicu da se transkripcija *Cxcl12* nalazi pod kontrolom multi-subjediničnih nukleoproteinskih kompleksa. Za PARP-1 je pokazano da je transkripcioni represor, koji interakcijom sa promotorom u fiziološkim uslovima obezbeđuje bazalan nivo ekspresije *Cxcl12*. Sa druge strane, za YY1 je ustanovljeno da je jak aktivator transkripcije *Cxcl12*. Simulacijom oksidativnog stresa, primenom STZ-a, uočena je indukcija transkripcije *Cxcl12* u beta ćelijama 6 h nakon tretmana. U datoj tački tretmana PARP-1 sa smanjenim afinitetom vezuje promotor, dok se YY1 nalazi u intenzivnoj interakciji sa promotorom, na osnovu čega je zaključeno da su za indukciju transkripcije *Cxcl12*, odgovorni stimulatívno dejstvo YY1 i uklanjenje inhibitornog efekta PARP-1. Uticaj enzimatske aktivnosti PARP-1 na transkripciju *Cxcl12* ispitan je nakon tretmana beta ćelija inhibitorom PARP-1, 3-aminobenzamidinom (3AB). Metoda lančane reakcije polimeraze u realnom vremenu je pokazala delimičnu represiju transkripcije *Cxcl12* nakon inhibicije enzimatske aktivnosti PARP-1, na osnovu čega je izveden zaključak da je intenzivno vezivanje ne-automodifikovanog PARP-1 za promotor odgovorno za smanjenje nivoa transkripcije. U doktorskoj tezi je, takođe, izučen uticaj CXCL12 na ekspresiju transkripcionih faktora koji učestvuju u njenoj transkripcionoj regulaciji. Imunoblot analizom je pokazano da pojačano prisustvo CXCL12 sprečava degradaciju YY1, stimuliše translokaciju Sp1 u jedro, sprečava ekspresiju C/EBP α , izaziva pojačanu ekspresiju PARP-1, sprečava ekspresiju izoforme p44 proteina p53 i izaziva smanjenje ekspresije FOXO3a, C/EBP β i STAT3.

U okviru ove teze po prvi put su ispitani molekularni mehanizmi regulacije ekspresije gena za CXCL12 u beta ćelijama pankreasa. U budućim istraživanjima indukcijom ili supresijom identifikovanih transkripcionih faktora uključenih u transkripcionu regulaciju *Cxcl12*, moglo bi se doprineti očuvanju funkcionalnih beta ćelija što bi jednoznačno vodilo ka prevenciji dijabetesa i/ili supresiji već razvijene bolesti.

Ključne reči: CXCL12; promotor CXCL12 gena; transkripciona regulacija; preživljavanje beta ćelija pankreasa; dijabetes; oksidativni stres izazvan streptozotocinom; PARP-1; YY1; RAM element.

Naučna oblast: Biologija

Uža naučna oblast: Molekularna biologija

UDK broj: [577.218 : 577.217] : 577.112.82 (043.3)

Molecular mechanisms responsible for the regulation of CXCL12 gene expression in pancreatic beta cells

ABSTRACT

Type 1 diabetes develops as a consequence of an autoimmune destruction of pancreatic beta cells in contrast to type 2 diabetes which is caused by a combination of insulin resistance and beta cell dysfunction. Since a beta cell deficit is present in both types of diabetes, scientific approaches aimed at restoring functional beta cells assume an important place in diabetes research. Elucidation of the molecular mechanisms which regulate the expression of genes encoding for proteins that are involved in normal beta cell functioning and survival could contribute to the development of new approaches for diabetes prevention and treatment. One of these proteins is the chemokine CXCL12 which plays an important role in the restoration of functional beta cell by promoting beta cell survival and initiating the transdifferentiation of alpha into beta cells.

This study presents evidence that CXCL12 promotes beta cell survival and protection against DNA damage after treatment with a diabetogenic agent, streptozotocin (STZ). Since the essential aspect of the protective effect of CXCL12 on the pancreatic beta cell prosurvival phenotype has been established, in this study the molecular mechanisms involved in rat CXCL12 gene (*Cxcl12*) transcriptional regulation in pancreatic beta cells are investigated. As a general rule, transcriptional regulation of gene expression depends on interactions of *trans*-acting protein factors and *cis*-acting DNA sequences of genes. The interaction of PARP-1 and a S/MAR element located -1725/-1592 bp upstream of the *Cxcl12* promoter was observed *in vitro* and *in vivo*, and the binding of PARP-1, YY1, C/EBP β , C/EBP α , STAT3, p53, FOXO3a, Sp1 and HMG I/Y to the *Cxcl12* promoter in the basal state. The latter result indicates that the listed transcription factors participate in *Cxcl12* transcriptional regulation in pancreatic beta cells. Co-immunoprecipitation experiments revealed the following protein-protein interactions between transcriptional regulators of *Cxcl12*: YY1 and PARP-1; FOXO3a and PARP-1; Sp1 and PARP-1; p53 and PARP-1; C/EBP β and PARP-1; YY1 and p53; YY1 and FOXO3a; p53 and FOXO3a; Sp1 and FOXO3a; C/EBP β and FOXO3a;

C/EBP α and FOXO3a; Sp1 and STAT3. These protein-protein interactions imply that multisubunit nucleoprotein complexes are potentially involved in the regulation of *Cxcl12* transcription. Using a gene reporter assay it was shown that PARP-1 behaves as a transcriptional repressor of *Cxcl12*. Under physiological conditions, PARP-1 interacts with the *Cxcl12* promoter, allowing for its constitutive expression. On the other hand, it was shown that YY1 functions as a powerful activator of *Cxcl12* transcription. The potential functions of PARP-1 and YY1 under different physiological states of beta cells were further deduced from the following observations: after a 6 h treatment with a STZ, *Cxcl12* transcription was induced; at the same time point, PARP-1 exhibited a very low binding affinity to the *Cxcl12* promoter, while YY1 displayed increased binding for the promoter. These results suggest that the activating potential of YY1 together with the removal of the inhibitory effect of PARP-1 were responsible for *Cxcl12* induction. The impact of PARP-1 enzymatic activity on *Cxcl12* transcription was examined after beta cells were treated with the PARP-1 inhibitor 3-aminobenzamide (3AB). Real-time polymerase chain reaction experiments revealed the partial suppression of the *Cxcl12* promoter after inhibition of PARP-1 enzymatic activity, suggesting that intensive binding of the non-automodified PARP-1 to the promoter decreased the transcriptional level of *Cxcl12*. In this study, the feed-back effect of CXCL12 on the expression of transcription factors involved in its transcriptional regulation was also explored. Immunoblot analysis showed that the increased presence of CXCL12 prevented YY1 degradation, stimulated Sp1 nuclear translocation, prevented C/EBP α expression, induced increased PARP-1 expression, blocked the expression of the p44 isoform of the p53 protein, and decreased FOXO3a, C/EBP β and STAT3 expression.

The molecular mechanisms involved in CXCL12 gene transcriptional regulation in pancreatic beta cells were investigated in this doctoral thesis for the first time. In future research, the induction or suppression of the identified transcription factors that participate in *Cxcl12* transcriptional regulation will be considered as a possible therapeutic strategy for improving beta cell functioning and viability, aimed at slowing down/preventing the onset of diabetes.

Key words: CXCL12; CXCL12 gene promoter; transcriptional regulation; diabetes; beta cell survival; streptozotocin-induced oxidative stress; PARP-1; YY1; S/MAR element.

Research area: Biology

Area of special interest: Molecular biology

UDC number: [577.218 : 577.217] : 577.112.82 (043.3)

Sadržaj

1. UVOD	1
1.1. DIJABETES	3
1.1.1. METABOLIZAM GLUKOZE	3
1.1.2. DIABETES MELLITUS ILI ŠEĆERNA BOLEST	4
1.1.3. STRATEGIJE ZA TRETMAN DIJABETESA	7
1.2. HEMOKIN CXCL12	9
1.2.1. STRUKTURA I FUNKCIJA CXCL12	10
1.2.2. ULOGA CXCL12 U PREDIKCIJI I SPREČAVANJU DIJABETESA	12
1.2.3. REGULACIJA TRANSKRIPCije GENA ZA CXCL12	15
1.3. TRANSKRIPCIONI FAKTORI - POTENCIJALNI REGULATORI TRANSKRIPCije GENA ZA CXCL12	16
1.3.1. POLI(ADP-RIBOZIL) POLIMERAZA-1	16
1.3.1.1. Enzimatska aktivnost PARP-1	17
1.3.1.2. Uloga PARP-1 u regulaciji transkripcije	19
1.3.1.3. Uloga PARP-1 u razvoju dijabetesa	21
1.3.2. YIN YANG 1 (YY1)	22
1.3.2.1. Struktura i funkcija YY1	22
1.3.2.2. Uticaj YY1 na transkripciju	23
1.3.3. Sp1 TRANSKRIPCIONI FAKTOR	26
1.3.3.1. Struktura i funkcija Sp1	26
1.3.3.2. Uticaj Sp1 na transkripciju	28
1.3.4. FOXO3a	29
1.3.4.1. Struktura i funkcija FOXO3a	29
1.3.4.2. Uticaj FOXO na transkripciju	30
1.3.5. HMG I/Y	33
1.3.5.1. Struktura i funkcija HMG I/Y	33
1.3.5.2. Uticaj HMG I/Y na transkripciju	33
1.3.6. PROTEIN p53	34
1.3.6.1. Struktura i funkcija p53	35
1.3.6.2. Uticaj p53 na transkripciju	37
1.3.7. STAT3	38
1.3.7.1. Struktura i funkcija STAT3	38
1.3.7.2. Uticaj STAT3 na transkripciju	40
1.3.8. C/EBP α i C/EBP β	41
1.3.8.1. C/EBP α	42
1.3.8.2. C/EBP β	44
2. HIPOTEZA I CILJEVI ISTRAŽIVANJA	46
3. MATERIJAL I METODE	48
3.1. ĆELIJSKA KULTURA	48

3.2. TEST VIJABILNOSTI ČELIJA	48
3.3. TEHNIKE ZA MANIPULACIJU PROTEINSKIM UZORCIMA	49
3.3.1. IZOLACIJA ČELIJSKOG LIZATA	49
3.3.2. IZOLACIJA JEDARNIH I CITOSOLNIH PROTEINA	49
3.3.3. TALOŽENJE PROTEINA TRIHLORSIRČETNOM KISELINOM	50
3.3.4. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE PROTEINA	50
3.4. ELEKTROFORETSKE TEHNIKE ZA RAZDVAJANJE PROTEINA	51
3.4.1. ELEKTROFORETSKO RAZDVAJANJE PROTEINA POD DENATURISUĆIM USLOVIMA (GLICINSKA SDS-PAGE)	51
3.4.2. ELEKTROFORETSKO RAZDVAJANJE PROTEINA MALE MOLEKULSKE MASE POD DENATURISUĆIM USLOVIMA (TRICINSKA SDS-PAGE)	52
3.5. PRENOS PROTEINA NA MEMBRANU	52
3.6. IMUNOBLOT ANALIZA PROTEINA - WESTERN BLOT	53
3.7. KO-IMUNOPRECIPITACIJA PROTEINA	54
3.7.1. PRIPREMA ČELIJSKOG LIZATA	54
3.7.2. PRIPREMA ČELIJSKOG LIZATA ZA IMUNOPRECIPITACIJU	55
3.7.3. REAKCIJA IMUNOPRECIPITACIJE	55
3.8. TEHNIKE ZA MANIPULACIJU NUKLEINSKIM KISELINAMA	56
3.8.1. IZOLOVANJE GENOMSKE DNK	56
3.8.2. LANČANA REAKCIJA POLIMERAZE	56
3.8.3. PCR U REALNOM VREMENU	59
3.8.3.1. Priprema uzoraka i izolacija totalne RNK	59
3.8.3.2. Reverzna transkripcija	60
3.8.3.3. Reakcija lančanog umnožavanja u realnom vremenu (qPCR)	60
3.9. ELEKTROFOREZA NUKLEINSKIH KISELINA U NEDENATURISUĆEM AGARONOM GELU	62
3.10. EKSTRAKCIJA DNK IZ AGARONOG GELA	62
3.11. ELEKTROFORETSKO ZAOSTAJANJE	63
3.11.1. PRIPREMA REAKCIJE ZA ELEKTROFORETSKO ZAOSTAJANJE	63
3.11.2. PRENOS DNK I DNK-PROTEIN KOMPLEKSA NA MEMBRANU	64
3.11.3. VIZUELIZACIJA BIOTINOM OBELEŽENE DNK	64
3.12. IMUNOPRECIPITACIJA HROMATINA	65
3.13. KOMET ESEJ (SCGE - SINGLE CELL GEL ELECTROPHORESIS)	67
3.14. KLONIRANJE <i>Cxcl12</i> PROMOTORA U REPORTERSKI VEKTOR	68
3.14.1. DIGESTIJA RESTRIKCIJONIM ENZIMIMA	68
3.14.2. LIGACIJA <i>Cxcl12</i> PROMOTORA U pMDICluc VEKTOR	69

3.15. TEHNIKE ZA MANIPULACIJU BAKTERIJAMA	69
3.15.1. KULTIVISANJE BAKTERIJA	69
3.15.2. PRIPREMANJE <i>E. COLI DH5α</i> KOMPETENTNIH ČELIJA	69
3.15.3. TRANSFORMACIJA <i>E. COLI DH5α</i> KOMPETENTNIH ČELIJA	70
3.16. ANALIZA PLAZMIDNOG KONSTRUKTA	70
3.16.1. IZOLOVANJE PLAZMIDNE DNK NA MALOJ SKALI	70
3.16.2. SEKVENCIRANJE <i>pCXCL12$_{luc}$</i> KONSTRUKTA	71
3.17. PROLAZNA TRANSFEKCIJA	72
3.18. LUCIFERAZNI ESEJ	74
3. 19. BIOINFORMATIKA	74
3.20. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA	75
4. REZULTATI	76
4.1. CXCL12 POSPEŠUJE PREŽIVLJAVANJE BETA ČELIJA PANKREASA	76
4.2. REGULACIJA TRANSKRIPCije GENA ZA CXCL12 (<i>Cxcl12</i>)	81
4.2.1. ANALIZA 5' REGIONA <i>Cxcl12</i>	81
4.2.2. INTERAKCIJE RAM-VEZUJUĆIH PROTEINA SA RAM 4 ELEMENTOM	81
4.2.2.1. <i>In vitro</i> interakcije RAM-vezujućih proteina i RAM 4 elementa	82
4.2.2.2. <i>In vivo</i> interakcija PARP-1 i RAM 4 elementa	85
4.2.3. KARAKTERIZACIJA <i>Cxcl12</i> PROMOTORA	87
4.2.4. INTERAKCIJE TRANSKRIPCIONIH FAKTORA SA <i>Cxcl12</i> PROMOTOROM	89
4.2.4.1. Prisustvo transkripcionih faktora koji imaju potencijalna mesta vezivanja u okviru <i>Cxcl12</i> promotora u Rin-5F ćelijama	89
4.2.4.2. <i>In vitro</i> interakcije transkripcionih faktora sa <i>Cxcl12</i> promotorom	91
4.2.4.3. <i>In vivo</i> interakcije transkripcionih faktora sa <i>Cxcl12</i> promotorom	93
4.2.5. MEĐUPROTEINSKE INTERAKCIJE TRANSKRIPCIONIH FAKTORA VEZANIH ZA <i>Cxcl12</i> PROMOTOR	98
4.2.6. UTICAJ RAZLIČITIH FAKTORA NA AKTIVNOST <i>Cxcl12</i> PROMOTORA	100
4.2.6.1. Aktivnost <i>Cxcl12</i> promotora	100
4.2.6.2. Uticaj hemokina CXCL12 na sopstvenu gensku transkripciju	103
4.2.6.3. Uticaj PARP-1 na aktivnost <i>Cxcl12</i> promotora	106
4.2.6.4. Uticaj YY1 na aktivnost <i>Cxcl12</i> promotora	110
4.2.7. UTICAJ CITOTOKSIČNOSTI IZAZVANE STREPTOZOTOCINOM NA REGULACIJU <i>Cxcl12</i> TRANSKRIPCije	112
4.2.8. UTICAJ POLI(ADP-RIBOZIL)ACIJE NA <i>Cxcl12</i> TRANSKRIPCIJU	117
4.3. UTICAJ CXCL12 NA EKSPRESIJU TRANSKRIPCIONIH FAKTORA KOJI UČESTVUJU U NJEGOVOJ TRANSKRIPCIONOJ REGULACIJI	121

5. DISKUSIJA	123
5.1. CXCL12 I BETA ČELIJE PANKREASA	123
5.1.1. <i>EKSPRESIJA CXCL12 GENA U BETA ČELIJAMA</i>	123
5.1.2. <i>CXCL12 DOPRINOSI OČUVANJU FUNKCIONALNIH BETA ČELIJA PANKREASA</i>	125
5.2. MOLEKULARNI MEHANIZMI TRANSKRIPCIONE REGULACIJE <i>Cxcl12</i> U BETA ČELIJAMA PANKREASA	126
5.2.1. <i>PROMOTOR CXCL12 GENA</i>	126
5.2.2. <i>INDUKCIJA TRANSKRIPCIJE <i>Cxcl12</i> GENA</i>	133
5.2.3. <i>TRANSKRIPCIONI FAKTORI UKLJUČENI U TRANSKRIPCIONU REGULACIJU <i>Cxcl12</i> U BETA ČELIJAMA PANKREASA PACOVA</i>	134
5.3. POVRATNI EFEKAT: KAKO CXCL12 UTIČE NA TRANSKRIPCIONE FAKTORE KOJI REGULIŠU NJEGOVU EKSPRESIJU?	154
6. ZAKLJUČCI	158
7. LITERATURA	160

1. UVOD

Za jedinstven fenotip svakog organizma na zemlji odgovorni su kako specifična nasledna informacija sadržana u genima svake jedinke, tako i regulacija ekspresije prisutnih gena. Centralna dogma molekularne biologije objašnjava protok genetičke informacije u živom svetu. Gen predstavlja fizičku i funkcionalnu jedinicu nasleđivanja. Ekspresijom gena, koja se odvija putem procesa transkripcije i translacije, nastaje protein ili RNK molekul. U procesu transkripcije informacija se sa DNK lanca prepisuje na iRNK molekul, dok se tokom translacije informacija prisutna u iRNK molekulu prevodi u redosled aminokiselina u polipeptidnom lancu proteina. Kontrola ekspresije gena znatno je složenija kod eukariota u odnosu na prokariote i odvija se na više različitih nivoa: strukture hromatina, epigenetske kontrole, inicijacije transkripcije, obrade i modifikacije primarnog transkripta, transporta iRNK, stabilnosti iRNK, regulacija transkripcije od strane malih nekodirajućih RNK, inicijacije translacije, posttranslacione modifikacije proteina, transporta proteina i proteinske stabilnosti.

Inicijacija transkripcije je glavna kontrolna tačka u regulaciji genske ekspresije. U odgovoru na van- i unutarćelijske signale ili tokom razvića, eukariotske ćelije imaju sposobnost da stimulišu ili utišaju transkripciju, kao i da regulišu nivo transkripcije aktivnih gena. Transkripciona regulacija gena odvija se putem međusobnih interakcija *cis*-regulatornih sekvenci i *trans*-delujućih proteina (Ranish i Hahn, 1996). Učestalost inicijacije transkripcije, koju vrši RNK polimeraza II, zavisi od interakcije transkripcionih faktora (*trans*-delujućih proteina) sa promotorskim i regulatornim elementima (*cis*-regulatornim sekvencama), koji mogu biti smešteni uzvodno ili nizvodno od mesta početka RNK sinteze. U sastavu svakog promotora nalazi se specifična kombinacija pozitivnih i negativnih *cis*-regulatornih sekvenci. Veliki broj gena u okviru osnovog promotora, sa kog se vrši inicijacija transkripcije, sadrži promotorske elemente kao što su element TATA i Inicijator (Int). Ukoliko se regulatorni elementi nalaze u blizini promotora nazivaju se proksimalni, a ukoliko regulišu transkripciju sa određene udaljenosti, nazivaju se distalni elementi.

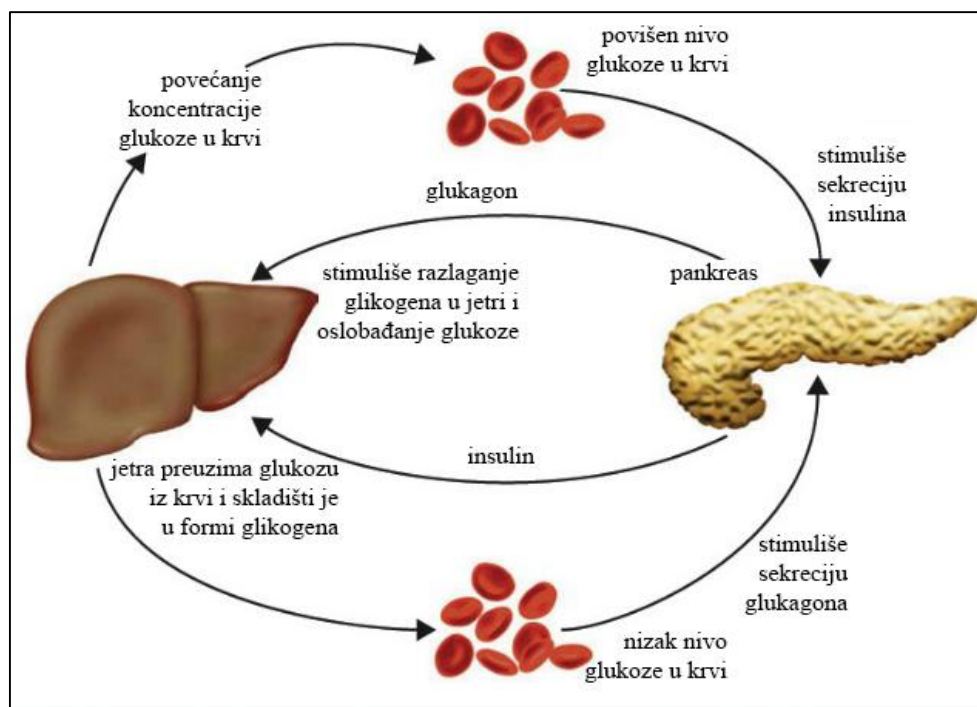
Transkripcioni faktori su proteini koji vezivanjem *cis*-regulatornih DNK sekvenci aktiviraju ili inhibiraju transkripciju. U zavisnosti od DNK sekvence koju vezuju transkripcioni faktori se dele na opšte i specifične transkripcione faktore. Opšti transkripcioni faktori vezuju osnovni promotor i učestvuju u formiranju preinicijacionog kompleksa. Specifični transkripcioni faktori vezuju specifične regulatorne elemente koje se nalaze u blizini ili na određenoj udaljenosti od mesta početka transkripcije. Prisustvo preklapajućih regulatornih elemenata može dovesti ili do kompeticije u vezivanju različitih transkripcionih faktora ili do sinergističkog dejstva između vezanih faktora (Mitchel i Tjian, 1989; Tan i Richmond, 1998).

Za razvoj nekih bolesti odgovorne su promene u strukturi gena – genske mutacije, dok se druge bolesti razvijaju kao posledica poremećaja genske ekspresije. Pokazano je da polimorfizmi u velikom broju gena doprinose razvoju oba tipa dijabetesa (tip 1 i tip 2). Dijabetes tip 1 nastaje usled autoimune destrukcije beta ćelija pankreasa, dok su za pojavu dijabetesa tip 2 odgovorni insulinska rezistentnost i nefunkcionalnost beta ćelija. Imajući u vidu da je nedostatak beta ćelija prisutan u oba tipa dijabetesa, potrebno je pronaći nove terapijske pristupe koji će omogućiti očuvanje funkcionalnih beta ćelija. Hemokin CXCL12 je protein koji doprinosi očuvanju beta ćelija tako što sa jedne strane sprečava njihovo odumiranje (Yano i sar., 2007; Liu i sar., 2011), dok sa druge strane učestvuje u transdiferencijaciji afa u beta ćelije (Habener i Stanojevic, 2012a). S obzirom na dokazano protektivno dejstvo CXCL12 na beta ćelije, u ovoj doktorskoj tezi su izučavani molekularni mehanizmi regulacije ekspresije gena za CXCL12 u beta ćelijama pankreasa. Rasvetljavanje molekularnih mehanizama regulacije ekspresije gena koji kodiraju proteine koji imaju važnu ulogu u preživljavanju beta ćelija, može doprineti razvoju novih strategija za prevenciju i lečenje dijabetesa.

1.1. DIJABETES

1.1.1. METABOLIZAM GLUKOZE

Povišen nivo glukoze u krvi, stimuliše sekreciju hormona insulina. Insulin omogućuje prelaz glukoze iz krvi u ćelije, gde se ona ili iskoristi za dobijanje energije ili se u ćelijama jetre čuva kao energetska rezerva u formi glikogena. Kada je nivo glukoze u krvi nizak, sekretuje se hormon glukagon. Glukagon dovodi do povećanja koncentracije glukoze u krvi tako što stimuliše razlaganje glikogena u jetri. I insulin i glukagon se proizvode u endokrinim ćelijama pankreasa. Pankreas je žlezda digestivnog trakta sa egzokrijonom i endokrinom funkcijom. Endokrioni pankreas izgrađuju endokrione ćelije, koje su odgovorne za sintezu i sekreciju nekoliko hormona koji imaju ulogu u metabolizmu glukoze.



Slika 1.1. Regulacija koncentracije glukoze u krvi od strane pankreatičnih hormona (Preuzeto sa internet stranice <http://iolrevision.blogspot.com/2012/11/hormones.html>).

Endokrine ćelije skupljene su u vidu ostrvaca, koja se nazivaju Langersanova ostrvca, koja su rasuta po lobulusima egzokrinog pankreasa. Beta ćelije pankreasa proizvode i izlučuju hormon insulin, dok su alfa ćelije odgovorne za sintezu glukagona.

Kod zdravih individua nakon obroka oslobađa se insulin koji omogućuje ćelijama da preuzmu glukozu i u zavisnosti od energetske potrebe razgrade je ili skladište. Nekoliko sati nakon obroka, kada nivo glukoze u krvi počinje da opada sekretuje se glukagon koji stimuliše oslobađanje glukoze iz energetske depoa (Slika 1.1).

1.1.2. DIABETES MELLITUS ILI ŠEĆERNA BOLEST

Reč *dijabetes*, što znači “teče kroz”, prvi je upotrebio Demetrije iz Apolonije oko 200. godine pre nove ere. Thomas Willis je 1675. godine, na postojeći naziv dodao reč *mellitus*, koja je izvedena iz latinskog i u prevodu znači “sladak”. Mathew Dobson je 1776. godine dokazao da sladak ukus potiče od prisustva šećera u krvi i mokraći dijabetičara. Frederick Grant Banting i John James Richard MacLeod, 1923. godine dobijaju Nobelovu nagradu za otkriće insulina.

Zbog visoke incidence, dijabetes se često naziva i ne-infektivna epidemijaska bolest 21. veka. U svetu je 2011. godine bilo 366 miliona ljudi obolelih od dijabetesa. Procenjuje se da će se broj obolelih za 20 godina povećati na 552 miliona. U Srbiji oko 630.000 osoba ili 8,6% stanovništva ima dijabetes. Pretpostavlja se da će do 2030. godine u Srbiji živeti 730.000 dijabetičara, odnosno da će oni činiti 10,2% populacije (Lalić i sar., 2012).

Dijabetes je hronični metabolički poremećaj, koji se karakteriše hiperglikemijom. Hiperglikemija je posledica nedovoljne sekrecije ili smanjenog biološkog dejstva hormona insulina. Nekompatibilna hiperglikemija može izazvati oštećenja tkiva i organa, nastanka kardiovaskularnih oboljenja, očnih bolesti, neuropatija i bolesti bubrega i jetre. Iako se komplikacije dijabetesa postepeno razvijaju, one značajno mogu da naruše kvalitet života obolelih osoba i u krajnjoj meri mogu dovesti do fatalnog ishoda (Grdović, 2012). Od dijabetesa i njegovih komplikacija 2011. godine u svetu je umrlo čak 4,6 miliona ljudi. Dijabetes je četvrti vodeći uzrok mortaliteta u Srbiji i Evropi, od čijih posledica u našoj zemlji godišnje umre približno 3000, a u Evropi 155.000 ljudi. U ove podatke nije

uračunata smrtnost od srčanog i moždanog udara i hronične bubrežne insuficijencije, kojima doprinosi dijabetes. Sa prosečnom stopom incidence mortaliteta od 27,3/100.000 stanovnika, Srbija je 2011. godine spadala u evropsku zemlju sa visokom stopom umiranja od dijabetesa (Lalić i sar., 2012). Zbog ovih alarmantnih podataka, potrebno je što pre pronaći efikasan način za prevenciju i lečenje dijabetesa.

Dijabetes tip 1 (DT1) je dominantan tip šećerne bolesti kod dece i mladih osoba i čini oko 5-10% obolelih od dijabetesa. U svetu svake godine od ovog tipa dijabetesa oboli oko 78.000 ljudi. U Srbiji se u proseku registruje 160 novoobolelih od DT1 godišnje. Prosečna stopa incidence iznosi 13,5/100.000 stanovnika, što odgovara evropskim zemljama sa srednje visokim rizikom oboljevanja od DT1 (Lalić i sar., 2012). Ranije se nazivao i juvenilni dijabetes, jer se prevalentno javlja kod mladih, ali se može javiti i kod odraslih ljudi i tada se označava kao latentni autoimuni dijabetes kod odraslih.

DT1 se karakteriše hiponsulinemijom izazvanom autoimunom destrukcijom beta ćelija pankreasa. Destrukcija beta ćelija nastaje zbog infiltracije leukocita u Langersanova ostrvca, što rezultira inflamacijom ostrvca, koja se naziva insulitis. T1D je poligenška bolest, za čiji razvoj je neophodna kako genetska predispozicija tako i okidač iz spoljašnje sredine koji dovodi do razvoja bolesti. Smatra se da određeni virusi, proteini prisutni u mleku i pojedine hemikalije mogu izazvati DT1 kod genetski predisponiranih individua. Destrukcija beta ćelija pankreasa, ima za posledicu nedostatak insulina, poremećaj metabolizma glukoze i hiperglikemiju. Osobe kod kojih je dijagnostikovano DT1, moraju svakodnevno da primaju terapiju egzogenim insulinom, kako bi se sprečio fatalan ishod bolesti. Kod osoba koje dugi niz godina boluju od DT1, gubitak beta ćelija iznosi oko 99%. U trenutku dijagnostikovanja DT1 kod pacijenata, masa beta ćelija je već smanjena za 80-90%. Nekoliko nezavisnih studija ukazuju da beta ćelje imaju sposobnost regeneracije (proliferacije i/ili neogeneze), s obzirom da su beta ćelije pronađene kod dijabetičara nekoliko decenija nakon dijagnostikovanja DT1 (Meier, 2008).

Dijabetes tip 2 (DT2) je najčešći oblik dijabetesa. Više od 90% obolelih ima ovaj tip dijabetesa. DT2 pacijenti su obično uzrasta između 40 i 59 godina života, mada se u poslednje vreme javlja i kod mlađih ljudi. Najmanje jedna polovina obolelih od DT2 nema postavljenu dijagnozu i nije svesna svoje bolesti. Prema podacima Registra za dijabetes u

Srbiji, godišnje se, u proseku registuje oko 17.000 novih pacijenata, a u trenutku dijagnostikovanja trećina pacijenata ima jednu ili više kasnih komplikacija – ishemijsku bolest srca, moždani udar, dijabetesno stopalo, retinopatiju, neuropatiju ili nefropatiju (Lalić i sar., 2012).

DT2 nastaje kao posledica smanjene osetljivosti insulinskih receptora za insulin – insulinske rezistentnosti i nefunkcionalnosti beta ćelija (Reaven, 1988; Meier i Butler, 2005). Ovaj tip dijabetesa je povezan sa gojaznošću, koja je glavni uzrok insulinske rezistentnosti. Privremena normalizacija nivoa glukoze u krvi može se postići gubitkom telesne težine i povećanom fizičkom aktivnošću. Zbog insulinske rezistentnosti smanjeno je preuzimanje glukoze od strane insulinskih ciljnih tkiva (mišića, masnog tkiva i jetre), što dovodi do povećane koncentracije glukoze u krvi. Hronično prisustvo visoke koncentracije glukoze u krvi, koja se naziva glukotoksičnost, može izazvati oštećanja različitih tkiva. Pojava hiperglikemije izaziva poremećaj u metabolizmu masti i dovodi do povećane koncentracije slobodnih masnih kiselina u krvi, odnosno do pojave lipotoksičnosti. Hronično prisustvo glukotoksičnosti i lipotoksičnosti dovodi do poremećaja u insulinskoj sekreciji i odumiranja beta ćelija (Grdović, 2012). Pored insulinske rezistentnosti, DT2 se karakteriše i disfunkcijom beta ćelija. Pojedine studije ukazuju da se poremećaj u sekreciji insulina javlja pre pojave insulinske rezistentnosti (Gerich, 1998). Činjenica da se kod pacijenata obolelih od DT2 kod kojih je izvršena transplantacija pankreasa, uprkos prisustvu insulinske rezistentnosti, nivo glukoze u krvi održavala na normalnom nivou, potvrđuje važnu ulogu poremećene funkcije beta ćelija u etiologiji DT2 (Pox i sar., 2002; Nath i sar., 2005). Kod pacijenata koji dugi niz godina boluju od DT2 masa beta ćelija smanjena je za 65% (Meier, 2008).

S obzirom da je gubitak beta ćelija prisutan u oba tipa dijabetesa, terapijski pristupi kao što su zamena ili regeneracija ćelija ostrvaca, mogu imati blagotvorno dejstvo na insulinsku sekreciju i održavanje normalnog nivoa glukoze u krvi (Meier i sar., 2006). Transplantacijom pankreasa ili ostrvaca kod obolelih od oba tipa dijabetesa nivo glukoze u krvi vraća se na normalne vrednosti. Međutim, transplantacija je povezana sa visikom stopom smrtnosti tokom hirurške intervencije, kao i neželjenim efektima hronične imunosupresije, što je čini neodgovarajućom metodom za rutinsko lečenje uzroka

dijabetesa. Pored toga, mala količina dostupnog pankreasa za transplantaciju nedovoljna je za sve veći broj dijabetičara. Zbog toga potrebno je pronaći alternativne terapijske strategije za očuvanje funkcionalnih beta ćelija kod pacijenata obolelih od dijabetesa (Meier, 2008).

1.1.3. STRATEGIJE ZA TRETMAN DIJABETESA

S obzirom da je gubitak beta ćelija prisutan u oba tipa dijabetesa, potrebno je pronaći terapijske pristupe za očuvanje (ili barem sprečavanje daljeg gubitka) funkcionalnih beta ćelija. Terapija egzogenim insulinom, koristi se za tretman DT1 i kasnog stadijuma DT2. Najčešći vid aplikacije insulinske terapije je podkožnim injeciranjem. Iako je terapija insulinom danas široko zastupljena, ona ima brojne nedostatke: kinetika lučenja endogenog insulina je znatno brža u odnosu na podkožnu aplikaciju insulina (Pfeifer i sar., 1981; Bruttomesso i sar., 1999); u fiziološkim uslovima, insulin se izlučuje u pulsevima u intervalima od 4-5 min (Porksen i sar., 1997); sekrecija endogenog insulina zavisi od prisustva glukoze u krvi (Matschinsky i sar., 1993); sekrecija hormona glukagona od strane alfa ćelija pankreasa zavisi od pulsirajućeg oslobađanja insulina od strane beta ćelija (Kendall i sar., 1990; Zhou i sar., 2004); pulsirajuće oslobađanje endogenog insulina utiče na metabolizam glukoze u jetri, dok egzogeno dodat insulin pretežno deluje na periferna tkiva. Takođe, prekomerna doza egzogenog insulina, može izazvati hipoglikemiju (Meier, 2008).

Jedan od potencijalnih načina za dobijanje funkcionalnih beta ćelija je *ex vivo* stimulacija diferencijacije embrionalnih stem ćelija u insulin sekretujuće ćelije (Meier i sar., 2006). Ovako nastale ćelije sekretuju insulin u odgovoru na razne stimuluse, ali ne i u odgovoru na glukozu (D'Amour i sar., 2006). Pored neosetljivosti na stimulaciju glukozom, manipulacija ljudskim embrionima iz etičkih razloga dalje komplikuje razvijanje ovog pristupa. Osim toga, u fiziološkim uslovima, beta ćelije se nalaze u sastavu složene strukture Langerhansovog ostrvca, gde se kontrola sekrecije insulina odvija na više različitih nivoa: kontrola od strane simpatičkih nervnih vlakana, endokrina kontrola od strane glukagona koji se produkuje u alfa ćelijama ostrvaca i parakrina kontrola od strane

somatostatina proizvedenog u delta ćelijama Langerhansovih ostrvaca. Imajući u vidu tehničke probleme prilikom formiranja jednog tipa ćelija, malo je verovatno da će se postići složena struktura ostrvaca diferencijacijom od embrionalnih stem ćelija (Meier, 2008). Još jedan ograničavajući faktor ovog pristupa je da još uvek nije moguće kontrolisati proliferaciju ovako nastalih ćelija, čime se javlja rizik od pojave kancera (Meier i sar., 2006).

U cilju očuvanja funkcionalnih beta ćelija poslednjih godina je sve zastupljeniji pristup koji se bazira na stimulaciji regeneracije beta ćelija od ćelija koje su već prisutne u organizmu tj. na replikaciji beta ćelija, neogenezi i transdiferencijaciji. Poznato je da masa beta ćelija može da se menja u različitim fiziološkim stanjima. Kod gojaznih osoba, masa beta ćelija se uveća za oko 50% (Butler i sar., 2003), dok se kod trudnih žena povećaju i masa beta ćelija i sekrecija insulina (Van Assche i sar., 1978; Kjos i Buchanan, 1999). Kod glodara u trudnoći, masa beta ćelija se uveća oko 2,5 puta, a nakon porođaja brzo se smanji tako što se smanji replikacija i pojača odumiranje beta ćelija apoptozom (Hellerstorm i Swenne, 1991; Sorenson i Brelje, 1997; Scaglia i sar., 1997). Jedan od mehanizama nastanka novih beta ćelija od endogenih prekursora je neogeneza. Tokom fetalnog perioda beta ćelije nastaju od ćelija epitela duktusa egzokrinog pankreasa, koje eksprimiraju insulin. Ove ćelije su sposobne da se diferenciraju u beta ćelije i nazivaju se „prekursorne ćelije“. U adultnom periodu pod dejstvom određenih stimulusa, takođe, procesom neogeneze nastaju beta ćelije od prekursora poreklom od duktalnih ćelija egzokrinog pankreasa. U uslovima hiperglikemije i insulinemije, putem neogeneze udvostručuje se masa beta ćelija (Paris, 2004). Bonner-Weir (1994) i Bouwens (1999) smatraju da u adultnom periodu, u duktusima egzokrinog pankreasa postoji populacija prekursornih ćelija, koje se nalaze u stanju mirovanja, koje se pod dejstvom određenog stimulusa diferenciraju u beta ćelije. Još jedan od načina za dobijanje funkcionalnih beta ćelija je proces transdiferencijacije. *In vitro* studije su pokazale da ćelije acinusa egzokrinog pankreasa i ćelije jetre tretirane određenim stimulusima mogu da se transdiferenciraju u ćelije koje poseduju karakteristike beta ćelija i proizvode insulin (Mashima i sar., 1996; Yang i sar., 2002). U slučaju velikog gubitka beta ćelija tokom DT1 i DT2, pokazana je transdiferencijacija alfa ćelije endokrinog pankreasa u potpuno funkcionalne beta ćelije. Do

transdiferencijacije alfa u beta ćelije dolazi reprogramiranjem postojećih alfa ćelija, bez ćelijske proliferacije ili prisustva populacije progenitornih ćelija (Habener i Stanojevic, 2012b). Treći način za povećanje mase beta ćelija je njihova replikacija. U fiziološkim uslovima beta ćelije imaju veoma nisku stopu replikacije. Korišćenjem BrdU tehnike pokazano je da je stopa replikacije kod pacova 0,07% dnevno (Teta i sar., 2005). Međutim, u uslovima kada je neophodna pojačana sekrecija insulina, beta ćelije pokazuju znatno veći kapacitet proliferacije. Kod glodara, replikacija beta ćelija je učestalija pet do deset puta nakon delimične pankreatomije, trudnoće, hronične hiperglikemije i nakon tretmana sa GLP-1 analogima (Bonner-Weir i sar., 1993; Peshavaria i sar., 2006). Iako, humane beta ćelije imaju znatno manju sposobnost proliferacije u odnosu na glodarske, određena stanja stimulišu proliferaciju beta ćelija čoveka. Pokazano je tumori koji produkuju gastrin i nalaze se u blizini pankreasa izazivaju porast replikacije beta ćelija za više od deset puta (Meier i sar., 2006). Pojačana replikacija beta ćelija zabeležena je i u ranoj fazi DT1 (Meier, 2008). Mogućnost nastanka novih beta ćelija procesom neogeneze, transdiferencijacije ili replikacije ukazuje da buduća istraživanja treba usmeriti u pravcu pronalaženja novih faktora, koji će preko nekog od prethodnog pomenutih procesa (ili njihovom kombinacijom), stimulisati formiranje funkcionalnih beta ćelija u cilju sprečavanja dijabetesa i njegovih komplikacija. Jedan od potencijalnih faktora je i hemokin CXCL12, koji na više načina doprinosi očuvanju funkcionalnih beta ćelija.

1.2. HEMOKIN CXCL12

Hemokini su familija malih citokina (veliĉine 8-12 kDa), koja sadrži više od 50 ĉlanova. Hemokini ostvaruju svoju funkciju vezivanjem za transmembranske receptore spregnute sa G proteinima (Pierce i sar., 2002). Vezivanjem hemokina za svoj receptor, aktiviraju se razliĉiti signalni putevi u ćeliji, što dovodi do razliĉitih bioloških odgovora kao što su: fluks kalcijuma, hemotaksija, „respiratorna eksplozija“, degranulacija i fagocitoza (Horuk, 2001).

Hemokin CXCL12 na osnovu poloŹaja cisteinskih ostataka spada u CXC podklasu hemokina, u kojoj su cisteinski ostaci odvojeni jednom amino kiselinom. Naziva se joŹ i

SDF-1 (eng. *stromal cell derived factor 1*). Ovaj naziv je dobio pošto je prvi put kloniran iz ćelija strome poreklom iz kosne srži (eng. *bone marrow-derived stromal cell line*) (Tashiro i sar., 1993). Kod čoveka uočeno je prisustvo 6 različitih izoformi CXCL12 (α , β , γ , δ , ϵ , i Φ), dok se kod miša CXCL12 javlja u vidu α i β izoformi. Sve pomenute izoforme nastaju alternativnim splajsovanjem jednog CXCL12 gena (Nagasawa i sar., 1996; Yu i sar., 2006). Kod pacova postoje tri CXCL12 izoforme: α , β i γ (Gleichmann i sar., 2000). Kryczek i sar. (2007) su pokazali da ne postoji biološka i funkcionalna razlika između različitih CXCL12 izoformi.

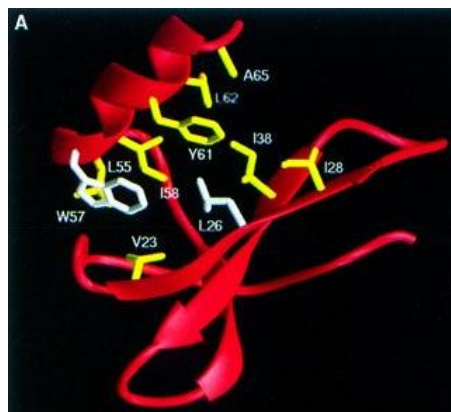
CXCL12 se eksprimira u velikom broju organa uključujući: kosnu srž, limfne čvorove, jetru, pluća, mozak, srce, bubrege, timus, pankreas, slezinu, jajnike i tanko crevo (Juarez i sar., 2004).

1.2.1. STRUKTURA I FUNKCIJA CXCL12

Proteinska sekvenca CXCL12 izoformi je visoko konzervirana kod različitih vrsta (Juarez i sar., 2004). Kod pacova, miša i čoveka CXCL12 α se sastoji od 89 amino kiselina (NCBI, Referentne sekvence: NP_071513.1, NP_068350.1, NP_954637.1) dok β izoforma kod sva tri organizma sadrži 93 amino kiseline (NCBI, Referentne sekvence: NP_001029054.1, NP_038683.1, NP_000600.1). CXCL12 γ pacova i čoveka sastoji se od 119 amino kiselina (NCBI, Referentne sekvence: NP_001029055.1, NP_001029058.1). Ostale izoforme prisutne kod čoveka su: δ – 140 amino kiselina, ϵ – 90 amino kiselina i Φ – 100 amino kiselina (Yu i sar., 2006). Tercijarnu strukturu CXCL12 čini tipični hemokinski zavoj, koji se sastoji od 3 antiparalelna β -lanca i jedne α -zavojnice (Slika 1.2) (Juarez i sar., 2004).

CXCL12 je hemokin sa mnogobrojnim funkcijama u organizmu. Svoje biološke efekte CXCL12 ostvaruje vezivanjem za CXCR4 transmembranski receptor (Bluel i sar., 1996). CXCR4 je receptor spregnut sa G proteinom, koji pripada porodici hemokinskih receptora. Nedavno je opisan još jedan CXCL12 receptor – CXCR7 (Balabanian i sar., 2005). Hemokini uglavnom vezuju više različitih receptora, i receptori obično interaguju sa više različitih hemokina. Po tom pitanju CXCL12/CXCR4 predstavlja izuzetak, jer jedino

CXCL12 vezuje receptor CXCR4. Činjenica da miševi kod kojih je utišan gen za CXCL12 umiru pre- ili perinatalno ukazuje na višestruku ulogu CXCL12 u razvoju organizma (Kryczek i sar., 2007).



Slika 1.2. Struktura CXCL12 proteina (Preuzeto sa internet stranice <http://www.nature.com/emboj/journal/v16/n23/full/7590670a.html>).

Migracija stem ćelija, koja predstavlja ključni proces u razviću, regulisana je od strane više različitih regulatornih osa, koje kontrolišu faktori rasta, citokini i hemokini. Obično utišavanje jedne faktor/receptor ose kompenzuje delovanje druge ose. Međutim, utišavanjem CXCL12/CXCR4 ose dolazi do poremećaja u kolonizaciji embrionalne kosne srži od strane hematopoetskih stem ćelija i do poremećaja u razvoju srca, mozga i krvnih sudova (Zou i sar., 1998; Tachibana i sar., 1998; Lazarini i sar., 2003). CXCL12 je prvobitno okarakterisan kao faktor koji stimuliše proliferaciju progenitora B limfocita (Nagasawa i sar., 1994). Zbog svoje sposobnosti da indukuje pokretljivost i hemotaksčni odgovor kod ćelija koje eksprimiraju CXCR4 receptor (Kucia i sar., 2005), CXCL12 je potentan hemoatraktant više tipova ćelija: T limfocita i monocita tokom njihove recirkulacije (Bleul i sar., 1996), prognitora B limfocita (D'Apuzzo i sar., 1997), dendritskih ćelija (Sozzani i sar., 1997) i progenitora hematopoetskih stem ćelija (Aiuti i sar., 1997; Wang i sar., 1998; Mohle i sar., 1998). Pokazano je da CXCL12 učestvuje u razvoju i sazrevanju centralnog nervnog sistema, tako što stimuliše migraciju i proliferaciju neurona malog mozga, indukuje hemoatrakciju ćelija mikroglije i stimuliše produkciju citokina od strane astrocita (Lazarini i sar., 2003). CXCL12/CXCR4 osa ima važnu ulogu u

reparaciji i regeneraciji tkiva. Tokom hipoksije u oštećenom tkivu indukuje se ekspresije CXCL12 gena, koja dovodi do hemoatrakcije stem ćelija koje ekspimiraju receptor CXCR4 i na taj način se regeneriše oštećeno tkivo (Ratajczak i sar., 2006). CXCL12/CXCR4 osa ima ulogu u i razvoju patofizioloških procesa kao što su HIV infekcija i rast kancera i metastaza (Feng i sar., 1996; Kryczek i sar., 2007). CXCR4 je jedan od hemokinskih receptora, koji virus HIV-a koristi prilikom infekcije CD4+ T limfocita (Moriuchi i sar., 1997). CXCL12/CXCR4 osa doprinosi nastanku metastaza jer kancer stem ćelije, kao i normalne stem ćelije, ekspimiraju CXCR4 receptor, što im omogućuje hemoatrakciju ka tkivima koja pojačano ekspimiraju CXCL12, kao što su limfni čvorovi, pluća, jetra ili kosti (Ratajczak i sar., 2006). Utvrđeno je da pojačano prisustvo hemokina CXCL12 smanjuje mogućnost razvoja dijabetesa tako što pospešuje preživljavanje beta ćelija pankreasa (Yano i sar., 2007).

1.2.2. ULOGA CXCL12 U PREDIKCIJI I SPREČAVANJU DIJABETESA

Gubitak beta ćelija karakteriše oba tipa dijabetesa. Pronalaženje faktora koji bi imali sposobnost da očuvaju funkcionalne beta ćelije može doprineti razvoju terapija kojim bi se efikasno tretirao dijabetes i sprečile njegove komplikacije. Hemokin CXCL12 je molekul sa protektivnim dejstvom na beta ćelije što ga čini potencijalnim terapijskim agensom u lečenju dijabetesa. Zaštitno delovanje CXCL12 ostvaruje na više načina: sprečavanjem odumiranja beta ćelija, indukcijom transdiferencijacije alfa u beta ćelije i stimulacijom neogeneze beta ćelija od prekursora poreklom iz duktusa egzokrinog pankreasa.

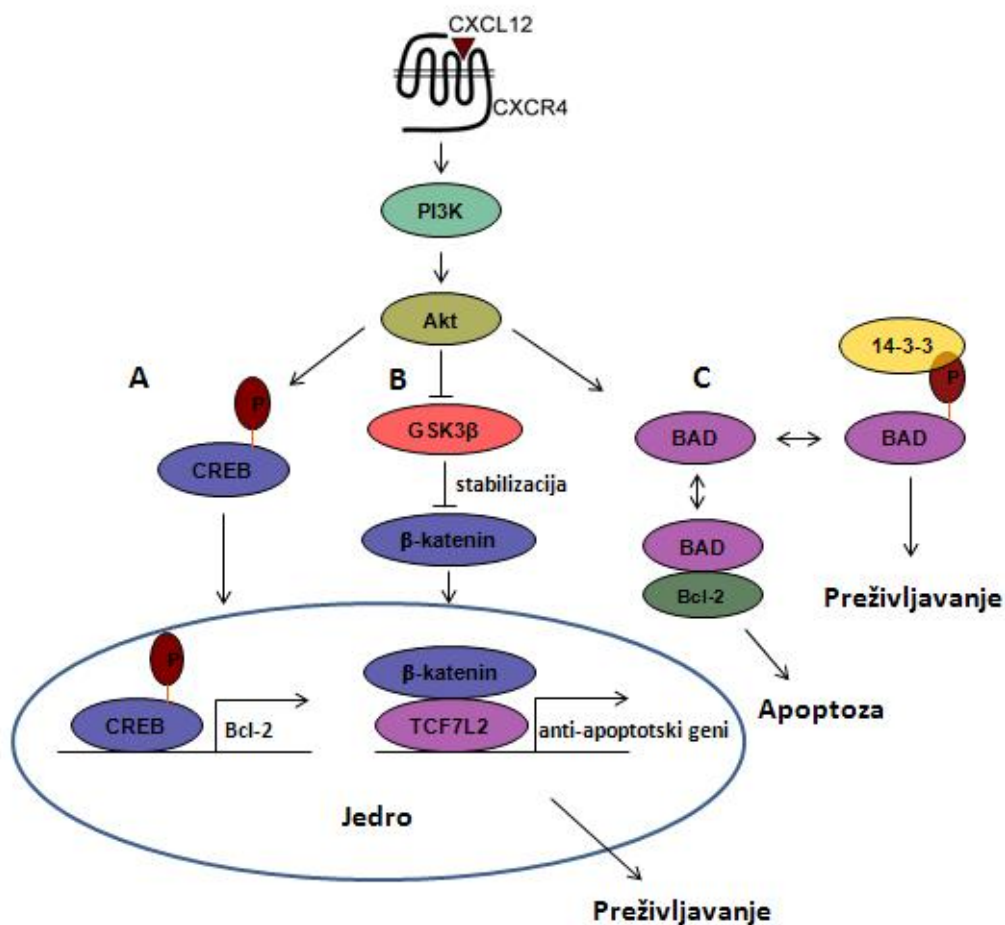
Antidijabetogeno svojstvo CXCL12 nedavno je potvrđeno u *in vitro* i *in vivo* studijama. Transgeni miševi, kod kojih je CXCL12 pojačano ekspimiran u beta ćelijama pankreasa, ne razvijaju dijabetes nakon tretmana dijabetogenim stimulusom. CXCL12 sprečava odumiranje beta ćelija pankreasa aktivacijom fosfatidil inozitol-3 kinaznog (PI3K)/Akt antiapoptotskog signalnog puta. Naime, vezivanje CXCL12 za CXCR4 receptor na površini membrane, rezultira u aktivaciji PI3K/Akt signalnog puta. Aktivirana Akt sprečava apoptozu aktivacijom više nishodnih puteva. Sa jedne strane, Akt fosforilacijom aktivira transkripcioni faktor CREB, čime indukuje njegovu translokaciju iz

citoplazme u jedro. U jedru se CREB vezuje za promotor antiapoptotskog Bcl-2 gena i indukuje njegovu ekspresiju (Slika 1.3A). Bcl-2 protein sprečava izlazak citohroma C kroz pore mitohondrijalne membrane, čime je onemogućena aktivacija citosolnih kaspaza, koje su efektori apoptoze. Sa druge strane, aktivirana Akt fosforiliše proapoptotski protein BAD. Nefosforilisani BAD formira heterodimerni protein sa Bcl-2, čime ga inaktivira, izazivajući apoptozu. Fosforilisani BAD vezuje 14-3-3 protein, čime je sprečena BAD-Bcl-2 interakcija, što omogućuje antiapoptotskom Bcl-2 proteinu da spreči apoptozu (Slika 1.3C) (Yano i sar., 2007). Takođe, aktivirana Akt kinaza stabilise i aktivira β -katenin/TCF7L2 transkripcione aktivatore, koji predstavljaju komponente Wnt signalnog puta (Slika 1.3B). Ukratko, aktivirana Akt inhibira glikogen sintazu kinazu-3 β (GSK-3 β). Aktivna GSK-3 β fosforiliše β -katenin i na taj način ga obeležava za ubikvitinaciju i degradaciju u proteazomima. Inhibicijom GSK-3 β , sprečava se degradacija β -katenina, što ima za posledicu njegovu akumulaciju u citoplazmi i jedru. U jedru β -katenin interaguje sa transkripcionim faktorom TCF7L2 i formirani heterodimer indukuje transkripciju gena koji stimulišu preživljavanje ćelija (Liu i Habener, 2009).

Nedavno je pokazano da različiti dijabetogeni stimulusi, kao što su citokini, taspigargin i streptozotocin, uslovljavaju pojačanu ekspresiju gena za CXCL12 u beta ćelijama pankreasa. Zanimljivo je da se tretmanom beta ćelija sa rekombinovanim CXCL12 indukuje ekspresija gena za CXCL12. Sintetisani CXCL12 se sekretuje iz ćelije i vezuje za CXCR4 receptor prisutan na membrani beta ćelije i na taj način sa jedne strane autokrinim putem aktivira antiapoptotske signalne puteve koji pospešuju preživljavanje beta ćelija, dok sa druge strane pozitivnom spregom indukuje svoju ekspresiju (Liu i sar., 2011).

CXCL12/CXCR4 signalni put u embrionalnom pankreasu važan je za diferencijaciju endokrinog pankreasa, dok ovaj signalni put u adultnom pankreasu može imati ulogu u neogenezi i preživljavanju beta ćelija. U embrionalnom i adultnom pankreasu CXCL12 i CXCR4 se eksprimiraju u ćelijama ostrvaca, dok se CXCR4 ekspirira i u ćelijama duktusa pankreasa. Ovi rezultati ukazuju da bi u embrionalnom pankreasu gradijent CXCL12 mogao navoditi ćelije duktusa u ostrvca koja se formiraju. U adultnom pankreasu, ćelije duktusa koje eksprimiraju CXCR4 migriraju prema ostrvcima koja proizvode CXCL12. Ćelije duktusa bi mogle da služe kao prekursori za nastanak

endokrinih ćelija pankreasa i na način učestvuju u neogenezi beta ćelija (Kayali i sar., 2003; Kayali i sar., 2012).



Slika 1.3. Shematski prikaz antiapoptotskog signalnog puta u beta ćelijama pankreasa aktiviranog od strane CXCL12/CXCR4 ose.

Prethodno je spomenuta nova strategija za tretman pacijenata obolelih od dijabetesa, koja podrazumeva transdiferencijaciju alfa u beta ćelije. Pokazano je da povreda beta ćelija indukuje ekspresiju gena za CXCL12, i da sekretovani CXCL12 izaziva de-diferencijaciju susedih alfa ćelija u pro-alfa ćelije. Dediferencijacija alfa u pro-alfa ćelije je prvi korak u procesu transdiferencijacije. Pro-alfa ćelije zatim sintetišu GLP-1 i njegov receptor, koji stimulišu finalni korak njihove transdiferencijacije u beta ćelije (Habener i Stanojevic,

2012a). S obzirom, da se dijabetes karakteriše nedostatkom funkcionalnih beta ćelija, proces de-diferencijacije koji se odvija u pankreasu, mogao bi da bude efikasna strategija u tretmanu ove bolesti.

Pored uloge koju ostvaruje u sprečavanju dijabetesa, CXCL12 predstavlja i potencijalni marker u predikciji nastanka i razvoja DT1. Gen za humani CXCL12 smešten je na hromozomu 10, lokacija 10q11.1, pored lokusa *IDDM10*, koji predstavlja region sa velikim brojem genskih polimorfizama koji se dovode u vezu sa DT1. Sama lokalizacija gena u blizini lokusa koji je povezan sa DT1, dovodi CXCL12 u poziciju potencijalnog markera u predikciji nastanka i razvoja DT1. Tome u prilog ide i nekoliko studija koje ukazuju na povezanost polimorfizma 3'G801A u genu za CXCL12, sa ranom pojavom dijabetesa (Dubois-Laforgue i sar., 2001; Ide i sar., 2003).

1.2.3. REGULACIJA TRANSKRIPCije GENA ZA CXCL12

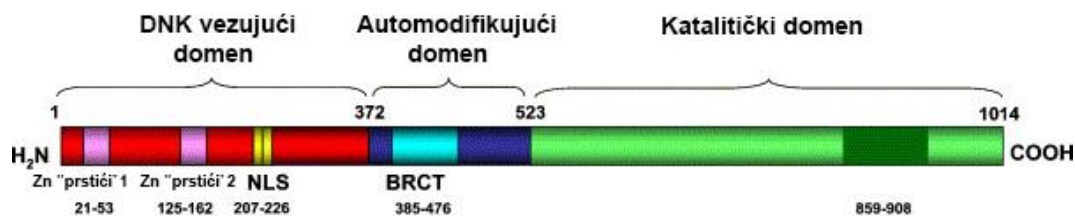
Analiza promotora gena za humani CXCL12 (*CXCL12*) pokazala je da ovaj promotor sadrži nekanonski TATA element (eng. *non-canonical TATA box*), sa citozinom umesto adenina na poziciji 2 (Garsija-Moruja i sar., 2005). Nizvodno se nalazi inicijator element (Int) (Garsija-Moruja i sar., 2005; Lagergren i sar., 2007), sa kog se inicira transkripcija kod eukariotskih gena koje imaju nekanonski TATA element (Smale, 1997). U promotoru je uočeno je prisustvo nekoliko CpG ostrvaca. Transkripcioni faktor Sp1 poseduje 15 potencijalnih mesta vezivanja u okviru proksimalnog promotora. Pokazano je da Sp1 vezuje 6 motiva i da ovaj transkripcioni faktor stimuliše transkripciju CXCL12 gena u bazalnim uslovima. Afinitet vezivanja za *CXCL12* promotor pokazali su još i protein koji se vezuje za element TATA (eng. *TATA binding protein, TBP*), CAC-BF, NF-AT, GAGA faktor, AP-2, NF-X3/E12, XPF1 i HNF-3 (Garsija-Moruja i sar., 2005). Pored Sp1, poznato je još nekoliko aktivatora transkripcije CXCL12 gena: EBF, STAT3, c-myb, C/EBP β i HIF-1 (Ceradini i sar., 2004; Langergren i sar., 2007; Olive i sar., 2008; Chen i sar., 2010; Calonge i sar., 2010; Kim i sar., 2007). Dosad su identifikovana dva inhibitora transkripcije CXCL12 gena: p53 i Foxf1 (Moskovits i sar., 2006; Kalin i sar., 2008).

Prvobitno se smatralo da je CXCL12 gen koji se konstitutivno eksprimira. Međutim, nedavno je pokazano da se ekspresija CXCL12 gena indukuje kao odgovor na povredu ćelije (Liu i sar., 2011), nakon stimulacije ćelije citokinima i u uslovima ćelijske konfluentnosti (Calonge i sar., 2010), u uslovima hipoksije i zaustavljanja ćelijskog ciklusa (Santiago i sar., 2011) i nakon zračenja ćelija γ zracima i tretmanom antibioticima (Ponomaryov i sar., 2000).

1.3. TRANSKRIPCIONI FAKTORI - POTENCIJALNI REGULATORI TRANSKRIPCIJE GENA ZA CXCL12

1.3.1. POLI(ADP-RIBOZIL) POLIMERAZA-1

Poli(ADP-ribozil) polimeraza-1 (PARP-1) je jedarni protein od 113 kDa sa mnogobrojnim funkcijama. PARP-1 je glavni enzim odgovoran za reakciju poli(ADP-ribozil)acije (Althaus i Richter, 1987), koja predstavlja jednu od posttranslacionih modifikacija proteina jedra. Ovaj enzim je uključen u signalizaciju oštećenja nastalih na DNK i njegova primarna uloga u ćeliji vezana je za aktivaciju mehanizama popravke nastalih oštećenja (Bhatia i sar., 1990). Sastoji od tri osnovna domena: C-terminalnog domena od 54 kDa, koji predstavlja katalitički domen, odgovoran za prenos ADP-ribozih jedinica na proteine-akceptore; N-terminalnog domena od 46 kDa, koji ima ulogu u vezivanju za DNK i sadrži dva motiva Zn-prstiju; srednji deo čini automodifikujući domen od 22 kDa koji predstavlja akceptorni region tokom reakcije automodifikacije (Slika 1.4) (D'Amours i sar., 1999).



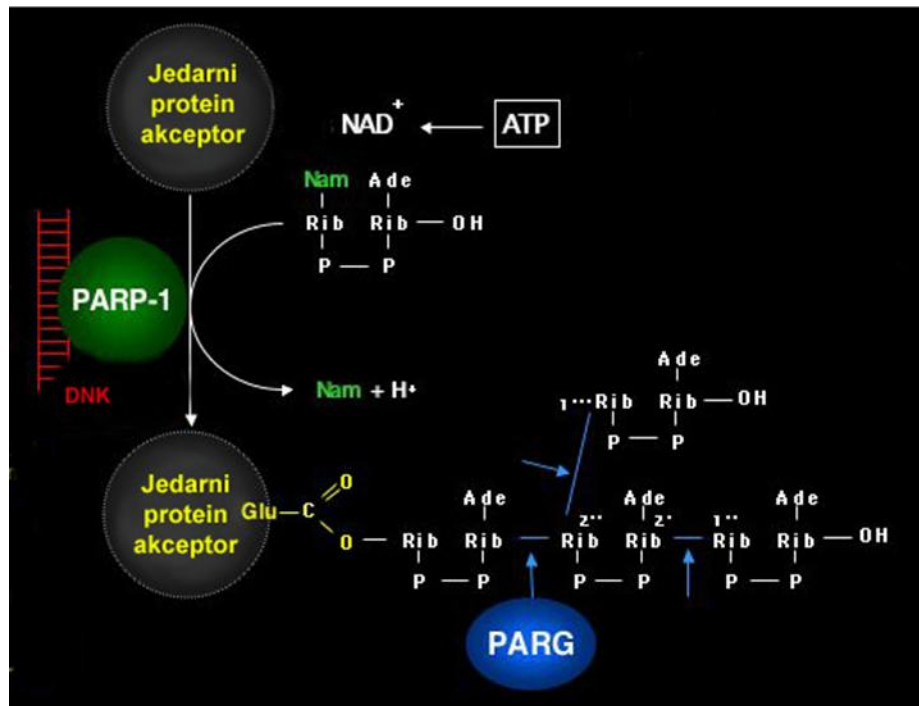
Slika 1.4. Shematski prikaz linearne strukture PARP-1 (Preuzeto od Meyer-Ficca i sar., 2005).

Drugi motiv Zn-prsta u okviru N-domena olakšava vezivanje PARP-1 za DNK i stimuliše aktivaciju katalitičkog domena na C-terminusu (Langelier i sar., 2008). Automodifikujući domen se karakteriše prisustvom BRCT domena, koji učestvuje u međuproteinskim interakcijama i navodi enzime koji učestvuju u popravci DNK na mesto DNK oštećenja (Masson i sar., 1998; El Khamisy i sar., 2003).

PARP-1 učestvuje u regulaciji različitih procesa u jedru: reparaciji DNK i održavanju integriteta genoma (Ko i Ren, 2012), u regulaciji ekspresije različitih gena na nivou transkripcije (Chu i sar., 2007; Ono i sar., 2009), regulacija replikacije i diferencijacije (Sugimura i sar., 2008; Yingbiao i Tulin, 2010), učešće u regulaciji aktivnosti telomera (Gomez i sar., 2006; Gurung i sar., 2010), učešće u realizaciji ćelijske smrti (Ying i sar., 2005; Chaitanya i sar., 2010), uloga u obezbeđivanju hitnog izvora energije za potrebe ćelije (Surjana i sar., 2010) i služi kao signal za proteinsku degradaciju u oksidativnom stresu (Ciftci i sar., 2001; Ullrich i Grune, 2001).

1.3.1.1. Enzimatska aktivnost PARP-1

Enzimatska aktivnost PARP-1 podrazumeva reakciju poli(ADP-ribozil)acije (PARilacije), u kojoj se ADP-ribozne jedinice prenose na proteine-akceptore. Ukoliko PARP-1 poli(ADP-riboz)iluje sam sebe, reakcija se naziva automodifikacija, dok u reakciji heteromodifikacije PARP-1 vrši poli(ADP-riboz)ilaciju drugih jedarnih proteina-akceptora (de Murcia i sar., 1997). Sinteza polimera ADP-riboze se odvija u tri koraka: inicijacije ili mono(ADP-riboz)ilacije, elongacije i razgranavanja strukture ADP-riboznih polimera (Shieh i sar., 1998). U reakciji poli(ADP-riboz)ilacije PARP-1 katalizuje hidrolizu NAD^+ (nikotinamid adenin dinukleotid), što rezultira oslobađanjem nikotinamidskog prstena i jedne ADP-ribozne jedinice, koja služi kao gradivna jedinica za formiranje (ADP)-riboznih polimera (Slika 1.5) (Schreiber i sar., 1995; Burkle, 2001; Smith, 2001). PARilovani proteini su negativno naelektrisani pošto svaka ADP-ribozna jedinica poseduje dve negativno naelektrisane fosforne grupe. PARP-1 je protein koji se najintenzivnije ADP-riboziluje *in vivo* u reakciji automodifikacije (Rolli i sar., 2000), što rezultira u inhibiciji enzimске aktivnosti.



Slika 1.5. Metabolizam ADP-riboze (Preuzeto sa internet stranice <http://parplink.u-strasbg.fr>).

U reakciji heteromodifikacije PARP-1 PARiluje različite jedarne proteine, među kojim se nalaze: DNK-zavisna protein kinaza (Ariumi i sar., 1999), topozomeraza I (Krupitza i Cerruti, 1989) i II (Scovassi i sar., 1993), lamin B (Adolph i Song, 1985a), B23 (Ramsamoj i sar., 1995), histoni i HMG proteini (Oei i sar., 1997). Mnogobrojni transkripcioni faktori su akceptori ADP-riboznih jedinica: NF- κ B (Oliver i sar., 1999), AP-2 (Kannan i sar., 1999), Oct-1, YY-1 (Oei i Shi, 2001), B-MYB (Cervellera i Sala, 2000), p53 (Wesierska-Gadek i sar., 2005), TFIIF (Rawling i sar., 1997), NFAT (Olabisi i sar., 2008), Sp1 (Zaniolo i sar., 2007) i Elk1 (Cohen-Armon i sar., 2007). Heteromodifikacijom transkripcionih faktora, oni postaju negativno šaržirani, što im onemogućuje da vežu specifične sekvence u okviru promotora (Zaniolo i sar., 2007). Na ovaj način, posttranslaciona reakcija koju sprovodi PARP-1, bitno utiče na regulaciju transkripcije različitih gena.

1.3.1.2. Uloga PARP-1 u regulaciji transkripcije

PARP-1 reguliše transkripciju na dva različita nivoa: modifikacijom histona u cilju promene strukture hromatina i interakcijom sa promotorima i regulatornim elementima gena i transkripcionim faktorima.

PARilacija hromatinskih proteina utiče na stabilnost nukleozoma i viših nivoa organizacije hromatina. Glavni hromatinski proteini-akceptori ADP-riboznih jedinica su histoni H1 i H2B (Huletsky i sar., 1989; Soldatenkov i sar., 2002), mada svi histoni mogu biti heteromodifikovani u određenoj meri (D'Amours i sar., 1999). PARilacijom histona dolazi do dekonenzacije hromatina (Mathis i Althaus, 1987; Realini i Althaus, 1992), čime DNK postaje dostupna transkripcionoj mašineriji. Heteromodifikacija nehistskih proteina hromatina i transkripcionih faktora, dodatno doprinosi dekonenzaciji hromatina (D'Amours i sar., 1999).

Drugi vid regulacije transkripcije odvija se interakcijom PARP-1 sa DNK sekvencama koje se nazivaju regioni asocijacije sa jedarnim matriksom (RAM elementi). RAM elementi predstavljaju definisane DNA sekvence koje ostvaruju kontakt sa proteinima jedarnog matriksa, što dovodi do usidranja DNK petlji i formiranja specifične hromatinske organizacije. RAM elementi ne poseduju definisanu konsenzus sekvencu, već se karakterišu specifičnom sekundarnom strukturom. To su regioni na DNK koji su bogati AT bazama i koji strukturno i funkcionalno određuju RAM. Ovi AT-bogati regioni su strukturno organizovani u vidu manjeg žljeba DNK (Adachi i sar., 1989; Käs i sar., 1989) i poseduju jak potencijal ka baznom rasparivanju pod uticajem superspiralnog naboja (Kohwi-Shigematsu i Kohwi, 1990; Bode i sar., 1992). Mutacije u strukturi RAM elemenata koje poništavaju sposobnost baznog rasparivanja i smanjuju afinitet vezivanja ka jedarnom matriksu, onemogućuju pojačanu transkripciju gena (Bode i sar., 1992).

PARP-1 može da reguliše transkripciju kao „klasični“ transkripcioni faktor, vezivanjem za specifične DNK sekvence u okviru promotora ili regulatornih elemenata gena. Pokazano je da se u uzvodnom regulatornom regionu gena za PARP-1 miša (*Parp-1*) nalaze dva RAM elementa koji zajedno sa promotorom reguliše transkripciju *Parp-1*. Pored vezivanja oba RAM elementa, PARP-1 vezuje i specifičnu konsenzus sekvencu 5'-

GGCCT-3' u okviru svog promotora. Interakcije PARP-1 sa svojim promotorom i RAM elementom predstavljaju negativnu povratnu spregu u regulaciji ekspresije *Parp-1* (Vidaković i sar., 2009).

PARP-1 vezuje i *cis*-regulatorni element MCAT, koji kontroliše transkripciju gena koji se eksprimiraju u srčanom i skeletnom mišićnom tkivu. PARP-1 vezuje 5'-TGTTG-3' konsenzus sekvencu u okviru MCAT elementa. Vezivanjem PARP-1 za MCAT element stimuliše se transkripcija gena, u mišićnim ćelijama, dok interakcija PARP-1 sa MCAT elementom inhibira transkripciju ovih gena u ne-mišićnim ćelijama. Pretpostavlja se da PARP-1 interakcijom sa drugim transkripcionim regulatorima obezbeđuje tkivno-specifičnu ekspresiju gena, koji poseduju MCAT element (Butler i Ordahl, 1999).

Poznato je učešće PARP-1 u transkripcionoj regulaciji gena za Reg protein, koji indukuje proliferaciju beta ćelija pankreasa, zbog čega predstavlja potencijalni terapijski agens u tretmanu dijabetesa. PARP-1 interaguje sa *cis*-regulatornim elementom, sekvencom 5'-TGCCCCTCCCAT-3', koji se nalazi u okviru promotora gena za Reg protein. Pokazano je da automodifikovan PARP-1 ne vezuje *cis*-regulatorni element Reg gena, dok inhibicija enzimske aktivnosti PARP-1 omogućuje formiranje transkripcionog kompleksa i transkripciju gena za Reg protein (Akiyama i sar., 2001).

Takođe, PARP-1 inhibira transkripciju gena za CXCL1. PARP-1 motiv u okviru promotora nalazi se u blizini NF- κ B vezivnog mesta, pri čemu interakcija PARP-1 sa promotorom sprečava vezivanje NF- κ B za svoj motiv. U bazalnim uslovima PARP-1 vezuje promotor, čime je inhibirana transkripcija gena za CXCL1. U uslovima stresa, PARP-1 se automodifikuje i gubi interakciju sa DNK, što omogućuje vezivanje transkripcionog faktora NF- κ B za promotor. Vezivanje NF- κ B stimuliše transkripciju CXCL1 gena (Amiri i sar., 2006).

Poznato je da PARP-1 vezuje regulatornu sekvencu u okviru prvog introna Bcl-6 gena, čime inhibira transkripciju ovog gena (Ambrose i sar., 2006). Takođe je utvrđeno da PARP-1 vezuje regulatorne sekvence u okviru gena za Pax-6 (Plaza i sar., 1999) i gena za MHC II (Wu i sar., 2000). Dalja istraživanja bi trebala da rasvetle uticaj PARP-1 na transkripciju ovih gena tj. da se ispita da li je PARP-1 transkripcioni aktivator ili inhibitor.

PARP-1 učestvuje u kontroli transkripcije različitih gena i kao ko-regulator transkripcije. Heteromodifikacijom određenih transkripcionih faktora, kao što su YY1 (Oei i Shi, 2001), NF- κ B (Oliver i sar., 1999), TFIIF (Rawling i sar., 1997), Oct-1 (Oei i Shi, 2001), B-MYB (Cervellera i Sala, 2000) i AP-2 (Kannan i sar., 1999) sprečava se njihovo vezivanje za DNK što utiče na transkripciju ciljnih gena (Zaniolo i sar., 2007).

1.3.1.3. Uloga PARP-1 u razvoju dijabetesa

Tokom dijabetesa i njegovih komplikacija, slobodni radikali nastali tokom oksidativnog stresa izazivaju prekide na DNK, što dovodi do aktivacije PARP-1, sinteze PAR-ova i potrošnje ćelijske energije, što rezultira nekrozom beta ćelija (Szabo, 2005). Miševi kod kojih je uklonjen gen za PARP-1 (PARP^{-/-} miševi), ne razvijaju dijabetes nakon tretmana dijabetogenim agensom, imaju normalan nivo glukoze u krvi i očuvana ostrvca pankreasa, što ukazuje da uklanjanje PARP-1, doprinosi očuvanju beta ćelija, sprečavanjem energetskog kolapsa i nekroze beta ćelija u uslovima oksidativnog stresa izazvanog dijabetogenim stimulusom (Pieper i sar., 1999). Pored toga, inhibicija PARP-1, sprečava razvoj dijabetesa kod NOD miševa. NOD miševi predstavljaju soj, koji spontano razvija insulitis usled infiltracije leukocita u ostrvca pankreasa, što rezultira nastankom DT1. Aplikacija inhibitora PARP-1 kod NOD miševa indukuje apoptozu leukocita koji su se infiltrirali u ostrvca, i tako sprečava autoimunu destrukciju beta ćelija pankreasa (Suarez-Pinzon i sar., 2003).

Pokazano je da inhibicija PARP-1 ima sposobnost da stimuliše regeneraciju ostrvaca pankreasa kod pacova kod kojih je uklonjeno 90% pankreasa. Reg protein je odgovoran za regeneraciju beta ćelija. Utvrđeno je da ovaj protein indukuje replikaciju vezivanjem za svoj receptor na beta ćeliji, čime se ublažava eksperimentalno izazvan dijabetes (Takasawa i Okamoto, 2002). Kao što je spomenuto u poglavlju Uvod, 1.3.1.2, inhibiran PARP-1 vezuje *cis*-regulatorni element u okviru promotora Reg gena, čime je omogućena njegoa transkripcija (Akiyama i sar., 2001).

Na kraju može se zaključiti da se inhibicijom PARP-1 sprečava nekroza i stimuliše replikacija beta ćelija, a ujedno se i indukuje apoptoza infiltriranih leukocita, odgovornih za razvoju insulitisa.

1.3.2. YIN YANG 1 (YY1)

Yin Yang 1 (YY1) je transkripcioni faktor od 63 kDa, koji ima važnu ulogu u fundamentalnim biološkim procesima kao što su embriogeneza, replikacija, diferencijacija i proliferacija ćelija. Uticaj YY1 na biološke procesa ogleda se u njegovoj sposobnosti da inicira, aktivira ili inhibira transkripciju ciljnih gena (Gordon i sar., 2006).

1.3.2.1. Struktura i funkcija YY1

YY1 pripada „GLI-Kruppel“ familiji proteina, koji se karakterišu prisustvom motiva Zn-prstiju. Sastoji se od 414 amino kiselina. C-terminalni domen, koji je odgovoran za represiju transkripcije, sadrži četiri motiva Zn-prstiju. Motivi Zn-prstiju potpomažu vezivanje za specifičnu DNK sekvencu i doprinose transkripcionoj inhibiciji (Shi i sar., 1997). Aktivacioni domen čini 11 amino kiselina koje se nalaze na N-terminusu (Shi i sar., 1997, Nguyen i sar., 2004). Pored C-terminalnog represionog domena, još jedan region, bogat glicinom, koji se sastoji od 30 amino kiselina, ima sposobnost da inhibira transkripciju (Yang i sar., 1996).

YY1 ima ulogu u regulaciji ćelijskog ciklusa. Ovaj transkripcioni faktor učestvuje u transkripcionoj regulaciji gena za Ciklin D1. Kada je vezan za promotor, YY1 inhibira transkripciju Ciklin D1 gena. Pri kraju G1 faze, gubi se interakcija YY1 sa promotorom, što rezultira transkripcijom Ciklin D1 gena i prelaskom iz G1 u S fazu ćelijskog ciklusa (Cicatiello i sar., 2004). Važnost YY1 tokom embriogeneze pokazana je kod miševa kod kojih je utišan gen za YY1. Homozigoti su umirali pre stadijuma gastrulacije, dok su heterozigoti preživeli, ali su znatno zaostajali u rastu i imali poremećaj u razvoju nervnog sistema (Donohoe i sar., 1999).

YY1 inhibira transkripciju gena za PARP-1 (Doetch i sar., 2012) i CXCR4 koji predstavlja receptor za CXCL12 (Tarnowski i sar., 2010). Sa druge strane, YY1 je aktivator transkripcije gena za antiinflamatorni citokin interleukin-4 (IL-4) (Guo i sar., 2001), koji sprečava razvoj dijabetesa (Berman i sar., 1996), što ukazuje na potencijalno protektivnu ulogu YY1 u dijabetesu.

1.3.2.2. Uticaj YY1 na transkripciju

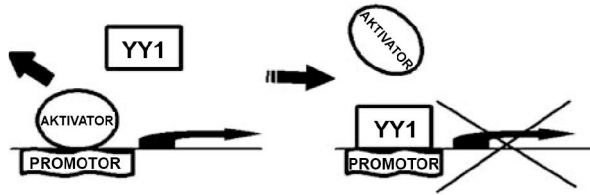
YY1 vezuje konsenzus sekvencu 5'-(A/c/g)(A/t)NATG(G/a/t)(C/a)(G/c/t)-3', (velika slova ukazuju na nukleotid, koji se češće javlja u okviru konsenzus sekvence, N predstavlja bilo koji nukleotid). Većina gena kičmenjaka i virusa u okviru svog promotora sadrži potencijalno mesto vezivanja za YY1, što ukazuje da YY1 učestvuje u regulaciji transkripcije velikog broja gena (Klar i sar., 2005). Ukoliko se YY1 motiv nalazi nizvodno od mesta početka transkripcije, često se poklapa sa Kozak sekvencom, pri čemu se ATG nukleotidi u okviru motiva podudaraju sa inicijacionm kodonom (Xi i sar., 2007).

YY1 utiče na transkripciju na više različitih načina: inicijacijom transkripcije vezivanjem za inicijator element (Int) i aktivacijom ili inhibicijom transkripcije (Slika 1.6) (Shi i sar., 1997). Smatra se da YY1 inhibira transkripciju ciljnih gena na tri različita načina: model zamene (eng. *displacement model*), interferencijom sa transkripcionim aktivatorima i interakcijom sa transkripcionim ko-represorima (Slika 1.6A, B, C) (Shi i sar., 1997; Thomas i Seto, 1999). Prema modelu zamene, YY1 se nalazi u kompeticiji za preklapajuće vezivno mesto sa transkripcionim aktivatorom i ovo je najčešći vid inhibicije transkripcije od strane YY1. Na ovaj način YY1 učestvuje u regulaciji transkripcije gena za serumski amiloid u ćelijama hetpatocita, gde se YY1 nalazi u kompeticiji za preklapajuće vezivno mesto za NF-κB, koji je aktivator transkripcije ovog gena (Slika 1.6A) (Lu i sar., 1994). Prema modelu interferencije YY1 sprečava transkripcionog aktivatora da indukuje transkripciju, bez kompeticije za isto vezivno mesta na DNK. U nekim slučajevima, uprkos vezanom aktivatoru za DNK, YY1 može da se veže za udaljeno vezivno mesto i spreči aktivaciju transkripcije. Ovakav slučaj delovanja YY1 zabeležen je u promotoru c-fos gena, gde se dva vezivna mesta za YY1 nalaze između CRE sekvence i TATA elementa. Pored

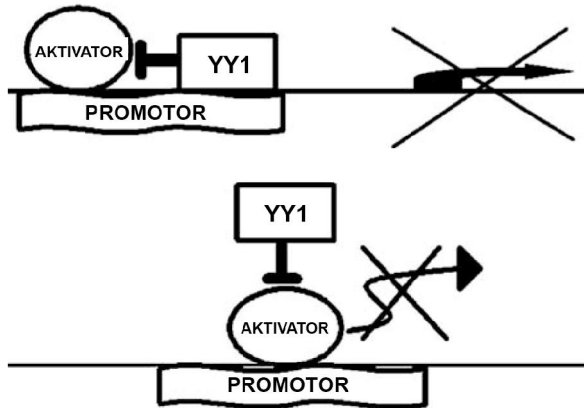
toga, YY1 može direktno da interaguje sa transkripcionim aktivatorom vezanim za DNK, i na taj način inhibira njegovo delovanje što će rezultirati represijom transkripcije. I ovaj način inhibicije transkripcije zabeležen je kod c-fos gena, gde je pokazano da YY1 interaguje preko motiva Zn-prstiju sa motivom leucinskog zatvarača CREB transkripcionog aktivatora (Slika 1.6B) (Shi i sar., 1997). Poslednji način inhibicije transkripcije od strane YY1 je interakcija sa ko-represorima, koji mogu ili direktno učestvovati u inhibiciji transkripcije ili indukovati remodelovanje i kondenzaciju hromatina i tako pomoći YY1 u represiji transkripcije (Slika 1.6C) (Thomas i Seto, 1999).

YY1 aktivira transkripciju na tri različita načina: direktnom aktivacijom transkripcije, inhibicijom YY1 represorne aktivnosti i interakcijom sa drugim transkripcionim aktivatorima (Slika 1.6D, E, F) (Gordon i sar., 2006). Prema prvom modelu aktivacije transkripcije, YY1 interakcijom direktno aktivira faktore koji stimulišu transkripciju: protein koji se vezuje za element TATA (TBP) i opšti transkripcioni faktor TFIIB. Međutim, za uspešnu aktivaciju transkripcije najverovatnije je neophodno i prisustvo ko-faktora, tako da se pretpostavlja da je ovaj model previše pojednostavljen (Slika 1.6D) (Gordon i sar., 2006). Drugi model aktivacije transkripcije od strane YY1 je inhibicija represorne aktivnosti YY1, pri čemu YY1 interaguje sa drugim faktorima u ćeliji što rezultira u promeni njegove strukture i izlaganju (eng. *unmasking*) N-terminalnog aktivirajućeg domena YY1. Tokom interakcije dolazi do konformacionih promena, koje obuhvataju i C-terminalni inhibitorni domen. Smatra se da C-terminalni domen igra važnu ulogu u inhibiciji N-terminalnog domena (Slika 1.6E) (Thomas i Seto, 1999). Treći način aktivacije transkripcije od strane YY1 je navođenje transkripcionih ko-aktivatora na promotore ciljnih gena (Thomas i Seto, 1999). YY1 ima sposobnost da interaguje sa ko-aktivatorima sa aktivnošću histon acetiltransferaza (HAT), kao što su CBP i p300 (Slika 1.6F) (Lee i sar., 1998). Interakcijom sa HAT, YY1 putem epigenetskih promena reguliše transkripciju jer prisustvo HAT omogućuje dekonenzaciju hromatinu i aktivnu transkripciju.

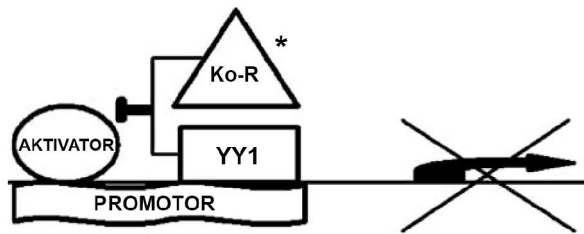
A. Model zamene



B. Model interferencije



C. Interakcija sa ko-represorima



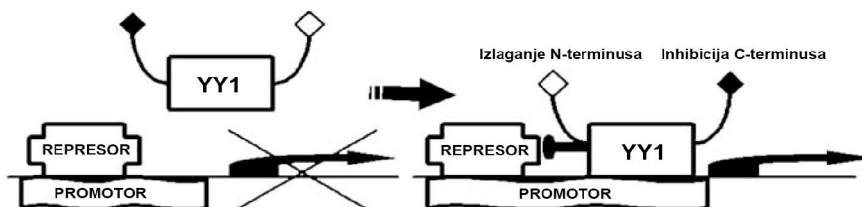
* Ko-represor

D. Direktna aktivacija

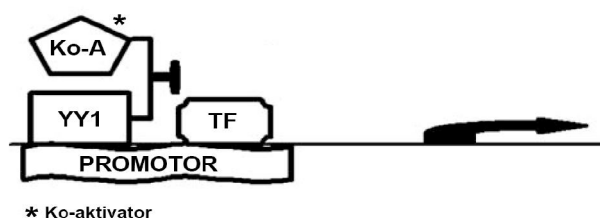


* Transkripcioni faktor

E. Inhibicija represorne aktivnosti YY1



F. Interakcija sa transkripcionim aktivatorima



Slika 1.6. Shematski prikaz uticaja YY1 na transkripciju (Preuzeto od Gordon i sar., 2006).

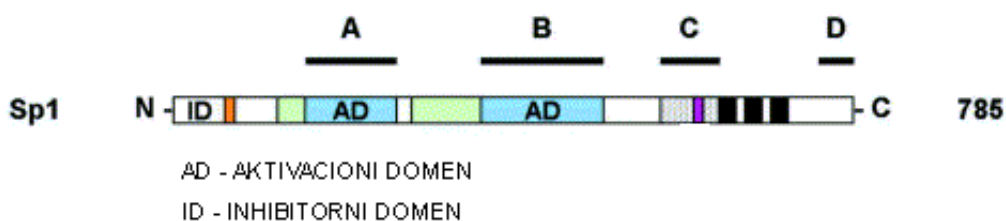
1.3.3. Sp1 TRANSKRIPCIONI FAKTOR

Sp1 je transkripcioni faktor od 100 kDa, koji ima ključnu ulogu u održavanju bazalnog nivoa transkripcije konstitutivno eksprimiranih gena. Pored toga, Sp1 može da aktivira ili inhibira transkripciju ciljnih gena u odgovoru na fiziološki ili patofiziološki stimulus. Sp1 reguliše transkripciju hiljada gena, koji imaju ulogu u različitim fiziološkim procesima kao što su: ćelijski rast, diferencijacija, adhezija i migracija, apoptoza, angiogeneza i inflamacija (Tan i Khachigian, 2009).

1.3.3.1. Struktura i funkcija Sp1

Sp1 je prvi otkriveni član Sp/XKLF (eng. *Specificity protein/Krüppel-like factor*) familije transkripcionih faktora. Članove ove familije karakteriše prisustvo tri motiva Zn-prstiju na C-terminalnom kraju. Sp1 se sastoji od 785 amino kiselina. Protein je podeljen na četiri pod-domena sa specifičnim funkcijama (Slika 1.7) (Pascal i Tjian, 1991). Pod-domeni

A i B su transaktivacioni domeni, koji stimulišu transkripciju, nakon interakcije DNK-vezujućeg domena sa DNK. Ova dva pod-domena su bogata aminokiselinom glutaminom, koji je neophodan za transaktivaciju (Roos i sar., 1997; Yang i sar., 2001). Pored uloge u transaktivaciji pod-domeni A i B, učesvuju u proteinskim interakcijama prilikom oligomerizacije i formiranja homotetramera Sp1 proteina. DNK-vezujući domen je pod-domen C, koji se nalazi na C-terminalnom kraju i poseduje tri motiva Zn-prstiju, koji su neophodni za vezivanje specifičnih DNK sekvenci bogatih GC nukleotidima (Pascal i Tjian, 1991). Pod-domen D, koji se takođe nalazi na C-terminalnom kraju, ima ulogu u formiranju složenijih Sp1 kompleksa, kao što je povezivanje Sp1 tetramera (Matsushita i sar., 1998). N-terminalni region sadrži inhibitorni domen i Sp1 element (eng. *Sp1 box*), koji predstavlja sekvencu za proteolitičku degradaciju (Harrison i sar., 2000).



Slika 1.7. Shematski prikaz linearne strukture Sp1 (Preuzeto od Bouwman i Philipsen, 2002).

Sp1 aktivira transkripciju gena, čiji proteinski produkti imaju ulogu u inflamaciji (CD34, CD7, CD20, CXCL4) (Taranenko i Krause, 2000; Koh i sar., 2008; Deniaud i sar., 2009; Shimizu i sar., 2010), ćelijskoj adheziji i migraciji (α -aktin, CD99) (Lee i sar., 2001; Hinz i sar., 2003; Subramanian i sar., 2004), angiogenezi i razviću (biglikan, endoglin) (Ungefroren i Krull, 1996; Botella i sar., 2001); proliferaciji (gastrin, hromogranin A) (Aunis, 1991; Chupreta i sar., 2000); metabolizmu (uridin fosfataza 1, transglutaminaza 2, receptor za progesteron) (Rupprecht i sar., 1993; Xu i sar., 2004; Deniaud i sar., 2009). Negativno dejstvo Sp1 ostvaruje na transkripciju gena za ciklin D2, Bcl9 i na transkripciju sopstvenog gena (Deniaud i sar., 2009). Poznato je da je Sp1 odgovoran za održavanje bazalne transkripcije humanog CXCL12 gena u ćelijskoj liniji astrocita. Budući da gen za

CXCL12 ne poseduje klasični TATA element, smatra se da Sp1 ima ključnu ulogu u inicijaciji i održavanju transkripcije CXCL12 gena (Garcia-Moraju i sar., 2005).

1.3.3.2. Uticaj Sp1 na transkripciju

Sp1 vezuje GC-bogate regulatorne elemente na DNK (eng. *GC box*), (sekvence 5'-GGGGCGGGG-3'), koji predstavljaju važne *cis*-regulatorne sekvence neophodne za transkripcionu regulaciju mnogih konstitutivno eksprimiranih, tkivno-specifičnih, virusnih i inducibilnih gena (Philipsen i Suske, 1999; Suske, 1999; Bouwman i Philipsen, 2002). Smatra se da ima ključnu ulogu u regulaciji transkripcije konstitutivno eksprimiranih gena, koji nemaju TATA element. TATA element vezuje TBP, koji predstavlja sastavni deo proteinskog kompleksa TFIID. Pored TBP, opšti transkripcioni faktor TFIID sadrži i faktore vezane za TBP (eng. *TBP-associated factors*, **TAF**). U odsustvu TATA elementa, Sp1 interaguje sa TBP i TAF proteinima i tako pomaže vezivanje TFIID za promotor (Chiang i Roeder 1995, Tanese i sar., 1996). TFIID omogućuje RNK polimerazi II (Pol II) i transkripcionoj mašineriji da se vežu za promotor (Kaufmann i Smale, 1994).

Uloga Sp1 u održavanju transkripcije konstitutivno eksprimiranih gena, ogleda se i u sprečavanju utišavanja gena DNK metilacijom. Veliki broj GC elemenata, koji predstavljaju vezivna mesta Sp1, nalazi se u regulatornim regionima konstitutivno eksprimiranih gena. Vezivanjem GC elementa, Sp1 sprečava DNK metilaciju i omogućuje gensku transkripciju (Pfeifer i sar., 1990; Macleod i sar., 1994).

Poznato je da Sp1 ima sposobnost da deluje kao oligomer. Pojedini promotori poseduju više Sp1 vezivnih mesta, i vezujući se za susedne DNK sekvence formiraju se međuproteinske interakcije između pojedinačnih Sp1 molekula. Pored toga, pokazano je da Sp1 može biti vezan u formi multimera za pojedninačno vezivno mesto (Li i sar., 2004).

Uprkos činjenici da je prvobitno opisan kao faktor odgovoran za bazalnu transkripciju konstitutivno eksprimiranih gena, pokazano je da različite posttranslacione modifikacije, kao što su fosforilacija, acetilacija, sumoilacija, ubikvitinacija i glikozilacija mogu uticati na transkripcionu aktivnost i stabilnost Sp1 transkripcionog faktora. Glikozilacija Sp1 je ključni signal za transport Sp1 iz citosola u jedro (Majumdar i sar.,

2006). Sumoilacija negativno utiče na transkripcionu aktivnost Sp1 (Spengler i sar., 2005), dok acetilacija Sp1 povećava promotorsku aktivnost određenih gena (Chen i sar., 2008). Fosforilacijom Sp1, može se smanjiti ili povećati njegova transaktivaciona sposobnost, što rezultira inhibicijom ili aktivacijom ciljnih gena (Ko i sar., 2003). Kombinacijom posttranslacionih modifikacija precizno se modulira transkripciona aktivnost Sp1, u zavisnosti od prisustva fiziološkog ili patofiziološkog stimulusa (Tan i Khachigian, 2009).

1.3.4. FOXO3a

FOXO3a je protein od 97 kDa, koji učestvuje u regulaciji fundamentalnih bioloških procesa kao što su: ćelijski ciklus, ćelijski metabolizam, ćelijska smrt i odgovor na stres. Svoju ulogu primarno ostvaruje u uslovima oksidativnog ili metaboličkog stresa. Budući da u fiziološkim uslovima ne učestvuje u održavanju metaboličke homeostaze ćelije, naziva se „tihu čuvar“. Na transkripciju ciljnih gena može imati aktivirajući ili inhibitoran efekat (Chiacchiera i Simone, 2010).

1.3.4.1. Struktura i funkcija FOXO3a

FOXO3a pripada „O“ podklasi „Forkhead“ familije transkripcionih faktora. Članovi ove familije sadrže DNK-vezujući domen okarakterisan kao krilata zavojnica (eng. *winged-helix*). Ovaj domen se naziva i „Forkhead box“, po kome je cela familija transkripcionih faktora dobila ime (Kaestner i sar., 2000). Foxo3a se sastoji od 673 amino kiselina. DNK-vezujući motiv („Forkhead box“), odgovoran za prepoznavanje specifične DNK sekvence, nalazi se na N-terminalnom kraju proteina (Glauser i Schlegel, 2007). „Forkhead box“ domen grade tri α -zavojnice i tri β -lanca (Tsai i sar., 2007) dok C-terminalni region sadrži transaktivacioni domen. Pored toga, FOXO3a sadrži dve sekvence za navođenje proteina u jedro (eng. *nuclear localization signal*, **NLS**) i tri sekvence za navođenje proteina iz jedra u citosol (eng. *nuclear export sequence*, **NES**). Prisustvo pomenutih aminokiselinskih sekvenci, omogućuje kretanje FOXO3a između dva ćelijska odeljka, čime se reguliše aktivnost ovog transkripcionog faktora (Slika 1.8) (Glauser i Schlegel, 2007).



Slika 1.8. Shematski prikaz linearne strukture FOXO3a (Preuzeto od Barthel i sar., 2005).

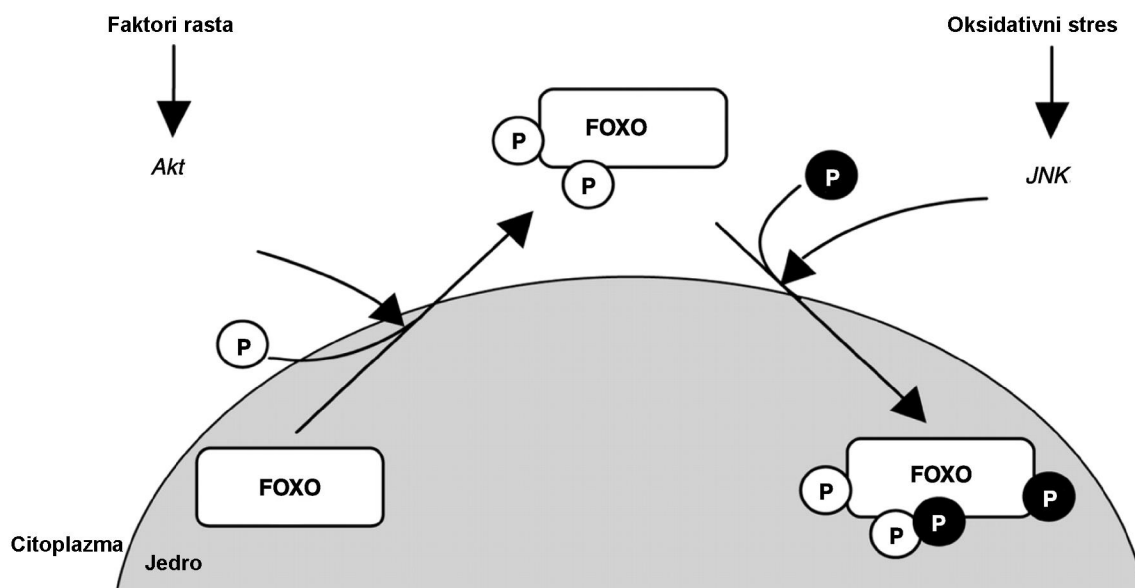
FOXO3a indukuje transkripciju gena koji imaju ulogu u zaustavljanju ćelijskog ciklusa (p21, p27, Ciklin G2, RBL2, Bcl6), ćelijskoj smrti (GADD45, BIM, FasL, PUMA, PTEN, BNIP3, BNIP3L), ćelijskom metabolizmu (PGC1 α , PEPCK, UCP2) i ćelijskom odgovoru na stres (SOD2, katalaza) (You i sar., 2006; Ho i sar., 2008; Chiacchiera i sar., 2009;). Sa druge strane, FOXO3a inhibira transkripciju gena odgovornih za napredovanje ćelijskog ciklusa (cikline D, E i A) (Schmidt i sar., 2002; Delpuech i sar., 2007; Ho i sar., 2008;). Smatra se da je primarna uloga FOXO3a u održavanju metaboličke homeostaze ćelije nakon izlaganja stresogenom stimulusu (Chiacchiera i Simone, 2010).

1.3.4.2. Uticaj FOXO na transkripciju

Transkripcioni faktori iz FOXO familije, vezuju konzervirane konsenzus sekvence koje se nazivaju FHRE (eng. *forkhead response element*), (5'-TTGTTTAC-'3) u promotorima ciljnih gena (Furuyama i sar., 2000).

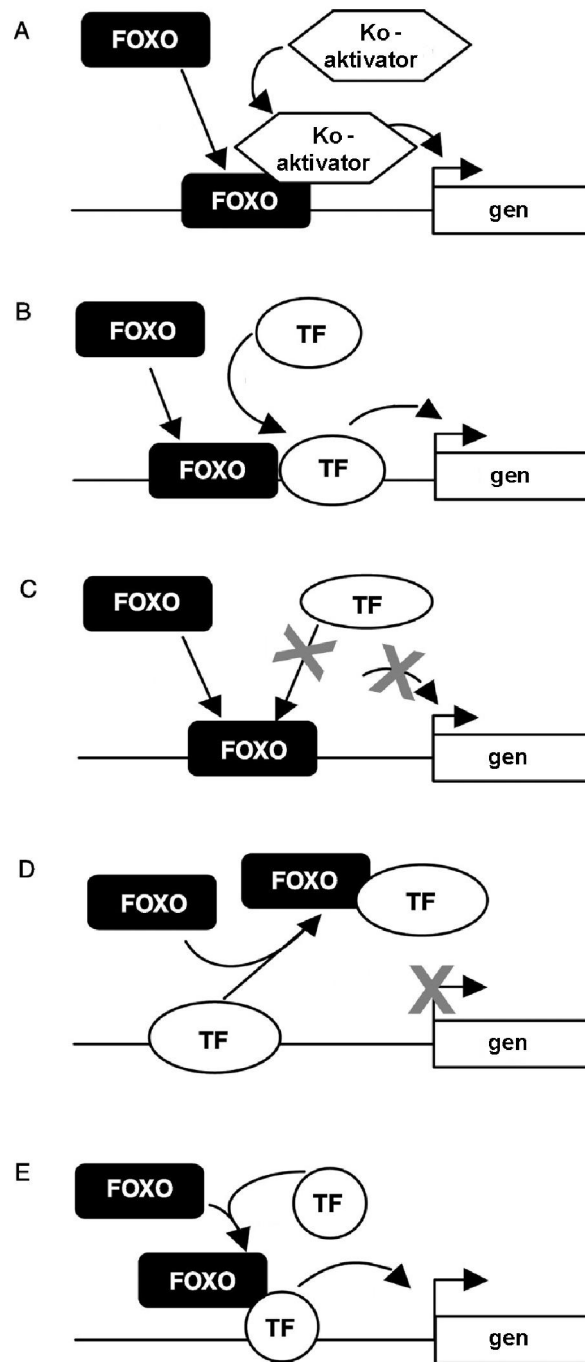
Prvi nivo kontrole transkripcije gena regulisane od strane FOXO proteina zavisi od raspodele FOXO u ćelijskim odeljcima, odnosno od njegovog pojačanog prisustva u jedru. U zavisnosti od vrste stimulusa, fosforilacija FOXO može izazvati njegovu translokaciju u jedro ili njegov prelazak iz jedra u citosol. Različiti faktori rasta, kao što su IGF-I, (eng. *insulin-like growth factor-I*), eritropoetin, EGF (eng. *epidermal growth factor*), stimulišu translokaciju FOXO iz jedra u citosol (Glauser i Schlegel, 2007). Vezivanjem faktora rasta za receptor, aktivira se PI3K/Akt signalna kaskada, što rezultira fosforilacijom FOXO na specifičnim mestima, koja prepoznaju 14-3-3 proteini. Formirani kompleks FOXO/14-3-3 napušta jedro i prelazi u citoplazmu. Takođe, vezivanjem 14-3-3 proteina blokira se NLS

sekvenca, čime je sprečen ponovni povratak FOXO u jedro (Cahill i sar., 2001). Sa druge strane, u odgovoru na oksidativni stres, kinaza JNK fosforiliše FOXO, stimulišući tako njegovu translokaciju u jedro (Slika 1.9) (Matsmuto i Accili, 2005).



Slika 1.9. Uticaji faktora rasta i oksidativnog stresa na raspodelu FOXO proteina (Preuzeto od Glauser i Schlegel, 2007).

FOXO proteini mogu izazvati aktivaciju ili inhibiciju transkripcije ciljnih gena. Aktivaciju transkripcije FOXO ostvaruje interakcijom sa transkripcionim ko-aktivatorima (Slika 1.10A) ili drugim transkripcionim faktorima (Slika 1.10B) (Barthel i sar., 2005). Sa druge strane, FOXO može inhibirati transkripciju kompeticijom sa transkripcionim aktivatorom za isto vezivno mesto u promotoru (Slika 1.10C). Takođe, FOXO može imati ulogu ko-represora (Slika 1.10D) ili ko-aktivatora i tako regulisati transkripciju gena čiji promotori ne poseduju FOXO konsenzus sekvencu (Slika 1.10E) (Glauser i Schlegel, 2007).



TF- transkripcioni faktor

Slika 1.10. Shematski prikaz uticaja FOXO na transkripciju (Preuzeto od Glauser i Schlegel, 2007).

1.3.5. HMG I/Y

Proteini HMG I i HMG Y nastaju alternativnim splajsovanjem pre-iRNK, transkribovane sa istog gena i obeležavaju se kao HMG I/Y (Johnson i sar., 1989). HMG I/Y poseduje jak afinitet vezivanja za RAM elemente i učestvuje u regulaciji transkripcije gena koji sadrže ili se nalaze u blizini sekvenci bogatih AT nukleotidima (Zhao i sar., 1993). HMG I/Y može biti i pozitivan i negativan regulator transkripcije.

1.3.5.1. Struktura i funkcija HMG I/Y

HMG I/Y je član HMG (eng. *high mobility group*) familije hromozomskih proteina. Protein HMG I se sastoji od 107, a HMG Y od 96 aminokiselina. Oba proteina poseduju tri domena preko kojih se vezuju za manji žleb DNK zavojnice koji je bogat AT nukleotidima (eng. *AT-hook*) (Reeves, 2000). HMG I/Y učestvuju u različitim biološkim procesima u jedru, kao što su transkripcija, replikacija, integracija retrovirusa i rekombinacija (Reeves, 2000).

HMG I/Y ima važnu ulogu u razvoju insulinske rezistencije, koja je jedan od glavnih uzroka DT2. Uloga HMG I/Y u razvoju insulinske rezistentnosti, ogleda se u učešću HMG I/Y u transkripcionoj regulaciji gena za insulinski receptor, o čemu će biti više reči u poglavlju Uvod, 1.3.5.2. Shodno tome, miševi kod kojih je utišan gen za HMG I/Y, razvijaju dijabetes i eksprimiraju veoma male količine receptora za insulin (Semple, 2009). Kod pacijenata obolelih od DT2, takođe, je zabeležena smanjena ekspresija HMG I/Y proteina (Foti i sar., 2003).

1.3.5.2. Uticaj HMG I/Y na transkripciju

Zbog svoje sposobnosti da formira „stereospecifične“ multiproteinske komplekse na sekvencama bogatim AT nukleotidima (potencijalnim RAM elementima), koje se nalaze u blizini ili u okviru promotora, HMG I/Y se naziva „arhitekturni“ ili „strukturni“ transkripcioni faktor (Reeves, 2000). Pozitivan efekat HMG I/Y na transkripciju ogleda se

u njegovoj sposobnosti da veže RAM element i tako stabilizuje otvorenu strukturu hromatina, čime se omogućuje transkripcija susednih gena. Pokazano je da HMG I/Y ima sposobnost da kompetitivno „istisne“ sa RAM elementa proteine koji inhibiraju transkripciju, kao što je histon H1 (Zao i sar., 1993). Na primer, za transkripciju gena za insulinski receptor neohodno je formiranje multiproteinskog kompleksa HMG I/Y/Sp1/C/EBP β , pri čemu se HMG I/Y vezuje za sekvencu bogatu AT nukleotidima koja se nalazi u okviru promotora i istovremeno interaguje sa Sp1 i C/EBP β proteinima, olakšavajući njihovo vezivanje za promotor (Foti i sar., 2003). Pored gena za insulinski receptor, HMG I/Y stimuliše transkripciju gena koji se eksprimiraju u ćelijama imunskog sistema (IL-2, IL-2R α , TNF- β , CXCL1) i u endotelnim ćelijama krvnih sudova (E-Selektin, iNOS, CD-44) (Fashena i sar., 1992; Lewis i sar., 1994; Himes i sar., 2000; Foster i sar., 2000; Reeves i sar., 2000; Nirodi i sar., 2001).

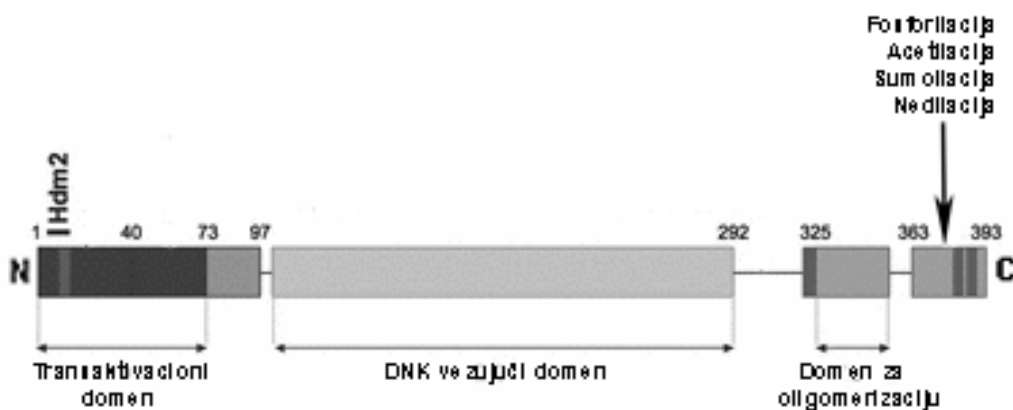
Inhibitoran efekat na transkripciju HMG I/Y ostvaruje kompeticijom za vezivno mesto u okviru promotora sa transkripcionim aktivatorom. Ovaj vid regulacije transkripcije zabeležen je u slučaju gena za IL-4, gde se HMG I/Y vezuje za motiv transkripcionog faktora NF-AT, proteina koji aktivira transkripciju IL-4 gena (Klein-Hessling i sar., 1996).

1.3.6. PROTEIN p53

Protein p53 je transkripcioni faktor, molekulske mase 53 kDa, koji se zbog svoje važne uloge u regulaciji i kontroli ćelijskog ciklusa i deobe naziva “čuvar” genoma (Lane, 1992). U odgovoru na različite stresogene stimulse, p53 se brzo aktivira i dolazi do povećanja njegove količine u jedru gde učestvuje u regulaciji transkripcione aktivacije ili inhibicije različitih gena čiji produkti kontrolišu zaustavljanje ćelijskog ciklusa, reparaciju oštećene DNK i apoptozu, sprečavajući na taj način nepravilnu replikaciju ćelija i akumulaciju mutacija (Vousden i Lane, 2007).

1.3.6.1. Struktura i funkcija p53

Protein p53 se sastoji od 393 amino kiselina. Čini ga šest domena: N-terminalni transaktivacioni domen koji sadrži NES signal; domen bogat prolinom; centralni DNK-vezujući domen; region „zgloba“ (eng. *hinge region*) koji sadrži glavni NLS signal; C-terminalni domen za oligomerizaciju i bazni domen (Slika 1.11.) (May i May, 1999). N-terminalni domen odgovoran je za interakciju sa velikim brojem ćelijskih proteina uključenih u transkripcionu regulacionu mašineriju, kao što su TBP, TAF 240 i TAF 260 (Truant i sar., 1993). U okviru NES signala smeštenog na N-terminalnom domenu, nalazi se vezivno mesto za E3-ubikvitin ligazu koja je specifična za p53, a u zavisnosti od organizma, odnosno da li je u pitanju miš ili čovek, obeležava se sa Mdm2 ili Hdm2 (eng. *Murine double minute 2; Human double minute 2*) (Honda i sar., 1997; Haupt i sar., 1997). Centralni DNK vezujući domen je odgovoran za prepoznavanje i vezivanje specifičnih DNK sekvenci (Cho i sar., 1994). Formiranje oligomera p53 proteina vrši se interakcijom C-terminalnih domena. C-terminalni domen sadrži α -zavojnica i β -lanac (Marius Clore i sar., 1995).



Slika 1.11. Shematski prikaz linearne strukture p53 proteina (Preuzeto od Marcel i Hainaut, 2009).

Svaka subjedinica tetramernog kompleksa p53 formira dimer preko antiparalelnih interakcija njihovih β -lanaca, a dimeri interaguju preko hidrofobnih i elektrostatičkih kontakata između α -zavojnica formirajući tetramere (Cho i sar., 1994). Bazni domen je

akceptor posttranslacionih modifikacija kao što su: fosforilacija, acetilacija, sumoilacija i nedilacija. U okviru ovog domena se nalaze i dva NLS signala (Marcel i Hainaut, 2009). Protein p53 je fosfoprotein. Step en fosforilisanosti utiče na konformaciju proteina i međuproteinske interakcije, što ukazuje na važnu ulogu fosforilacije u ćelijskim procesima u kojima učestvuje p53 (Vogelstein i Kinzler, 1992). U normalnim uslovima p53 se nalazi u maloj količini u ćelijama, što je posledica interakcije sa Hdm2 (ili Mdm2), koja ga mono- i poliubikvitiniluje i tako obeležava za izmeštanje iz jedra u citosol, gde se p53 degraduje u proteozomima (Geyer i sar., 2000). U odgovoru na stresogeni stimulus, fosforiliše se vezivno mesto za Hdm2 (Mdm2) na p53 proteinu, čime se sprečava interakcija između p53 i Hdm2 (Mdm2), što rezultira stabilizacijom p53 proteina. Takođe, fosforilacijom vezivnog mesta za Hdm2/Mdm2 maskira se NES sekvenca što ima za posledicu akumulaciju p53 proteina u jedru (Zhang i Xiong, 2001). Zatim sledi složena kaskada posttranslacionih modifikacija, kao što su fosforilacija, acetilacija, sumoilacija i nedilacija, koje stabilišu formiranje p53 tetramera. U formi tetramera p53 sa velikim afinitetom vezuje specifične DNK sekvence i stimuliše transkripciju ciljnih gena (Halazonetis i Kandil, 1993; Thut i sar., 1995).

Kod ljudi je opisano postojanje deset različitih izoformi p53 proteina. Sve izoforme poseduju identičan DNK-vezujuć i domen, a razlike postoje u N- i/ili C-terminalnim domenima. Izoforma p44, molekulske mase 44 kDa, kojoj nedostaje N-terminalni transaktivacioni domen, interferira sa p53 proteinom pošto ima sposobnost da kompetitivno „istisne“ p53 sa promotora ciljnih gena (Marcel i Hainaut, 2009).

Jedna od najznačajnijih uloga p53 proteina je kontrola ćelijskog rasta, koja se odvija transaktivacijom WAF1/CIP1 gena, koji kodira p21 protein. Protein p21 inhibira kinaznu aktivnost Cdk-2-Ciklin kompleksa, odgovornog za prelazak iz G1 u S fazu ćelijskog ciklusa (el-Deiry i sar., 1993). Zastoj na G1-S prelazu ćelijskog ciklusa služi za proveru i popravku DNK oštećenja pre replikacije. Vreme obezbeđeno zastojem ćelijskog ciklusa, p53 koristi za vezivanje za DNK, pri čemu se aktiviraju reparacioni mehanizmi i sprečava nasleđe genetičkih mutacija u novonastalim ćelijama. Ukoliko su oštećenja DNK takva da reparacioni mehanizmi ne mogu da ostvare svoju funkciju, povećan nivo p53 proteina može usmeriti ćeliju ka apoptozi. Regulacija apoptoze zavisi od proteina p53, a sastoji se u

uravnotežavanju nivoa Bcl-2 i Bax proteina (Haupt i sar., 1996). Protein p53 aktivira transkripciju Bax gena, čiji povećan nivo ekspresije indukuje ćelijsku smrt. Istovremeno, p53 protein inhibira ekspresiju Bcl-2 gena. Promena odnosa Bcl-2/Bax proteina dovodi do programirane ćelijske smrti (Haupt i sar., 1995).

1.3.6.2. Uticaj p53 na transkripciju

Regulaciju transkripcije p53 protein ostvaruje vezivanjem za element koji se naziva p53RE (eng. *p53 response-element*), koji predstavlja palindromsku sekvencu 5'-PuPuPuC(A/T)(T/A)GPiPiPi-3' (Pu je purin; Pi je pirimidin) (Hoh i sar., 2002). Protein p53 može imati i pozitivan i negativan efekat na transkripciju.

Modifikacija histona i promene u strukturi hromatina su jedan od mehanizama za aktivaciju transkripcije p53 ciljnih gena (Laptenko i Prives, 2006). Vezivanjem za p53RE sekvence u okviru promotora, p53 stabilizuje otvorenu strukturu hromatina interakcijom sa faktorima koji modifikuju hromatin, kao što je p300 HAT i metiltransferaze PRMT1 i CARM1 (Espinosa i Emerson, 2001; Barlev i sar., 2001; Hsu i sar., 2004; An i sar., 2004). Takođe, direktnim interakcijama sa komponentama medijatorskog kompleksa i opštim transkripcionim faktorima kao što su TFIIA i TFIID, p53 doprinosi formiranju preinicijacionog kompleksa, čime stimuliše transkripciju ciljnih gena (Xing i sar., 2001; Zhang i sar., 2005).

Protein p53 učestvuje u inhibiciji transkripcije ciljnog gena na više različitih načina. Naime, p53 može inhibirati transkripciju interferencijom sa transkripcionim aktivatorom, pri čemu fizička interakcija dva proteina uzrokuje inaktivaciju transkripcionog aktivatora, čime se onemogućuje transkripcija (Gu i sar., 2004; Zhu i sar., 2005). Kompeticijom za preklapajuće vezivno mesto, p53 onemogućuje aktivatoru da veže regulatornu sekvencu, što rezultira represijom transkripcije (Li i sar., 2001; St Clair i sar., 2004). Ranije je spomenuto da p53 ima sposobnost da interaguje sa članovima transkripcione mašinerije preko N-terminalnog domena. Ovim interakcijama može se sprečiti formiranje preinicijacionog kompleksa, neophodnog za inicijaciju transkripcije (Ko i Prives, 1996). Interakcija p53 proteina sa proteinima koji modifikuju strukturu hromatina, kao što su

histon deacetilaze (HDAC), ima za posledicu nastanak „zatvorene“ strukture hromatina, čime promotor postaje nedostupan transkripcionoj mašineriji (Murphy i sar., 1999; Ho i sar., 2005). Johnson i sar. (2001) su uočili postojanje specifičnih inhibitornih p53RE sekvenci, čijim vezivanjem p53 inhibira transkripciju.

Aktivaciono dejstvo p53 proteina ispoljava se na sledećoj grupi gena: GADD 45, Hdm2 (Mdm 2), p21 WAF 1, cyclin 6, Bax, Fas, TGF, IGF-binding protein 3, dok su IL-6, Rb, MDR 1, Topoisomeraza II α , c-fos, Bcl-2 transkripciono inhibirani (Weintraub i sar., 1991, Wu i sar., 1993, el-Deiry i sar, 1993, Johnson i sar., 2001). Sam p53 protein inhibira transkripciju sopstvenog gena (Deffie i sar., 1993, Batemann, 1998). Među genima koji se nalaze pod negativnom transkripcionom regulacijom p53 proteina su i hemokin CXCL12 i njegov receptor CXCR4. Inhibicija transkripcije CXCL12 gena je pokazana u fibroblastima, dok je negativan efekat p53 na CXCR4 ekspresiju uočen u ćelijama tumora dojke (Moskovits i sar., 2006; Mehta i sar., 2007).

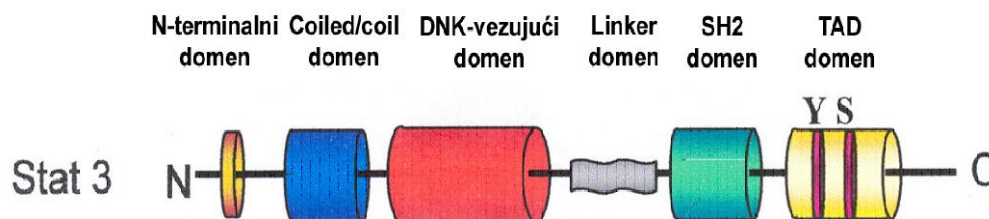
1.3.7. STAT3

STAT3 je transkripcioni faktor, molekulske mase 91 kDa, koji se aktivira u odgovoru na citokine i faktore rasta (Darnell i sar., 1994; Fu i sar., 1999). Svoju funkciju ostvaruje aktivacijom transkripcije gena, čiji produkti imaju ulogu u napredovanju ćelijskog ciklusa i sprečavanju apoptoze (Karni i sar., 1999; Barre i sar., 2003).

1.3.7.1. Struktura i funkcija STAT3

STAT3 pripada STAT familiji transkripcionih faktora. Sam naziv STAT (eng. *Signal Transducers and Activators of Transcription*) označava dvostruku funkciju proteina: prenos hormonskih signala sa površine ćelije do jedra i aktivaciju transkripcije ciljnih gena u jedru. STAT3 se sastoji od 770 amino kiselina i poseduje šest strukturno i funkcionalno očuvanih domena, karakterističnih za STAT familiju proteina: N-terminalni domen za oligomerizaciju, domen zavojnice, DNK-vezujući domen, linker domen, SH2 i C-terminalni domen (Slika 1.12). Preko N-terminalnog domena odvijaju se međuproteinske

interakcije i dimer-dimer interakcije putem kojih se formiraju tetrameri STAT molekula (Darnell, 1997). U blizini N-terminalnog oligomerizacionog domena nalazi se domen označen kao zavojnica koja se sastoji od četiri α -zavojnice (eng. *coiled-coil*). Ovaj domen formira veliku hidrofilnu površinu koja omogućuje interakcije sa drugim proteinima koji poseduju iste zavijene strukture (Collum i sar., 2000; Kisseleva i sar., 2002). U okviru regiona zavojnice nalazi se NLS sekvenca. DNK-vezujući domen ima strukturu β -ploča povezanih sa nestrukturalnim petljama (Chen i sar., 1998). Ovaj domen određuje specifičnost STAT proteina prema DNK sekvencama. Broj direktnih mesta preko kojih aminokiselinski ostaci ostvaruju kontakt sa DNK je mali zbog čega je za efektivnu transkripcionu aktivnost važno kooperativno vezivanje STAT proteina za DNK (McBride i sar., 2000). DNK-vezujući domen, takođe, sadrži NLS signal. SH2 domen ima sposobnost da prepozna fosfotirozinske motive i ima važnu ulogu u prenosu signala u tri važna koraka: usmeravanje STAT proteina ka receptorima prepoznavanjem specifičnih fosfotirozinskih motiva na njima; asocijacija sa aktiviranim JAK enzimima (Gupta i sar., 1996; Barahmand-Pour i sar., 1998); STAT homo- ili heterodimerizacija kojom se uspostavlja interakcija između SH2 domena jednog STAT monomera i fosfotirozinskog ostatka drugog STAT monomera (Shuai i sar., 1994; Gupta i sar., 1996). C-terminalni region sadrži transaktivirajući domen koji je odgovoran za interakciju sa transkripcionim kompleksom.



Slika 1.12. Shematski prikaz linearne strukture STAT3 (Preuzeto od Bowman i sar., 2000).

U okviru ovog domena se nalaze dva glavna mesta fosforilacije STAT3 proteina: tirozin na poziciji 705 (Tyr705) i serin na poziciji 727 (Ser727). Kao što je već spomenuto

dimerizacija STAT3 proteina odigrava se preko pTyr705-SH2 interakcije. Fosforilacijom Ser727 pojačava se transaktivaciona sposobnost STAT3 (Wen i sar., 1995).

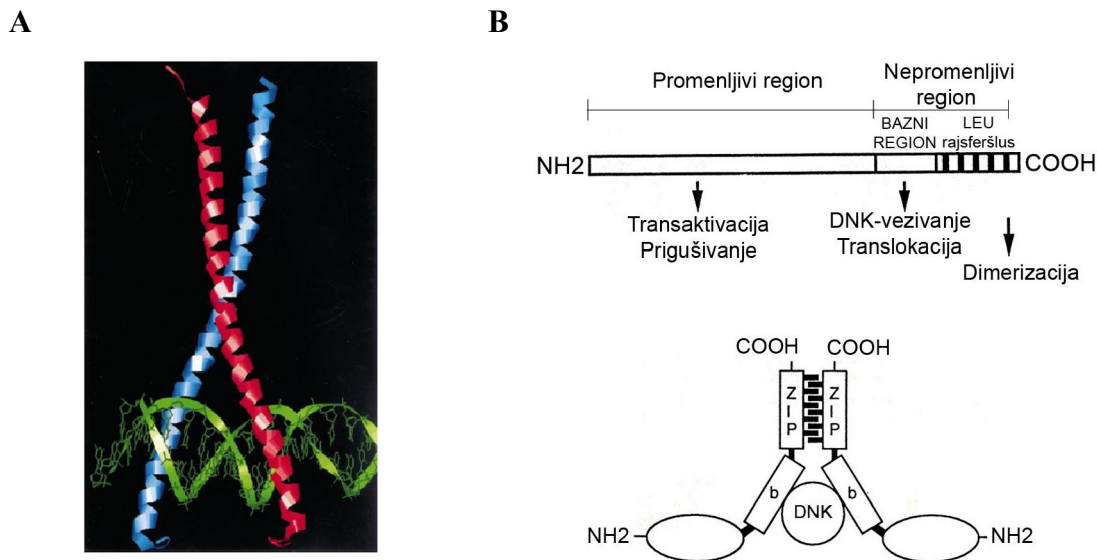
STAT3 je prvobitno otkriven i okarakterisan kao faktor koji se aktivira u odgovoru na IL-6 i koji indukuje transkripciju gena koji se nalaze pod kontrolom IL-6 citokina (Akira i sar., 1994; Minami i sar., 1996). Kasnije je utvrđeno da i drugi citokini i faktori rasta aktiviraju STAT3 (Runge i sar., 1998). Nakon aktivacije STAT3 indukuje transkripciju gena uključenih u procese proliferacije, diferencijacije, razvića i preživljavanja (Ihle, 1995; Bromberg i sar., 1996; Akira, 2000). STAT3 je neophodan regulator ranog embrionalnog razvića jer miševi kod kojih je uklonjen STAT3 gen umiru oko sedmog dana embrionalnog razvića (Takeda i sar., 1997).

1.3.7.2. Uticaj STAT3 na transkripciju

U nestimulisanim ćelijama STAT3 se nalazi u citoplazmi u latentnoj, neaktivnoj formi. Nakon stimulacije ekstraćelijskim ligandom, JAK kinaze (eng. *Janus-activated kinases*) fosforilišu kritični tirozin (Tyr705) na C-terminalnom domenu, čime se aktivira STAT3, što rezultira njegovom homo- i heterodimerizacijom i premeštanjem formiranih dimera u jedro gde se vezuju za regulatorne elemente gena u okviru HRE (eng. *Hormone Responsive Element*) i indukuju gensku transkripciju (Darnell, 1997). U okviru HRE elemenata STAT3 vezuje konsenzus sekvencu 5'-TTCCNGGAA-3' (Decker i Kovarik, 1999). Aktivaciju transkripcije ciljnih gena STAT3 ostvaruje interakcijom sa koaktivatorima koji imaju aktivnost HAT, kao što su CBP/p300 i NcoA/SRC1a. Nakon stimulacije ćelija IL-6, na promotoru ciljnih gena, CBP/p300 i NcoA/SRC1a interaguju sa C-terminalnim transaktivacionim domenom STAT3, čime se stabilizuje otvorena struktura hromatina i omogućuje transkripcija (Giraud i sar., 2002). Aktivaciono dejstvo STAT3 transkripcionog faktora ispoljava se na sledećoj grupi gena: c-myc, Ciklin D1, Bcl-2, Bcl-xL i β 2-makroglobulin (Bromberg i sar., 1999; Kiuchi i sar., 1999; Zhang i Darnell, 2001; Yoo i sar., 2001). Takođe je pokazano da STAT3 aktivira transkripciju CXCL12 gena u glatkim mišićnim ćelijama krvnih sudova (Olive i sar., 2008).

1.3.8. C/EBP α i C/EBP β

C/EBP familiju transkripcionih faktora čine proteini koji se vezuju za CCAAT/pojačivački element gena (eng. *CCAAT/Enhancer Binding Proteins*). C/EBP proteini pripadaju superfamiliji transkripcionih faktora koja sadrži domen baznog leucinskog zatvarača (eng. *basic Leucine Zipper Domain*, **bZIP domain**) i predstavlja najveću i najočuvaniju grupu eukariotskih transkripcionih faktora (Takiguchi, 1998; Niu i sar., 1999). Transkripcioni faktori iz C/EBP familije se sastoje iz N-terminalnog transaktivacionog regiona i bipartitnog DNK-vezujućeg domena, označenog kao bZIP (Slika 1.13B). N-terminalni region se razlikuje između članova C/EBP familije i sadrži domene koji deluju kao aktivatori ili inhibitori transkripcije (Williams i sar., 1995). Domen bZIP se sastoji iz dva dela: baznog regiona, koji ostvaruje interakciju sa DNK i regiona leucinskog zatvarača, koji predstavlja dimerizacioni region odgovoran za homo- i heterodimerizaciju C/EBP proteina.

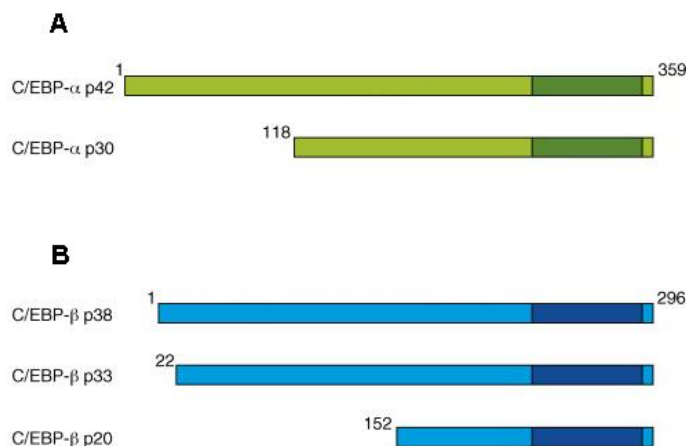


Slika 1.13. Model strukture C/EBP proteina. (A) Slika strukture bZIP regiona homodimera C/EBP β vezanog za DNK iz proteinske baze podataka (Preuzeto od Ramji i Foka, 2002); (B) Shematski prikaz linearne strukture bZIP proteina i dimera vezanog za DNK (Preuzeto od Wedel i Ziegler-Heitbrock, 1995).

Zbog visokog stepena strukturne i funkcionalne homologije baznog regiona, C/EBP α i C/EBP β vezuju identične DNK sekvence (Ramji i Foka, 2002). Dimerizacioni region predstavlja α -zavojnica u kojoj je svaka sedma amino kiselina leucin. Homo- i heterodimerizacija C/EBP proteina se odvija interakcijom α -zavojnica monomera. Dimerizacija proteina je preduslov za vezivanje DNK, pošto je u formi dimera, baznim regionima proteina omogućeno da ostvare specifičan kontakt sa DNK *cis*-regulatornim elementima (Slika 1.13) (Lamb i McKnight, 1991). Prethodno je spomenuto da C/EBP α i C/EBP β prepoznaju identične DNK motive u okviru pojačivača i promotora različitih gena, tako da je određena optimalna konsenzus palindromska sekvenca 5'-ATTGCGCAAT-3' za vezivanje ovih genskih regulatornih proteina za DNK (Osada i sar., 1997).

1.3.8.1. C/EBP α

C/EBP α se javlja u vidu dve izoforme: od 42 kDa (p42) i 30 kDa (p30), koje nastaju alternativnom translacijom tj. alternativnim korišćenjem različitih AUG inicijacionih kodona (Calkhoven i sar., 2000). Izoforma p42 se sastoji od 359 amino kiselina, a izoforma p30, kojoj nedostaje deo N-terminalnog transaktivacionog domena, od 241 amino kiseline (Slika 1.14A) (Nerlov, 2007).



Slika 1.14. Shematski prikaz linearnih struktura C/EBP α i C/EBP β izoformi (Preuzeto od Nerlov, 2007).

Pokazano je da p42 ima veću transkripcionu aktivnost u poređenju sa kraćom, p30 izoformom (Descombes i Schibler, 1991; Lin i sar., 1993). Studije na miševima kod kojih je uklonjen gen za C/EBP α (C/EBP α -/-) pokazale su da ovaj protein ima kritičnu ulogu u uspostavljanju i održavanju energetske homeostaze ćelije. Većina (C/EBP α -/-) miševa umire u prvim satima nakon rođenja usled hipoglikemije. Pokazano je da C/EBP α reguliše transkripciju gena za glikogen sintetazu, enzim neophodan za sintezu glikogena. Takođe, C/EBP α transaktivira i promotore gena, čiji su produkti enzimi uključeni u proces glukoneogeneze u jetri, fosfoenolpiruvat karboksikinazu (PEPCK) i glukozo-6-fosfatazu (G6Paza) (Darlington i sar., 1995, Flodby i sar., 1996).

Smatra se da je C/EBP α ključni faktor koji reguliše diferencijaciju različitih tipova ćelija, među kojima su adipociti, hepatociti i hematopoetske ćelije. Svoju ulogu u diferencijaciji C/EBP α , sa jedne strane ostvaruje interakcijom sa tkivno specifičnim transkripcionim faktorima, indukujući time ekspresiju tkivno specifičnih gena, a sa druge strane inhibicijom ćelijske proliferacije (Nerlov, 2007). Jedan od mehanizama inhibicije proliferacije je direktna interakcija C/EBP α sa Cdk 2 i 4, koje predstavljaju ključne regulatore napretka ćelijskog ciklusa. Interakcijom sa C/EBP α sprečava se interakcija Cdk 2 i 4 sa ciklinima, čime je onemogućeno napredovanje ćelijskog ciklusa (Wang i sar., 2001). Pored toga, pokazano je da C/EBP α interferira sa E2F kompleksom i time sprečava transkripciju gena odgovornih za ulazak ćelije u S fazu ćelijskog ciklusa. E2F aktivira transkripciju gena, čiji su proteinski produkti neophodni za prelazak iz G1 u S fazu ćelijskog ciklusa (Johnson, 2005). Na transkripcionom nivou C/EBP α sprečava proliferaciju, tako što aktivira transkripciju WAF1/CIP1 gena koji kodira p21 protein (Firestone i sar., 2001). Ranije je spomenuto da p21 inhibira kinaznu aktivnost Cdk-2-Ciklin kompleksa, koji je odgovoran za prelazak u S fazu ćelijskog ciklusa (el-Deiry i sar., 1993).

1.3.8.2. C/EBP β

Alternativnim procesom translacije sa različitih AUG kodona, nastaju tri izoforme C/EBP β proteina: izoforma molekulske mase od 38 kDa (p38), označava se još i LAP* (eng. *Liver Activating Protein**), izoforma od 33 kDa (p33), naziva se LAP i izoforma od 20 kDa (p20), označava se još i LIP (eng. *Liver Inhibitory Protein*) (Slika 1.14B). Izoforma p38 se sastoji od 296 amino kiselina, a preostale dve izoforme kojima nedostaje deo N-terminalnog transaktivacionog domena sastoji se od 274 (p33) i 144 (p20) amino kiselina (Nerlov, 2007). LIP izoforma funkcioniše kao dominantan inhibitor pošto sa drugim C/EBP faktorima formira nefunkcionalne heterodimere (Descombes i Schibler, 1991).

Uprkos činjenici da je u pojedinim tkivima zabeležena konstitutivna ekspresija C/EBP β , inflamatorni stimuli, kao što su citokini IL-1 β i IL-6 imaju sposobnost da indukuju ekspresiju C/EBP β gena (Descombes i sar., 1990). C/EBP β je uključen u transkripcionu regulaciju gena koji kodiraju: citokine (IL-6, IL-4, IL-5, TNF- α) (Natsuka i sar., 1992; Davydov i sar., 1995; van Dijk i sar., 1999; Greenwel i sar., 2000), akutno fazne proteine (serum amyloid A, serum amiloid P i α 1-kiseli glikoprotein) (Poli, 1998), antiapoptotske proteine (Bcl-2) (Heckman, i sar., 2003), proteine koji svoju ulogu ostvaruju u nervnom sistemu (supstanca P, neurokinin A, holin acetiltransferaza) (Robert i sar., 2002; Kovacs i sar., 2006). Pored toga, C/EBP β zajedno sa C/EBP α učestvuje u adipogenezi i hematopoezi, indukcijom transkripcije tkivno specifičnih gena (Calkhoven i sar., 2000; Choy i Derynck, 2003). Calonge i sar. (2009) su pokazali da, uprkos činjenici da je C/EBP β neophodan za bazalnu transkripciju CXCL12 gena u astrocitima i ćelijama strome, C/EBP β snažno indukuje aktivnost CXCL12 promotora nakon stimulacije ćelija IL-1 β i IL-6, kao i u uslovima ćelijske konfluentnosti. Takođe, u ćelijama promijelocitne leukemije C/EBP β učestvuje u bazalnoj transkripciji CXCL12 gena i u indukciji CXCL12 ekspresije, posle tretmana ćelija sa ATRA (eng. *all-trans-retinoic acid*) (Kim i sar., 2007).

Transaktivaciona aktivnost C/EBP β regulisana je na više nivoa. Da li će C/EBP β imati aktivaciono ili inhibitorno dejstvo na gensku transkripciju, zavisi prevashodno od odnosa LAP i LIP izoformi (Calkhoven i sar., 2002; Nerlov, 2007). Takođe, fosforilacija

igra važnu ulogu u modulaciji aktivnosti i funkcije C/EBP β proteina. Fosforilacijom treonina Thr235 od strane MAP kinaze (mitogen-aktivirane protein kinaze) i serina Ser105 od strane protein kinaze C i p38 kinaze indukuje se transaktivirajući potencijal C/EBP β proteina (Engelman i sar., 1998; Zhu i sar., 2002). Sa druge strane, Akt kinaza, suprimira transaktivacionu sposobnost C/EBP β fosforilacijom N-terminalnog regiona (Guo i sar., 2001).

2. HIPOTEZA I CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Budući da je gubitak beta ćelija prisutan u oba tipa dijabetesa, neophodno je pronaći načine za očuvanje funkcionalnih beta ćelija. Identifikacija gena, čiji su proteinski produkti ključni za normalno funkcionisanje i preživljavanje beta ćelija, kao i rasvetljavanje molekularnih mehanizama regulacije njihove genske ekspresije mogu doprineti razvoju novih strategija za prevenciju i lečenje dijabetesa. To znači da bi se identifikacijom, a potom i ciljanom indukcijom ili supresijom transkripcionih faktora koji regulišu transkripciju gena koji omogućuju funkcionisanje beta ćelija, mogli unaprediti terapijski pristupi za lečenje dijabetesa. Jedan od primera ciljane genske indukcije u terapiji dijabetesa je transkripcioni faktor Pdx-1, čija pojačana ekspresija nakon primene terapijika omogućuje očuvanje funkcionalnih beta ćelija kod pacijenata obolelih od dijabetesa (Stoffers i sar., 2000). Hemokin CXCL12 je faktor koji na više načina doprinosi očuvanju funkcionalnih beta ćelija. U odgovoru na povredu beta ćelije CXCL12 sa jedne strane pospešuje preživljavanje beta ćelija (Yano i sar., 2007; Liu i sar., 2011), dok se druge strane učestvuje u transdiferencijaciji alfa u beta ćelije (Habener i Stanojevic, 2012a). Ono što čini CXCL12 posebno zanimljivim kandidatom za terapijskog agensa u lečenju dijabetesa je mogućnost njegove indukcije u odgovoru na povredu beta ćelije (Liu i sar., 2011), što ga čini urođenim odbrambenim proteinom. Uprkos činjenici da CXCL12 predstavlja obećavajući terapijski agens za tretman dijabetesa, molekularni mehanizmi regulacije njegove ekspresije u beta ćelijama su potpuno nepoznati. Rasvetljavanjem molekularnih mehanizama transkripcione regulacije *Cxcl12* u beta ćelijama, mogle bi se unaprediti strategije za tretman dijabetesa. Od posebnog je interesa razjasniti mehanizme regulacije ekspresije *Cxcl12* nakon primene dijabetogenog agensa na beta ćelije. Shodno tome, postavljeni su sledeći ciljevi doktorske teze:

- 1 **Ispitati protektivno dejstvo CXCL12 na beta ćelije.** Pomoću eseja za ispitivanje ćelijske vijabilosti i procenu DNK oštećenja utvrdilo bi se da li CXCL12 utiče na

očuvanje DNK integriteta i preživljavanje beta ćelija u uslovima oksidativnog stresa izazvanog dijabetogenim stimulusom.

2. **Ispitati molekularne mehanizme transkripcione regulacije gena za CXCL12 u beta ćelijama u fiziološkim uslovima.** Pomoću kompjuterskih predikcija mapirali bi se promotor i RAM elementi u uzvodnom 5' regionu CXCL12 gena (*Cxcl12*) pacova. *In vitro* i *in vivo* tehnikama identifikovali bi se transkripcioni faktori sa afinitetom za vezivanje promotora *Cxcl12*. Na osnovu afiniteta za vezivanje promotora izvršio bi se odabir transkripcionih faktora čija bi se uloga u transkripcionoj regulaciji CXCL12 gena u beta ćelijama detaljnije ispitala. Analizom međuproteinskih interakcija između identifikovanih transkripcionih regulatora CXCL12 gena, ispitalo bi se da li nukleoproteinski kompleksi regulišu ekspresiju *Cxcl12*. Ukoliko se detektuje prisustvo RAM elemenata u 5' regionu *Cxcl12*, izučavale bi se interakcije između RAM-vezujućih proteina i detektovanih RAM elemenata.
3. **Analiza transkripcije *Cxcl12* u uslovima oksidativnog stresa izazvanog dijabetogenim stimulusom.** Korišćenjem *in vivo* tehnike hromatinske imunoprecipitacije ispitala bi se transkripciona regulacija *Cxcl12* nakon tretmana beta ćelija dijabetogenim agensom tj. u uslovima oksidativnog stresa.
4. **Ispitati uticaj CXCL12 na ekspresiju transkripcionih faktora koji učestvuju u regulaciji njegove transkripcije.** Pomoću imunoblot analize utvrdilo bi se da li hronično prisustvo pojačano eksprimiranog CXCL12 utiče na ekspresiju transkripcionih faktora za koje je pokazano da su uključeni u regulaciju njegove ekspresije.

Na osnovu rezultata dobijenih u doktorskoj tezi pokušaće da se postave hipotetički modeli koji bi rasvetlili molekularne mehanizme transkripcione regulacije gena za CXCL12 u bazalnim i u uslovima oksidativnog stresa izazvanog dijabetogenim stimulusom.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. ĆELIJSKA KULTURA

Ćelijska linija, insulinoma beta ćelija pacova (*Ratus norvegicus*), Rin-5F (wt) (ATCC-CRL-2058) kao i Rin-5F klon ćelije koje poseduju stabilno integrisan gen za humani CXCL12 (#1), (dobijen ljubaznošću dr Ludwig-a Wagner-a, Odeljenje interne medicine III, Medicinski univerzitet u Beču, Austrija) gajene su u RPMI medijumu (Roswell Park Memorial Institute medium, PAA Laboratories GmbH), u koji je dodat 10% fetalni goveđi serum (eng. *fetal bovine serum*, **FBS**) i antibiotici (50 units/ml penicilina i 50 µg/ml streptomicina).

Mišja (*Mus musculus*) tumorska linija fibroblasta NIH3T3 (ATCC-CRL-1658) i NIH3T3 sa utišanim genom za PARP-1 (PARP-1^{-/-} ćelije) (dobijene ljubaznošću dr Valérie Schreiber, Département Intégrité du Génome UMR7175-LC1 CNRS, Strasbourg, Francuska), gajene su u modifikovanom Dubelko medijumu (Dubelco's Modified Eagle Medium-DMEM, PAA Laboratories GmbH) u koji je dodat 10% FBS i antibiotici (50 units/ml penicilina i 50 µg/ml streptomicina).

Sve ćelijske linije gajene su na temperaturi od 37°C u atmosferi od 5% CO₂. Kada su ćelije dostigle stanje potpune konfluentnosti, tripsinizovane su i kultivisane ponovo.

3.2. TEST VIJABILNOSTI ĆELIJA

Vijabilnost Rin-5F (wt i #1) ćelija ispitana je 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolium bromid (MTT) esejom. Rin-5F ćelije sejane su u sterilne ploče sa 96 bunarića ravnog dna, i po dostizanju 70% konfluentnosti tretirane su sa rastućim koncentracijama STZ-a (0,1-15 mM), 24 h na 37°C. U određenim eksperimentima Rin-5F wt ćelije su pretretirane rastućim koncentracijama 3AB-a (0,2-50 µM) 30 min, nakon čega je sledio tretman sa 5 mM STZ-om u naredna 24 h. Nakon uklanjanja medijuma, u svaki bunarić dodato je 200 µl MTT-a (Sigma, M5655), koncentracije 0,5 mg/ml rastvorenog u RPMI medijumu. Ćelije su inkubirane 2 h na 37°C u mraku. Po isteku inkubacije MTT medijum

je odliven, a u svaki bunarić sa ćelijama naliveno je 100 µl dimetil sulfoksida (DMSO) u cilju rastvaranja nastalih kristala formazana. Apsorbanca je izmerena na 570 nm. Vijabilnost ćelija je izražena u procentima, nakon poređenja sa kontrolnim ćelijama za koje se smatra da su 100% vijabilne.

3.3. TEHNIKE ZA MANIPULACIJU PROTEINSKIM UZORCIMA

3.3.1. IZOLACIJA ĆELIJSKOG LIZATA

Ćelijski lizat izolovan je sa ProteoJET Mammalian Cell Lysis Reagent-om (Fermentas), po preporuci proizvođača. Rin-5F ćelije sejane su u sterilne ploče sa 6 bunarića ravnog dna, i po dostizanju 80% konfluentnosti pokupljene su u 1 ml PBS pufera (20 mM Na₂HPO₄, 10 mM KCl, 70 mM KH₂PO₄, 340 mM NaCl, pH 7,4). Ćelije su prebačene u novu ependorf epruvetu i centrifugirane na 250 x g, 5 min. Po završetku centrifugiranja, supernatant je odstranjen, a talog ćelija resuspendovan je u 20 zapremina ProteoJET Mammalian Cell Lysis Reagent-a. Uzorci su inkubirani 10 min na rotirajućoj platformi na sobnoj temperaturi. Ćelijski lizati su prečišćeni centrifugiranjem uzoraka na 16.000 x g, 15 min. Supernatant, koji sadrži ćelijski lizat prebačen je u novu ependorf epruvetu, alikvotiran i čuvan na -80°C.

3.3.2. IZOLACIJA JEDARNIH I CITOSOLNIH PROTEINA

Izolacija jedarnih i citosolnih proteina izvršena je sa ProteoJET Cytoplasmic and Nuclear Protein Extraction Kit-om (Fermentas) po uputstvu proizvođača. Alikvot od 3 x 10⁷ Rin-5F ćelija je ispran sa PBS-om, centrifugiranjem na 250 x g, 5 min na sobnoj temperaturi. Talog ćelija je resuspendovan u 1 ml hladnog pufera za lizu (Cell lysis buffer) u koji je dodat koktel proteaznih inhibitora Miks G (Serva) (1X) i DTT (1 mM). Nakon toga ćelije su inkubirane 10 min na ledu, uz povremeno mućkanje. Ćelije su zatim centrifugirane 7 min na 500 x g na 4°C, da bi se razdvojila citosolna od jedarne proteinske frakcije. Nakon centrifugiranja supernatant, koji sadrži citosolne proteine, je pažljivo

odliven u novu ependorf epruvetu, a zatim je ponovljeno centrifugiranje citosolnih proteina 15 min na 20.000 x g na 4°C zarad odstranjivanja moguće kontaminacije proteinima iz taloga. Supernatant, koji predstavlja citosolne proteine, prebačen je u novu ependorf epruvetu i čuvan je na -80°C. Jedarni talog je ispran dva puta sa 500 µl hladnog pufera za ispiranje jedara (Nuclei washing buffer) u koji je dodat koktel proteaznih inhibitora Miks G (Serva) (1X) i DTT (3 mM). Zatim su jedra centrifugirana 7 min na 500 x g na 4°C i supernatant je pažljivo odliven. Jedarni talog je resuspendovan u 150 µl hladanog pufera za čuvanje jedara (Nuclei storage buffer) u koji je dodat koktel proteaznih inhibitora Miks G (Serva) (1X) i DTT (5 mM). U jedarnu suspenziju dodato je 15 µl hladnog reagensa za liziranje jedara (Nuclei lysis reagent) i jedra su inkubirana 15 min na ledu, uz povremeno mućkanje. Zatim su jedra centrifugirana 5 min na 20.000 x g, na 4°C. Supernatant, koji sadrži lizat jedarnih proteina, prebačen je u novu ependorf epruvetu, alikvotiran i čuvan na -80°C.

3.3.3. TALOŽENJE PROTEINA TRIHLORSIRĆETNOM KISELINOM

U cilju detekcije prisustva CXCL12 proteina koji izlučuju wt i #1 ćelije, istaloženi su proteini iz medijuma u kome su gajene ćelije. Rin-5F ćelije (wt i #1) sejane su u sterilne ploče sa 6 bunarića ravnog dna. Po dostizanju 70% konfluentnosti uklonjen im je kompletan medijum i zamenjen sa RPMI koji nije sadržao FBS. Ćelije su inkubirane u ovom medijumu preko noći na 37°C. Sutradan, pokupljen je ćelijski supernatant koji je inkubiran sa 13% trihlorsirćetnom kiselinom (eng. *trichloroacetic acid*, TCA), 1 h na 4°C. Zatim su uzorci centrifugirani na 16.000 x g, 5 min na 4°C. Talog je ispran u 70% etanolu, a potom ponovo centrifugiran na 16.000 x g, 5 min na 4°C. Nakon centrifugiranja, etanol je uklonjen, a dobijeni talog proteina rastvoren u je Laemmli puferu.

3.3.4. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE PROTEINA

Koncentracije proteina određene su metodom Lowry-ja i sar. (1951). Uzorak proteina zapremine 5 µl razblažen je vodom do finalne zapremine od 200 µl i pomešan sa 1

ml sveže pripremljenog rastvora koji se dobija mešanjem 1 ml 1% CuSO₄, 1 ml 2% K-Na-tartarata i 49 ml 4% Na₂CO₃ i 49 ml 0,2 N NaOH. Smeša je promešana i inkubirana 10 min na sobnoj temperaturi posle čega je uzorcima dodato 100 µl Folinovog reagensa razblaženog u odnosu 1:1 (v/v) sa vodom. Posle 10 min inkubacije na sobnoj temperaturi, merena je apsorbanca uzoraka na 750 nm. Koncentracije proteina su očitavane sa standardne prave (A₇₅₀) u funkciji koncentracije proteina, dobijene određivanjem apsorbanca standardnih koncentracija serumskog albumina goveda.

3.4. ELEKTROFORETSKE TEHNIKE ZA RAZDVAJANJE PROTEINA

3.4.1. ELEKTROFORETSKO RAZDVAJANJE PROTEINA POD DENATURISUĆIM USLOVIMA (GLICINSKA SDS-PAGE)

Za razdvajanje i karakterizaciju proteina prema molekulskim masama, korišćena je tehnika jednodimenzionalne elektroforeze u poliakrilamidnom gelu u prisustvu natrijum-dodecilsulfata i glicina (glicinska SDS-PAGE). Jednodimenzionalno razdvajanje proteina po molekulskim masama rađeno je po modifikovanoj metodi (Sambrook i sar., 1989), koju je postavio Laemmli 1970. godine.

Elektroforeza je rađena u Bio-Rad sistemu (Mini-PROTEAN II, Electrophoresis Cell. Cat. Num. 165-2940). Za elektroforetsko razdvajanje proteina korišćen je 12% poliakrilamidni gel u 0,375 M Tris-HCl, pH 8,8, 0,1% SDS, 0,05% amonijum-persulfat (AMPS) i 0,05% TEMED (tetrametilendiamin). Preko polimerizovanog gela nalivao se 4% gel za skoncentrisavanje uzorka koji je sadržao: 0,125 M Tris-HCl, pH 6,8, 0,1% SDS, 0,05% AMPS i 0,1% TEMED. Elektroadni pufer koji se naliva u rezervoare sadrži 0,192 M glicin, 25 mM Tris-HCl, pH 8,3, i 0,1% SDS (Laemmli, 1970). Proteini se rastvaraju u puferu za uzorke (2% SDS, 0,0625 M Tris-HCl, pH 6,8, 5% ME i 8,8% glicerol). U ovom puferu, proteini se denaturišu zagrevanjem u ključaloj vodi u trajanju od 4 min, a potom se centrifugiraju na 10.000 x g, 3 min. Pripremljeni uzorci proteina se ekvilibrišu na sobnoj temperaturi pre nanošenja na gel. Uzorci proteina putuju pod naponom od 0,12 kV u gelu za skoncentrisavanje, odnosno 0,15 kV kroz gel za razdvajanje u trajanju od jednog sata. Po

završetku elektroforeze gelovi su bojani Coomassie plavim ili su korišćeni za prenos elektroforetski razdvojenih proteina na membrane.

3.4.2. ELEKTROFORETSKO RAZDVAJANJE PROTEINA MALE MOLEKULSKE MASE POD DENATURISUĆIM USLOVIMA (TRICINSKA SDS-PAGE)

U cilju detekcije CXCL12 proteina, koji je male molekulske mase (12 kDa), proteini istaloženi iz supernatanta Rin-5F ćelija razdvojeni su na jednodimenzionalnoj elektroforezi u poliakrilamidnom gelu u prisustvu natrijum-dodecilsulfata i tricina (tricinska SDS-PAGE) po metodi Shagger i von Jagow (1987). Elektroforeza je rađena u Bio-Rad sistemu (Mini-PROTEAN II, Electrophoresis Cell. Cat. Num. 165-2940). Za elektroforetsko razdvajanje proteina korišćen je 10% poliakrilamidni gel u puferu za gel (3 M Tris, pH 8,45, 0,3% SDS), 16,67% glicerolu, 0,05% AMPS i 0,05% TEMED. Preko polimerizovanog gela nalivao se 4% gel za skoncentrisavanje uzorka koji je sadržao: pufer za gel (3 M Tris, pH 8,45, 0,3% SDS), 0,05% AMPS i 0,1% TEMED. Anodni pufer činio je 200 mM Tris, pH 8,9, dok se katodni pufer sastojao od 100 mM Tris, 100 mM Tricin i 0,1 % SDS. Proteini iz supernatanta ćelija, rastvoreni u Laemmli puferu, su nanešeni na gel i elektroforeza je putovala na 0,2 kV, 45 min na 4°C. Po završetku elektroforeze razdvojeni proteini su sa gela prenešeni na membranu.

3.5. PRENOS PROTEINA NA MEMBRANU

Proteini razdvojeni na jednodimenzionalnoj SDS-PAGE preneti su na odgovarajuće membrane pod uticajem električne struje po metodi Burnette-a (1981). Korišćene su PVDF membrane (polyvinylidene difluoride, Hybond-P, RPN303F, Amersham Pharmacia Biotech), koje su optimizirane za prenos proteina. Prenos je rađen u mini aparatu za transfer (Bio-Rad, Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell). Nakon elektroforeze gel i membrana su inkubirani 30 min u hladnom puferu za transfer (25 mM Tris-HCl, pH 8,3, 192 mM glicin, 20% metanol). Pod uticajem konstantne struje prenos je išao preko noći na 0,03 kV i 40 mA. Po završenom transferu membrana je bojena bojom Ponceau-S (1%

Ponceau-S u 5% sirćetnoj kiselini), a gel Coomassie-plavim radi provere ispravnosti toka transfera i elektroforeze. Membrane su dalje korišćene za imunoblot analizu.

3.6. IMUNOBLOT ANALIZA PROTEINA - WESTERN BLOT

Imunološka detekcija proteina rađena je po modifikovanoj metodi Towbin i sar. (1979). Proteini su razdvojeni na jednodimenzionalnoj SDS-poliakrilamidnoj gel elektroforezi i prenešeni na PVDF membrane. Membrane su zatim isprane 2 do 3 puta u trajanju od 10 min, u 0,2 % rastvoru Tween 20 u TBS puferu (20 mM Tris-HCl (pH 7,6), 150 mM NaCl) skraćeno TBS-T. Nakon ispiranja, proteini na membrani su blokirani inkubiranjem membrane u 5% nemasnom mleku rastvorenom u TBS-T puferu, 1 h, na sobnoj temperaturi uz lagano mućkanje. Filteri su zatim isprani sa dve brze izmene pufera i tri puta po 5 min u TBS-T puferu. Membrane su potom inkubirane sa primarnim antitelom razblaženim u odgovarajućem odnosu sa 3% mlekom u TBS-T puferu, 2 h na sobnoj temperaturi uz lagano mućkanje. Po završenoj inkubaciji, membrane su isprane sa dve brze izmene pufera i 5 puta po 5 min u TBS-T puferu. Filteri su zatim inkubirani sa sekundarnim antitelom koje je konjugovano peroksidazom (HRP) u odgovarajućem razblaženju, u rastvoru 3% mleka u TBS-T, 1 h na sobnoj temperaturi uz lagano mućkanje. Nevezana sekundarna antitela su potom odstranjena ispiranjem, nekoliko puta po 5 min u rastvoru TBS-T. Nakon toga, rađena je vizuelizacija nagrađenih kompleksa antigen-antitelo bojenjem membrane luminol reagensom (Western Blotting Chemiluminescence Luminol Reagent, Solution A and Solution B, Santa Cruz Biotechnology, sc-2048) i stavljanjem pod filmove (Hyperfilm ECL, Santa Cruz Biotechnology, RPN3103K) prema uputstvima proizvođača.

Kvantifikacija proteina je urađena u programu TotalLab (Phoretix) v1.1 i izražena je u relativnim jedinicama.

U eksperimentima su korišćena sledeća primarna antitela: poliklonalno anti-PARP-1 antitelo (Santa Cruz, H-250) u razblaženju 1:1000, poliklonalno anti-YY1 antitelo (Santa Cruz, H-414) u razblaženju 1:250, poliklonalno anti-C/EBP β antitelo (Santa Cruz, C-19) u razblaženju 1:750, monoklonalno anti-Sp1 antitelo (Santa Cruz, E-3) u razblaženju 1:250,

poliklonalno anti-p53 antitelo (Santa Cruz, FL-393) u razblaženju 1:750, poliklonalno anti-STAT3 antitelo (Santa Cruz, H-190) u razblaženju 1:1000, poliklonalno anti-FKHRL1 antitelo (Santa Cruz, H-144) u razblaženju 1:250, poliklonalno anti-HMG-I/HMG-Y antitelo (Santa Cruz, FL-95) u razblaženju 1:250, poliklonalno anti-C/EBP α antitelo (Santa Cruz, 14AA) u razblaženju 1:500, poliklonalno anti-SDF-1 (Santa Cruz, FL-93) u razblaženju 1:250, poliklonalno anti-NF- κ B p65 antitelo (Santa Cruz, C-20) u razblaženju 1:750, poliklonalno anti-kaspaza 3 antitelo (Santa Cruz, H-277) u razblaženju 1:750, monoklonalno anti-PAR antitelo (ALEXIS, H10) u razblaženju 1:1600 i poliklonalno anti- β -aktin antitelo (Abcam, ab8227) u razblaženju 1:2000. Kao odgovarajuća sekundarna antitela korišćena su: za PARP-1, YY1, C/EBP β , p53, STAT3, FKHRL1, HMGI/Y, C/EBP α , kaspaza 3, NF- κ B p65 i β -aktin anti-zečje antitelo (Santa Cruz, sc-2004), a za Sp1 i PAR anti-mišje antitelo (Cell Signaling). Sva sekundarna antitela su korišćena u razblaženju 1:2000.

3.7. KO-IMUNOPRECIPITACIJA PROTEINA

3.7.1. PRIPREMA ĆELIJSKOG LIZATA

Alikvot od 10^7 Rin-5F wt ćelija ispran je sa 10 ml PBS-a i centrifugiran je 10 min na 400 x g na 4°C. Supernatant je odliven i ispiranje je ponovljeno dva puta. Talog ćelija je resuspendovan u 1 ml hladnog pufera za lizu (50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 150 mM NaCl, 0,1% Triton-X100) u koji je dodat 0,2 mM PMSF i koktel proteaznih inhibitora Miks G (Serva) (1X) i inkubiran 30 min na ledu, uz povremeno mućkanje. Lizirane ćelije su zatim centrifugirane 15 min na 10.000 x g na 4°C. Nakon centrifugiranja supernatant, koji predstavlja ćelijski lizat, prebačen je u novu ependorf epruvetu, alikvotiran i čuvan na -80°C.

3.7.2. *PRIPREMA ĆELIJSKOG LIZATA ZA IMUNOPRECIPITACIJU*

Priprema ćelijskog lizata za imunoprecipitaciju podrazumeva njegovo prečišćavanje pred inkubaciju sa primarnim antitelom od interesa. Sto mikrolitara agaroznih kuglica kuplovanih sa proteinom A/G (Santa Cruz, sc-2003) prebačeno je u ependorf epruvetu. Agarozne kuglice su resuspendovane u 450 µl ohlađenog pufera za lizu ćelija (50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 150 mM NaCl, 0,1% Triton-X100 u koji je dodat 0,2 mM PMSF). Posle mešanja uzorak je centrifugiran 1 min na 10.000 x g na 4°C. Ispiranje agaroznih kuglica je dva puta ponovljeno na isti način. Posle poslednjeg ispiranja na talog kuglica je dodato 50 µl hladnog pufera za lizu. Ovih 50 µl prečišćenih agaroznih kuglica prebačeno je u drugu ependorf epruvetu, u kojoj je bilo 500 µl lizata Rin-5F wt ćelija (Materijal i metode; 3.7.1). Lizat je inkubiran sa kuglicama 1 h na ledu. Nakon inkubacije kompletan sadržaj je centrifugiran na 10.000 x g, 10 min na 4°C. Dobijeni supernatant sa prečišćenim lizatom prebačen je u novu ependorf epruvetu.

3.7.3. *REAKCIJA IMUNOPRECIPITACIJE*

U 500 µl prečišćenog lizata Rin-5F wt ćelija dodato je 5 µl (1 µg) primarnog antitela na protein od interesa. Inkubacija sa antitelom je trajala 2 h na 4°C. Na kompletnu smesu posle inkubacije, dodato je 100 µl ispranih agaroznih kuglica koje su kuplovane sa proteinom A/G. Inkubacija je nastavljena 1 h na 4°C na rotirajućoj platformi. Nakon inkubacije uzorak je centrifugiran na 10.000 x g, 1 min na 4°C. Supernatant je pažljivo odličen, a talog kuglica ispiran 5 puta sa 500 µl ohlađenog pufera za lizu. Posle poslednjeg ispiranja supernatant je pažljivo odklonjen, a na talog smo dodali 50 µl pufera za elektroforezu. Talog je vorteksovan i zagrevan na 100°C, 10 min. Nakon zagrevanja uzorak je centrifugiran na 10.000 x g, 5 min i supernatant je prebačen u novu ependorf epruvetu. Nakon ovakve pripreme uzorak je spreman za nanošenje na gel i za elektroforetsko razdvajanje.

U odvojenim eksperimentima korišćena su različita primarna antitela: anti-PARP-1 antitelo (Santa Cruz, H-250), anti-YY1 antitelo (Santa Cruz, H-414), anti-C/EBPβ antitelo

(Santa Cruz, C-19), anti-Sp1 antitelo (Santa Cruz, E-3), anti-p53 antitelo (Santa Cruz, FL-393), anti-FKHRL1 antitelo (Santa Cruz, H-144) i anti-C/EBP α antitelo (Santa Cruz, 14AA).

3.8. TEHNIKE ZA MANIPULACIJU NUKLEINSKIM KISELINAMA

3.8.1. IZOLOVANJE GENOMSKE DNK

Alikvot od $1,5 \times 10^7$ Rin-5F wt ćelija ispran je sa PBS-om. Ćelije su resuspendovane u 3 ml modifikovanog Bredlijevog pufera (Modified Bradley buffer) pH 7,5 (10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 2mM EDTA, 10 mM NaCl, 0,5% SDS) u koji je dodato 60 μ g proteinaze K i inkubirane preko noći na 55°C. Sutradan, uzorci su inkubirani 30 min na sobnoj temperaturi. Nakon toga dodata je 1 zapremina rashlađenog apsolutnog etanola u koji je dodat 75 mM Na-acetat. Uzorci su inkubirani 2 h na sobnoj temperaturi, uz povremeno mućkanje. DNK je staložena centrifugiranjem na 5.000 x g, 5 min na sobnoj temperaturi. Talog je nakon etanolske precipitacije, ispran sa 1 ml 70% rashlađenog etanola, a zatim su uzorci inkubirani 1 h na sobnoj temperaturi. Ispiranje DNK sa 70% etanolom, ponovljeno je dva puta i nakon poslednjeg ispiranja, etanol je potpuno uklonjen, a talog DNK osušen dok sav etanol nije ispario. Talog DNK je rastvoren TE puferu, (1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl, pH 7,6), alikvotiran i čuvan na -20°C. Koncentracija i čistoća genomske DNK određena je merenjem apsorbance na 260 nm i 280 nm.

3.8.2. LANČANA REAKCIJA POLIMERAZE

Lančana reakcija polimeraze (eng. *polymerase chain reaction*, **PCR**) korišćena je za umnožavanje promoterske sekvence gena za CXCL12 pacova (*Cxcl12*) i RAM 4 elementa (region asocijacije sa jedarnim matriksom) koji se nalazi uzvodno od *Cxcl12* promotora, na poziciji -1725/-1592 bp. Za umnožavanje DNK fragmenata, korišćen je DreamTaqTM PCR Master Mix (2X) (Fermentas) po uputstvima proizvođača. Reakciona smeša za PCR reakciju sastojala se od 12,5 μ l DreamTaqTM PCR Master Mix-a (2X), 2 μ l „forward“ (fw) i

2 µl „reverse“ (rev) prajmera (finalne koncentracije 0,8 pM), DNK matrice (1,5 µg) i sterilne vode bez nukleaza, koja je dodata do ukupne zapremine PCR reakcije 25 µl. Sekvence korišćenih prajmera prikazane su u Tabeli 3.1. Uslovi PCR reakcije za umnožavanje *Cxcl12* promotora bili su: inicijalna denaturacija DNK 5 min na 95°C, zatim prvi ciklus, koji se sastojao od 30 s denaturacije na 95°C, 30 s za vezivanje prajmera na 63°C i 90 s polimerizacije DNK lanca na 72°C. Prvi ciklus je ponovljen 5 puta. Drugi ciklus se sastojao od 30 s denaturacije na 95°C, hibridizacije prajmera 30 s na 65°C i 90 s elongacije na 72°C. Drugi ciklus je ponovljen 35 puta. Nakon toga je sledila finalna ekstenzija DNK lanca na 72°C, 5 min. PCR reakcija za umnožavanje RAM 4 elementa odvijala se po sledećim uslovima: inicijalna denaturacija 5 min na 95°C, nakon toga je sledio ciklus koji se sastojao od 30 s DNK denaturacije na 95°C, 30 s hibridizacije prajmera na 58°C i 90 s polimerizacije na 72°C. Ciklus je ponovljen 40 puta. Poslednji korak je bio finalna ekstenzija DNK lanca 5 min na 72°C.

Tabela 3.1. Sekvence prajmera korišćenih u PCR-u za EMSA, ChIP i kloniranje.

Naziv prajmera	Sekvenca para prajmera 5'-3'	Dužina fragmenta (bp)
Promotor za EMSA	5'-biotin-CAGCACAGCCCTACGTTAGA-3' 5'-biotin-ACAGAGCTGCGAGCCTTGCC-3'	739
RAM 4 element	5'-biotin-GAGTAGGTTTTACCCAAGAG-3' 5'-biotin-GATACCTGACGCCTGTATAA-3'	134
Fragment 1 za ChIP	5'-CAGCACAGCCCTACGTTAGA-3' 5'-AGAGGCGAAACTGTGTTCCA-3'	246
Fragment 2 za ChIP	5'-TGGAACACAGTTTCGCCTCT-3' 5'-AAGGGGCGTGTCTGAAGTGT-3'	265
Fragment 3 za ChIP	5'-ACACTTCAGACACGCCCTT-3' 5'-ACAGAGCTGCGAGCCTTGCC-3'	268
Promotor za kloniranje	5'-GGTCGATACTAGTTTGTAAGACACCAATGACC-3' 5'-CCTAAGCCTCGAGTGGCGGGAGGGCGCGCCGGAGGCT-3'	1901

Pomoću PCR-a umnoženi su fragmenti 1, 2 i 3 *Cxcl12* promotora, nakon hromatinske imunoprecipitacije. Reakciona smeša za PCR reakciju sadržala je: 12,5 µl DreamTaq™ PCR Master Mix-a (2X), 2 µl fw i 2 µl rev prajmera (oba finalne koncentracije 0,8 pM), 3,5 µl sterilne vode bez nukleaza i 5 µl DNK matrice. Za umnožavanje promotorskih fragmenata korišćene su sekvence prajmera prikazane u Tabeli 3.1. PCR reakcija za fragmente 1 i 2 promotora, odvijala se u sledećim uslovima: inicijalna denaturacija DNK 5 min na 95°C, nakon toga je sledio ciklus koji se sastojao od 30 s denaturacije na 95°C, 30 s vezivanja prajmera na 55°C i 90 s polimerizacije na 72°C. Ciklus je ponovljen 40 puta. Završna elongacija DNK bila je 5 min na 72°C. Uslovi PCR reakcije za umnožavanje fragmenata 3 *Cxcl12* promotora bili su: inicijalna denaturacija DNK 5 min na 95°C, zatim prvi ciklus, koji se sastojao od 30 s denaturacije na 95°C, 30 s za hibridizaciju prajmera na 55°C i 90 s polimerizacije na 72°C. Prvi ciklus je ponovljen 5 puta. Drugi ciklus se sastojao od 30 s denaturacije na 95°C, vezivanja prajmera 30 s na 58°C i 90 s elongacije na 72°C. Drugi ciklus je ponovljen 35 puta. Nakon toga je sledila finalna ekstenzija DNK lanca na 72°C 5 min. Za kontrolu imunoprecipitacije hromatina, rađena je PCR reakcija sa pozitivnim prajmerima za β-aktin, obezbeđenim od proizvođača (ChIP-IT™ Express, Active Motif). U reakciju je dodato 12,5 µl DreamTaq™ PCR Master Mix-a (2X), 4 µl β-aktin prajmer miksa, 3,5 µl sterilne vode bez nukleaza i 5 µl DNK matrice. PCR reakcija se odvijala u sledećim uslovima: inicijalna denaturacija DNK 5 min na 95°C, nakon toga je sledio ciklus koji se sastao od 30 s denaturacije na 95°C, 30 s vezivanja prajmera na 59°C i 90 s polimerizacije na 72°C. Ciklus je ponovljen 40 puta. Završna elongacija DNK bila je 5 min na 72°C.

PCR reakcija je korišćena za umnožavanje *Cxcl12* promotora koji je ukloniran u vektor pMDIcLuc. Reakciona smeša za PCR reakciju sastojala se od 12,5 µl DreamTaq™ PCR Master Mix-a (2X), 2 µl „forward“ (fw) i 2 µl „reverse“ (rev) prajmera (oba finalne koncentracije 0,8 pM), DNK matrice (100 ng) i sterilne vode bez nukleaza, koja je dodata do ukupne zapremine PCR reakcije 25 µl. Sekvence prajmera date su u Tabeli 3.1. Fw prajmer je sadržao restrikciono mesto za SpeI restrikcionu endonukleazu, dok se u okviru rev prajmera nalazilo restrikciono mesto za XhoI restrikcioni enzim. Uslovi PCR reakcije bili su: inicijalna denaturacija DNK 15 min na 95°C, nakon toga je sledio ciklus koji se

sastojao od 1 min denaturacije na 94°C, 1 min za vezivanja prajmera na 57°C i 90 s polimerizacije na 72°C. Ciklus je ponovljen 40 puta. Završna elongacija DNK bila je 10 min na 72°C.

3.8.3. PCR U REALNOM VREMENU

Transkripcija gena analizirana je pomoću PCR-a u realnom vremenu ili kvantitativnog PCR-a (eng. *real-time PCR*, **qPCR**).

3.8.3.1. Priprema uzoraka i izolacija totalne RNK

Rin-5F wt i klon #1 ćelije sejane su u sterilne ploče sa 6 bunarića ravnog dna, i nakon dostizanja 80% konfluentnosti izolovana je totalne RNK. U pojedinim eksperimentima Rin-5F wt ćelije su po dostizanju 80% konfluentnosti tretirane sa 5 mM STZ-om (EC₅₀) u različitim vremenskim intervalima (0,5, 1, 3, 6 h). U određenim eksperimentima ćelije su tretirane 30 min sa 50 µM 3-aminobenzamidinom (3AB), dok su u nekim eksperimentima ćelije prvobitno tretirane sa 50 µM 3AB-om 30 min, nakon je sledio tretman sa 5 mM STZ-om u trajanju od 6 h. Izolacija totalne RNA izvršena je pomoću GeneJET RNA Purification Kit (Thermo Fisher Scientific) prema uputstvu proizvođača.

Ćelije su isprane PBS-om, a zatim pokupljene u 1 ml PBS-a i prebačene u novu ependorf epruvetu. Nakon centrifugiranja 5 min na 250 x g, supernatant je odbačen, a talog ćelija je resuspendovan u 600 µl pufera za lizu (Lysis Buffer) u koji je dodato 20 µl, 14,3 M β-merkaptotetanol. Ćelije su promešane vorteksovanjem, a zatim homogenizovane u cilju potpunog liziranja. Na lizirane ćelije dodato je 360 µl, 96% etanola i svaki uzorak je promešan. Ćelijski lizat je prebačen u kolonu (GeneJET RNA Purification Column) i centrifugiran 1 min na 13.000 x g. Filtrat je odbačen, a na kolonu je dodato 700 µl pufera 1 za ispiranje (Wash Buffer 1) i uzorak je centrifugiran 1 min na 13.000 x g. Nakon odlivanja filtrata, kolona je isprana sa 600 µl pufera 2 za ispiranje (Wash Buffer 2) i ponovo centrifugirana 1 min na 13.000 x g. Zatim je odklonjen filtrat i kolona je još jednom isprana sa puferom 2 za ispiranje (250 µl) i centrifugirana 2 min na 13.000 x g. Kolona je prebačena u novu ependorf epruvetu koja je po iskazu proizvođača oslobođena prisustva

RNKaze hemijskim pre-tretmanom (eng. *RNase-free*). Sterilna voda oslobođena prisustva nukleaza (50 µl) postavlja se na sam centar kolone gde se nalazi vezana RNK i kolona se centrifugira ponovo na 13.000 x g, 1 min na sobnoj temperaturi. Dobijen je eluat koji sadrži celokupnu ćelijsku RNK. Čistoća i koncentracija dobijene totalne RNK proverene su merenjem absorbance na spektrofotometru, a kvalitet izolovane RNK isptan je razdvajanjem na 1,5% agaroznom gelu.

3.8.3.2. Reverzna transkripcija

Reakciji reverzne transkripcije prethodio je tretman izolovane totalne RNK sa DNKazom u cilju uklanjanja potencijalno preostale DNK. Reakciona smeša se sastojala od 1 µg RNK, 1 µl 10 x reakcionog pufera sa MgCl₂ (10 x Reaction Buffer with MgCl₂), 1 µl (1 u) DNKaze I, koja je oslobođena RNKaze (Dnase I, Rnase-free) (Fermentas). Ukupan volumen reakcione smeše od 10 µl dopunjen je sterilnom vodom. Reakciona smeša je inkubirana 30 min na 37°C. Reakcija je zaustavljena dodavanjem 1 µl, 50 mM EDTA i inkubacijom na 65°C, 10 min. Ovako pripremljena RNK služila je kao matrica za reverznu transkripciju tj. sintezu cDNK (eng. *complementary DNA*, **cDNA**) čija je sekvenca komplementarna sekvenci iRNK. Sinteza cDNK je izvršena reakcijom reverzne transkripcije uz pomoć RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas). Reakciona smeša sastojala se od 1 µg RNK tretirane DNKazom, 1 µl oligo (dT) prajmera, 4 µl 5 x reakcionog pufera (5 x Reaction Buffer), 1 µl (20 U) inhibitora RNKaze (RiboLock™), 2 µl 10 mM dNTP, 1 µl (200 U) reverzne transkriptaze (RevertAid™, M-MuLV Reverse Transcriptase) i dH₂O do ukupne zapremine reakcije od 20 µl. Reakcija reverzne transkripcije odvijala se na 42°C, 1 h. Reakcija je zaustavljena zagrevanjem uzoraka 5 min na 70°C. Sintetisana cDNK čuvana je na -20°C do dalje upotrebe.

3.8.3.3. Reakcija lančanog umnožavanja u realnom vremenu (qPCR)

U qPCR reakciji korišćen je Maxima™ SYBR® Green/ROX qPCR Master Mix (2X) (Fermentas). Maxima™ SYBR® Green/ROX qPCR Master Mix (2X) sadržao je DNK polimerazu (Maxima™ Hot Start *Taq* DNA polimerase), dNTP, odgovarajući pufer

za PCR reakciju i fluorescentnu boju SYBR Green I. cDNK matrica pre dodavanja u qPCR reakciju razblažena je 6x. Reakciona smeša za qPCR sastojala se od 5 µl Maxima™ SYBR® Green/ROX qPCR Master Mix (2X), po 0,5 µl odgovarajućih prajmera za gen od interesa (finalne koncentracije 0,5 pM), 1 µl razblažene cDNK i 3 µl dH₂O. Korišćeni parovi prajmera dati su u Tabeli 3.2. Deset mikrolitara reakcione smeše dodato je u svaki bunarić mikroploče za kvantitativni PCR (MicroAmp™ Optical, Applied Biosystems). Bunarići su zapečaćeni optičkim adhezivnim filmom (Applied Biosystems), ploča je centrifugirana 3 minuta na 1000 x g i prenetu u termoblok aparata za qPCR (ABI Prism 7000, Applied Biosystems). Uslovi amplifikacije bili su sledeći: inicijalna denaturacija 10 min na 95°C, praćena ciklusom koji se sastojao od koraka denaturacije DNK lanaca 15 s na 95°C i koraka vezivanja prajmera i elongacije lanaca od 1 min na 60°C. Ciklus je ponovljen 40 puta. Nivo ekspresije ispitivanog gena standardizovan je u odnosu na ekspresiju gena za β-aktin detektovanog u istom uzorku i iskazan kao 2-dCt, gde je dCt razlika između Ct vrednosti gena od interesa i gena za β-aktin.

Tabela 3.2. Sekvence prajmera korišćenih za qPCR analizu.

Naziv gena	Sekvenca para prajmera 5' - 3'	Dužina fragmenta (bp)
CXCL12 (pacovski)	5'-GATTCTTTGAGAGCCATGTC-3' 5'-GTCTGTTGTTGCTTTTCAGC-3'	107
PARP-1	5'-CTGGTGGACATTGTGAAAGG-3' 5'-TCTGCCTTCTGCTCAGTTTC-3'	442
YY1	5'-GCCAGCCGAGATCGTGGAAC-3' 5'-GATCATGGGCGGGTGGTGGT-3'	202
CXCR4	5'-CTGACTGGTACTTTGGGAAA-3' 5'-GGAACACCACCATCCACAGG-3'	228
β-aktin	5'-AGATTACTGCCCTGGCTCCT-3' 5'-ACATCTGCTGGAAGGTGGAC-3'	119
CXCL12 (humani)	5'-ATGAACGCCAAGGTCGTGGT-3' 5'-GGGCACAGTTTGGAGTGTG-3'	151

3.9. ELEKTROFOREZA NUKLEINSKIH KISELINA U NEDENATURISUĆEM AGARAZNOM GELU

Uzorci genomske DNK su razdvajani u 1% agaroznom gelu (1 g agaroze u 100 ml 0,5 x TBE pufera). Uzorci su pripremani sa rastvorom 0,025% brom-fenol plavog, 0,025% ksilen-cijanola i 3% glicerola. Elektroforeza se odvijala u 0,5 x TBE puferu (45 mM Tris baza, 45 mM borna kiselina, 1 mM EDTA), 2 h pri naponu od 80 V. Nakon elektroforeze gelovi su bojeni rastvorom etidijum bromida koncentracije 0,5 µg/ml 0,5 x TBE pufera.

Produkti PCR reakcije su razdvajani u 1,5% agaroznom gelu (1,5 g agaroze u 100 ml 0,5 x TBE pufera). Uzorci su pripremani na gore opisan način, a elektroforeza je tekla 45 min pri voltaži od 80 V u 0,5 x TBE puferu. Nakon elektroforeze gelovi su bojeni rastvorom etidijum bromida koncentracije 0,5 µg/ml 0,5 x TBE pufera.

Ukupna RNK razdvojena je u 1,5% agaroznom gelu. Gel i uzorci su pripremljeni kao u slučaju razdvajanja DNK fragmenta. Elektroforetsko razdvajanje trajalo je 1,5 h na 80 V. Gel je bojen na gore opisan način.

3.10. EKSTRAKCIJA DNK IZ AGARAZNOG GELA

Ekstrakcija DNK fragmenta iz 1,5% agaroznog gela vršena je sa QIAquick Gel Extraction Kit-om (Qiagen) po uputstvima proizvođača. Pomoću skalpela isečeni komadi DNK fragmenta iz agaroznog gela smešteni su u ependorf epruvetu. Na 1 komad agaroznog gela sa DNK dodato je 3 zapremine pufera QG (na 100 mg gela sa DNK doda se 100 µl pufera). Smesa je inkubirana 10 min na 65°C. Inkubacija na ovoj temperaturi pomaže rastvaranje agaroze i oslobađanje DNK u rastvor. Rastvaranje je potpomognuto vorteksovanjem na svaka 2-3 min. Na rastvorenu smesu dodat je izopropanol u količini koja odgovara 1 zapremini gela. Kompletna smesa je naneta na QIAquick kolonu u cilju vezivanja DNK i njene izolacije iz rastvora. Smesa u koloni je centrifugirana na 10.000 x g, 1 min na sobnoj temperaturi. Supernatant je odbačen, a na kolonu je naliveno 0,5 ml QG pufera i kolona je još jednom centrifugirana, pod istim uslovima. Kolona je isprana sa 0,75

ml pufera PE centrifugiranjem na 10.000 x g, 1 min na sobnoj temperaturi. Supernatant je odbačen, a kolona je centrifugirana suva, pod pomenutim uslovima da bi se odstranio etanol koji je prisutan u puferu PE. Elucija DNK je izvršena pomoću pufera EB (10 mM Tris-HCl, pH 8,5). Pufer se postavlja na sam centar kolone gde se nalazi vezana DNK i kolona se centrifugira ponovo na 10.000 x g, 1 min na sobnoj temperaturi. Dobijen supernatant sadrži eluiranu i delimično skoncentrisanu DNK. Koncentracija i čistoća eluata određivana je merenjem apsorbance na 260 nm i 280 nm.

3.11. ELEKTROFORETSKO ZAOSTAJANJE

Tehniku elektroforetskog zaostajanja (eng. *electrophoretic mobility-shift assay*, EMSA) prvi put su opisali Garner i Revzin (1981) i Fried i Crothers (1981). EMSA se koristi za izučavanje specifičnih interakcija *trans*-delujućih proteina i *cis*-regulatornih DNK sekvenci *in vitro*. Pomoću ove metode ispitane su interakcije između *Cxcl12* promotora i transkripcionih faktora i između RAM 4 elementa i RAM-vezujućih proteina.

3.11.1. PRIPREMA REAKCIJE ZA ELEKTROFORETSKO ZAOSTAJANJE

Dvadeset mikrograma jedarnog lizata dodato je u pufer za vezivanje (20% glicerol, 5 mM MgCl₂, 2,5 mM EDTA, 2,5 mM DTT, 250 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 7,5) i ostavljeno da se inkubira 10 min na sobnoj temperaturi. U slučaju ispitivanja „super-pomaka“ (eng. *super-shift*) u reakciju je dodato 1 µg antitela i inkubirano 15 min na 37°C. Korišćena su sledeće antitela: anti-PARP-1 antitelo (C2-10, ALEXIS Biochemicals), anti-PARP-1 antitelo (R&D), anti-PARP-1 (H-250, Santa Cruz), anti-YY1 antitelo (H-414, Santa Cruz), anti-C/EBPβ antitelo (C-19, Santa Cruz), anti-Sp1 antitelo (E-3, Santa Cruz), anti-p53 antitelo (FL-393, Santa Cruz), anti-STAT3 antitelo, (H-190, Santa Cruz), anti-FKHRL1 antitelo (H-144, Santa Cruz), anti-HMG-I/HMG-Y antitelo (FL-95, Santa Cruz), anti-C/EBPα antitelo (14AA, Santa Cruz), anti-NFκB p65 antitelo (C-20, Santa Cruz), anti-FKHR antitelo (C-20, Santa Cruz), anti-HNF-6 antitelo (H-100, Santa Cruz), anti-lamin B antitelo (M-20, Santa Cruz) i anti-C1D antitelo (ProteinTech group, Inc). Zatim su u

reakciju dodati 1 μg nespecifičnog kompetitora (polyIdC, Amersham) i 100 ng DNK obeležene biotinom. Sledila je inkubacija 30 min na 37°C. Reakcione smese su razdvojene na 1% agaroznom nenedenaturišućem gelu (1 g agaroze u 100 ml 0,5 x TBE pufera) na sobnoj temperaturi. Do potpunog prelaska iz bunarića u gel uzorci su putovali pri naponu od 40 V, a nakon ulaska u gel napon je povećana na 80 V. Elektroforeza je tekla 3 h.

3.11.2. PRENOS DNK I DNK-PROTEIN KOMPLEKSA NA MEMBRANU

U cilju vizuelizacije DNK iz formiranih protein-DNK kompleksa, biotinom obeležena DNK i formirani DNK-protein kompleksi su sa agaroznog gela pasivnim (kapilarnim) transferom preneti na membranu (Nytran membrana, Sigma-Aldrich). Prenos na membranu podrazumeva nekoliko koraka: nakon završene elektroforeze, agarozni gel je potopljen u 0,4 M NaOH 10 min. Gel i membrana stavljeni su u sendvič od filter papira (Whatman 3MM), a zatim položeni na postolje, koje je stajalo u kadici, napunjenoj puferom za transfer (0,4 M NaOH/1 M NaCl). Most od filter papira, koji se nalazio do gela bio je uronjen u pufer za transfer. Na ovako postavljen sistem za transfer položeni su listići od papirne vate i teg, kako bi se obezbedio kapilarni transfer tj. prenos DNK-protein kompleksa sa gela na membranu.

3.11.3. VIZUELIZACIJA BIOTINOM OBELEŽENE DNK

Vizuelizacija biotinom obeležene DNK nakon transfera na membranu, vršena je pomoću UltraSNAPTM Detection Kita-a (Vector Laboratories) po uputstvu proizvođača. Membrana je blokirana 30 min u 20 ml reagensa za blokiranje (PolyBlockTM Reagent) na sobnoj temperaturi uz lagano mešanje. Zatim, membrana je inkubirana sa streptavidinom konjugovanim sa alkalnom fosfatazom 30 min na sobnoj temperaturi uz lagano mešanje. Nakon toga, membrana je isprana 3 puta po 15 min sa 30 ml pufera za ispiranje A (Wash A). Sledilo je kratko ispiranje membrane puferom za ispiranje B (Wash B). U cilju vizuelizacije nagrađenih biotin-streptavidin kompleksa membrana je bojena 5 min sa 5 ml hemiluminescentnog supstrata za alkalnu fosfatazu (DuoLuxTM Substrate). Zatim je

membrana isprana sa 30 ml pufera za ispiranje B (Wash B) i stavljena pod filmove (Hyperfilm ECL, Santa Cruz Biotechnology, RPN 3103 K) prema uputstvu proizvođača.

3.12. IMUNOPRECIPITACIJA HROMATINA

Pomoću imunoprecipitacije hromatina (eng. *chromatin immunoprecipitation*, **ChIP**) ispitano je vezivanje transkripcionih faktora za *Cxcl12* promotor i vezivanje PARP-1 za RAM 4 element u ćeliji *in vivo*. Korišćen je kit ChIP-ITTM Express (Active Motif). Rin-5F wt ćelije su sejane u sterilne Petri šolje i po dostizanju 80% konfluentnosti tretirane su 10 min sa rastvorom za fiksaciju (1% formaldehid), kako bi se učvrstile veze (eng. *cross-linking*) između DNK i proteina i međusobne veze između proteina. Zatim su ćelije isprane sa rashlađenim PBS-om. Fiksacija je zaustavljena inkubacijom ćelija 5 min u glicinskom rastvoru za zaustavljanje fiksacije (Glycine Stop-Fix Solution) na sobnoj temperaturi. Nakon toga, ćelije su ponovo isprane sa rashlađenim PBS-om. Ćelije su pokupljene u 2 ml PBS-a u koji je dodat 5 mM PMSF. Ćelije su centrifugirane 10 min na 720 x g na 4°C. Supernatant je odliven, a ćelijski talog je resuspendovan u 1 ml rashlađenog pufera za lizu (Lysis Buffer) u koji dodato 5 µl koktela proteaznih inhibitora (Protease Inhibitor Cocktail, PIC) i 5 µl PMSF. U puferu za lizu ćelije su inkubirane 30 min na 4°C. Ćelije su homogenizovane, da bi se efikasnije oslobodila jedra. Homogenat je centrifugiran 10 min na 2.400 x g na 4°C. Supernatant je pažljivo odliven, a jedarni talog resuspendovan u 350 µl pufera za sonifikaciju (Shearing Buffer) u koji je dodato 1,75 µl PIC. Zatim su jedra sonifikovana sa 20 pulseva, u cilju fragmentacije hromatina. Jedan puls je trajao 20 s, a pauza između pulseva iznosila je 30 s. Fragmentisan hromatin je centrifugiran 10 min na 18.000 x g na 4°C. Supernatant, koji je sadržao fragmentisan hromatin, pažljivo je prebačen u novu ependorf eprvetu. Deset mikrolitara hromatina prebačeno je u novu ependorf eprvetu i čuvano na -20°C. Ovo je kontrolni hromatin, koji će služiti kao pozitivna kontrola u PCR reakciji. Reakcija imunoprecipitacije hromatina sastojala se od 25 µl magnetnih kuglica kuplovanih sa proteinom G, 10 µl pufera 1 za ChIP, 30 µl fragmentisanog hromatina, 1 µl PIC, 3 µg antitela na protein od interesa i dH₂O do ukupne zapremine reakcije od 100 µl. Za imunoprecipitaciju korišćena su sledeća antitela: anti-

PARP-1 antitela (Roche i H-250, Santa Cruz), anti-YY1 antitelo (H-414, Santa Cruz), anti-C/EBP β antitelo (C-19, Santa Cruz), anti-Sp1 antitelo (E-3, Santa Cruz), anti-p53 antitelo (FL-393, Santa Cruz), anti-STAT3 antitelo (H-190, Santa Cruz), anti-FKHRL1 antitelo (H-144, Santa Cruz), anti-HMG-I/HMG-Y antitelo (FL-95, Santa Cruz) i anti-C/EBP α antitelo (14AA, Santa Cruz). Reakciona smeša je inkubirana preko noći u orbitalnom šejkeru na 4°C. Sutradan supernatant je odliven, a magnetne kuglice su isprane jednom sa 800 μ l pufera 1 za ChIP i dva puta sa 800 μ l pufera 2 za ChIP. Supernatant je pažljivo odliven, a kuglice su resuspendovane u 50 μ l pufera za eluciju AM2 (Elution Buffer AM2) i ostavljene 15 min da se inkubiraju na orbitalnom šejkeru, da bi se raskinule veze između hromatina i magnetnih kuglica. Zatim je dodato 50 μ l pufera za reverzni „cross-linking“ i supernatant koji sadrži hromatin je prenet u novu ependorf epruvetu. U 10 μ l kontrolnog hromatina dodato je 88 μ l pufera 2 za ChIP i 2 μ l 5 M NaCl. Kontrolni i imunoprecipitovan hromatin inkubirani su 15 min na 95°C. Zatim je dodato 2 μ l proteinaze K, da bi se uklonili hromatinski proteini. Uzorci su promešani vorteksovanjem i ostavljeni da se inkubiraju 1 h na 37°C. Nakon toga, u uzorke je dodato 2 μ l rastvora za zaustavljanje proteinaze K (Proteinase K Stop Solution). DNK je čuvana na -20°C. PCR je korišćen za amplifikaciju fragmenata *Cxcl12* promotora i RAM 4 elementa.

Efikasnost fragmentacije hromatina ultrazvukom, ispitivana je po sledećoj proceduri, preporučenoj od strane proizvođača. U 50 μ l alikvotiranog hromatina, dodato je 150 μ l dH₂O i 10 μ l 5 M NaCl. Uzorci su zagrevani 15 min na 95°C, da bi se raskinule veze između DNK i proteina (eng. *reverse cross-linking*). Zatim je dodat 1 μ l RNKaze A da bi se uklonila RNK. Uzorci su inkubirani 15 min na 37°C. Nakon toga, uzorci su inkubirani sa 1 μ l proteinaze K 15 min na 67°C. Po završetku inkubacije, u svaki uzorak je dodato 200 μ l smeše fenol:hloroform i sadržaj je promešan na vorteksu. Centrifugiran je sadržaj svake epruvete 5 min na 16.000 x g. Pažljivo je prebačena gornja vodena faza u novu ependorf epruvetu bez zadiranja u donju vodenu fazu. Dodato je 20 μ l 3 M Na-acetata, pH 5,2 i 500 μ l apsolutnog etanola. DNK je precipitirana 1 h na -80°C. Precipitat je centrifugiran 10 min na 16.000 x g. Etanol je odliven i pelet je ispran sa 500 μ l 70% rashlađenog etanola. Talog je centrifugiran 5 min na 16.000 x g. Etanol je ponovo odliven i talog osušen dok sav etanol nije ispario. Talog je resuspendovan u 10 μ l dH₂O. Koncentracija i čistoća DNK

određivana je merenjem apsorbance na 260 nm i 280 nm. Fragmentisana DNK je razdvojena na 1% agaroznom gelu.

3.13. KOMET ESEJ (SCGE - SINGLE CELL GEL ELECTROPHORESIS)

Za procenu oštećenja DNK nakon tretmana STZ-om korišćen je alkalni komet esej po metodi Singh i sar. (1988). Rin-5F ćelije wt i #1 sejane su u sterilne ploče sa 6 bunarića ravnog dna, i po dostizanju 80% konfluentnosti tretirane su sa 5 mM STZ-om (EC_{50}), 30 min na 37°C. U određenim eksperimentima Rin-5F wt ćelije tretirane su sa 5 mM STZ-om u različitim vremenskim intervalima (0,5, 1, 3, 6 h). Kontrolne i tretirane ćelije pokupljene su u PBS-u. Deset mikrolitara ćelijske suspenzije je pomešano sa 75 μ l 1% LMPA (low melting point agarose) koja je pre-temperirana na 37°C i uzorak je razliven ravnomernim nakapavanjem na prethodno pripremljenu mikroskopsku pločicu. Priprema pločice se sastoji u prekrivanju pločice 1,5% agarozom koja nakon sušenja predstavlja tanki sloj na koji se dalje nanosi uzorak. Obe vrste agaroze su napravljene u PBS puferu. Nakon nanošenja uzorka u LMPA, mikroskopska pločica je prekrivena pokrovnim staklom i ostavljena 10 min da se agarozna stegne. Pokrovno staklo je uklonjeno i nanešen je još jedan sloj 1% LMPA. Mikroskopske pločice su zatim stavljene u hladan pufer za lizu (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris-baza, 1% Triton X-100, 10% DMSO, pH pufera 10) koja se odvijala 2 h na 4°C. Nakon lize, mikroskopske pločice su inkubirane u puferu za elektroforezu (300 mM NaOH, 1 mM EDTA, pH pufera 13) 30 min na 4°C sa ciljem denaturacije DNK na baznom pH. Mikroskopske pločice su zatim postavljene u sistem za elektroforezu, koja je trajala 30 minuta na 0,01 kV. Nakon toga, pločice su isprane 3 x 5 min u puferu za neutralizaciju (0,4 Tris-HCl, pH 7,4) i bojene sa bojom za nukleinske kiseline SYBR GREEN I (Sigma-Aldrich, S 9430). Komete su vizuelizovane i fotografisane pomoću fluorescentnog mikroskopa, Leica DMLB (uvećanje 40x) koji je povezan sa CCD kamerom.

Kao parametar DNK oštećenja korišćen je moment repa komete koji predstavlja proizvod dužine repa i procenta DNK u repu komete. Moment repa komete je izražen u relativnim svetlosnim jedinicama (eng. *relative light units*, **RLU**) po pikselu. Kvantifikacija

momenta repa kometa je urađena upotrebom kompjuterskog programa TriTekCometScoreTMFreeware v1.5 koji je dostupan na web-strani AutoComet.com.

3.14. KLONIRANJE *Cxcl12* PROMOTORA U REPORTERSKI VEKTOR

3.14.1. DIGESTIJA RESTRIKCIJOM ENZIMIMA

PCR-om je umnožen *Cxcl12* promotor na gore opisan način (Materijal i metode, 3.8.2). Dobijeni PCR produkt je prečišćen na koloni (Materijal i metode, 3.10), a koncentracija i čistoća izmerene na spektrofotometru. Nakon toga su digestijom sa SpeI (Fermentas) i XhoI (Fermentas) restrikcionim enzimima kreirani jednolančani "lepljivi krajevi". Reakcija restrikcione digestije sastojala se od: 0,65 µg PCR-om umnoženog *Cxcl12* promotora, 3 µl 10 x Tango pufera (10xBuffer TangoTM, Fermentas), 0,3 µl (3 U) SpeI enzima (Fermentas), 0,3 µl (3 U) XhoI enzima (Fermentas) i H₂O do ukupne zapremine reakcije 30 µl.

Kao vektor za kloniranje korišćen je pMDICluc plazmid koji, kao reporterski gen sadrži gen za luciferazu svica. Uzvodno od gena za luciferazu nalazi se promotor citomegalovirusa (CMV), oivičen restrikcionim mestima za enzime SpeI i XhoI. Pored toga, pMDICluc sadrži gen za rezistenciju na ampicilin. pMDICluc vektor je digeriran sa SpeI i XhoI restrikcionim endonukleazama u cilju isecanja CMV promotora iz plazmida i umesto njega ubacivanja *Cxcl12* promotora. Reakcija restrikcione digestije sadržala je: 0,8 µg plazmida, 3 µl 10 x Tango pufera (10xBuffer TangoTM, Fermentas), 0,3 µl (3 U) SpeI enzima (Fermentas), 0,3 µl (3 U) XhoI enzima (Fermentas) i dH₂O do ukupne zapremine 30 µl. Na taj način formiraju se SpeI i XhoI "lepljivi krajevi" koji su komplementarni istim krajevima, dobijenim digestijom PCR produkta sa SpeI i XhoI. Istovremeno su pripremane i kontrolne digestije u kojima je plazmid (200 ng u reakciji finalnog volumena 10 µl) digeriran samo jednim enzimom. Linearizacija plazmida u obe jednostruke digestije je potvrda aktivnosti oba restrikciona enzima.

Smeše za digestiju inkubirane su preko noći na 37°C. Produkti digestije analizirani su elektroforezom na 1% agaroznom gelu.

3.14.2. *LIGACIJA Cxcl12 PROMOTORA U pMDICluc VEKTOR*

Smeša za ligaciju sadržala je 100 ng digeriranog pMDICluc vektora, 111 ng digeriranog PCR produkta *Cxcl12* promotora, 1,3 µl 10 x pufera za ligaciju, 1 µl (1,5 U) T4 DNK Ligaze (Fermentas) i H₂O do ukupne zapremine reakcije 13 µl. Ligaciona smeša je inkubirana preko noći na 16°C.

3.15. TEHNIKE ZA MANIPULACIJU BAKTERIJAMA

3.15.1. *KULTIVISANJE BAKTERIJA*

E. coli bakterije soja *DH5α* kultivisane su u tečnom, LB (Luria-Bertani) medijumu (1% tripton, 1% NaCl, 0,5% ekstrakt kvasca) ili na čvrstoj, LA podlozi (1% tripton, 1% NaCl, 0,5% ekstrakt kvasca, 1,5% bakto-agar) prema metodi Sambrook i sar. (1989). Svi medijumi za kultivisanje su sterilisani autoklaviranjem.

Bakterije su kultivisane na temperaturi od 37°C. Kako bi se obezbedio selektivni rast transformanata, u tečni i čvrsti medijum dodato je 80 µg/ml ampicilina, s obzirom da pMDICluc nosi rezistenciju na ovaj antibiotik.

3.15.2. *PRIPREMANJE E. COLI DH5α KOMPETENTNIH ĆELIJA*

Pojedinačna bakterijska kolonija preneti je sa čvrste LA podloge u 5 ml tečnog LB medijuma bez antibiotika. *DH5α* bakterijski soj ne poseduje rezistenciju na antibiotike. Bakterije su kultivisane preko noći, uz aeraciju, na 37°C. Sutradan 1 ml prekonodne kulture inokulisan je u 20 ml svežeg LB medijuma. Bakterije su kultivisane na 37°C dok nisu postigle gustinu od 0,3 – 0,5 OD, što je određeno merenjem na spektrofotometru na talasnoj dužini od 600 nm. Bakterije iz ove kulture su razblažene dodavanjem 2 ml bakterijske

kulture u 20 ml svežeg LB medijuma. Kultivacija bakterija je nastavljena na 37°C do postizanja gustine od 0,5 OD_{600nm}. Na ovaj način je dobijen veliki broj bakterijskih ćelija koje se nalaze u eksponencijalnoj fazi rasta. Kultura je centrifugirana na 3.300 x g 10 min na 4°C. Bakterijski talog resuspendovan je u 10 ml hladnog 0,1 M CaCl₂. Nakon toga, bakterije su inkubirane na ledu 10 min i ponovo centrifugirane pri istim uslovima. Talog bakterija je resuspendovan u 2 ml ohlađenog rastvora sačinjenog od 85% 0,1 M CaCl₂ i 15% glicerola. Kompetentne bakterijske ćelije čuvane su u alikvotima od 200 µl na -80°C.

3.15.3. TRANSFORMACIJA E. COLI DH5α KOMPETENTNIH ĆELIJA

U 200 µl kompetentnih bakterija dodata je ligaciona smeša plazmida i *Cxcl12* promotora uz veoma pažljivo, blago mešanje. Zatim su bakterije i ligaciona smeša inkubirani 30 min na ledu. Smeša je prebačena u ugrejanu ependorf epruvetu, inkubirana 2 min na 42°C, a zatim 10 min na ledu. Izlaganjem smeše temperaturnom šoku propustljivost bakterijskih membrana dostiže maksimum, što omogućuje efikasnu transformaciju. Transformisanim bakterijama dodato je 800 µl tečnog LB medijuma bez antibiotika i kultivacija je nastavljena 1 h na 37°C u aerisanim uslovima. Nakon toga, u bakterijsku kulturu je dodat 1 ml svežeg LB medijuma sa ampicilinom i nastavljeno je sa gajenjem bakterija 2 h na 37°C uz aeraciju. Alikvot bakterijske kulture (50 µl) razmazan je po čvrstoj LA podlozi koja sadrži ampicilin. Rast bakterija odvijao se preko noći na 37°C, posle čega su uočene pojedinačne kolonije na Petri šoljama. S obzirom na selektivnost podloge, samo transformati tj. bakterije koje su priimile plazmidnu DNK mogu da izrastu.

3.16. ANALIZA PLAZMIDNOG KONSTRUKTA

3.16.1. IZOLOVANJE PLAZMIDNE DNK NA MALOJ SKALI

Plazmidna DNK izolovana je pomoću QIAprep Spin Miniprep Kit-a (Qiagen). Pojedinačna bakterijska kolonija preneti je sa čvrste selektivne podloge u 5 ml tečnog LB

medijuma sa antibiotikom i inkubirana preko noći na 37°C u aerisanim uslovima. Prekonoćna kultura je prebačena u ependorf epruvetu, a zatim centrifugirana 5 min na 10.000 x g. Bakterijski talog je resuspendovan u 250 µl pufera P1. Dodato je 250 µl pufera za lizu P2 i sadržaj je promešan invertovanjem epruvete 4 do 6 puta. Nakon toga, dodato je 350 µl pufera za neutralizaciju N3 i epruveta je ponovo invertovana 4 - 6 puta. Zatim su uzorci centrifugirani 10 min na 10.000 x g i supernatant je nanešen na QIAprep kolonu. Kolona je centrifugirana 1 min na 10.000 x g, da bi se omogućila adsorpcija plazmidne DNK na kolonu. Filtrat je odbačen i na kolonu je dodato 500 µl PB pufera. Kolona je centrifugirana 1 min na 10.000 x g. Nakon centrifugiranja filtrat je odliven, a DNK je isprana sa 750 µl PE pufera. Ponovljeno je centrifugiranje kolone 1 min na 10.000 x g. Kolona je prebačena u novu ependorf epruvetu i centrifugirana 1 min na 10.000 x g, da bi se odstranili i poslednji tragovi pufera. Kolona je ponovo prebačena u novu ependorf epruvetu i dodato je 100 µl pufera za eluciju EB. Kolona je inkubirana 1 min na sobnoj temperaturi u cilju povećanja DNK prinosa. Kolona je centrifugirana 1 min na 10.000 x g, nakon čega je dobijen eluat u kome je rastvorena plazmidna DNK.

3.16.2. SEKVENCIRANJE *pCXCL12luc* KONSTRUKTA

Nakon izolacije plazmidne DNK tj. umnožavanja kloniranog konstrukta, neophodno je izvršiti analizu plazmidne sekvence. Sekvenciranje *pCXCL12luc* konstrukta je rađeno BigDye™ Terminator v 3.1 Ready Reaction Kit-om (Applied Biosystems) kapilarnom elektroforezom na automatskom sekvenceru (3130 Genetic Analyzer, Applied Biosystems). Za sekvenciranje su korišćeni sledeći prajmeri: rev prajmer za fragment 1 i fw prajmer za fragment 2 *Cxcl12* promotora, pomoću kojih su umnoženi fragmenti *Cxcl12* promotora nakon imunoprecipitacije hromatina, Tabela 3.1. Smeša za sekvenciranje sastojala se od 300 ng plazmidnog konstrukta, 3,2 µl prajmera (finalne koncentracije 0,4 pM), 3 µl Ready Reaction Mix (Applied Biosystems) i dH₂O do finalne zapremine reakcije od 8 µl. PCR reakcija za sekvenciranje odvijala se u sledećim uslovima: inicijalna denaturacija DNK 1 min na 96°C, nakon čega je sledio ciklus koji se sastojao od denaturacije 10 s na 96°C, vezivanja prajmera 5 s na 50°C i elongacije DNK lanca 4 min na 60°C. Ciklus je ponovljen

25 puta. Produkti PCR reakcije za sekvenciranje su prečišćeni precipitacijom sa Na-acetatom i etanolom. U reakciju je dodato 40 μ l Na-acetata, uzorci su promućkani i centrifugirani 20 min na 10.000 x g. Supernatant je uklonjen i talog je ispran sa 200 μ l 70% etanola. Uzorci su centrifugirani 10 min na 10.000 x g, nakon čega je supernatant odstranjen i još jednom ponovljen korak ispiranja 70% etanolom. Talog je osušen i rastvoren u 25 μ l Hi-Di formamida. Preciptovana PCR reakcija za sekvenciranje je naneta u bunarić u mikrotitarskoj ploči. Dobijeni rezultati su analizirani programom Sequencing Analysis v.5.2 (<http://www.applied biosystems.com>).

3.17. PROLAZNA TRANSFEKCIJA

Rin-5F (wt i klon #1) i NIH3T3 (PARP^{+/+} i PARP^{-/-}) ćelije su transfekovane sa pCXCL12luc i pMDICluc konstruktima. PARP^{+/+} i PARP^{-/-} fibroblasti su ko-transfekovani sa pCXCL12luc i PARP-1 ekspresionim konstruktom, pEVC PARP. NIH3T3 su ko-transfekovane sa plazmidima pCXCL12luc i pcDNA3.1 FLAG YY1. U svaku reakciju transfekcije dodat je vektor pMDICRluc. Vektor pMDICRluc je kontrolni vektor za normalizaciju efikasnosti transfekcije. Opis plazmida, korišćenih u eksperimentima prolazne transfekcije dat je u Tabeli 3.3.

Ćelije su zasejane dan pre transfekcije u sterilne ploče sa 24 bunarića ravnog dna. Ćelije su gajene pod normalnim uslovima, u medijumu sa 10% fetalnog govedeg seruma, bez antibiotika. Sutradan ćelije su dostigle 70% konfluentnosti i 4 h pre transfekcije im je promenjen medijum. Plazmid (0,5 μ g pMDICluc, pCXCL12luc i pcDNA3.1 FLAG YY1, 0,065 μ g pMDICRluc i 3 μ g pEVC PARP) je rastvoren u minimalnom medijumu do 25 μ l ukupne zapremine. U 23 μ l minimalnog medijuma dodato je 2 μ l lipofektaminaTM 2000 (Invitrogen). Smesa je blago promešana i ostavljena da se inkubira na sobnoj temperaturi 5 min. Zatim je pomešana rastvorena plazmidna DNK sa rastvorenim lipofektaminom i nastavljeno je sa inkubacijom na sobnoj temperaturi 20 min. Tokom inkubacije formiraju se kompleksi između lipofektamina i DNK. Iz svakog bunarića sa ćelijama izvučen je medijum i ćelije su isprane sa 500 μ l PBS-a. Ćelijama je dodato 50 μ l minimalnog

medijuma (-FBS). Po isteku inkubacije, u svaki bunarić je dodato 50 µl lipofektamin-DNK kompleksa.

Tabela 3.3. Plazmidi korišćeni u eksperimentima prolazne transfekcije.

pMDICluc	Konstrukt u kome se gen za luciferazu svica nalazi pod kontrolom CMV promotora. Sadrži gen za rezistenciju na ampicilin. Korišćen je kao pozitivna kontrola u luciferaznom eseju. (Meike Hennecke, Helmholtz Center for Infection Research, Braunschweig, Nemačka).
pMDICRluc	Vektor u kome se gen za <i>Renilla</i> luciferazu nalazi pod kontrolom promotora CMV. Služio je kao kontrolni konstrukt za normalizaciju efikasnosti transfekcije. (Meike Hennecke, Helmholtz Center for Infection Research, Braunschweig, Nemačka).
pEVC PARP	Ekspresioni vektor koji sadrži kodirajuću sekvencu gena za PARP-1 miša, koju kontroliše RSV promotor i gene za rezistenciju na ampicilin i higromicin. (dr Valérie Schreiber, Département Intégrité du Génome UMR7175-LC1 CNRS, Strasbourg, Francuska).
pcDNA3.1 FLAG YY1	Ekspresioni konstrukt za FLAG-om obeleženu kodirajuću sekvencu za humani YY1 gen. Posедуje CMV promotor i gen za rezistenciju na neomicin. (Dr Martin Klar, Helmholtz Center for Infection Research, Braunschweig, Nemačka).
pCXCL12luc	Reporterski plazmid, koji sadrži promotor CXCL12 gena pacova, koji se nalazi ispred gena za luciferazu svica, i gen za rezistenciju na ampicilin.

Ćelije su inkubirane na 37°C i nakon 2 h u ćelije je dodato 100 µl medijuma sa 20% fetalnog goveđeg seruma i nastavljeno je sa inkubacijom na 37°C u narednih 48 h. Vrednost dobijene aktivnosti luciferaze svica u ćelijskim linijama transfekovanim sa pMDICluc i pCXCL12luc normalizovana je u odnosu na aktivnost *Renilla* luciferaze poreklom iz pMDICRluc plazmida i izražena kao relativna luciferazna jedinica (eng. *relative luciferase unit*, **RLU**). RLU je predstavljena kao srednja vrednost ± standardna greška dobijena iz najmanje tri nezavisna eksperimenta.

3.18. LUCIFERAZNI ESEJ

Luciferazna aktivnost je izmerena pomoću kita Dual-Luciferase® Reporter Assay System (Promega Corporation) prema uputstvima proizvođača.

Transfekovane ćelije su isprane sa 500 µl PBS-a i inkubirane sa 100 µl pufera za pasivnu lizu (PLB pufer) 15 min uz lagano mućkanje. Lizirane ćelije su prebačene u novu endorf epruvetu i centrifugirane 30 s na 16.100 x g. Supernatant, koji sadrži prečišćen ćelijski lizat, je prebačen u novu endorf epruvetu, alikvotiran i čuvan na -80°C.

U 10 µl ćelijskog lizata dodato je 50 µl LAR II reagensa i izmerena je aktivnost luciferaze svica. Zatim je dodato 50 µl Stop & Glo® reagensa i zabeležena je aktivnost *Renilla* luciferaze.

3. 19. BIOINFORMATIKA

Kompjuterska predikcija promotorske sekvence gena za CXCL12 pacova izvršena pomoću programa Genomatix Software GmbH (Minhen, Nemačka). Pomoću SIDD (Stresom Indukovani Destabilizovani regioni u DNK Dupleksu) algoritma mapirani su RAM elementi koji se nalaze u 5' regionu *Cxcl12*, uzvodno od promotora (<http://genomics.ucdavis.edu/benham/sidd/index.php>). Potencijalna mesta vezivanja transkripcionih faktora u okviru *Cxcl12* promotora ispitana su korišćenjem sledećih programa:

ALGGEN-PROMO (http://alggen.lsi.upc.es/cgi-bin/promo_v3/promo/promoinit.cgi?dirDB=TF_8.3),

MatInspector (http://www.genomatix.de/cgi-bin/matinspector_prof) i

TRANSFAC (<http://www.biobase-international.com/pages/index.php?id=40>).

Poravnanje para proteinskih sekvenci za PARP-1 miša i pacova urađeno je pomoću programa BLASTP 2.2.27 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

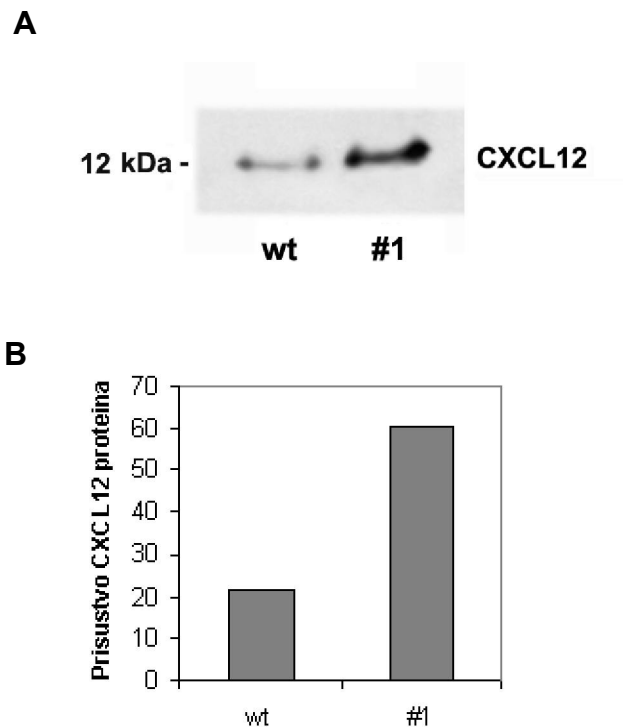
3.20. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA

Rezultati dobijeni u eksperimentima statistički su obrađeni programskim paketom „GraphPad Prism“ (GraphPad Prism Version 4.0, GraphPad Software Inc.). U ovom programu izračunate su srednja vrednost i standardna greška za ispitivane parametre. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm standardna greška. Studentov t test je korišćen za ispitivanje statističke značajnosti između dve grupe, pri čemu su vrednosti $p < 0,05$ smatrane statistički značajnim.

4. REZULTATI

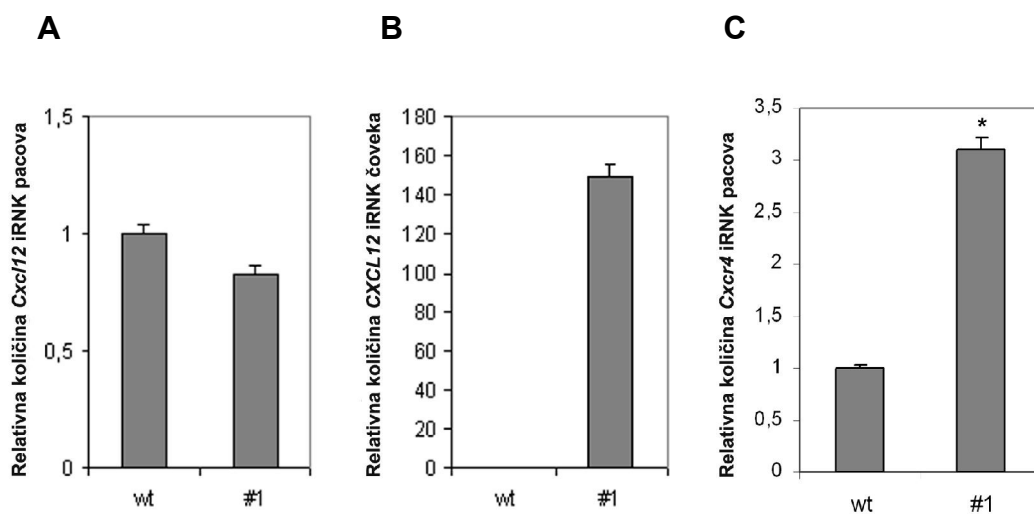
4.1. CXCL12 POSPEŠUJE PREŽIVLJAVANJE BETA ĆELIJA PANKREASA

Uticaj hemokina CXCL12 na preživljavanje beta ćelija pankreasa ispitan je na ćelijskoj liniji insulinoma beta ćelija pacova, Rin-5F (wt) i istoj liniji sa stabilno integrisanim genom za humani CXCL12, Rin-5F klon (#1). Pojačana ekspresija gena za CXCL12 u ćelijama Rin-5F klona #1 pokazana je imunoblot analizom, nakon taloženja proteina iz medijuma u kome su gajene wt i klon #1 ćelije (Slika 4.1). Istaloženi proteini su razdvojeni tricinskom SDS-PAGE elektroforezom i preneti na PVDF membranu. Korišćenjem anti-CXCL12 antitela, imunoblot analiza je pokazala prisustvo tri puta više CXCL12 proteina u ćelijskom supernatantu klona #1 u odnosu wt ćelije (Slika 4.1).



Slika 4.1. Prisustvo CXCL12 proteina u medijumu u kome su gajene Rin-5F wt i Rin-5F #1 ćelije. Imunoblot analiza (A) i grafički prikaz kvantifikacije (B) prisustva CXCL12 proteina istaloženog iz medijuma u kome su gajene Rin-5F wt i #1.

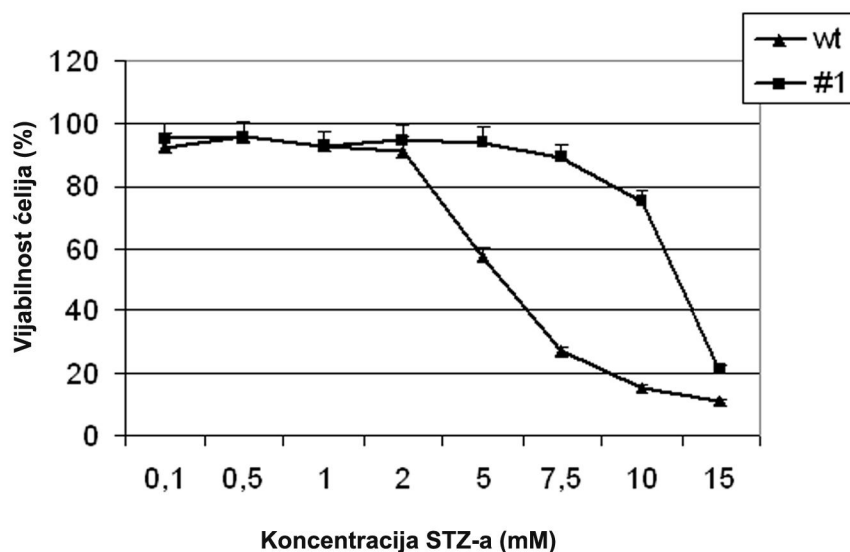
Ekspresija gena za CXCL12 u wt i klon #1 ćelijama ispitana je i na nivou iRNK. Izolovana je totalna RNK iz Rin-5F ćelija (wt i #1), a zatim je reakcijom reverzne transkripcije sintetisana komplementarna DNK (eng. *complementary DNA*, **cDNK**), koja je služila kao matrica u reakciji lančanog umnožavanja u realnom vremenu (qPCR). Kvantifikacijom cDNK, stiće se uvid u nivo transkripcije jer je cDNK isintetisana na osnovu iRNK matrice ispitivanog gena pomoću oligo (dT) prajmera koji odgovaraju poli-A repu iRNK. Tehnikom qPCR-a kvantifikovana je iRNK CXCL12 gena pacova (*Cxcl12*) korišćenjem prajmera koji su prikazani u Tabeli 3.2 (Materijal i metode, 3.8.3). Pokazano je da ćelije klona #1, sadrže manju količinu iRNK za *Cxcl12* u odnosu na wt ćelije. Statističkom analizom je utvrđeno da ovo smanjenje nije statistički značajno, na osnovu čega je zaključeno da se pacovski gen za CXCL12 podjednako transkribuje u ćelijama wt i klona #1 (Slika 4.2A).



Slika 4.2. Relativna ekspresija gena za CXCL12 pacova, CXCL12 čoveka i CXCR4 pacova u Rin-5F wt i Rin-5F klon #1 ćelijama. Relativna količina iRNK za gene CXCL12 pacova (A), CXCL12 čoveka (B) i CXCR4 pacova (C) u ćelijama Rin-5F wt i Rin-5F klon #1 analizirana je metodom PCR u realnom vremenu. Nivo ekspresije ispitivanih gena standardizovan je u odnosu na ekspresiju gena za β -aktin detektovanog u istom uzorku i iskazan kao 2^{-dCt} . Prikazana je srednja vrednost \pm standardna greška rezultata dobijenih iz tri nezavisna eksperimenta. Srednje vrednosti dobijene za klon #1 ćelije su bile statistički značajno različite (*) u odnosu na srednje vrednosti dobijene za wt ćelije ($p < 0,05$).

Zatim je proveren nivo transkripcije humanog gena za CXCL12 (*CXCL12*) (Slika 4.2B). Rezultati qPCR analize, pokazali su da ćelije klona #1 sadrže 150 puta više iRNK za CXCL12 u odnosu na wt ćelije, čime je potvrđena stabilna genomska integracija gena za humani CXCL12 u ćelijama #1 (Slika 4.2A i B). Takođe, qPCR-om, kvantifikovana je i iRNK za CXCR4 koji predstavlja jedan od dva receptora za CXCL12. Dobijeni rezultati pokazali su statistički značajno ($p < 0,05$) veću transkripciju gena za CXCR4 (*Cxcr4*) u ćelijama klona #1 u odnosu na wt ćelije (Slika 4.2C). Detektovana ekspresija gena za CXCL12 i CXCR4 u wt i klon #1 ćelijama ukazuje na postojanje autokrinog i parakrinog signalnog puta kojim CXCL12 ostvaruje svoje efekte, kako na beta ćelije pankreasa iz kojih se sekretuje, tako i na sve okolne beta ćelije.

Uticaj CXCL12 na preživljavanje beta ćelija pankreasa ispitan je testom vijabilnosti (MTT), nakon tretmana wt i klon #1 ćelija rastućim koncentracijama streptozotocina (STZ) (Slika 4.3). STZ je toksični analog glukoze koji selektivno ulazi u beta ćelije putem GLUT2 transprotera. Zbog ovakvog mehanizma delovanja STZ je definisan kao dijabetogeni agens koji se kroz različite model-sisteme koristi za izazivanje dijabetesa kod pacova i miševa.

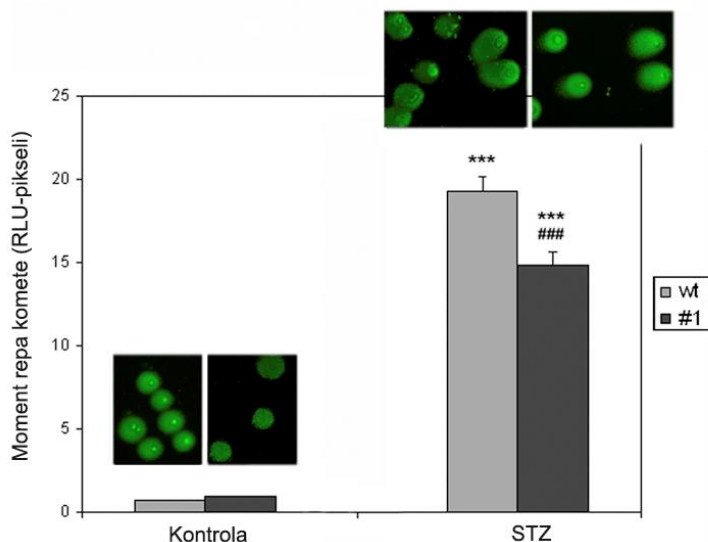


Slika 4.3. Vijabilost Rin-5F wt i Rin-5F klon #1 ćelija u uslovima oksidativnog stresa. Vijabilnost ćelija Rin-5F wt i Rin-5F klon #1 nakon tretmana rastućim koncentracijama STZ-a ispitana je pomoću MTT eseja.

STZ izaziva smrt beta ćelija posredstvom DNK alkilacije i produkcije reaktivnih kiseoničnih vrsta (ROS) i reaktivnih azotnih vrsta (RNS). Wt i klon #1 ćelije tretirane su rastućim koncentracijama STZ-a (0,1-15 mM) tokom 24 h. Po završetku tretmana, dodat je MTT, koji ulazi u ćelije i prolazi do mitohondrija, gde ga enzim sukcinat dehidrogenaza redukuje do nerastvorljivog formazana. Ćelije se nakon tretmana MTT-om rastvaraju u organskom rastvaraču DMSO-u, koji rastvara kristale formazana, čija se količina analizira spektrofotometrijski. S obzirom, da je redukcija formazana moguća samo u metabolički aktivnim ćelijama, nivo formiranog formazana je mera broja aktivnih tj. vijabilnih ćelija. Na Slici 4.3 uočava se da su rastuće koncentracije STZ-a toksičnije za wt ćelije. Koncentracija STZ od 5 mM izazvala je smrt 42% ćelija wt i 6% ćelija klona #1. Zbog umiranja 42% ćelija wt pri koncentraciji od 5 mM, ova koncentracija STZ-a je u narednim eksperimentima korišćena kao EC₅₀. Rezultati testa vijabilnosti pokazali su da CXCL12 pospešuje preživljavanje beta ćelija pankreasa, s obzirom da su ćelije klona #1 pokazale smanjenu osetljivost na dejstvo STZ-a.

Budući da STZ svoje toksično dejstvo na ćelije ispoljava putem oštećenja DNK, u sledećem eksperimentu koristeći komet esej, ispitan je stepen oštećenja DNK tokom oksidativnog stresa izazvanog dijabetogenim stimulusom (STZ-om) (Slika 4.4). Rin-5F ćelije (wt i klon #1) tretirane su 5 mM STZ-om 30 min. Po završetku tretmana, ćelije su ukalupljene u agarozu na mikroskopskoj pločici, nakon čega je sledila liza ćelija. Elektroforeza se odvijala u baznom puferu (pH 13), što je omogućilo denaturaciju DNK i analizu kako jedno- tako i dvolančanih prekida na DNK. Elektroforetskim razdvajanjem oštećeni DNK delovi putuju iz jedra u pravcu katode (u smeru struje) čime se formiraju strukture koje podsećaju na komete. Količina DNK prisutna u repu komete, ukazuje na intenzitet DNK oštećenja. U kontrolnim uslovima veliki broj ćelija (90-95%) wt i klona #1 je bio bez repa komete (Slika 4.4), na osnovu čega se zaključuje da u ovim ćelijama nema DNK oštećenja. Nakon tretmana STZ-om, velika količina DNK nalazila se u repu komete, što ukazuje na visok nivo dvolančanih prekida na DNK. Analizom momenta repa komete koji predstavlja proizvod dužine repa i procenta DNK u repu komete, uočeno je statistički značajno ($p < 0,001$) smanjenje DNK oštećenja u ćelijama klona #1 u odnosu na wt ćelije tokom tretmana STZ-om (Slika 4.4). S obzirom da je uočen 1,3 puta manji stepen oštećenja

DNK u ćelijama klona #1 tj. u beta ćelijam pankreasa koje pojačano eksprimiraju CXCL12, može se zaključiti da CXCL12 aktivira signalne puteve u ćeliji, koji doprinose očuvanju DNK tokom oksidativnog stresa izazvanog dijabetogenim stimulusom.



Slika 4.4. DNK oštećenje u Rin-5F wt i Rin-5F klon #1 ćelijama u uslovima oksidativnog stresa. Stepen DNK oštećenja u Rin-5F wt i Rin-5F klon #1 ćelijama nakon tretmana STZ-om utvrđen je pomoću komet eseja. Prikazana je srednja vrednost \pm standardna greška momenta repa komete (parametra DNK oštećenja) dobijenih iz tri nezavisna eksperimenta. Srednje vrednosti momenta repa komete su bile statistički značajno različite (***) za STZ-om tretirane ćelije u odnosu na vrednosti dobijene za kontrolne, ne-tretirane ćelije ($p < 0,001$). Srednje vrednosti momenta repa komete dobijene nakon tretmana STZ-om za klon #1 ćelije su bile statistički značajno različite (###) u poređenju sa vrednostima dobijenim posle tretmana wt ćelija STZ-om ($p < 0,001$).

Budući da je pokazano da pojačano prisustvo CXCL12 doprinosi očuvanju DNK integriteta i pospešuje preživljavanje beta ćelija pankreasa nakon primene dijabetogenog agensa, sledeći korak je bio ispitivanje molekularnih mehanizama njegove transkripcione regulacije. Identifikacija transkripcionih faktora koji učestvuju u regulaciji ekspresije gena koji kodiraju proteine koji imaju važnu ulogu u normalnom funkcionisanju i preživljavanju beta ćelija, može doprineti razvoju novih strategija za prevenciju i lečenje dijabetesa.

4.2. REGULACIJA TRANSKRIPCIJE GENA ZA CXCL12 (*Cxcl12*)

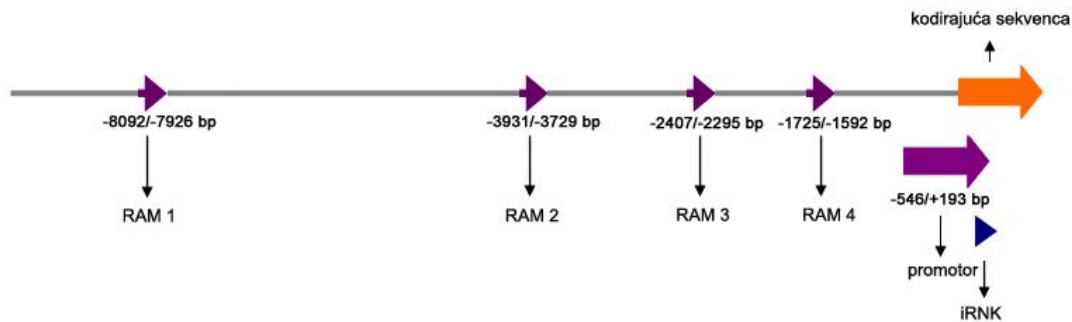
4.2.1. ANALIZA 5' REGIONA *Cxcl12*

U cilju rasvetljavanja molekularnih mehanizama koji regulišu *Cxcl12* transkripciju, identifikovane su DNK regulatorne sekvence uzvodno od *Cxcl12* kodirajuće sekvence. Kompjuterskom predikcijom, SIDD analizom, ispitano je prisustvo RAM elemenata u 10 kb dugom 5' regionu CXCL12 gena (NCBI Referentna Sekvenca: NC_005103.3), dok je pomoću kompjuterskog programa Genomatix (Genomatix, Minhen, Nemačka) definisana promotorska sekvenca *Cxcl12*.

SIDD analizom mapirana su četiri potencijalna RAM elementa u uzvodnom 5' kraju CXCL12 gena: RAM 1 (-8092/-7926 bp), RAM 2 (-3931/-3729 bp), RAM 3 (-2407/-2295 bp) i RAM 4 (-1725/-1592 bp) (Slika 4.5). Genomatix je definisao 739 bp dug promotor (-546/+193), a kodirajuća sekvenca počinje na +87 nukleotidu.

4.2.2. INTERAKCIJE RAM-VEZUJUĆIH PROTEINA SA RAM 4 ELEMENTOM

SIDD analiza identifikovala je četiri potencijalna RAM elementa (Slika 4.5). Najudaljeniji RAM (RAM 1) je 0,8 kb udaljen od mesta početka transkripcije (eng. *transcription start site*, TSS), dok se ostali RAM elementi nalaze na rastojanju od oko 0,4 kb (RAM 2), 0,23 kb (RAM 3) i 0,16 kb (RAM 4) od TSS. Zbog male verovatnoće da prva tri RAM elementa učestvuju u regulaciji ekspresije CXCL12 gena, usled velike udaljenosti od mesta početka transkripcije i zbog mogućnosti da su regulatorni elementi nekog drugog gena koji se nadovezuje na *Cxcl12*, nije analizirano vezivanje RAM-vezujućih proteina za RAM 1, RAM 2 i RAM 3. Ispitana je interakcija proteina sa RAM 4 elementom, koji je najbliži TSS i nalazi se na poziciji -1725/-1592 bp.



Slika 4.5. Shematski prikaz uzvodnog 5' regiona CXCL12 gena. Prikazane su pozicije potencijalnih RAM elemenata, promotora, početka kodirajuće sekvence i početka sinteze iRNK.

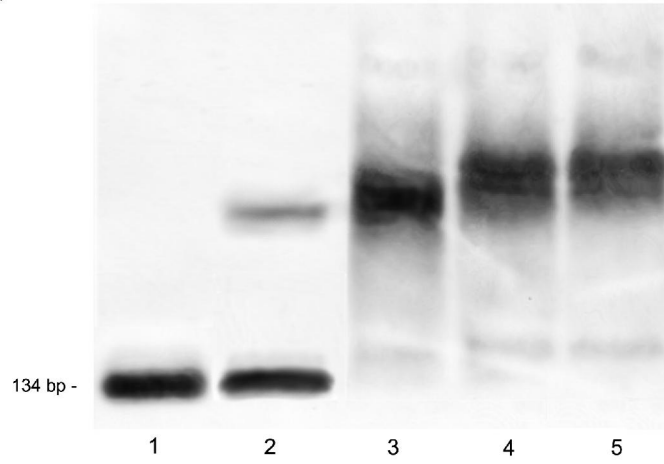
4.2.2.1. *In vitro* interakcije RAM-vezujućih proteina i RAM 4 elementa

Pomoću *in vitro* tehnike elektroforetskog zaostajanja (eng. *electrophoretic mobility-shift assay*, **EMSA**) ispitana je sposobnost RAM-vezujućih proteina, PARP-1, HMG I/Y, lamin B i C1D, da vežu RAM 4 element. PCR-om, koristeći specifične prajmere obeležene biotinom, umnožen je 134 bp dugačak RAM 4 element. Biotinilovani krajevi DNK omogućuju vizuelizaciju DNK u formiranim nukleoproteinskim kompleksima nakon EMSA. Nakon inkubacije RAM 4 elementa sa proteinima u puferu za vezivanje, uzorak je nanešen na agarozni gel. Po završetku elektroforeze, izvršen je transfer sa gela na membranu, nakon čega je usledila vizuelizacija DNK.

Interakcije PARP-1 sa RAM 4 elementom prikazane su na Slici 4.6A. Na Slici 4.6A, kolona 2, uočava se traka, dugačka 134 bp, koja odgovara RAM 4 elementu, kao i traka iznad, koja odgovara kompleksu rekombinovanog PARP-1 proteina (recPARP-1) i RAM 4 elementa koji sporije putuje u gelu u poređenju sa slobodnim DNK fragmentom. Nakon inkubacije RAM 4 elementa i jedarnih proteina izolovanih iz Rin-5F wt ćelija, formiran je veliki kompleks proteina sa RAM 4 elementom, koji je sporije putovao u gelu u odnosu na recPARP-1 - RAM 4 kompleks, što ukazuje da se pored PARP-1 za RAM 4 vezuju i drugi jedarni proteini (Slika 4.6A, kolona 3).

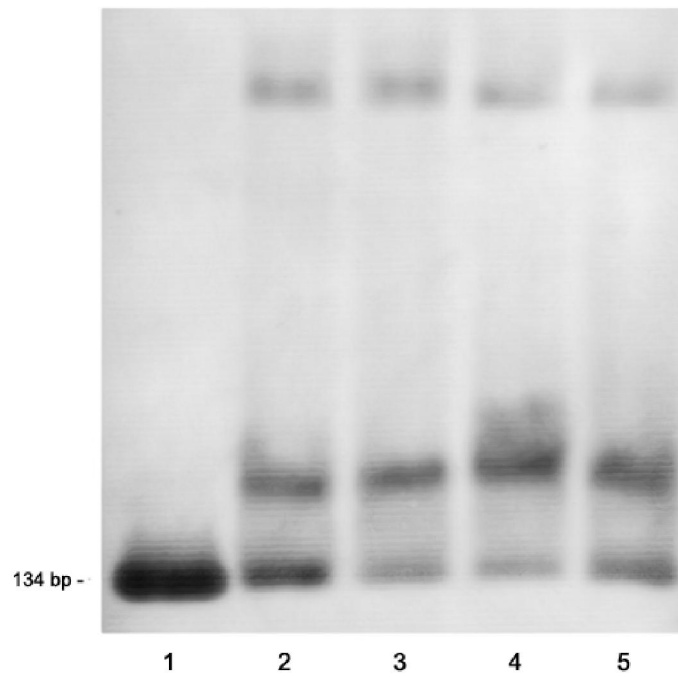
A

PARP-1 antitelo	-	-	-	H-250 +	R&D +
jedarni lizat	-	-	+	+	+
rekombinovani PARP-1	-	+	-	-	-
DNK (RAM 4)	+	+	+	+	+



B

antitelo	-	-	HMG I/Y +	LAMIN B +	C1D +
jedarni lizat	-	+	+	+	+
DNK (RAM 4)	+	+	+	+	+



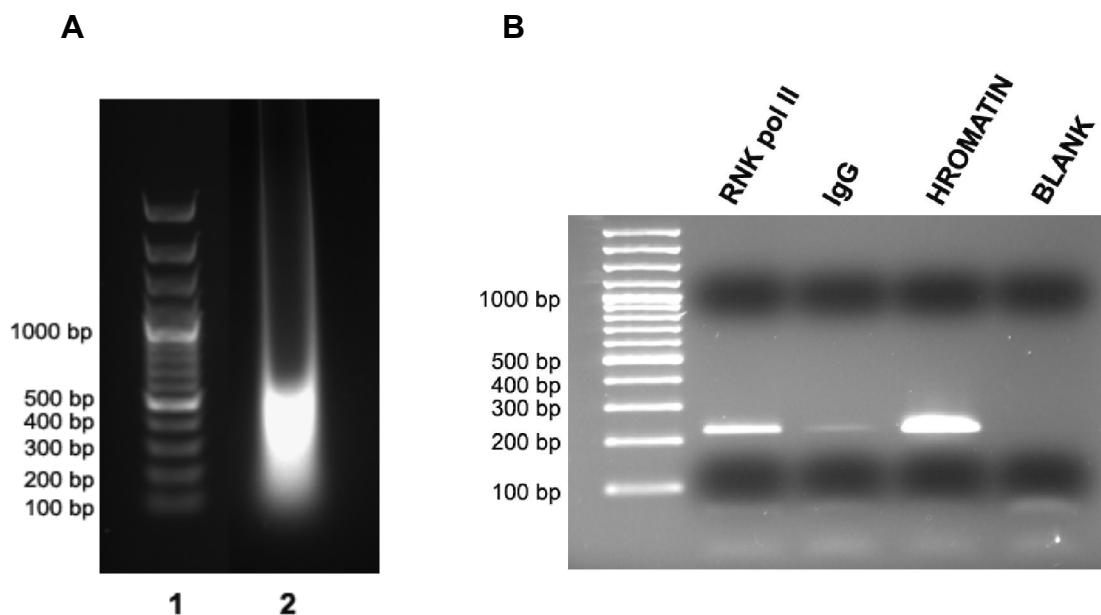
Slika 4.6. Afinitet vezivanja RAM-vezujućih proteina za RAM 4 element ispitan je pomoću tehnike elektroforetskog zaostajanja. (A) Interakcije između RAM 4 elementa i PARP-1. Krajevi RAM 4 elementa su obeleženi biotinom što potvrđuje da PARP-1 vezuje specifičnu sekvencu u okviru RAM 4. Vezivanje PARP-1 za RAM 4 je potvrđeno nakon inkubacije rekombinovanog PARP-1 sa RAM 4 (kolona 2). Analiza super-pomaka je izvršena pomoću dva anti-PARP-1 antitela (kolone 4 i 5). (B) Interakcije između RAM 4 elementa i HMG I/Y, LAMIN B i C1D proteina. Analiza super-pomaka je izvršena koristeći anti-HMG I/Y (kolona 4), anti-lamin B (kolona 5) i anti-C1D (kolona 5) antitela.

Da bi se potvrdilo vezivanje PARP-1 za RAM 4 element, tokom inkubacije RAM 4 sa jedarnim proteinima dodato je antitelo na PARP-1 protein. Nakon razdvajanja kompleksa, zapaženo je prisustvo super-pomaka (eng. *super-shift*), jer je protein – RAM 4 kompleks zbog vezivanja anti-PARP-1 antitela sporije putovao u gelu (Slika 4.6A, kolone 4 i 5). Korišćenjem 2 različita anti-PARP-1 antitela (Santa Cruz, H-250 i R&D), analizom super-pomaka, pokazano je da PARP-1 vezuje RAM 4 element *in vitro*. Prisustvo biotina na krajevima PCR-om umnoženog RAM 4 elementa isključuje mogućnost da je PARP-1 vezan za krajeve DNK sekvence i potvrđuje vezivanje PARP-1 za specifičnu sekvencu unutar RAM 4 elementa.

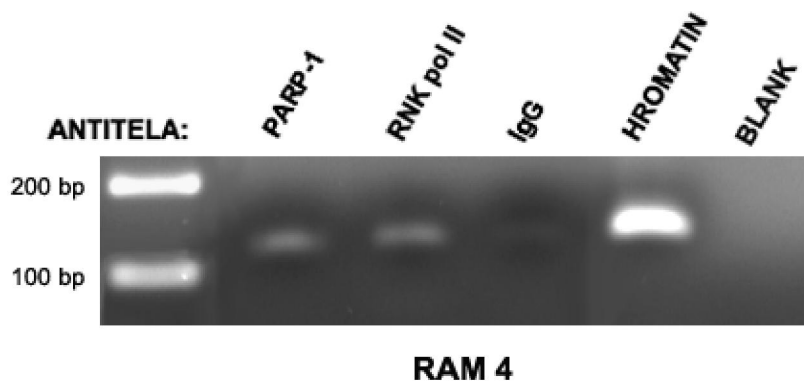
Ispitivanje *in vitro* interakcija RAM 4 elementa sa proteinima HMG I/Y, lamin B i C1D prikazano je na Slici 4.6B. Nakon inkubacije RAM 4 elementa sa jedarnim proteinima, zapaženo je prisustvo trake od 134 bp, kao i 2 sporije trake, koje odgovaraju kompleksima između RAM 4 i jedarnih proteina (Slika 4.6B, kolona 2). Dodavanjem antitela na HMG I/Y (Slika 4.6B, kolona 3) i C1D (Slika 4.6B, kolona 5) u EMSA reakciju, nije došlo do promene u formiranim protein – DNK kompleksima, što ukazuje da ova 2 RAM-vezujuća proteina ne interaguju sa RAM 4 elementom. Dodavanjem antitela na lamin B u EMSA reakciju, formiran je „oblak“ iznad protein – DNK kompleksa. Takođe, došlo je do blagog zaostajanja formiranog protein – DNK kompleksa, i trake od 134 bp, koja odgovara RAM 4 elementu (Slika 4.6B, kolona 4). Ovi rezultati ukazuju da lamin B vezuje RAM 4 element sa malim afinitetom.

4.2.2.2. *In vivo* interakcija PARP-1 i RAM 4 elementa

Pomoću imunoprecipitacije hromatina (eng. *Chromatin immunoprecipitation, ChIP*) ispitano je da li PARP-1 vezuje RAM 4 element *in vivo*. Konfluentne Rin-5F wt ćelije tretirane su formaldehidom u cilju učvršćivanja veza između DNK i proteina i proteina međusobno. Nakon toga je izolovan i ultrazvukom fragmentisan kroslinkovan hromatin. Hromatin je iscepkao na fragmente veličine 200-600 bp (Slika 4.7A). Ovo je optimalna fragmentacija hromatina, pošto nisu dobijeni fragmenti kraći od samog RAM 4 elementa, što bi onemogućilo njegovo umnožavanje, s obzirom da je RAM 4 dugačak 134 bp. Zatim je sledila, imunoprecipitacija hromatina sa anti-PARP-1 antitelom. Kao pozitivna kontrola imunoprecipitacije korišćena je RNK polimeraza II (RNK pol II), zbog svoje sposobnosti da nespecifično veže DNK, jer ova polimeraza vrši transkripciju velikog broja gena vezujući najrazličitije DNK sekvence. Anti-Imunoglobulin G (IgG) antitelo korišćeno je kao negativna kontrola imunoprecipitacije, s obzirom da ovo antitelo ne prepoznaje DNK-vezujuće proteine. Sledilo je uklanjanje proteina iz hromatina i prečišćavanje DNK koja je služila kao matrica za umnožavanje DNK regiona od interesa. Za kontrolu imunoprecipitacije hromatina, rađena je PCR reakcija sa prajmerima za β -aktin. Kao pozitivna kontrola PCR reakcije korišćena je genomska DNK tj. fragmenisan hromatin nakon uklanjanja proteina. U negativnu kontrolu PCR reakcije (blank) umesto DNK dodata je voda. Očekivani aktinski fragment dužine 230 bp, dobijen je u PCR reakciji koja je kao matricu sadržala DNK, dobijenu nakon imunoprecipitacije sa RNK pol II, dok PCR produkt nije detektovan u PCR reakciji čija je matrica bila DNK dobijena nakon imunoprecipitacije sa IgG (Slika 4.7B). Zatim je PCR reakcijom, koristeći specifične prajmere za RAM 4 element (sekvence prajmera su prikazana u poglavlju Materijal i metode u Tabeli 3.1), amplifikovana DNK dobijena nakon imunoprecipitacije sa anti-PARP-1 antitelom kao i odgovarajuće, gore navedene kontrole imunoprecipitacije i PCR-a. Nakon razdvajanja PCR produkta agaroznom elektroforezom, uočena je traka od 134 bp (Slika 4.8), koja dogovara RAM 4 elementu, što ukazuje da PARP-1 vezuje RAM 4 element *in vivo*.



Slika 4.7. Kontrola imunoprecipitacije i fragmentacije hromatina. (A) Elektroforetsko razdvajanje fragmentisanog hromatina u agaroznom gelu. Poređenjem sa DNK standardom (kolona 1) uočava se da je hromatin fragmentisan na fragmente dužine 200-600 bp (kolona 2). (B) Kontrola imunoprecipitacije hromatina izvršena je pomoću PCR reakcije koristeći prajmere za β -aktin. Za imunoprecipitaciju, RNK pol II je služila kao pozitivna, a IgG kao negativna kontrola. Za PCR reakciju genomska DNK dobijena uklanjanjem hromatinskih proteina je korišćena kao pozitivna, a voda, odnosno blank kao negativna kontrola. PCR produkti umnoženi korišćenjem prajmera za β -aktin razdvojeni su elektroforezom u agaroznom gelu.



Slika 4.8. *In vivo* interakcija PARP-1 i RAM 4 elementa. Afinitet vezivanja PARP-1 za RAM 4 element analiziran je metodom hromatinske imunoprecipitacije (ChIP). Hromatin je imunoprecipitovan koristeći anti-PARP-1 antitelo. Vezivanje PARP-1 za RAM 4 element potvrđeno je umnožavanjem RAM 4 elementa, dužine 134 bp, PCR reakcijom. Kontrole imunoprecipitacije i PCR reakcije objašnjene su u okviru legende za Sliku 4.7.

4.2.3. KARAKTERIZACIJA *Cxcl12* PROMOTORA

Kompjuterska predikcija Genomatix-a definisala je 739 bp dugačak *Cxcl12* promotor (Slika 4.9). Analizom promotorskih elemenata utvrđeno je da promotor sadrži nekanonski TATA element (eng. *non-canonical TATA box*) na poziciji -25/-20 bp, sa citozinom umesto adenozina na drugoj poziciji, što je takođe uočeno kod promotora gena za CXCL12 čoveka (Garcia-Moruja i sar., 2005). Promotor sadrži inicijator element (Int; od +13 do +20 bp), čija sekvenca je u saglasnosti sa prihvaćenom Int-konsenzus sekvencom (KYAYTCYYY, gde Y označava C/T, a K znači G/T). Nizvodno od Int elementa, nalazi se potencijalna Kozak sekvenca (GCCATGG), na poziciji +84/+90 bp, koja sadrži inicijacioni ATG kodon za početak translacije. Potencijalna Kozak sekvenca *Cxcl12*, se u potpunosti podudara sa konsenzus sekvencom kičmenjaka (RCCATGG, gde R označava A ili G) (Kozak, 1984). Uočeno je da se potencijalna Kozak sekvenca poklapa sa vezivnim mestom za transkripcioni faktor YY1 (+84/+90 bp). Promotor *Cxcl12* je bogat GC bazama, koje čine 62,5% promotorske sekvence i potencijalno upućuje na mogućnost epigenetske regulacije transkripcije *Cxcl12* putem metilacije promotora.

Promotor *Cxcl12* je analiziran u cilju pronalazjenja potencijalnih vezivnih mesta za transkripcione faktore pomoću kompjuterskih predikcija: ALGGEN-PROMO, MatInspector i TRANSFAC.



Slika 4.9. Shematski prikaz promotora CXCL12 gena. Prikazani su promotorski elementi i potencijalna mesta vezivanja YY1, C/EBPβ, C/EBPα, STAT3, p53, FOXO3a, Sp1, HMG I/Y i NF-κB transkripcionih faktora na osnovu analize programa ALGEN-PROMO, MatInspector i TRANSFAC. Potencijalna mesta vezivanja za PARP-1 preuzeta su od Akiyama i sar. (2001) i Vidaković i sar. (2009).

Kompjuterski programi su pokazali da u okviru *Cxcl12* promotora postoje dva potencijalna mesta vezivanja za NF-κB (-523/-514 bp i -198/-189 bp), četiri za HMG I/Y (-521/-515 bp, -317/-311 bp, -197/-191 bp i -119/-113 bp), šest potencijalnih mesta vezivanja za C/EBPα (-459/-454 bp, -449/-444 bp, -359/-354 bp, -339/-334 bp, +41/+46 bp i +172/+177 bp), sedam za C/EBPβ (-459/-453 bp, -449/-443 bp, -360/-354 bp, -340/-334 bp, -229/-222 bp, +41/+47 bp i +171/+177 bp), petnaest za p53 (-450/-444 bp, -270/-264 bp, -221/-215 bp, -

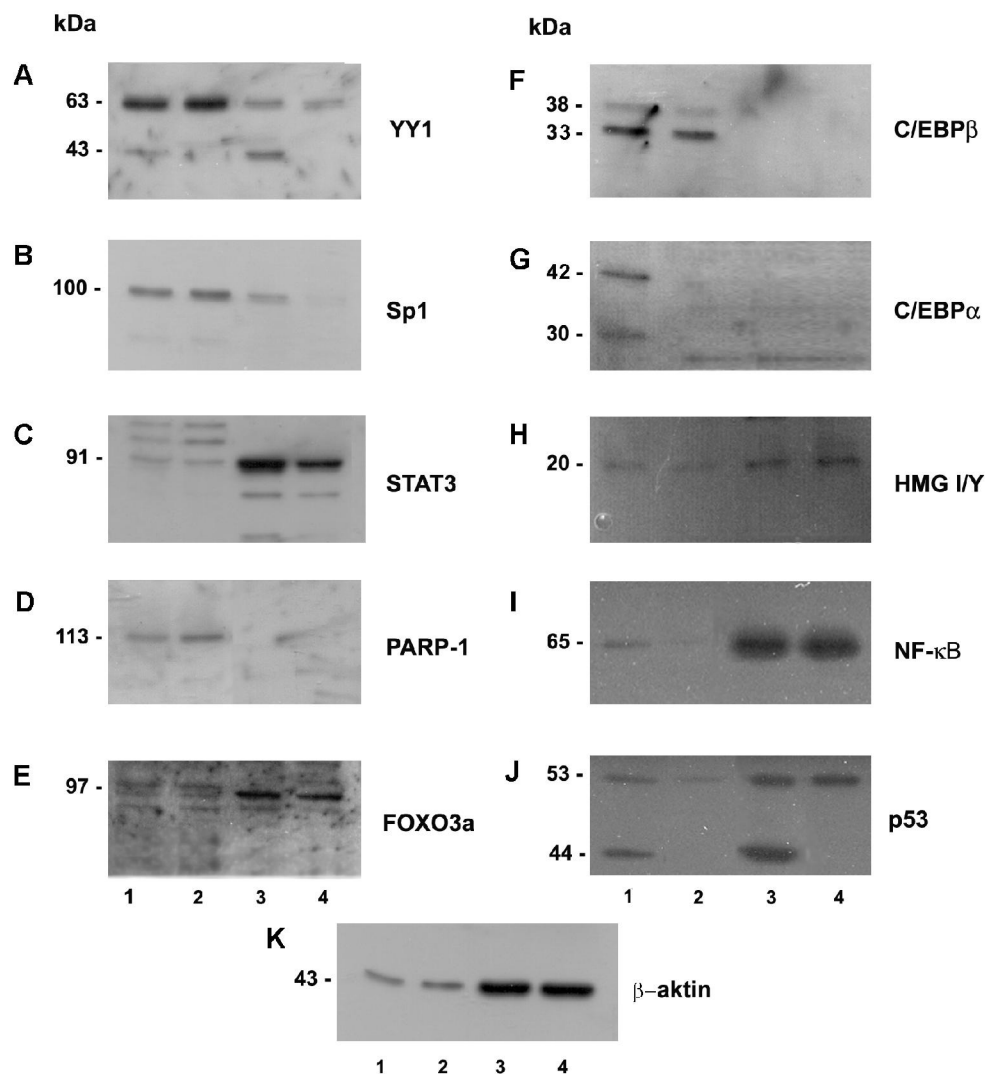
154/-148 bp, -116/-110 bp, -64/-58 bp, -52/-46 bp, -47/-41 bp, -20/-14 bp, +43/+49 bp, +67/+73 bp, +75/+81 bp, +111/+117 bp, +160/+166 bp i +173/+179 bp), tri za FOXO3a (-446/-439 bp, -294/-287 bp i -263/-256 bp), četiri za YY1 (-432/-424 bp, -421/-413 bp, -245/-239 bp i +84/+90 bp), jedan za STAT3 (-320/-314 bp) i deset za Sp1 (-216/-211 bp, 155/-147 bp, -116/-111 bp, -65/-57 bp, -46/-41 bp, -21/-13 bp, -11/-1 bp, +65/+75 bp, +76/+81 bp, +159/+167 bp). S obzirom da je sposobnost PARP-1 da veže specifične DNK sekvence relativno skoro otkrivena, u kompjuterskim programima za predikciju vezivnih mesta transkripcionih faktora, se još uvek ne nalaze PARP-1 vezujuće konsenzus sekvence. Međutim, na osnovu literaturnih podataka utvrđeno je da PARP-1 poseduje tri potencijalna vezivna mesta u *Cxcl12* promotoru: 5'-GGCCT-3' na poziciji -187/-183 bp (Vidaković i sar., 2009) i 5'-TGCCC-3' na pozicijama -448/-444 bp i +45/+49 bp (Akiyama i sar., 2001).

4.2.4. INTERAKCIJE TRANSKRIPCIONIH FAKTORA SA *Cxcl12* PROMOTOROM

4.2.4.1. Prisustvo transkripcionih faktora koji imaju potencijalna mesta vezivanja u okviru *Cxcl12* promotora u Rin-5F ćelijama

Pre nego što se pristupilo ispitivanju interakcija transkripcionih faktora sa promotorom *Cxcl12*, ispitano je prisustvo transkripcionih faktora, koji na osnovu kompjuterske predikcije imaju vezivno mesto u promotoru, u jedru i citosolu Rin-5F wt ćelija. Imunoblot analiza je pokazala prisustvo YY1 proteina, molekulske mase 63 kDa, u jedru i u manjoj meri u citosolu Rin-5F wt ćelija. U citosolu i jedru wt ćelija, anti-YY1 antitelo je detektovalo i traku veličine 43 kDa, koja odgovara degradacionom produktu YY1 proteina (Slika 4.10A, kolone 1 i 3). Imunoblot analizom uočeno je i prisustvo Sp1, STAT3, FOXO3a HMG I/Y i NF-κB proteina u jedru i citosolu wt ćelija (Slika 4.10B, C, E, H i I, kolone 1 i 3). Antitelom na PARP-1 potvrđeno je prisustvo ovog proteina u jedru wt ćelija (Slika 4.10D, kolona 1). Imunoblot analizom na prisustvo C/EBPβ, ovaj protein detektovan je u vidu izoformi od 33 i 38 kDa u jedru wt ćelija (Slika 4.10F, kolona 1). Anti-C/EBPα antitelo pokazalo je da je ovaj protein prisutan u jedru wt ćelija u izoformama

od 30 i 42 kDa (Slika 4.10G, kolona 1). Protein p53 se nalazi u jedru i citosolu wt ćelija u vidu izoformi od 53 i 44 kDa (Slika 4.10J, kolone 1 i 3).



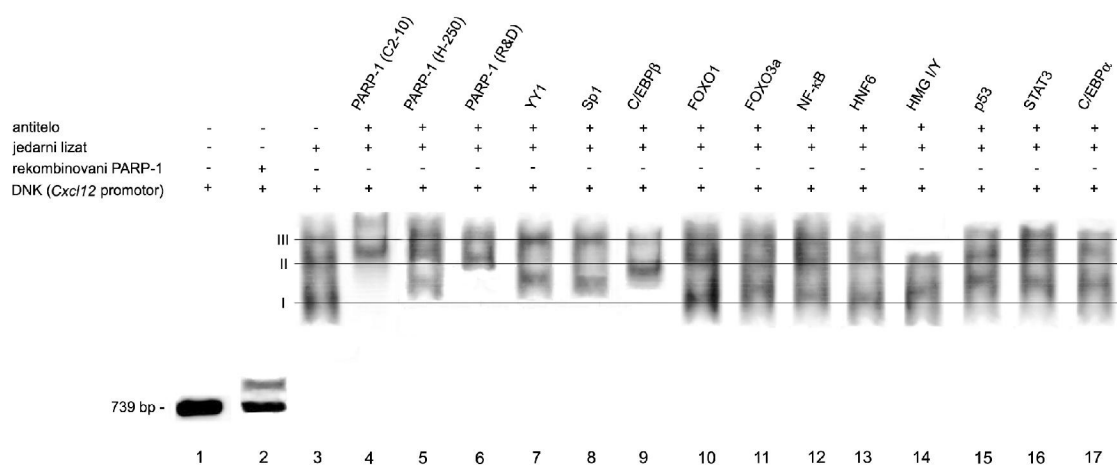
Slika 4.10. Prisustvo transkripcionih faktora koji imaju potencijalna mesta vezivanja u okviru *Cxcl12* promotora u jedru i citosolu Rin-5F wt i Rin-5F klon #1 ćelija. Imunoblot analiza proteina izolovanih iz jedra wt ćelija (kolona 1), jedra klon #1 ćelija (kolona 2), citosola wt ćelija (kolona 3) i citosola klon # 1 ćelija (kolona 4) na prisustvo YY1 (A), Sp1 (B), STAT3 (C), PARP-1 (D), FOXO3a (E), C/EBPβ (F), C/EBPα (G), HMG I/Y (H), NF-κB (I), p53 (J) i β-aktin (K) proteina.

4.2.4.2. *In vitro* interakcije transkripcionih faktora sa *Cxcl12* promotorom

Pošto je imunoblot analiza pokazala prisustvo svih transkripcionih faktora u jedru Rin-5F wt ćelija, koji na osnovu kompjuterske predikcije imaju vezivno mesto u okviru promotora, sledeći korak je bio ispitivanje koji od pomenutih transkripcionih faktora vezuje promotor i reguliše transkripciju *Cxcl12*. Pomoću tehnike EMSA, za svaki transkripcioni faktor analiziran je afinitet vezivanja *Cxcl12* promotora. PCR reakcijom, koristeći prajmere obeležene biotinom, umnožen je 739 bp dugačak *Cxcl12* promotor. Biotiom obeležen *Cxcl12* promotor inkubiran je sa jedarnim proteinima, izolovanim iz Rin-5F wt ćelija, a potom su protein-DNK kompleksi razdvojeni agaroznom elektroforezom. EMSA je pokazala da su formirana tri protein-DNK kompleksa između jedarnih proteina i *Cxcl12* promotora (Slika 4.11, kolona 3), što ukazuje da više jedarnih proteina vezuje promotor. Analizom super-pomaka ispitano je vezivanje svakog pojedinačnog transkripcionog faktora za promotor. Kada se u EMSA reakciju doda antitelo na protein od interesa, zaostajanje ili nestajanje protein-DNK kompleksa, ukazuje da ispitivani protein vezuje DNK sekvencu. Zaostajanje protein-DNK kompleksa može nastati tako što se antitelo vezuje za protein koji je direktno vezan za DNK i pošto antitelo doprinosi veličini kompleksa, nagrađeni kompleks sporije putuje u gelu u odnosu na sam protein-DNK kompleks. Pored toga, zaostajanje može biti posledica vezivanja ispitivanog proteina za neki drugi protein koji je direktno vezan za DNK, što znači da je ispitivani protein indirektno, preko interagujućeg partnera vezan za DNK. Sa druge strane, nestajanje protein-DNK kompleksa je posledica vezivanja antitela za DNK-vezujući domen proteina, čime se sprečava vezivanje proteina za DNK, što ukazuje da je ispitivani protein u direktnoj interakciji sa DNK.

U EMSA reakciji, sa *Cxcl12* promotorom i jedarnim proteinima inkubirano je i antitelo na ispitivani transkripcioni faktor (Slika 4.11). Prisustvo antitela na YY1 (Slika 4.11, kolona 7), Sp1 (Slika 4.11, kolona 8), C/EBP β (Slika 4.11, kolona 9), p53 (Slika 4.11, kolona 15), STAT3 (Slika 4.11, kolona 16) i C/EBP α (Slika 4.11, kolona 17) protein u EMSA reakciji izazvalo je zaostajanje I i II protein-DNK kompleksa. U reakciji super-pomaka sa anti-FOXO3a antitelom sporije je putovao I kompleks (Slika 4.11, kolona 11).

Dodavanjem anti-HMG I/Y antitela uočeno je nestajanje III kompleksa, što može biti posledica vezivanja antitela za DNK vezujući domen HMG I/Y proteina, čime je sprečeno vezivanje HMG I/Y za *Cxcl12* promotor (Slika 4.11, kolona 14). Prisustvo antitela na NF- κ B protein u reakciji, nije izazvalo zaostajanje ili nestajanje formiranog protein-DNK kompleksa, što ukazuje da NF- κ B ne vezuje *Cxcl12* promotor, iako poseduje vezivno mesto u okviru promotora (Slika 4.11, kolona 12). Kao negativne kontrole u EMSA reakcijama, korišćena su antitela na dva transkripciona faktora, FOXO1 i HNF6, koja nemaju mesta vezivanja u promotoru, čijim dodavanjem nije došlo do promena u formiranim protein-DNK kompleksima (Slika 4.11, kolone 10 i 13). Afinitet vezivanja PARP-1 za *Cxcl12* promotor, ispitan je sa tri različita anti-PARP-1 antitela (ALEXIS, C2-10; Santa Cruz, H-250 i R&D).



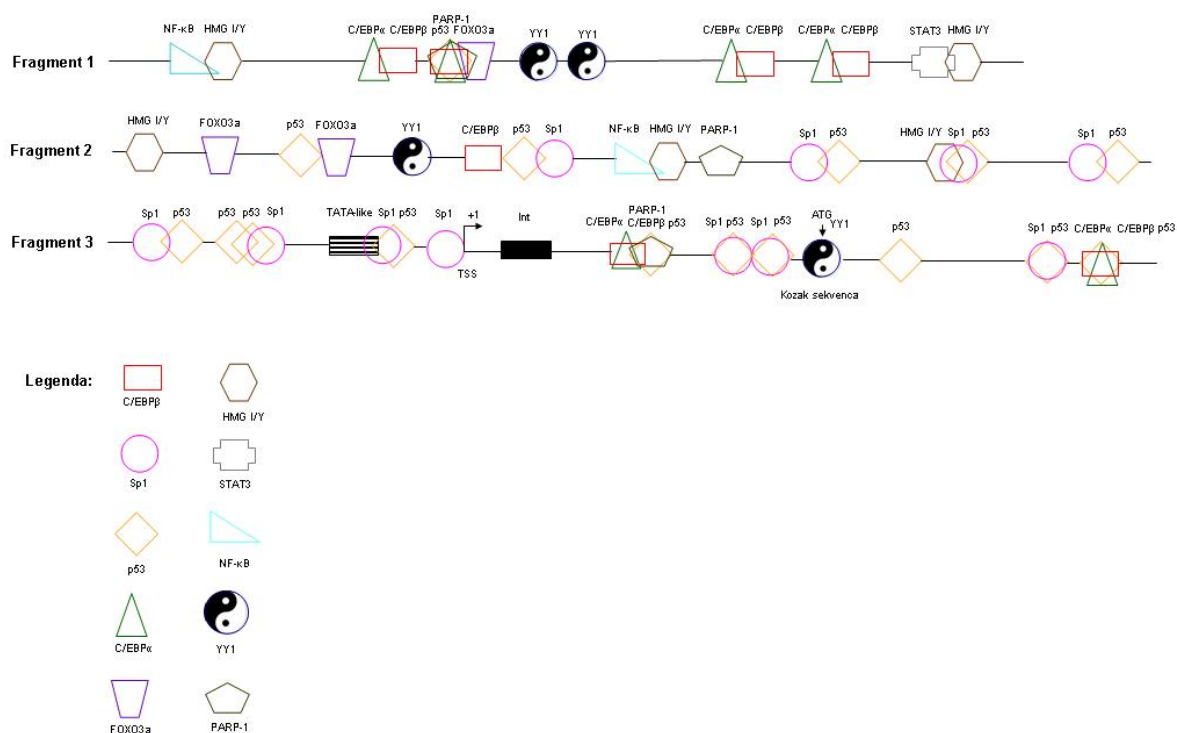
Slika 4.11. *In vitro* interakcije transkripcionih faktora i promotora *Cxcl12*. Afinitet vezivanja transkripcionih faktora za *Cxcl12* promotor utvrđen je korišćenjem tehnike EMSA. Analizom superpomaka, koristeći antitelo na transkripcioni faktor od interesa ispitano je vezivanje PARP-1 (kolone 4, 5, 6), YY1 (kolona 7), Sp1 (kolona 8), C/EBP β (kolona 9), FOXO1 (kolona 10), FOXO3a (kolona 11), NF- κ B (kolona 12), HNF6 (kolona 13), HMG I/Y (kolona 14), p53 (kolona 15), STAT3 (kolona 16), C/EBP α (kolona 17). Interakcija PARP-1 sa promotorom *Cxcl12* potvrđena je nakon inkubacije rekombinovanog PARP-1 sa promotorom *Cxcl12* (kolona 2).

U reakcijama super-pomaka sa tri pomenuta anti-PARP-1 antitela, došlo je do zaostajanja I kompleksa (Slika 4.11, kolone 4, 5, i 6), dok je u reakciji sa antitelom ALEXIS (C2-10), došlo do zaostajanja i II i III protein-DNK kompleksa (Slika 4.11, kolona 4). Vezivanje PARP-1 za *Cxcl12* promotor, dodatno je potvrđeno inkubacijom promotora sa rekombinovanim PARP-1 proteinom. Nakon razdvajanja kompleksa na gelu, zapažena je traka od 739 bp, koja odgovara promotoru, kao i sporija traka, koja predstavlja kompleks PARP-1 – *Cxcl12* promotor (Slika 4.11, kolona 2). Na osnovu ovih rezultata može se izvesti zaključak da transkripcioni faktori: PARP-1, YY1, Sp1, C/EBP β , FOXO3a, HMG1/Y, p53, STAT3 i C/EBP α vezuju *Cxcl12* promotor *in vitro*. Sa druge strane, NF- κ B uprkos postojanju vezivnog mesta, ne interaguje sa *Cxcl12* promotorom.

4.2.4.3. *In vivo* interakcije transkripcionih faktora sa *Cxcl12* promotorom

Pomoću metode imunoprecipitacije hromatina (ChIP) ispitano je da li se detektovane interakcije transkripcionih faktora sa *Cxcl12* promotorom dešavaju *in vivo*. ChIP predstavlja *in vivo* tehniku pošto se pomoću nje ispituju interakcije između DNK i proteina u živoj, intaktnoj ćeliji. Najčešće se koristi za analizu vezivanja transkripcionih faktora za promotore ispitivanih gena. Metoda se izvodi tako što se žive ćelije tretiraju nekim agensom za unakrsno vezivanje (eng. *cross-linking*), kao što je formaldehid. Na ovaj način se učvrste interakcije između DNK i proteina i proteina međusobno, tako da se može reći da se na ovaj način ćelija „zaledi“ u određenom fiziološkom stanju. Zatim sledi liziranje ćelija i fragmentisanje hromatina, koji se koristi za imunoprecipitaciju sa antitelom na protein od interesa. Nakon imunoprecipitacije, vrši se uklanjanje proteina i prečišćavanje DNK, koja služi kao matrica u PCR reakciji. Koristeći specifične prajmere kojima se umnožava analizirana DNK sekvenca, utvrđuje se da li je ispitivani protein asosovan sa ovom DNK sekvencom *in vivo*.

Da bi se detaljnije ispitala vezivna mesta transkripcionih faktora u okviru *Cxcl12* promotora, 739 bp dug promotor je podeljen na 3 fragmenta.

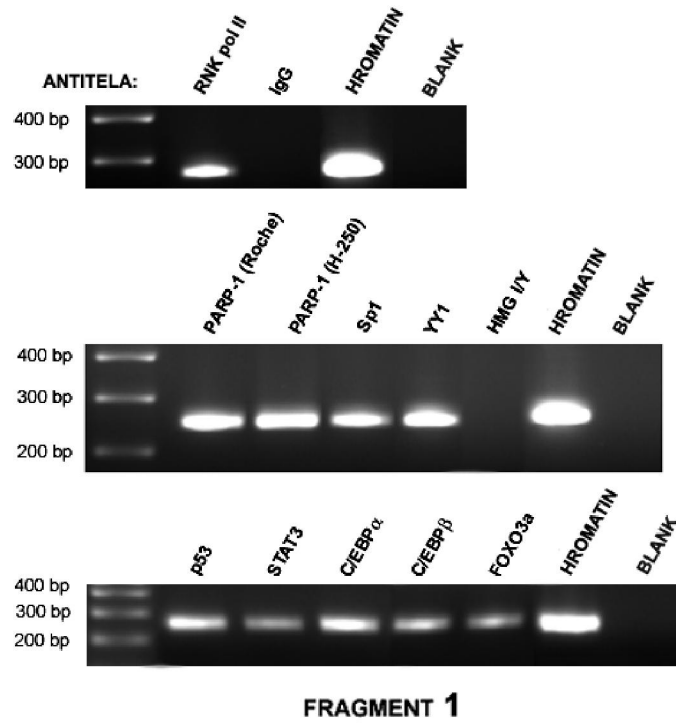
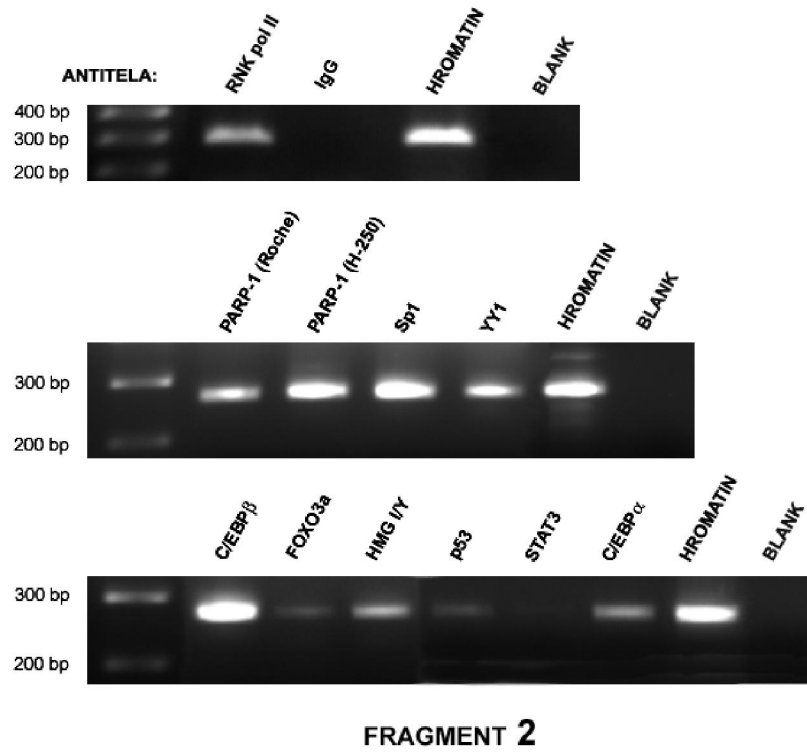


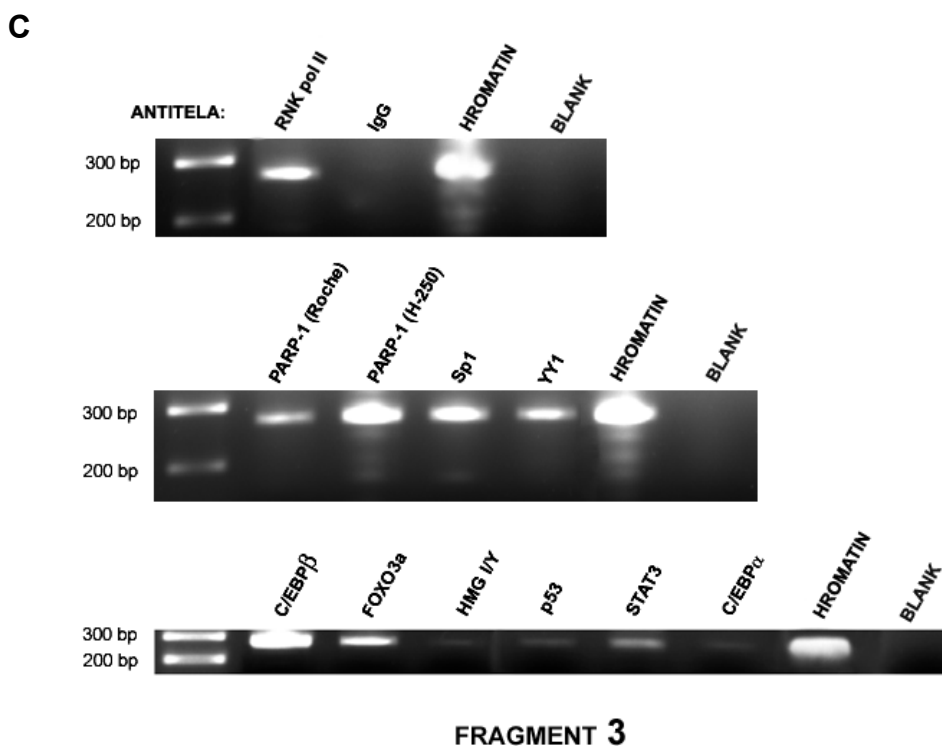
Slika 4.12. Shematski prikaz fragmenata *Cxcl12* promotora. Prikazani su promotorski fragmenti CXCL12 gena (fragment 1, 2 i 3) kao i potencijalna mesta vezivanja ispitivanih transkripcionih faktora u okviru svakog promotorskog fragmenta.

Fragment 1 je bio dužine 247 bp (-546/-299 bp), fragment 2 – 265 bp (-319/-54 bp) i fragment 3 je bio 267 bp dugačak i nalazio se na poziciji od -74 do +193 bp. Na slici 4.12 dat je shematski prikaz promotorskih fragmenata i vezivnih mesta transkripcionih faktora u okviru svakog fragmenta.

Svaki od tri promotorska fragmenta sadrži PARP-1 vezivno mesto (Slika 4.12). Koristeći dva različita anti-PARP-1 antitela (Santa Cruz, H-250 i Roche), pokazano je da PARP-1 vezuje sva tri promotorska fragmenta (Slika 4.13).

Transkripcioni faktor Sp1 vezuje sva tri promotorska fragmenta, uprkos činjenici da poseduje vezivno mesto samo unutar drugog i trećeg fragmenta (Slika 4.12 i 4.13).

A**B**



Slika 4.13. *In vivo* interakcije transkripcijskih faktora i promotora *Cxcl12*. Imunoprecipitacija hromatina je izvršena koristeći antitela na PARP-1, Sp1, YY1, C/EBP β , FOXO3a, HMG I/Y, p53, STAT3 i C/EBP α proteine. Ispitano je vezivanje transkripcijskih faktora za (A) promotorski fragment 1, dužine 247 bp, (B) promotorski fragment 2, dužine 265 bp i (C) promotorski fragment 3, dužine 267 bp. Kontrole imunoprecipitacije i PCR reakcije objašnjene su u okviru legende za Sliku 4.7.

Vezivanje Sp1 za promotorski fragment 1, može biti posledica međuproteinske interakcije, što bi značilo da Sp1 interaguje sa drugim proteinom koji je direktno vezan za fragment 1. U tom slučaju Sp1 vezuje fragment 1 kao heterodimer ili kao član multi-subjedinичnog nukleoproteinskog kompleksa.

YY1 vezuje sva tri promotorska fragmenta (Slika 4.13). Svaki fragment sadrži najmanje jedno vezivno mesto (Slika 4.12). Potencijalna Kozak sekvenca *Cxcl12* promotora poklapa se sa YY1 motivom u trećem fragmentu. Prisustvo pomenute sekvence u trećem fragmentu ukazuje da ovaj fragment sadrži mesto početka translacije.

C/EBP β vezuje sva tri promotorska fragmenta (Slika 4.13). Prvi promotorski fragment poseduje četiri C/EBP β vezivna mesta, koja se poklapaju sa C/EBP α motivima (Slika 4.12). Jedno od tih C/EBP α /C/EBP β mesta se poklapa sa p53 i PARP-1 motivima i delimično sa FOXO3a motivom. U drugom fragmentu se C/EBP β vezivno mesto ne poklapa sa mestom nekog drugog transkripcionog faktora, što ukazuje da se C/EBP β direktno vezuje za drugi *Cxcl12* fragment. U trećem fragmentu prisutna su dva C/EBP β motiva, od kojih se jedan poklapa sa C/EBP α i p53 vezivnim mestima, a drugi sa PARP-1, C/EBP α i p53 motivima (Slika 4.12). C/EBP α vezuje fragmente 1 i 2, dok p53 vezuje samo fragment 1 (Slika 4.13). Ovi rezultati ukazuju da C/EBP β /C/EBP α /p53 vezivna mesta u trećem fragmentu vezuje C/EBP β . Takođe je pokazano da C/EBP α vezuje fragment 2 promotora iako ne poseduje vezivno mesto u ovom fragmentu, što ukazuje da C/EBP α interaguje sa drugim proteinom, koji je direktno vezan za promotor.

Protein p53 vezuje samo fragment 1, iako poseduje vezujuća mesta duž celog promotora (Slika 4.12 i 4.13). Fragment 1 sadrži jedno p53 vezivno mesto, koje se preklapa sa C/EBP β /C/EBP α i PARP-1 motivom i delimično sa FOXO3a motivom. p53 ne vezuje fragmente 2 i 3, uprkos činjenici da ovi fragmenti poseduju potencijalna vezivna mesta. Fragment 2 sadrži pet p53 motiva, od kojih se četiri preklapaju sa Sp1 mestima, a jedno je povezano sa FOXO3a motivom. U fragmentu 3 promotora nalazi se deset p53 motiva, od kojih se sedam preklapaju sa Sp1 mestima, jedan sa C/EBP β /C/EBP α mestima i jedan sa PARP-1 i C/EBP β /C/EBP α motivima.

FOXO3a interaguje sa promotorskim fragmentom 1 (Slika 4.13A). Ovaj fragment poseduje jedan FOXO3a motiv, koji se delimično preklapa sa PARP-1/C/EBP β /C/EBP α /p53 vezivnim mestom (Slika 4.12). Uprkos činjenici da fragment 2 sadrži dva FOXO3a vezivna mesta, FOXO3a ne vezuje ovaj fragment. Sa druge strane, FOXO3a je vezan za fragment 3, u okviru kog se ne nalazi vezivno mesto što ukazuje da je FOXO3a vezan za ovaj fragment preko interagujućeg partnera (Slika 4.12 i 4.13).

HMG I/Y ne vezuje fragment 1, iako ovaj fragment poseduje 2 HMG I/Y motiva (Slika 4.12 i 4.13A). Jedan od motiva se preklapa sa NF- κ B mestom, a drugi sa STAT3 mestom. HMG I/Y interaguje sa promotorskim fragmentom 2, u okviru kog se nalaze tri vezujuća mesta, od kojih se jedno preklapa sa NF- κ B mestom, a drugo se delimično

poklapa sa Sp1/p53 mestom. HMG I/Y ne vezuje fragment 3, koji ne sadrži vezujuće mesto za ovaj transkripcioni faktor (Slika 4.12 i 4.13).

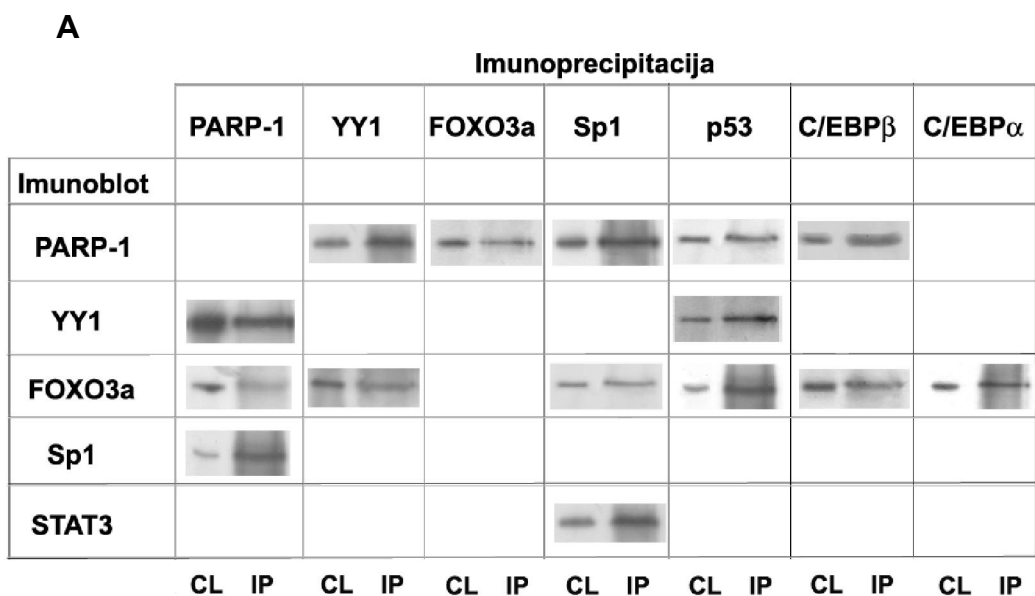
STAT3 vezuje promotorske fragmente 1 i 3 (Slika 4.13). Fragment 1 poseduje jedan STAT3 motiv, koji se poklapa sa HMG I/Y mestom, što ukazuje da u bazalnim uslovima ovo preklapajuće mesto vezuje STAT3. Treći promotorski fragment ne poseduje STAT3 motiv, na osnovu čega se pretpostavlja da se interakcija STAT3 sa ovim promotorskim fragmentom odvija preko interagujućeg partnera koji je direktno vezan za DNK (Slika 4.12 i 4.13).

Na osnovu prikazanih rezultata može se izvesti zaključak da prvi, distalni promotorski fragment vezuju PARP-1, FOXO3a, p53, Sp1, YY1, C/EBP α , C/EBP β i STAT3, dok sa drugim promotorskim fragmentom interaguju HMG I/Y, YY1, C/EBP α , C/EBP β , PARP-1 i Sp1 *in vivo*. Treći promotorski fragment koji sadrži osnovni promotor, *in vivo*, vezuju C/EBP β , PARP-1, Sp1, YY1, FOXO3a i STAT3.

4.2.5. MEĐUPROTEINSKE INTERAKCIJE TRANSKRIPCIONIH FAKTORA VEZANIH ZA *Cxcl12* PROMOTOR

Veliki broj transkripcionih faktora formira međusobno homo- ili heterodimere. Dimerizacija između transkripcionih faktora dovodi do izmene u afinitetu vezivanja datog proteinskog kompleksa za DNK, tj. do izmene transaktivacione sposobnosti proteinskog kompleksa. Sledeći korak u izradi doktorske teze, bio je da se ispita način vezivanja transkripcionih faktora za promotor *Cxcl12* - da li se identifikovani transkripcioni faktori vezuju kao monomeri za promotor ili u kompleksu sa drugim transkripcionim faktorima. Detektovane međuproteinske interakcije transkripcionih faktora bi zajedno sa rezultatima hromatinske imunoprecipitacije, mogle da odgovore na pitanje da li ispitivani transkripcioni faktori vezuju direktno promotorsku sekvencu *Cxcl12* ili posredno preko interakcije sa nekim drugim proteinom.

Metodom ko-immunoprecipitacije izučavane su međuproteinske interakcije transkripcionih faktora, za koje je pokazano da vezuju *Cxcl12* promotor *in vitro* i *in vivo*.



B

C/EBP β → PARP-1, FOXO3a
YY1 → PARP-1, p53, FOXO3a
PARP-1 → FOXO3a, Sp1, C/EBP β , p53, YY1
p53 → PARP-1, YY1, FOXO3a
Sp1 → FOXO3a, PARP-1, STAT3
FOXO3a → PARP-1, YY1, Sp1, p53, C/EBP α , C/EBP β
C/EBP α → FOXO3a

Slika 4.14. Međuproteinske interakcije transkripcionih regulatora CXCL12 gena. Koristeći anti-PARP-1, anti-YY1, anti-FOXO3a, anti-Sp1, anti-p53, anti-C/EBP β i anti-C/EBP α antitela, izvršena je imunoprecipitacija proteina iz ćelijskog lizata Rin-5F wt ćelija, na način opisan u poglavlju Materijal i metode, 3.7. Dobijeni precipitati su razdvojeni elektroforezom u SDS poliakrilamidnom gelu i preneti na PVDF membranu. (A) Imunoblotom je analizirano prisustvo koprecipitovanih proteina korišćenjem antitela na PARP-1, YY1, FOXO3a, Sp1 i STAT3 proteine. (B) Shematski prikaz detektovanih međuproteinskih interakcija transkripcionih faktora.

Ćelijski lizat dobijen iz Rin-5F wt ćelija korišćen je kao polazna proteinska frakcija u imunoprecipitaciji. Nakon imunoprecipitacije sa antitelom na protein od interesa, dobijeni precipitat razdvojen je u SDS-poliakrilamidnom gelu. Nakon prenosa na PVDF membranu, imunoblotom je analizirano prisustvo ko-precipitovanih proteina, korišćenjem antitela na imunoprecipitovan protein i antitela na protein koji predstavlja potencijalnog interagujućeg partnera imunoprecipitovanog proteina. Posle imunoprecipitacije sa anti-PARP-1 antitelom, imunoblot analiza je pokazala da PARP-1 interaguje sa YY1, FOXO3a i Sp1 proteinima u ćelijskom lizatu Rin-5F wt ćelija (Slika 4.14A). Imunoprecipitacija sa anti-YY1 antitelom, potvrdila je interakciju između YY1 i PARP-1, i pokazala da su YY1 i FOXO3a interagujući partneri. Nakon imunoprecipitacije sa anti-FOXO3a antitelom, potvrđeno je da FOXO3a i PARP-1 međusobno interaguju. Prisustvo specifičnih međuproteinskih interakcija uočeno je između C/EBP β i PARP-1 i između C/EBP β i FOXO3a (Slika 4.14A). FOXO3a je detektovan u precipitatima, nakon imunoprecipitacije sa anti-C/EBP α antitelom (Slika 4.14A). Imunoprecipitacija sa anti-Sp1 antitelom potvrdila je PARP-1–Sp1 interakciju i pokazala da su Sp1 i STAT3 i Sp1 i FOXO3a interagujući partneri u beta ćelijama pankreasa. Ovom metodom, takođe su detektovane interakcije između p53 i PARP-1, p53 i YY1 i između p53 i FOXO3a (Slika 4.14A). Shematski prikaz uočenih interakcija između transkripcionih faktora prikazan je na Slici 4.14B.

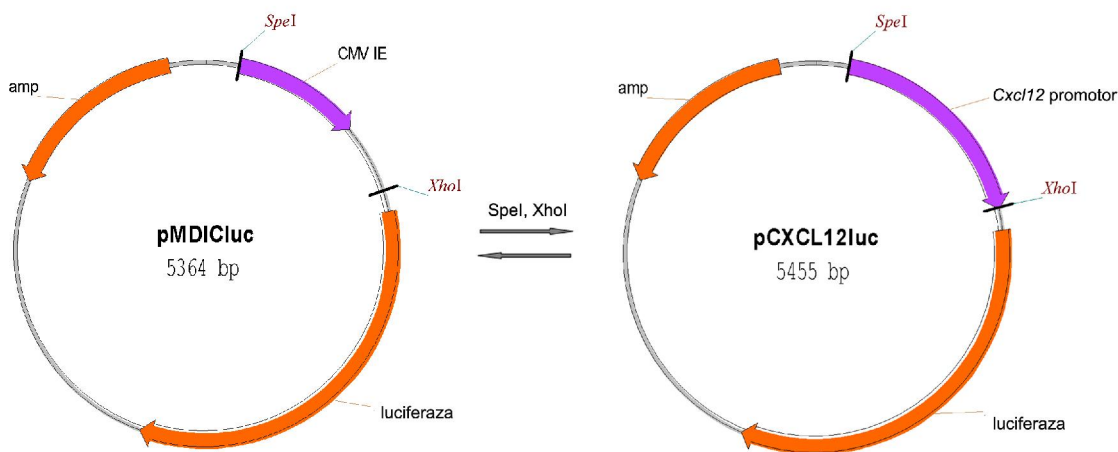
4.2.6. UTICAJ RAZLIČITIH FAKTORA NA AKTIVNOST *Cxcl12* PROMOTORA

4.2.6.1. Aktivnost *Cxcl12* promotora

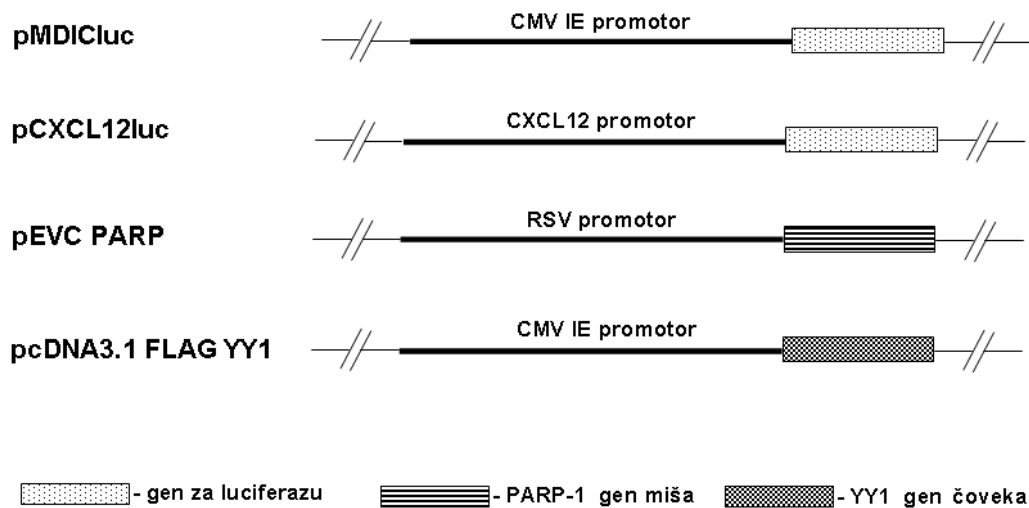
U cilju ispitivanja aktivnosti *Cxcl12* promotora u ćeliji i uticaja različitih faktora na *Cxcl12* transkripciju napravljen je reporterski vektor pCXCL12luc, u kome je *Cxcl12* promotor ukloniran ispred gena za luciferazu svica.

Kao vektor za kloniranje korišćen je pMDICluc plazmid koji, kao reporterski gen sadrži gen za luciferazu svica. Uzvodno od gena za luciferazu nalazi se promotor citomegalovirusa (CMV), oivičen restrikcionim mestima za enzime SpeI i XhoI (Slika 4.15). U odvojenim reakcijama, izvršena je digestija *Cxcl12* promotora i pMDICluc vektora

sa restrikcionim enzimima SpeI i XhoI, kako bi se formirali komplementarni jednolančani “lepljivi krajevi”. Nakon ligacije promotora *Cxcl12* u pMDICluc vektor, dobijeni konstrukt, nazvan pCXCL12luc, (Slika 4.15 i 4.16) umnožen je u *E. coli* bakterijama, soja *DH5a*. Da bi se proverila aktivnost *Cxcl12* promotora, klonirani konstrukt pCXCL12luc, ubačen je u NIH3T3 ćelije tehnikom transfekcije uz pomoć katjonskog lipida, lipofektamina 2000 (Invitrogen). Lipofektamin omogućuje DNK kondenzaciju i nastali lipozom/DNK kompleks ulazi u ćeliju endocitozom. Ulaskom plazmida u jedro ćelije, omogućena je njegova ekspresija. Kao pozitivna kontrola korišćen je pMDICluc konstrukt, pošto CMV pokazuje jaku promotorsku aktivnost u NIH3T3 ćelijama (Lin i sar., 2001). Da bi se testirala efikasnost transfekcije, oba vektora su ko-transfekovana sa plazmidom pMDICRluc. Dva dana nakon transfekcije, ćelije su lizirane i izmerena je aktivnost luciferaze uz pomoć Dual-Luciferase® Reporter Assay System (Promega Corporation).



Slika 4.15. pCXCL12luc konstrukt. Iz pMDICluc vektora digestijom sa SpeI i XhoI restrikcionim enzimima isečen je promotor CMV. PCR-om umnožen *Cxcl12* promotor, takođe je podvrgnut restrikcionoj digestiji sa SpeI i XhoI enzimima, nakon čega je ligiran sa digeriranim pMDICluc vektorom.



Slika 4.16. Konstrukti korišćeni u eksperimentima prolazne transfekcije. pMDICluc -kontrolni plazmid u kome se gen za luciferazu svica nalazi pod kontrolom CMV promotora. pCXCL12luc -reporterski plazmid u kome promotor *Cxcl12* kontroliše ekspresiju gena za luciferazu svica. pEVC PARP - ekspresioni vektor koji sadrži kodirajuću sekvencu gena za PARP-1 miša. pcDNA3.1 FLAG YY1 - ekspresioni konstrukt sa FLAG-om obeleženom kodirajućom sekvencom za humani YY1 gen.

Vrednost dobijene aktivnosti luciferaze svica normalizovana je u odnosu na aktivnost *Renilla* luciferaze poreklom iz pMDICluc plazmida i izražena je kao relativna luciferazna jedinica (eng. *relative luciferase units*, **RLU**). RLU je predstavljena kao srednja vrednost \pm standardna greška dobijena iz najmanje tri nezavisna eksperimenta.

Luciferaznim esejom detektovana je luciferazna aktivnost u ćelijama transfekovanim sa pCXCL12luc plazmidom, što je potvrda da je pCXCL12luc funkcionalan plazmid, koji sadrži promotor *Cxcl12* koji je podložan aktivaciji i sposoban da stimuliše ekspresiju gena za luciferazu svica. Aktivnost *Cxcl12* promotora je 25 puta manja od aktivnosti CMV promotora u NIH3T3 ćelijama (Slika 4.17A). Statistička analiza je pokazala da je aktivnost *Cxcl12* promotora značajno različita u odnosu na aktivnost CMV promotora ($p < 0,01$). NIH3T3 su korišćene kao kontrolna ćelijska linija u eksperimentima

transfekcija, pošto su veoma pogodne za ovu vrstu eksperimentana, imajući u vidu se korišćenjem njih kao ćelija „domaćina“, postiže visok nivo efikasnosti transfekcije.

Sledeći korak bio je da se ispita aktivnost *Cxcl12* promotora u Rin-5F wt ćelijama. Kao pozitivna kontrola ponovo je korišćen pMDICluc vektor. U svaku reakciju transfekcije dodat je plazmid za normalizaciju transfekcije, pMDICRluc. Luciferazni esej je pokazao 58 puta manju aktivnost *Cxcl12* promotora u odnosu CMV promotor (Slika 4.17B). Nakon statističke obrade podataka zaključeno je da je aktivnost *Cxcl12* promotora značajno različita u odnosu na aktivnost CMV promotora ($p < 0,01$).

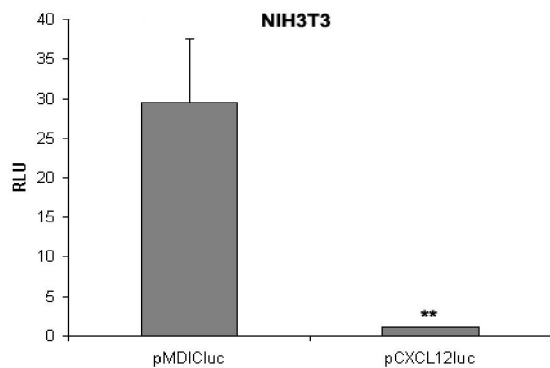
U sledećem eksperimentu upoređena je promotorska aktivnost gena za CXCL12 u NIH3T3 i Rin-5F wt ćelijama. Zbog različite efikasnosti transfekcije dve ćelijske linije, aktivnost *Cxcl12* promotora nije se mogla direktno porediti. Zbog toga su obe ćelijske linije transfekovane i sa pMDICluc vektorom, koji je služio kao kontrola. Aktivnost *Cxcl12* promotora izražena je u odnosu na CMV promotor, pri čemu se smatra da je aktivnost CMV promotora u svakoj ćelijskoj liniji 100%. Vrednosti luciferaze svica normalizovane su sa vrednošću *Renilla* luciferaze. Nakon luciferaznog eseja uočeno je da je aktivnost *Cxcl12* promotora 2,3 puta veća u NIH3T3 ćelijama u odnosu na Rin-5F wt ćelije (Slika 4.17C). Statistička analiza je pokazala da je aktivnost *Cxcl12* promotora u NIH3T3 ćelijama značajno različita u odnosu na promotorsku aktivnost u Rin-5F wt ćelijama ($p < 0,05$).

4.2.6.2. Uticaj hemokina CXCL12 na sopstvenu gensku transkripciju

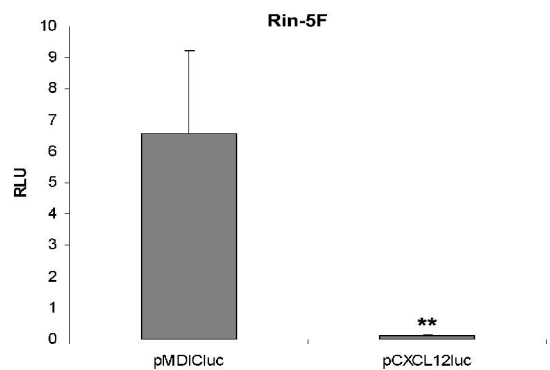
Da bi se ispitao uticaj CXCL12 na aktivnost svog promotora, izvršena je transfekcija Rin-5F wt ćelija i Rin-5F klona #1, u kome je CXCL12 protein pojačano prisutan, sa plazmidom pCXCL12luc (Slika 4.1). Paralelno sa transfekcijom sa vektorom pCXCL12luc, izvršena je transfekcija i sa kontrolnim pMDICluc konstruktom svake ćelijske linije (Slika 4.16). U svaku reakciju transfekcije dodat je i plazmid pMDICRluc, koji je imao ulogu u normalizaciji stepena transfekcije. Aktivnost *Cxcl12* promotora iskazana je u odnosu na aktivnost CMV promotora. Nakon merenja luciferazne aktivnosti, zapaženo je smanjenje aktivnosti *Cxcl12* promotora u ćelijama klona #1 u odnosu na wt

ćelije (Slika 4.18). Međutim, statistička analiza je pokazala da ovo smanjenje nije statistički značajno, što ukazuje da CXCL12 ne utiče bitno na svoju transkripciju.

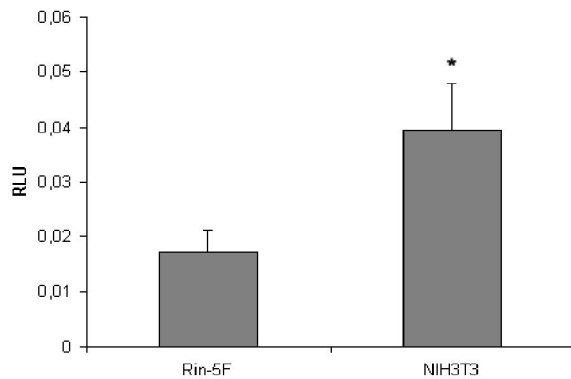
A



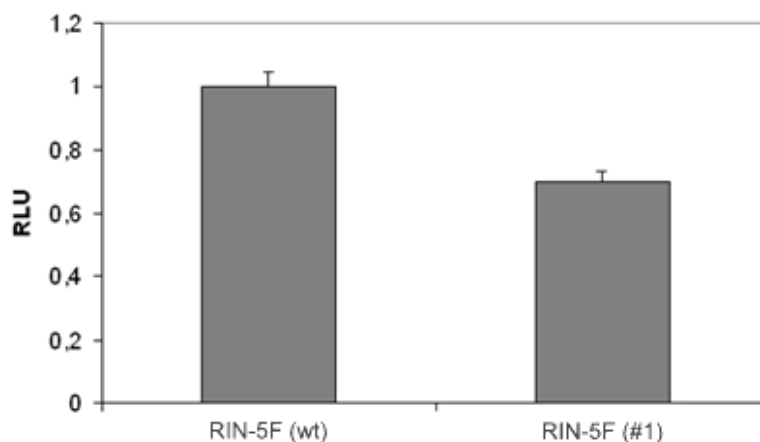
B



C



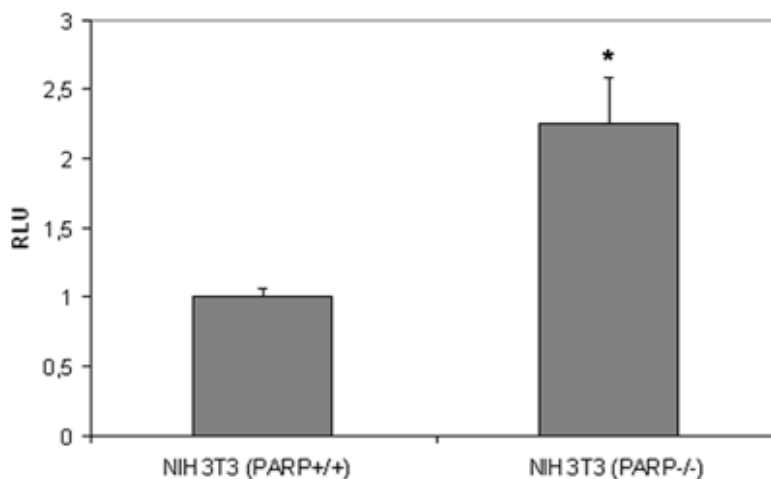
Slika 4.17. Aktivnost *Cxcl12* promotora u NIH3T3 i Rin-5F wt ćelijama. (A) NIH3T3 i (B) Rin-5F wt ćelije su transfekovane sa pMDICluc i pCXCL12luc plazmidima. Prikazana je srednja vrednost \pm standardna greška rezultata dobijenih iz tri nezavisna eksperimenta. Srednje vrednosti dobijene za luciferaznu aktivnost pCXCL12luc vektora su bile statistički značajno različite (**) u odnosu na srednje vrednosti dobijene za luciferaznu aktivnost pMDICluc vektora ($p < 0,01$). (C) Poređenje aktivnosti *Cxcl12* promotora u Rin-5F wt i NIH3T3 ćelijama. Aktivnost *Cxcl12* promotora je izražena u odnosu na aktivnost CMV promotora. Prikazana je srednja vrednost \pm standardna greška rezultata dobijenih iz tri nezavisna eksperimenta. Srednje vrednosti dobijene za aktivnost *Cxcl12* promotora u NIH3T3 ćelijama su bile statistički značajno različite (*) u odnosu na srednje vrednosti dobijene za aktivnost *Cxcl12* promotora u Rin-5F wt ćelijama ($p < 0,05$).



Slika 4.18. Uticaj CXCL12 na ekspresiju sopstvenog gena. Rin-5F wt i Rin-5F klon #1 ćelije su transfekovane sa pMDICluc i pCXCL12luc plazmidima. Aktivnost *Cxcl12* promotora je izražena u odnosu na aktivnost CMV promotora. Prikazana je srednja vrednost \pm standardna greška rezultata dobijenih iz tri nezavisna eksperimenta.

4.2.6.3. Uticaj PARP-1 na aktivnost *Cxcl12* promotora

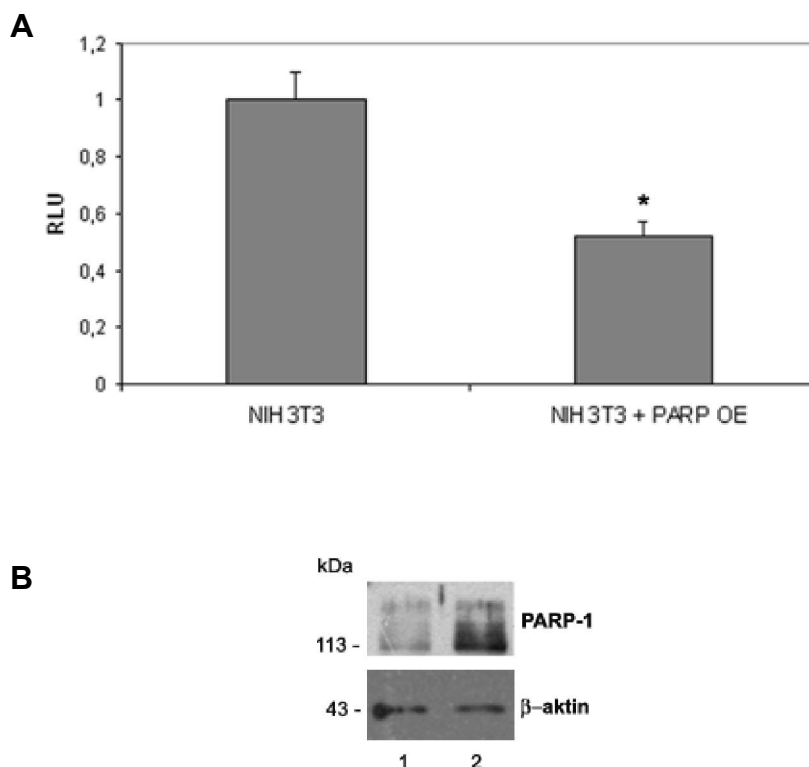
S obzirom, da je pokazano da PARP-1 vezuje *Cxcl12* promotor *in vitro* i *in vivo*, sledeći korak bio je ispitivanje uticaja PARP-1 na aktivnost *Cxcl12* promotora tj. da li je PARP-1 aktivator ili inhibitor *Cxcl12* transkripcije. Aktivnost *Cxcl12* promotora ispitana je u NIH3T3 fibroblastima (PARP^{+/+}) i u fibroblastima kod kojih je gen za PARP-1 uklonjen (PARP-1^{-/-}). Obe ćelijske linije transfekovane su sa pCXCL12luc i sa kontrolnim pMDICluc plazmidom, a svaka rekcijska transfekcija sadržala je i plazmid pMDICluc. Aktivnost *Cxcl12* promotora iskazana je u odnosu na aktivnost promotora CMV. Nakon luciferaznog esaja uočeno je statistički značajno ($p < 0,05$) povećanje aktivnosti *Cxcl12* promotora u PARP-1^{-/-} ćelijama u poređenju sa PARP^{+/+}. U PARP-1 deficitarnim ćelijama *Cxcl12* promotor je bio dva puta aktivniji u odnosu na ćelije koje ekspimiraju PARP-1 (Slika 4.19).



Slika 4.19. Aktivnost *Cxcl12* promotora u odsustvu PARP-1. NIH3T3 (PARP^{+/+}) i NIH3T3 (PARP^{-/-}) ćelije su transfekovane sa pCXCL12luc i pMDICluc plazmidima. Aktivnost *Cxcl12* promotora je izražena u odnosu na aktivnost CMV promotora. Prikazana je srednja vrednost \pm standardna greška rezultata dobijenih iz tri nezavisna eksperimenta. Srednja vrednost aktivnosti *Cxcl12* promotora u PARP-1^{-/-} ćelijama je bila statistički značajno različita (*) u odnosu na srednju vrednost dobijenu za aktivnost *Cxcl12* promotora u PARP^{+/+} ćelijama ($p < 0,05$).

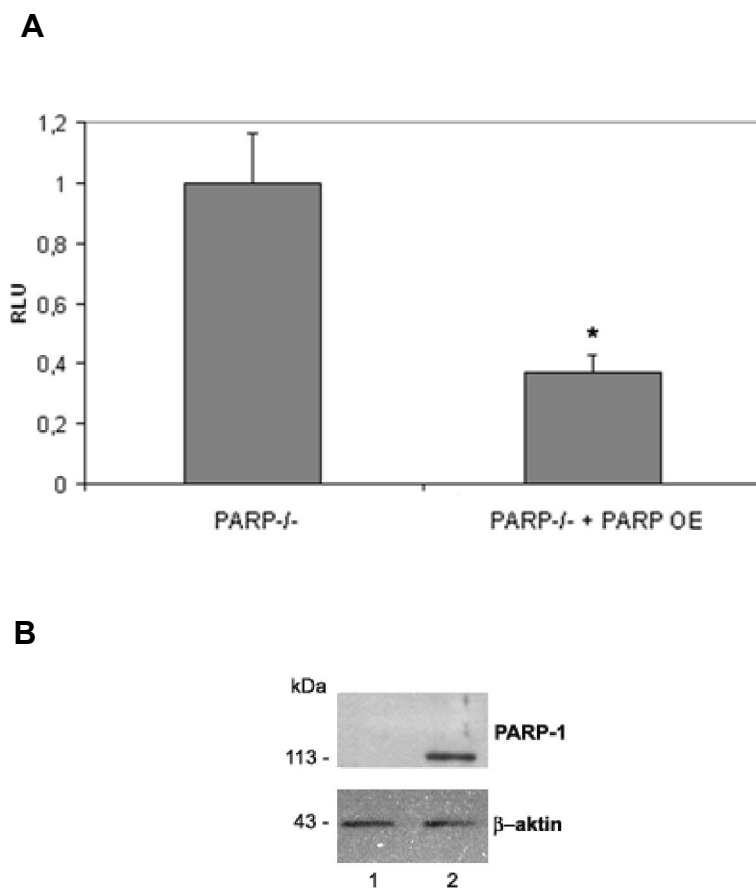
Veća aktivnost promotora u odsustvu PARP-1 ukazuje na činjenicu da PARP-1 inhibira *Cxcl12* transkripciju svojim vezivanjem za promotor. Aktivnost *Cxcl12* promotora u prisustvu visoke koncentracije PARP-1 u ćeliji, dalje je potvrdilo inhibitoran efekat PARP-1 na *Cxcl12* transkripciju. U cilju eksprimiranja visoke koncentracije PARP-1 u ćeliji, NIH3T3 ćelije su ko-transfekovane sa ekspresionim konstruktom pEVC PARP, zajedno sa pCXCL12luc i pMDICRluc plazmidima. Ekspresioni vektor pEVC PARP sadrži kodirajuću sekvencu gena za PARP-1 miša, koju kontroliše promotor Raus sarkoma virusa (RSV) (Slika 4.16). S obzirom da se ispituje uticaj mišjeg PARP-1 proteina na promotorsku sekvencu *Cxcl12* pacova, ispitano je u kojoj meri se proteinske sekvence za PARP-1 u ova dva organizma podudaraju. Pomoću programa BLASTP 2.2.27 izvršeno je poravnanje para proteinskih sekvenci za PARP-1 miša (NCBI, referentna sekvenca: NP_031441.2) i pacova (NCBI, referentna sekvenca: NP_037195.1). Mišji i pacovski PARP-1 pokazuju 97% homologije, što ukazuje na visoku evolutivnu konzerviranost ovog proteina kod različitih vrsta glodara. Zbog velike sličnost proteinske sekvence, može se pretpostaviti da će mišji PARP-1 imati isti uticaj na *Cxcl12* promotor, kao i pacovski. Na Slici 4.20A prikazana je normalizovana aktivnost *Cxcl12* promotora nakon transfekcije NIH3T3 ćelija sa pCXCL12luc vektorom (kolona 1 na grafiku) i nakon ko-transfekcije fibroblasta sa plazmidima pCXCL12luc i pEVC PARP (kolona 2 na grafiku). U prisustvu visoke koncentracije PARP-1, zabeleženo je statistički značajno ($p < 0,05$) smanjenje aktivnosti *Cxcl12* promotora. Sa Slike 4.20A uočava se da je u uslovima pojačanog prisustva PARP-1 u NIH3T3 ćelijama (kolona 2) aktivnost *Cxcl12* promotora dva puta manja, u odnosu na njegovu aktivnost u kontrolnim NIH3T3 ćelijama (kolona 1). Pojačana ekspresija PARP-1 u NIH3T3 ćelijama nakon ko-transfekcije sa plazmidom pEVC PARP potvrđena je imunoblot analizom. Lizati ćelija transfekovanih sa plazmidom pCXCL12luc (Slika 4.20B, kolona 1) i ko-transfekovanih sa plazmidima pEVC PARP i pCXCL12luc (Slika 4.20B, kolona 2), elektroforetski su razdvojeni i nakon prenosa na membranu ispitano je prisustvo PARP-1 i β -aktin proteina odgovarajućim antitelima. Protein β -aktin je korišćen kao kontrola za ujednačenost proteinskih koncentracija, tj. kao protein čija se količina prisutna u citoplazmi ćelija ne menja bez obzira na primenjen tretman. Pomoću antitela na β -aktin imunoblot analiza je potvrdila da su prilikom elektroforetskog razdvajanja proteinskih

uzoraka, inicijalno nanešene jednake koncentracije proteina. S obzirom da je u uzorku koji je ko-transfekovan sa ekspresionim konstruktom pEVC PARP (Slika 4.20B, kolona 2), detektovano više PARP-1 proteina nego u kontrolnim NIH3T3 ćelijama (Slika 4.20B, kolona 1), zaključuje se da je smanjenje aktivnosti *Cxcl12* promotora uočeno nakon luciferaznog esej (Slika 4.20A) posledica inhibitornog dejstva PARP-1 na *Cxcl12* transkripciju.



Slika 4.20. Aktivnost *Cxcl12* promotora u uslovima pojačanog prisustva PARP-1 u NIH3T3 ćelijama. NIH3T3 ćelije su transfekovane sa pCXCL12luc (kolona 1) i ko-transfekovane sa pCXCL12luc i pEVC PARP vektorima (eng. *PARP over-expression* – PARP OE) (kolona 2). (A) Luciferazni esej prikazuje aktivnost *Cxcl12* promotora u prisustvu PARP-1 u fiziološkim uslovima (kolona 1) i u uslovima pojačane ekspresije PARP-1 (kolona 2). Prikazana je srednja vrednost ± standardna greška rezultata dobijenih iz tri nezavisna eksperimenta. Statistička značajnost (*) $p < 0,05$. (B) Imunoblot analiza, korišćenjem anti-PARP-1 antitela, potvrđuje pojačano prisustvo PARP-1 nakon uvođenja pEVC PARP konstrukta u NIH3T3 ćelije (kolona 2). Antitelo na β -aktin je korišćeno kao kontrola za ujednačenost proteinskih koncentracija uzoraka.

Inhibitoran uticaj PARP-1 na *Cxcl12* transkripciju, još jednom je potvrđen nakon ekspresije PARP-1 u PARP^{-/-} ćelijama. Na Slici 4.21A, prikazana je normalizovana aktivnost *Cxcl12* promotora nakon transfekcije PARP^{-/-} ćelija sa plazmidom pCXCL12luc (kolona 1 na grafiku) i nakon ko-transfekcije PARP^{-/-} ćelija sa plazmidima pEVC PARP i pCXCL12luc (kolona 2 na grafiku).



Slika 4.21. Aktivnost *Cxcl12* promotora u uslovima ekspresije PARP-1 u PARP^{-/-} ćelijama. PARP^{-/-} ćelije su transfekovane sa pCXCL12luc (kolona 1) i ko-transfekovane sa pCXCL12luc i pEVC PARP (eng. *PARP over-expression* – PARP OE) (kolona 2). (A) Luciferazni esej prikazuje aktivnost *Cxcl12* promotora u odsustvu PARP-1 (kolona 1) i u uslovima ekspresije PARP-1 (kolona 2). Prikazana je srednja vrednost ± standardna greška rezultata dobijenih iz tri nezavisna eksperimenta. Statistička značajnost (*) p<0,05. (B) Imunoblot analizom, koristeći antitelo na PARP-1, potvrđena je ekspresija PARP-1 u PARP^{-/-} ćelijama (kolona 2). Antitelo na β-aktin je korišćeno kao kontrola za ujednačenost proteinskih koncentracija uzoraka.

Prisustvo PARP-1 izazvalo je statistički značajan ($p < 0,05$) pad aktivnosti *Cxcl12* promotora. Sa Slike 4.21A uočava se da je uvođenjem PARP-1 u PARP^{-/-} ćelije došlo je do smanjenja aktivnosti promotora *Cxcl12*, 2,5 puta. Ekspresija PARP-1 u PARP^{-/-} ćelijama nakon ko-transfekcije sa pEVC PARP, potvrđena je imunoblot analizom. Na Slici 4.21B, prikazano je da sa anti-PARP-1 antitelom nije detektovan PARP-1 u lizatima PARP^{-/-} ćelija nakon transfekcije sa pCXCL12luc (kolona 1), dok je nakon ko-transfekcije sa pEVC PARP i pCXCL12luc uočena traka od 113 kD, koja odgovara PARP-1 (kolona 2). Antitelo na β -aktin je detektovalo jednake količine ovog proteina u uzorcima, što ukazuje da su jednake koncentracije proteina nanešene na gel.

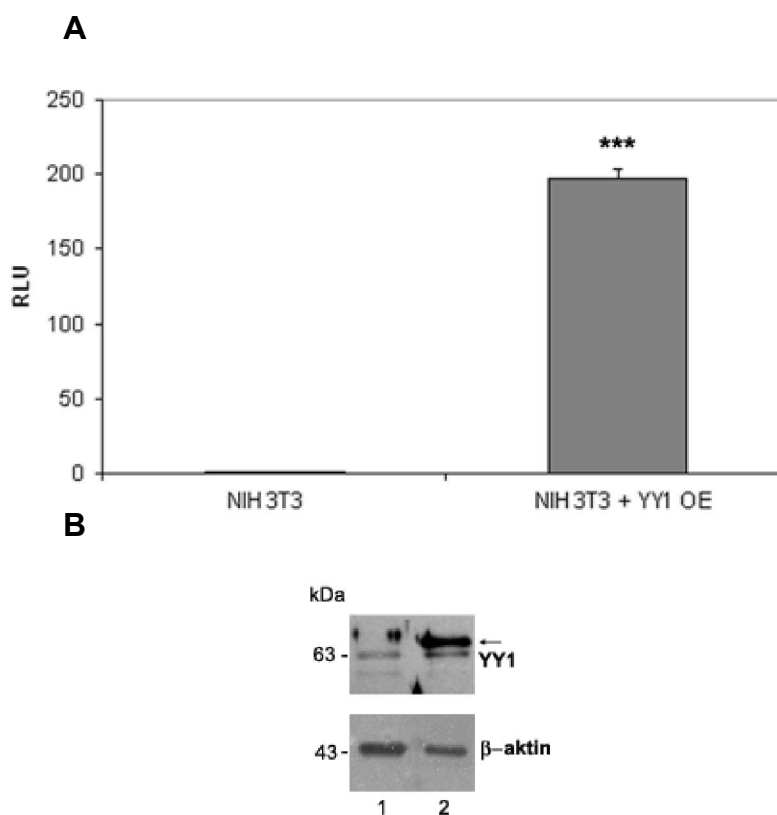
Na osnovu prikazanih rezultata može se zaključiti da PARP-1 svojim afinitetom za vezivanje promotora *Cxcl12* smanjuje intenzitet transkripcije gena za CXCL12, ali pri tome ne inhibira transkripciju u potpunosti, omogućujući time njen bazalni nivo. S obzirom da vezivanjem za promotor *Cxcl12* izaziva smanjenje nivoa transkripcije, PARP-1 je definisan kao inhibitor *Cxcl12* transkripcije.

4.2.6.4. Uticaj YY1 na aktivnost *Cxcl12* promotora

Prethodno je pokazano da transkripcioni faktor YY1 interaguje sa *Cxcl12* promotorom *in vitro* i *in vivo*. Pomoću eksperimenata transfekcije i luciferaznog eseja analiziran je funkcionalni efekat pomenute interakcije na *Cxcl12* transkripciju tj. ispitano je da li YY1 deluje kao aktivator ili inhibitor ekspresije *Cxcl12*.

Aktivnost *Cxcl12* promotora ispitana je u uslovima visoke koncentracije YY1 proteina. Pojačana ekspresija YY1 ostvarena je uvođenjem ekspresionog vektora pcDNA3.1 FLAG YY1 u NIH3T3 ćelije. pcDNA3.1 FLAG YY1 je ekspresioni vektor u kome se gen za humani YY1 obeležen FLAG-om, nalazi pod kontrolom CMV promotora (Slika 4.16). Aminokiselinska sekvenca YY1 proteina pacova je 97,6% identična sa YY1 proteinom miša i 97,8% identična sa YY1 proteinom čoveka (Nishiyama, 2002). Zbog veoma visoke konzerviranosti YY1 u sva tri organizma, može se pretpostaviti da će se humani YY1 protein eksprimirati u ćelijama miša i efikasno regulisati aktivnost *Cxcl12* promotora pacova. NIH3T3 ćelije su transfekovane sa pCXCL12luc plazmidom (Slika

4.22A, kolona 1) i ko-transfekovane sa ekspresionim vektorom pcDNA3.1 FLAG YY1 i pCXCL12luc (Slika 4.22A, kolona 2). U svaku reakciju transfekcije dodat je plazmid za normalizaciju, pMDICRluc.



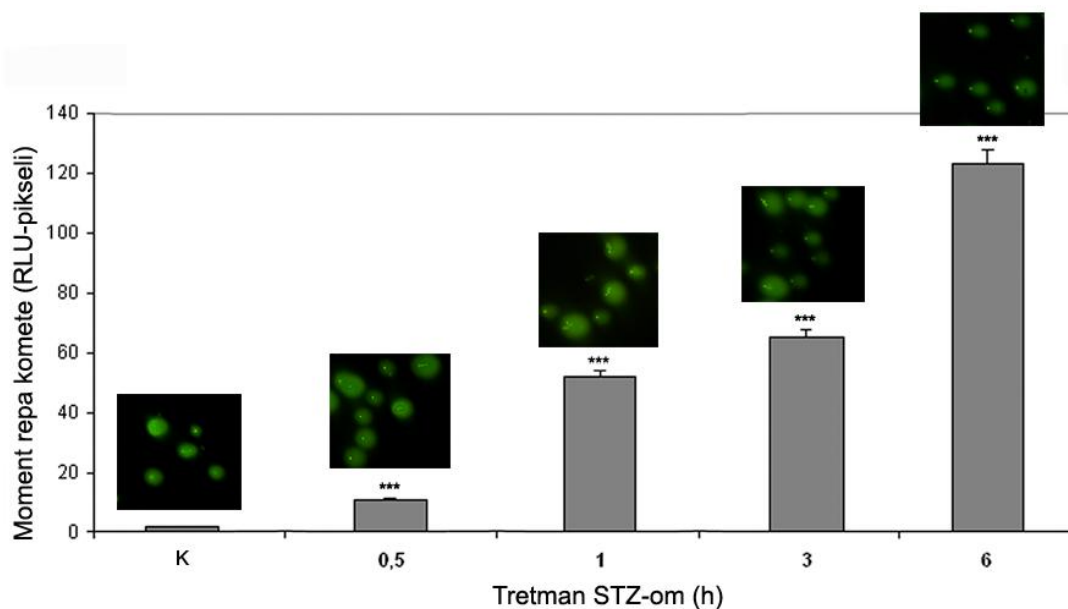
Slika 4.22. Aktivnost *Cxcl12* promotora u uslovima pojačanog prisustva YY1. NIH3T3 ćelije su transfekovane sa pCXCL12luc (kolona 1) i ko-transfekovane sa pCXCL12luc i pcDNA3.1 FLAG YY1 plazmidima (eng. *YY1 over-expression* – YY1 OE) (kolona 2). (A) Luciferazni esej prikazuje aktivnost *Cxcl12* promotora u prisustvu YY1 u fiziološkim uslovima (kolona 1) i u uslovima pojačane ekspresije YY1 (kolona 2). Prikazana je srednja vrednost \pm standardna greška rezultata dobijenih iz tri nezavisna eksperimenta. Statistička značajnost (***) $p < 0,001$. (B) Imunoblot analizom, korišćenjem antitela na YY1 protein, detektovana je ekspresija humanog YY1 proteina u NIH3T3 ćelijama (kolona 2). Strelica ukazuje na prisustvo FLAG-om obeleženog humanog YY1. Antitelo na β -aktin je korišćeno kao kontrola za ujednačenost proteinskih koncentracija uzoraka.

Pojačano prisustvo YY1 proteina izazvalo je signifikantno ($p < 0,001$) veću aktivnost *Cxcl12* promotora (Slika 4.22A). Na Slici 4.22A pokazano je da je u uslovima pojačane ekspresije YY1 proteina zabeležena čak 196 puta jača promotorska aktivnost *Cxcl12*. Prisustvo YY1 proteina u ćelijskim lizatima nakon transfekcije ispitano je imunoblot analizom. Na poziciji od 63 kD u oba uzorka detektovano je prisustvo mišjeg YY1 proteina poreklom iz NIH3T3 ćelija (Slika 4.22B). Međutim, u ćelijama ko-transfekovanim sa pcDNA3.1 FLAG YY1 (Slika 4.22B, kolona 2), uočeno je prisustvo još jedne trake iznad pozicije 63 kD, koja odgovara humanom YY1 proteinu, obeleženom FLAG-om. Antitelo na β -aktin korišćeno je za proveru ujednačenosti proteinskih koncentracija uzoraka.

Ovi rezultati ukazuju da je YY1 jak aktivator *Cxcl12* transkripcije.

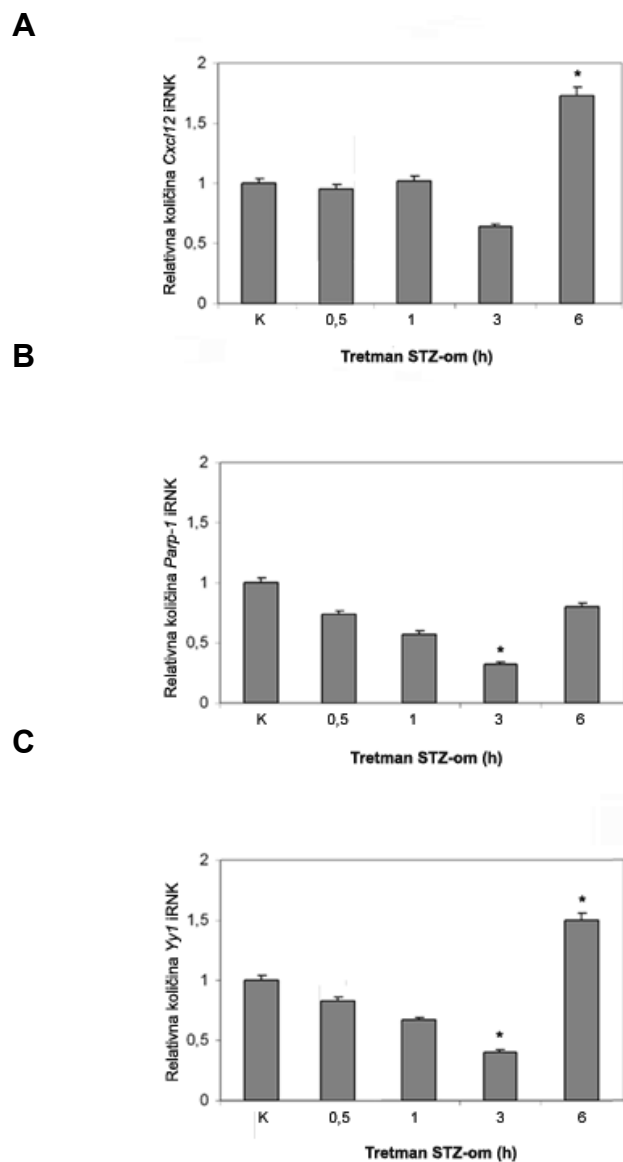
4.2.7. UTICAJ CITOTOKSIČNOSTI IZAZVANE STREPTOZOTOCINOM NA REGULACIJU *Cxcl12* TRANSKRIPCIJE

Da bi se ispitala transkripcija *Cxcl12* u uslovima oksidativnog stresa u beta ćelijama, Rin-5F wt ćelije tretirane su sa STZ-om, koji predstavlja toksični analog glukoze, koji izaziva smrt beta ćelija putem DNK alkilacije i proizvodnje ROS i RNS (o toksičnim efektima STZ-a na beta ćelije bilo je više reči u poglavlju Rezultati, 4.1). Korišćena je koncentracija STZ-a od 5 mM koja je definisana kao EC_{50} za Rin-5F wt ćelije (Slika 4.3). Na ćelije je primenjen STZ tretman različite dužine (0,5, 1, 3 i 6 h), a zatim je pomoću komet eseja praćen stepen oštećenja izazvanih na DNK. Uočeno je da sa porastom dužine tretmana progresivno raste i količina DNK u repu komete, što ukazuje da je duži tretman STZ-om izazivao veće oštećenje DNK molekula (Slika 4.23). Paralelno sa praćenjem DNK oštećenja, praćen je i nivo transkripcije *Cxcl12*, kao i gena za PARP-1 (*Parp-1*) i YY1 (*Yy1*) preko kvantifikacije prepisane iRNK u istim vremenskim tačkama tretmana ćelija STZ-om (0,5, 1, 3 i 6 h) (Slika 4.24). Nakon tretmana STZ-om, izolovana je totalana RNK iz ćelija, a zatim je sintetisana cDNK u reakciji reverzne transkripcije.



Slika 4.23. DNK oštećenje nakon tretmana Rin-5F wt ćelija STZ-om. Na Rin-5F wt ćelije je primenjen STZ tretman različite dužine (0,5, 1, 3 i 6 h). Stepen DNK oštećenja je ispitan komet esejom. Prikazana je srednja vrednost \pm standardna greška momenta repa komete (parametra DNK oštećenja) dobijenih iz tri nezavisna eksperimenta. Srednje vrednosti momenta repa komete su bile statistički značajno različite (***) za STZ-om tretirane ćelije u odnosu na vrednost dobijenu za kontrolne, ne-tretirane ćelije ($p < 0,001$). K- kontrolne ćelije; 0,5, 1, 3, 6, dužina primenjenog STZ tretmana izražena u satima (h).

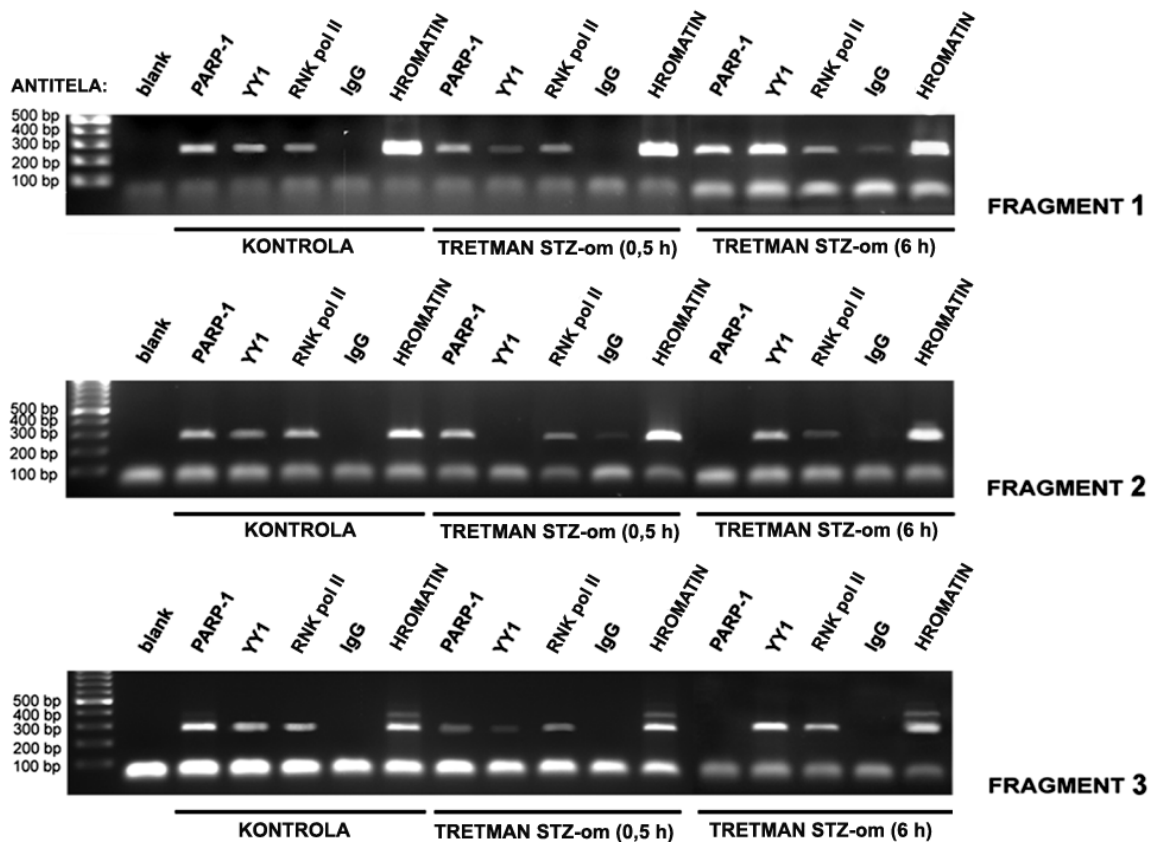
Tretman STZ-om od 6 h, izazvao je statistički značajan ($p < 0,05$) porast sinteze iRNK gena za CXCL12 (Slika 4.24A, kolona 6), što ukazuje da se indukcija transkripcije *Cxcl12* dešava kada je DNK veoma oštećena (Slika 4.23, kolona 5). Tretmani dužine 0,5 i 1 h, nisu doveli do promene nivoa *Cxcl12* transkripcije (Slika 4.24A, kolone 2 i 3), dok je nakon 3 h tretmana došlo do pada *Cxcl12* transkripcije, koji nije statistički značajan (Slika 4.24A, kolona 4). Nakon 3 h tretmana, zabeležen je statistički značajan ($p < 0,05$) pad *Parp-1* transkripcije (Slika 4.24B, kolona 4).



Slika 4.24. Relativna ekspresija *Cxcl12*, *Parp-1* i *Yy1* nakon tretmana Rin-5F wt ćelija STZ-om. Na Rin-5F wt ćelije je primenjen STZ tretman različite dužine (0,5, 1, 3 i 6 h). Relativna količina iRNK za *Cxcl12* (A), *Parp-1* (B) i *Yy1* (C) analizirana je metodom PCR u realnom vremenu. Nivo ekspresije ispitivanih gena standardizovan je u odnosu na ekspresiju gena za β -aktin detektovanog u istom uzorku i iskazan kao 2^{-dCt} . Prikazana je srednja vrednost \pm standardna greška rezultata dobijenih iz tri nezavisna eksperimenta. Srednje vrednosti dobijene za STZ-om tretirane ćelije su bile statistički značajno različite (*) u odnosu na vrednost dobijenu za kontrolne, ne-tretirane ćelije ($p < 0,05$). K- kontrolne ćelije; 0,5, 1, 3, 6, dužina primenjenog STZ tretmana izražena u satima (h).

Tretman u trajanju od 3 h izazvao je statistički značajan ($p < 0,05$) pad *Yy1* transkripcije (Slika 4.24C, kolona 4), dok je nakon 6 h tretmana zabeležen statistički značajan ($p < 0,05$) porast *Yy1* transkripcije (Slika 4.24C, kolona 5), što ukazuje da dugotrajno izlaganje beta ćelija dijabetogenom stimulusu dovodi do indukcije transkripcije gena za YY1. Povišen nivo *Yy1* transkripcije nakon 6 h tretmana, može biti odgovoran za pojačanu ekspresiju *Cxcl12* u datoj tački tretmana, s obzirom da je YY1 dokazani aktivator *Cxcl12* transkripcije.

Regulacija transkripcije *Cxcl12* u ranoj i kasnoj fazi oksidativnog stresa u beta ćelijama ispitana je metodom hromatinske imunoprecipitacije, putem koje je praćen afinitet vezivanja transkripcionih faktora PARP-1 i YY1 za promotor *Cxcl12* u pomenutim fazama oksidativnog stresa. Rin-5F wt ćelije su tretirane 30 min sa 5 mM STZ-om, što predstavlja ranu fazu oksidativnog stresa i 6 h, što odgovara kasnoj fazi oksidativnog stresa. Po završetku tretmana, ćelije su fiksirane 1% formaldehidom, hromatin je fragmenisan i nakon imunoprecipitacije hromatina sa antitelima na PARP-1 i YY1, ispitan je afinitet vezivanja dva pomenuta transkripciona faktora za tri fragmenta *Cxcl12* promotora. Na Slici 4.25 uočava se da nakon STZ tretmana od 30 min, PARP-1 vezuje fragment 3 sa smanjenim afinitetom, dok je vezivanje fragmenata 1 i 2, kao u kontrolnim ćelijama. Sa druge strane, u ranoj fazi oksidativnog stresa (STZ tretman od 30 min), YY1 je veoma slabo vezao fragmente 1 i 3, dok sa promotorskim fragmentom 2, YY1 ne interaguje u ovoj tački tretmana (Slika 4.25). U kasnoj fazi oksidativnog stresa (6 h tretmana), zapaža se da je PARP-1 vezan samo za promotorski fragment 1, dok se gubi afinitet vezivanja ovog proteina za fragmente 2 i 3 (Slika 4.25). Sa druge strane, u ovoj tački tretmana YY1 sa velikim afinitetom vezuje sva tri fragmenta promotora (Slika 4.25). Intenzivna interakcija YY1 sa *Cxcl12* promotorom u kasnoj fazi oksidativnog stresa, može da objasni indukciju *Cxcl12* transkripcije nakon 6 h tretmana, s obzirom da je ranije pokazano da je YY1 jak aktivator *Cxcl12* transkripcije.

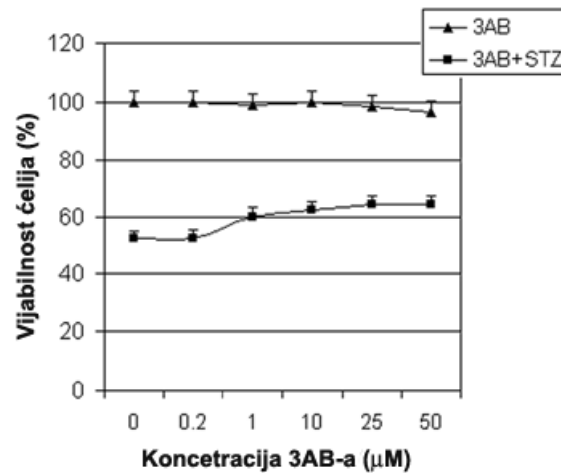


Slika 4.25. Regulacija *Cxcl12* promotora u uslovima oksidativnog stresa izazvanog STZ-om. Afinitet vezivanja PARP-1 i YY1 za *Cxcl12* promotor u ranoj (STZ tretman u trajanju od 0,5 h) i kasnoj (STZ tretman u trajanju od 6 h) fazi oksidativnog stresa ispitan je metodom hromatinske imunoprecipitacije. Hromatin je imunoprecipitovan sa antitelima na PARP-1 i YY1 proteine. Kontrole imunoprecipitacije i PCR-a objašnjene su u okviru legende za Sliku 4.7.

4.2.8. UTICAJ POLI(ADP-RIBOZIL)ACIJE NA *Cxcl12* TRANSKRIPCIJU

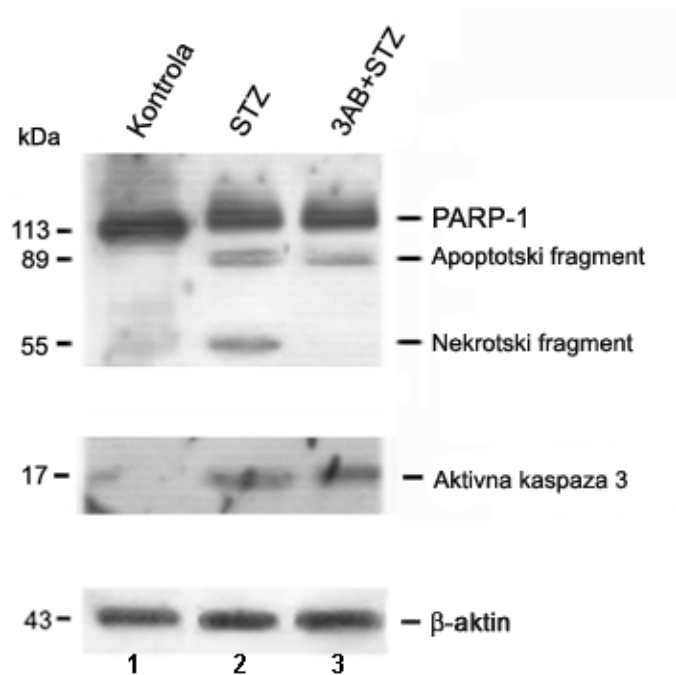
Eksperimenti transfekcije pokazali su da je PARP-1 inhibitor *Cxcl12* transkripcije. Sledeći korak bio je da se ispita da li PARP-1 enzimatska aktivnost utiče na *Cxcl12* transkripciju. Poznato je da se inhibicijom PARP-1 u oksidativnom stresu pospešuje preživljavanje ćelija. Zbog prisustva DNK oštećenja nastalih u intenzivnom oksidativnom stresu, PARP-1 postaje hiperaktivan i troši energetske rezerve NAD^+ , a zatim i ATP, vodeći ćeliju u nekrozu. Inhibicijom PARP-1 energetske rezerve ostaju očuvane i ćelija preživljava (Leal i sar., 2009). Primenom generalnog inhibitora 3AB-a, blokirana je enzimatska aktivnost PARP-1. Testom vijabilnost (MTT) ispitano je pri kojoj koncentraciji 3AB inhibira PARP-1 enzimatsku aktivnost.

Rin-5F wt ćelije su pre-tretirane rastućim koncentracijama 3AB-a (0,2 – 50 μM), 30 min, nakon čega je sledio tretman sa 5 mM STZ-om u naredna 24 h. Koncentracija 3AB-a od 50 μM , pospešila je preživljavanje ćelija za 10% (Slika 4.26). Efikasnost pomenute koncentracije 3AB-a u inhibiciji enzimatske aktivnosti PARP-1, dalje je potvrđena imunoblot analizom. Rin-5F wt ćelije u jednoj petri šolji tretirane su 5 mM STZ-om 6 h, a u drugoj su ćelije prvo pre-tretirane 50 μM 3AB-om, nakon čega je sledio tretman 5 mM STZ-om od 6 h. Po isteku tretmana, ćelije su lizirane, a zatim su proteini razdvojeni elektorforetski i preneti na PVDF membranu. Nakon tretmana STZ-om u ćelijskom lizatu prisutni su i apoptotski (89 kDa) i nekrotski (55 kDa) PARP-1 fragment (Slika 4.27, kolona 2). U procesu apoptoze, kaspaze 3 i 7 seku PARP-1 protein na fragmente od 24 i 89 kDa, dok u nekrozi katepsini B i D seku PARP-1 na fragmente veličine 55 i 42 kDa (Chaitanya i sar., 2010). S obzirom da su nakon tretmana STZ-om prisutni i apoptotski i nekrotski fragment može se zaključiti da ove ćelije umiru kombinacijom apoptotske i nekrotske smrti. U ćelijama koje su pre-tretirane 3AB-om prisutan je samo apoptotski fragment (Slika 4.27, kolona 3). Imajući u vidu da nekroza nastaje zbog hiperaktivacije PARP-1 jer zbog nagomilanih oštećenja na DNK dolazi do energetske kolapsa ćelije, odsustvo nekrotskog fragmenta u ćelijama pre-tretiranim sa 3AB-om, ukazuje da je PARP-1 enzimatska aktivnost efikasno inaktivirana sa koncentracijom 3AB-a od 50 μM . Na inhibiciju PARP-1 ukazuje i aktivacija efektorne kaspaze 3 (Slika 4.27).



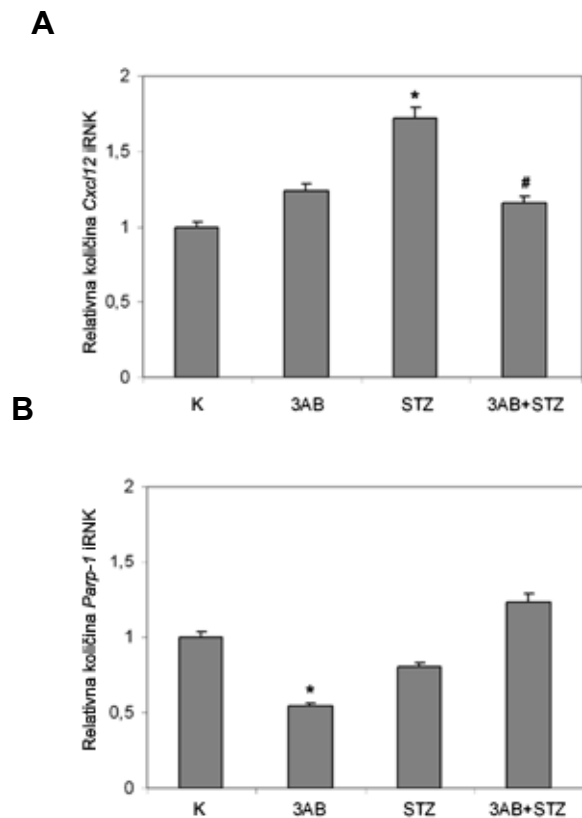
Slika 4.26. Uticaj inhibicije PARP-1 na preživljavanje Rin-5F wt ćelija u uslovima oksidativnog stresa. Rin-5F wt ćelije su tretirane rastućim koncentracijama 3AB-a, nakon čega je sledio tretman sa 5 mM STZ-om. Kontrolne ćelije su tretirane samo rastućim koncentracijama 3AB-a. Nakon primene tretmana vijabilnost ćelija je ispitana MTT esejom.

Uticaj inhibicije PARP-1 na *Cxcl12* transkripciju ispitan je pomoću qPCR metode. Rin-5F wt bile su izložene sledećim tretmanima: 50 μM 3AB, 30 min (Slika 4.28, kolona 2), 5 mM STZ, 6 h (Slika 4.28, kolona 3) i pre-tretman sa 50 μM 3AB-om, nakon čega je sledio STZ tretman u trajanju od 6 h (Slika 4.28, kolona 4). Na Slici 4.28A uočava se da je tretman STZ-om indukovao *Cxcl12* transkripciju, dok je paralelan tretman sa 3AB-om i STZ-om izazvao statistički značajno ($p < 0,05$) smanjenje *Cxcl12* transkripcije u odnosu na STZ-om indukovanu transkripciju. Ovi rezultati ukazuju da je inhibicija enzimske aktivnosti PARP-1, omogućila ne-automodifikovanom PARP-1 da intenzivno veže *Cxcl12* promotor i delimično inhibira transkripciju. Sa druge strane, tretman STZ-om i kombinacija STZ-a i 3AB-a, nisu doveli do statistički značajnih promena *Parp-1* transkripcije (Slika 4.28B). U slučaju tretmana sa 3AB-om, došlo je do statistički značajnog pada nivoa iRNK za PARP-1 gen (Slika 4.28B, kolona 2).



Slika 4.27. Uticaj inhibicije PARP-1 na tip ćelijske smrti nakon tretmana Rin-5F wt ćelija STZ-om. Imunoblot analiza ćelijskih lizata izolovanih iz kontrolnih (kolona 1), tretiranih STZ-om (kolona 2) i pre-tretiranih 3AB-om i tretiranih STZ-om (kolona 3) ćelija na prisustvo PARP-1, kaspaza 3 i β -aktin proteina. Označeni su apoptotski (89 kDa) i nekrotski (55 kDa) fragmenti PARP-1 proteina.

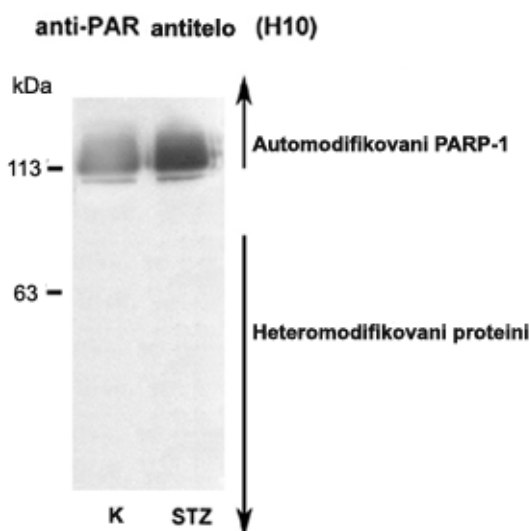
Rezultati imunoprecipitacije su potvrdili da su PARP-1 i YY1 interagujući partneri u Rin-5F wt ćelijama (Slika 4.14A). Ukoliko enzimatski aktivan PARP-1 heteromodifikuje YY1, sprečava se vezivanje YY1 za DNK sekvencu, usled negativnog naelektrisanja koje potiče od nagomilanih poli(ADP-riboz)nih polimera (Oei i sar., 1998). Sledeći korak u izradi doktorske teze, bio je da se ispita da li je u kasnoj fazi oksidativnog stresa (nakon 6 h tretmana STZ-om), kada se indukuje *Cxcl12* transkripcija, YY1 poli(ADP-ribozil)ovan. Rin-5F wt ćelije tretirane su STZ-om 6 h, i nakon tretmana ćelije su lizirane, a proteinski lizati su razdvojeni elektroforetski i preneti na PVDF membranu.



Slika 4.28. Uticaj inhibicije PARP-1 na relativnu ekspresiju *Cxcl12* i *Parp-1*. Rin-5F wt ćelije su tretirane 3AB-om (kolona 2), STZ-om (kolona 3), pre-tretirane 3AB-om i tretirane STZ-om (kolona 4). Relativna količina iRNK za *Cxcl12* (A) i *Parp-1* (B) analizirana je metodom PCR u realnom vremenu. Nivo ekspresije ispitivanih gena standardizovan je u odnosu na ekspresiju gena za β -aktin detektovanog u istom uzorku i iskazan kao $2^{-\Delta Ct}$. Prikazana je srednja vrednost \pm standardna greška rezultata dobijenih iz tri nezavisna eksperimenta. Srednje vrednosti su bile statistički značajno različite (*) u odnosu na srednju vrednost dobijenu za kontrolne, ne-tretirane (kolona 1) ćelije ($p < 0,05$). Srednje vrednosti su bile statistički značajno različite (#) u poređenju sa srednjom vrednosti koja je dobijena za STZ-om tretirane (kolona 3) ćelije ($p < 0,05$).

Korišćenjem antitela na produkte ezimatske aktivnosti PARP-1 tj. na ADP-ribozne polimere (PAR), ispitan je profil poli(ADP-ribozil)acije proteina u kontrolnim i tretiranim ćelijama. Imunoblot analiza pokazala je da tretman STZ-om od 6 h u Rin-5F wt ćelijama

izaziva automodifikaciju PARP-1, ali da ne dovodi do heteromodifikacije drugih proteina (Slika 4.29, kolona 2). U kontrolnim ćelijama detektovan je fiziološki nivo automodifikovanog PARP-1 (Slika 4.29, kolona 1). S obzirom, da YY1 nije heteromodifikovan ni u kontrolnim, ni u tretiranim ćelijama, omogućeno je njegovo vezivanje za *Cxcl12* promotor i indukcija transkripcije u kasnoj fazi oksidativnog stresa.



Slika 4.29. Enzimatska aktivnost PARP-1 u uslovima oksidativnog stresa. Imunoblot analiza produkata enzimske aktivnosti PARP-1, ADP-riboznih polimera (PAR) u proteinskim lizatima izolovanim iz kontrolnih (kolona 1) i STZ-om tretiranih (kolona 2) ćelija.

4.3. UTICAJ CXCL12 NA EKSPRESIJU TRANSKRIPCIONIH FAKTORA KOJI UČESTVUJU U NJEGOVOJ TRANSKRIPCIONOJ REGULACIJI

U poglavlju Rezultati, 4.2.4. pokazano je koji su transkripcioni faktori deo transkripcione mašinerije koja reguliše *Cxcl12* ekspresiju *in vitro* i *in vivo*. U poslednjoj etapi istraživanja ispitano je kako pojačano prisustvo CXCL12 (Rin-5F ćelije klona #1) utiče na ekspresiju pomenutih transkripcionih faktora.

Imunoblot analizom, korišćenjem antitela na transkripcioni faktor od interesa, ispitano je prisustvo transkripcionih faktora u jedru i citosolu Rin-5F wt ćelija i Rin-5F klona #1, kod koga je CXCL12 protein pojačano prisutan (Slika 4.1). Antitelo na YY1 detektovalo je traku od 63 kDa koja odgovara YY1 proteinu, u jedru i citosolu i wt i #1 ćelija. Međutim, prisustvo degradacionog produkta YY1 proteina od 43 kDa, uočeno je samo u wt ćelijama (Slika 4.10A). Prisustvo Sp1 proteina zabeleženo je u jedru i citosolu wt ćelija, dok je u ćelijama klona #1, ovaj protein prisutan samo u jedru (Slika 4.10B). STAT3 je prisutan u jednakim količinama u jedrima wt i klon #1 ćelija, dok se veća količina ovog proteina nalazi u citosolu wt ćelija u poređenju sa ćelijama klona #1 (Slika 4.10C). Više PARP-1 proteina detektovano je u jedru ćelija klona #1, nego u wt ćelijama (Slika 4.10D). PARP-1 nije prisutan u citosolu ispitivanih ćelija. U jedru wt i #1 ćelija uočeno je jednako prisustvo FOXO3a proteina, dok se u citosolu wt ćelija ovaj protein nalazi u većoj količini u odnosu na ćelije klona #1 (Slika 4.10E). C/EBP β prisutan je u jedru ćelija u vidu izoformi od 33 i 38 kDa (Slika 4.10F). Obe izoforme su zastupljenije u jedru wt ćelija u odnosu na jedra klona #1. C/EBP α nalazi se u jedru wt ćelija u obliku izoformi od 30 i 42 kDa, dok u ćelijama klona #1 nije zabeleženo prisustvo ovog proteina (Slika 4.10G). Imuoblot analiza pokazala je da nema razlike u ekspresiji HMG I/Y proteina između wt i klon #1 ćelija u oba ćelijska kompartmenta (Slika 4.10H). U bazalnim uslovima HMG I/Y je zastupljeniji u citosolu u odnosu na jedro. Protein p53 je detektovan u vidu izoformi od 44 i 53 kDa u jedru i citosolu wt ćelija, dok je u ćelijama klona #1 prisutna samo izoforma od 53 kDa u oba ćelijska odeljka (Slika 4.10J). Transkripcioni faktor koji ne vezuje promotor *Cxcl12*, NF- κ B nalazi se u jednakim količinama u citosolu wt i klon #1 ćelija, dok je u jedru zastupljeniji u wt ćelijama u odnosu na ćelije klona #1 (Slika 4.10I). Antitelo na β -aktin korišćeno je kao kontrola za ujednačenost koncentracija citosolnih i jedarnih proteina između ćelija wt i klona #1 (Slika 4.10K).

5. DISKUSIJA

5.1. CXCL12 I BETA ĆELIJE PANKREASA

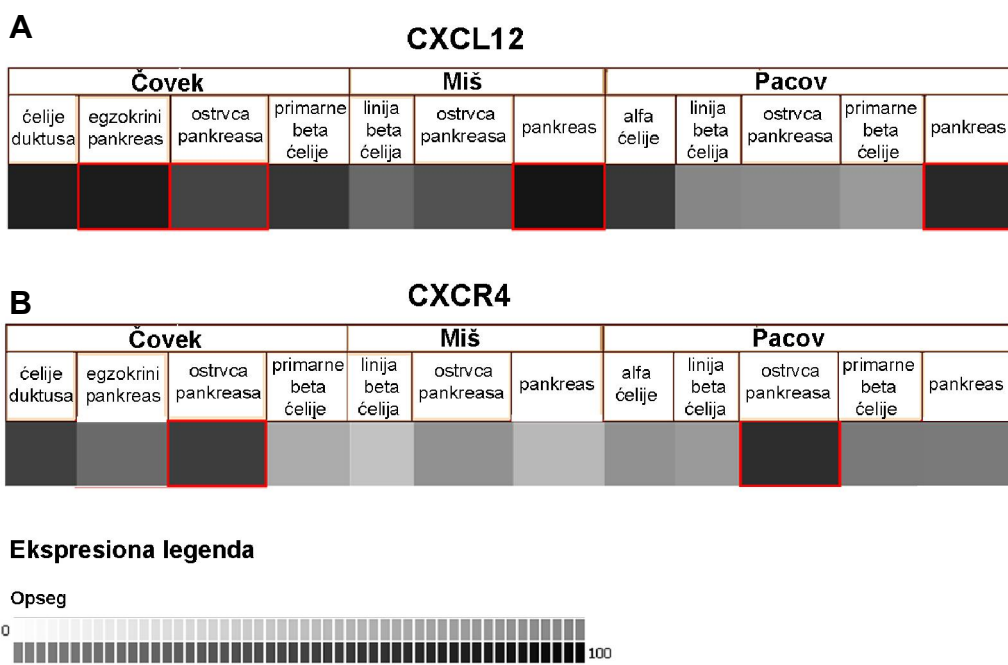
Očuvanjem funkcionalnih beta ćelija pankreasa mogu se sprečiti nastanak i razvoj dijabetesa i njegovih komplikacija. Zbog ogromnih razmera bolesti, koja se zbog visoke incidence naziva ne-infektivna epidemijska bolest 21. veka, kao i zbog teških posledica dijabetičnih komplikacija, pronalaženje terapijskih agenasa za tretman dijabetesa je više nego neophodno. Jedan od potencijalnih faktora koji doprinosi očuvanju beta ćelija je hemokin CXCL12. CXCL12 svoje protektivno dejstvo na beta ćelije ostvaruje na više načina: sprečavanjem odumiranja beta ćelija, indukcijom transdiferencijacije alfa u beta ćelije i stimulacijom neogeneze beta ćelija od prekursora poreklom iz duktusa egzokrinog pankreasa.

5.1.1. EKSPRESIJA CXCL12 GENA U BETA ĆELIJAMA

Za razliku od ostalih hemokina, koji su prisutni samo u određenim tkivima i čija se ekspresija indukuje u odgovoru na proinflamatorne citokine (Baggiolini i sar., 1994), CXCL12 se konstitutivno eksprimira u velikom broju tkiva i organa (Nagasawa i sar., 1994; Shirozu i sar., 1995). Među tkivima koja ekspimiraju CXCL12, nalaze se i Langerhansova ostrvca pankreasa (Slika 1.2). Prema Atlasu genske ekspresije u beta ćelijama (eng. *Beta Cell Gene Atlas*, **BCGA**), Langerhansova ostrvca pankreasa čoveka ekspimiraju više CXCL12 u odnosu na miša i pacova (nivo ekspresije je prikazan u proizvoljnim jedinicama: 75 – čovek, 69 – miš i 47 – pacov) (Slika 5.1A) (Kutlu i sar., 2009). Ćelijska linija insulinoma beta ćelija pacova - Rin-5F, koja je korišćena kao model sistem u ovoj doktorskoj tezi, eksprimira 20 puta više CXCL12 u poređenju sa Langerhansovim ostrvcima pankreasa pacova (neobjavljeni rezultati dobijeni u našoj laboratoriji). Ovi rezultati su u saglasnosti sa rezultatima Ihlan i sar. (2009), koji su pokazali da je ekspresija CXCL12 19,6 puta veća u humanim insulinoma tumorima u odnosu na normalna pankreatična ostrvca čoveka. Sa druge strane, Yano i sar. (2007) su objavili

da se u Langerhansovim ostrvcima miša CXCL12 pretežno eksprimira u endotelnim i glatkim mišićnim ćelijama krvnih sudova.

Za razliku od CXCL12, njegov receptor CXCR4 ekspimiraju tri glavna tipa endokrinih ćelija ostrvaca: alfa, beta i delta ćelije (Yano i sar., 2007). Prema BCGA, Langerhansova ostrvca pacova ekspimiraju više CXCR4 u poređenju sa čovekom i mišem (nivo ekspresije CXCR4 u proizvoljnim jednicama: 84 – pacov, 78 – čovek i 44 – miš) (Slika 5.1B) (Kutlu i sar., 2009). Ovi podaci ukazuju na postojanje parakrine i autokrine CXCL12/CXCR4 signalne ose u Langerhansovim ostrvcima. U ovom radu je pokazano da ćelijska linija Rin-5F eksprimira CXCL12 i njegov receptor CXCR4 (Slika 4.2A i C), što je u saglasnosti sa Yano i sar. (2007), Liu i sar. (2011) i BCGA (Slika 5.1) (Kutlu i sar., 2009), koji su takođe detektovali ekspresiju CXCL12 i CXCR4 u beta ćelijskoj liniji formiranoj od pankreasa pacova. Ekspresija CXCL12 i CXCR4 u Rin-5F ćelijama je učinilo ovu ćelijsku liniju adekvatnim model sistemom za ispitivanje transkripcione regulacije gena za CXCL12 u beta ćelijama.



Slika 5.1. Ekspresioni profili gena za CXCL12 (A) i CXCR4 (B) u različitim ćelijama pankreasa (Preuzeto sa http://www.tldbase.org/page/Overview/display/gene_id/7852).

5.1.2. CXCL12 DOPRINOSI OČUVANJU FUNKCIONALNIH BETA ĆELIJA PANKREASA

U doktorsoj tezi je pokazano da CXCL12 pospešuje preživljavanje beta ćelija pankreasa, pošto su Rin-5F ćelije klona #1, kod kojih je CXCL12 pojačano eksprimiran, bile manje osetljive na dejstvo STZ-a od Rin-5F wt ćelija (Slika 4.3). Slične podatke objavili su Liu i sar. (2011), koji su pokazali da pored toga što pozitivno utiče na preživljavanje beta ćelija, CXCL12 doprinosi očuvanju njihove funkcionalnosti, pošto su beta ćelije pre-tretirane sa rekombinovanim CXCL12 bile sposobne da sintetišu i izlučuju insulin u uslovima oksidativnog stresa izazvanog glukotoksičnošću. Antiapoptotsko dejstvo CXCL12 na beta ćelije potvrđeno je i u *in vivo* studiji Yano i sar. (2007), u kojoj je pokazano da transgeni miševi kod kojih je CXCL12 pojačano eksprimiran u beta ćelijama pankreasa (RIP-SDF-1 miševi) ne razvijaju dijabetes nakon primene dijabetogenog stimulusa. Prema Yano i sar. (2007) CXCL12 pospešuje preživljavanje beta ćelija aktivacijom Akt kinaze, što je u saglasnosti sa neobjavljenim rezultatima dobijenim u našoj laboratoriji, gde je pokazano da je Akt kinaza aktivnija u Rin-5F ćelijama klona #1 u odnosu na wt ćelije. Aktivacijom Akt kinaze aktivira se više nishodnih antiapoptotskih signalnih puteva, što rezultira indukcijom ekspresije Bcl-2 i drugih antiapoptotskih proteina i inaktivacijom proapoptotskog proteina BAD (Yano i sar., 2007; Liu i Habener, 2009). Akt put prenosa signala u odgovoru na CXCL12 prikazan je na Slici 1.4 i opisan u poglavlju Uvod, 1.2.2.

Pored toga što pospešuje preživljavanje beta ćelija, CXCL12 doprinosi i boljem očuvanju DNK u uslovima oksidativnog stresa izazvanog dijabetogenim stimulusom (Slika 4.4). Ovi rezultati ukazuju da CXCL12 aktivira mehanizme koji doprinose efikasnijoj odbrani ćelije od oksidativnog stresa i/ili efikasnijoj reparaciji oštećene DNK. U ovoj doktorskoj tezi po prvi put je opisan uticaj CXCL12 na očuvanje DNK integriteta u uslovima oksidativnog stresa. Potencijalni molekularni mehanizmi kojima CXCL12 doprinosi smanjenju DNK oštećenja su: inhibicija ekspresije p44 izoforme proteina p53, čime je omogućena ekspresija regulatora ćelijskog ciklusa p21; pojačana ekspresija PARP-1 i očuvanje funkcionalnog YY1 proteina, koji doprinosi efikasnoj reparaciji oštećene DNK

od strane PARP-1. Pomenuti molekularni mehanizmi detaljno su prodiskutovani u poglavlju Diskusija, 5.3.

Na osnovu iznetih podataka može se zaključiti da CXCL12 pomaže beta ćelijama da se izbore sa oksidativnim stresom koji ima važnu ulogu u razvoju oba tipa dijabetesa, što čini CXCL12 potencijalnim terapijskim agensom u tretmanu DT1 i DT2.

5.2. MOLEKULARNI MEHANIZMI TRANSKRIPCIONE REGULACIJE *Cxcl12* U BETA ĆELIJAMA PANKREASA

Rasvetljavanje molekularnih mehanizama regulacije ekspresije gena koji su ključni za normalno funkcionisanje i preživljavanje beta ćelija može doprineti razvoju novih terapijskih strategija za prevenciju i lečenje dijabetesa. Tako na primer, novi terapeutici koji stimulišu ekspresiju transkripcionog faktora Pdx-1, mogu da očuvaju funkciju beta ćelija kod dijabetičara (Stoffers i sar., 2000). Uprkos činjenici da je zbog svog protektivnog dejstva na beta ćelije CXCL12 obećavajući kandidat za terapijskog agensa u prevenciji i terapiji dijabetesa, molekularni mehanizmi regulacije njegove ekspresije u beta ćelijama su potpuno nepoznati. U doktorskoj tezi su po prvi put predstavljani transkripcioni faktori koji su uključeni u transkripcionu regulaciju *Cxcl12* u beta ćelijama. Pored toga, za dva novootkrivena transkripciona regulatora *Cxcl12*, PARP-1 i YY1, definisan je i funkcionalan efekat na ekspresiju *Cxcl12*. Takođe, prikazani su molekularni mehanizmi transkripcione regulacije *Cxcl12* u bazalnim uslovima i u uslovima oksidativnog stresa, izazvanog dijabetogenim stimulusom. Važno je još napomenuti da je u okviru doktorske teze po prvi put izvršena analiza promotora *pacovskog* gena za CXCL12.

5.2.1. PROMOTOR CXCL12 GENA

Analize promotora CXCL12 gena pacova (*Cxcl12*) (Slika 4.9) (Marković i sar., 2013) i čoveka (*CXCL12*) (Garcia-Moruja i sar., 2005) pokazale su da je CXCL12 promotor bogat GC bazama i da sadrži nekanonski TATA element i nizvodni Int element. Sekvenca i pozicija humanog i pacovskog nekanonskog TATA elementa su u potpunosti

očuvane i u oba slučaja TATA element čini sekvenca 5'-TCTAAA-3', koja se nalazi na poziciji -25/-20 bp. Prisustvo nekanonskog TATA elementa je zajednička karakteristika promotora gena, koji kodiraju hemokine iz CXC familije, sa izuzetkom IL-8 i CXCL11 hemokina (Garcia-Moruja i sar., 2005). Na Slici 5.2 prikazani su TATA elementi kod različitih hemokina iz CXC familije. Nekanonski TATA element je neophodan za bazalnu transkripciju CXCL12 gena, pošto se njegovom mutacijom aktivnost promotora smanjuje za 50% (Garcia-Moruja i sar., 2005). Činjenica da uprkos mutaciji TATA elementa CXCL12 promotor ostvaruje 50% svoje bazalne aktivnosti, ukazuje da u inicijaciji transkripcije CXCL12 gena učestvuju i drugi promotorski elementi. Poznato je da promotore koji sadrže nekanonski TATA element, protein TBP koji je komponenta opšteg transkripcionog faktora TFIID, vezuje sa smanjenim afinitetom (Smale, 1997). Interakcija slabog intenziteta između TBP i nekanonskog TATA elementa u okviru CXCL12 promotora, može biti odgovorna za delimičnu ulogu TATA elementa u inicijaciji transkripcije.

KONSENZUS	T*	A	T	A	A/T	A
CXCL12	T	C	T	A	A	A
Groα	C	A	T	A	A	A
Groβ	C	A	T	A	A	A
Groγ	C	A	T	A	A	A
GCP2	G	A	T	A	A	A
ENA-78	C	A	T	A	A	A
IL8	T	A	T	A	A	A
IP10	G	A	T	A	A	A
NAP-2	G	A	T	A	A	A
PF4	G	A	T	A	A	A
CXCL11	T	A	T	A	A	A
MIG	T	C	T	A	A	A

Slika 5.2. TATA elementi prisutni u promotoru različitih hemokina iz CXC familije (Preuzeto od Garcia-Moruja i sar., 2005)

U inicijaciji transkripcije *CXCL12* gena, pored nekanonskog TATA elementa, najverovatnije učesvuje i Int element, koji se i u pacovskom (Slika 4.9) i u humanom (Garcia-Moruja i sar., 2005) promotoru sastoji od identične sekvence (5'-TTC ACTCT-3'), koja se u oba promotora nalazi 31 bp nizvodno od TATA elementa. Garcia-Moruja i sar. (2005) su pokazali da se u okviru Int elementa promotora *CXCL12* nalazi sekundarno mesto početka transkripcije, što je u saglasnosti sa funkcijom Int elementa kao alternativnog TSS, kod promotora koji ne poseduju klasičan TATA element. Pokazano je da Int i TATA element sinergistički aktiviraju transkripciju ciljnog gena, pošto je insercijom Int nizvodno od TATA elementa aktivnost promotora nekoliko puta jača u odnosu na aktivnost promotora kada je prisutan samo jedan od promotorskih elemenata (Smale, 1997). Među proteinima koji imaju sposobnost da vežu Int element i iniciraju transkripciju nalaze se: TFIID, TFII-I i YY1. TFIID ima sposobnost da veže Int element samo ukoliko se uzvodno nalazi TATA element ili ukoliko je transkripcioni faktor Sp1 vezan za uzvodne *cis*-regulatorne sekvence (Kaufmann i Smale, 1994). Vezivanjem za Int, TFIID ima sposobnost da indukuje transkripciju, a interakcija se odvija najverovatnije direktnom interakcijom subjedninice TFIID, TAF250 sa Int elementom (Oelgeschlager i sar., 1996). Ipak, TFIID-Int interakcija je znatno slabija od interakcije između TATA elementa i TFIID, što ukazuje da je za potpunu aktivnost Int elementa potrebna interakcija sa drugim proteinom koji bi stabilisao formirani TFIID-Int kompleks (Smale, 1997). Protein TFII-I, takođe ima sposobnost da veže Int element i da inicira transkripciju određenih gena (Roy i sar., 1991; Manzano-Winkler i sar., 1996). Transkripcioni faktor YY1 je još jedan protein koji može da indukuje transkripciju pojedinih gena vezivanjem za Int element. Nakon vezivanja za Int, YY1 interaguje sa TFIIB i nagrađeni YY1-TFIIB-DNK kompleks omogućuje vezivanje RNK pol II za promotor (Usheva i Shenk, 1996). Za transkripciju indukovanu od strane YY1 ne samo da nije potrebno prisustvo TBP i drugih komponenti TFIID, već je pokazano da su TBP i TFIID nekompatibilni sa ovim načinom inicijacije transkripcije (Usheva i Shenk, 1994). Iako je u ovoj tezi pokazano da je YY1 veoma važan faktor u regulaciji *Cxcl12* transkripcije, imajući u vidu da je više molekula YY1 uključeno u transkripcionu regulaciju *Cxcl12*, pošto YY1 vezuje sva tri promotorska fragmenta *in vivo* (Slika 4.13), i da je YY1 veoma jak aktivator *Cxcl12* transkripcije (Slika

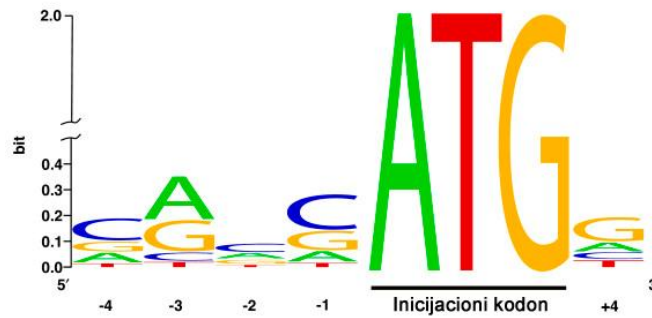
4.22), malo je verovatno da YY1 ima ulogu u inicijaciji transkripcije CXCL12 gena. Prvi razlog je to što se Int element *Cxcl12* ne poklapa sa YY1 vezivnim mestom. Uočeno je da ukoliko se YY1 motiv nalazi na minus lancu DNK onda se poklapa sa Int elementom, odnosno mestom početka transkripcije, dok ukoliko je YY1 motiv prisutan na plus lancu onda se podudara sa Kozak sekvencom, odnosno sa mestom početka translacije (Xi i sar., 2007). Promotor *Cxcl12* spada u drugu grupu promotora, pošto se sva četiri YY1 motiva nalaze na plus lancu i jedan od njih (na poziciji +84/+90 bp) se poklapa Kozak sekvencom (Slika 4.9), o čemu će biti više reči kasnije u ovom poglavlju. Pored toga pokazano je da TBP vezuje promotor *CXCL12* i da je nekanonski TATA element neophodan za bazalnu transkripciju *CXCL12* (Garcia-Moruja i sar., 2005), dok se inicijacija transkripcije od strane YY1 odvija u odsustvu TATA elementa i TBP proteina.

Još jedna karakteristika promotorske sekvence CXCL12 gena pacova je da je bogata GC bazama, što je u saglasnosti sa humanim promotorom (Garcia-Moruja i sar., 2005; Ramos i sar., 2010). Ramos i sar. (2010) su uočili prisustvo pet CpG ostrvaca u okviru promotora *CXCL12*. Konstitutivna ekspresija *CXCL12* gena u velikom broju organa je u saglasnosti sa prisustvom sekvence bogate GC bazama u promotoru, imajući u vidu da su promotori bogati GC bazama zajednička karakteristika konstitutivno eksprimiranih gena (Smale,1997).

Prisustvo sekvenci bogatih GC bazama u okviru promotora je usko povezano sa učešćem Sp1 transkripcionog faktora u regulaciji transkripcije, pošto Sp1 vezuje *cis*-regulatorne sekvence koje se nazivaju GC elementi. U doktorskoj tezi potvrđeno da Sp1 učestvuje u transkripcionoj regulaciji *Cxcl12*. Takođe, pokazano je da je više molekula Sp1 uključeno u kontrolu transkripcije, pošto ovaj transkripcioni faktor vezuje sva tri promotorska fragmenta *in vivo* (Slika 4.13). Sp1 ima deset potencijalnih mesta vezivanja u okviru promotora *Cxcl12*, od kojih se jedno nalazi neposredno pre TSS, na poziciji -11/-1 bp (Slika 4.9). Prisustvo Sp1 motiva u neposrednoj blizini TSS, potvrđeno je i kod promotora *CXCL12*, na poziciji -9/+1 bp, pri čemu se u humanom promotoru poslednji nukleotid Sp1 motiva poklapa sa TSS (Garcia-Moruja i sar., 2005). U okviru promotora *CXCL12*, Sp1 poseduje petnaest potencijalnih mesta vezivanja. Pokazano je da Sp1 vezuje šest motiva, od kojih su dva ključna za bazalnu transkripciju *CXCL12* jer se njihovom

mutacijom aktivnost promotora smanjuje za 87% (mutacijom Sp1 motiva na poziciji -57/-39 bp) i 50% (mutacijom Sp1 motiva na poziciji -9/+1) (Garcia-Moruja i sar., 2005). Važna uloga Sp1 u transkripcionoj regulaciji CXCL12 gena je očekivana, imajući u vidu da Sp1 ima ključnu ulogu u regulaciji transkripcije konstitutivno eksprimiranih gena koji nemaju klasičan TATA element. Kada TATA element nije prisutan u promotoru, Sp1 interaguje sa TBP i TAF proteinima i tako omogućuje vezivanje TFIID za promotor (Hoey i sar., 1993, Gill i sar., 1994, Chiang i Roeder 1995, Tanese i sar., 1996). Na početku ovog poglavlja spomenuto je da TFIID ima sposobnost da veže Int element jedino ukoliko se uzvodno nalazi TATA element ili ako je Sp1 vezan za uzvodne *cis*-regulatorne sekvence. U okviru promotora *Cxcl12*, sedam Sp1 motiva se nalazi uzvodno od Int elementa (Slika 4.9). Postoji mogućnost da Sp1 koji je vezan za svoje konsenzus sekvence uzvodno od Int pomaže TFIID da interaguje sa Int elementom *Cxcl12*. Insercijom Int elementa nizvodno od Sp1 vezujućih mesta, efikasnost inicijacije transkripcije se višestruko povećava (Smale, 1997).

Analizom promotora *Cxcl12* uočeno je prisustvo potencijalne Kozak sekvence, smeštene nizvodno od Int elementa (Slika 4.9). Kozak sekvenca (RCCATGG) predstavlja mesto početka translacije i u okviru nje se nalazi ATG inicijacioni kodon (Slika 5.3) (Kozak, 1984). Kod CXCL12 gena Kozak sekvenca je konzervirana između različitih vrsta. Kozak sekvence miša i pacova su identične (5'-GCCATGG-3'), dok se od humane razlikuju samo u poslednjem nukleotidu (5'-GCCATGA-3') (Nagasawa i sar., 1994; Garcia-Moruja i sar., 2005). U promotoru CXCL12 gena pacova potencijalno vezivno mesto za transkripcioni faktor YY1 na poziciji +84/+90 bp u potpunosti se poklapa sa Kozak sekvencom. Ovo poklapanje je i očekivano, imajući u vidu da se YY1 motivi koji se nalaze nizvodno od TSS podudaraju sa mestom početka translacije u mnogim promotorima (Xi i sar., 2007). Preklapajuće mesto, Kozak sekvenca/YY1 motiv se nalazi u okviru trećeg promotorskog fragmenta *Cxcl12*. YY1 vezuje treći promotorski fragment *in vivo* (Slika 4.13), a činjenica da je pomenuto vezivno mesto ujedno i jedini YY1 motiv u trećem fragmentu, ukazuje da je YY1 upravo sa njim u interakciji. Na osnovu toga može se pretpostaviti da sekvenca na poziciji +84/+90 zaista predstavlja Kozak sekvencu, sa koje će se inicirati translacija sa iRNK *Cxcl12*.



Slika 5.3. Kozak konsenzus sekvenca kod kičmenjaka (Preuzeto sa internet stranice <http://www.biomedcentral.com/1471-2164/6/166/figure/F6>).

Postavlja se pitanje biološkog značaja podudaranja mesta početka translacije sa YY1 motivom. Xi i sar. (2007) su analizirali promotore 723 humana gena i zaključili da ukoliko se YY1 motiv nalazi na plus lancu DNK, onda se uglavnom javlja nizvodno od TSS i poklapa sa Kozak sekvencom. Takođe, iRNK za većinu gena iz ove grupe imaju kratak 5'-netranslatujući region (eng. *5'-untranslated region, 5'-UTR*), čija dužina iznosi manje od 40 nukleotida. U ovu grupu gena spadaju geni koji se konstitutivno eksprimiraju u velikom broju tkiva, kao što su na primer geni koji kodiraju proteine koji ulaze u sastav ribozoma i jedarni geni koji kodiraju mitohondrijalne proteine. Kratki 5'-UTR obezbeđuju efikasnu inicijaciju translacije, pošto je smanjena mogućnost formiranja sekundarnih struktura iRNK uzvodno od AUG kodona. Autori smatraju da vezivanje YY1 može da pomogne u preciznom pozicioniranju transkripcione mašinerije i time obezbedi očuvan i kompletan 5'-UTR, nepohodan za visok stepen ekspersije ovih gena. Međutim, 5'-UTR iRNK za CXCL12 gen miša sastoji se od 58 nukleotida (Nagasawa i sar., 1994), a za humani od 96 nukleotida (Garcia-Moruja i sar., 2005), dok se na osnovu udaljenosti inicijacionog ATG kodona u okviru Kozak sekvence u odnosu na TSS u promotoru CXCL12 gena pacova može pretpostaviti da se pacovski 5'-UTR sastoji od 87 nukleotida (Slika 4.9). Iako ne poseduje 5'-UTR kraći od 40 nukleotida, CXCL12 se konstitutivno eksprimira u velikom broju organa, tako da možda poklapanje Kozak sekvence sa YY1 motivom na neki drugi način doprinosi konstitutivnoj ekspresiji CXCL12 gena. Ovoj pretpostavci ide u prilog i nedavna analiza promotora PARP-1 gena miša (*Parp-1*) (Doetsch

i sar., 2012). Kao i CXCL12 gen i PARP-1 gen se konstitutivno eksprimira u velikom broju tkiva. Takođe, kod *Parp-1*, YY1 motiv se javlja nizvodno od TSS i poklapa sa Kozak sekvencom. Udaljenost inicijacionog ATG kodona u sastavu Kozak sekvence od TSS, iznosi 98 nukleotida, što ukazuje da ni *Parp-1* ne spada u grupu gena sa 5'-UTR kraćim od 40 nukleotida. Primer *Parp-1*, ide u prilog pretpostavci da kratak 5'-UTR, nije jedina „prednost“ gena kod kojih se Kozak sekvence i YY1 motiv poklapaju, već da verovatno postoje i drugi mehanizmi putem kojih ova sekvence doprinosi konstitutivnoj ekspresiji gena.

Nakon transfekcije ćelijskih linija fibroblasta (NIH3T3) i insulinoma beta ćelija (Rin-5F) sa pCXCL12luc vektorom, u kome je promotor *Cxcl12* ukloniran ispred gena za luciferazu svica, uočena je promotorska aktivnost *Cxcl12* u oba ćelijska tipa (Slika 4.17). Pored pomenutih ćelija poznato je da je promotor CXCL12 gena aktivan u ćelijskoj liniji astrocita (U373), ćelijskoj liniji embrionalnih fibroblasta pluća (LC5), ćelijskoj liniji kosne srži (MS-5), ćelijskoj liniji glioblastoma-astrocitoma (U87), u glatkim mišićnim ćelijama krvnih sudova i ćelijskim linijama kancera dojke (T47D i MCF-7) (Garcia-Moruja i sar., 2005; Olive i sar., 2008; Chen i sar., 2010; Calonge i sar., 2010). U NIH3T3 ćelijama aktivnost promotora *Cxcl12* je 25 puta manja u odnosu na CMV promotor (Slika 4.17A). Promotor CMV je jak virusni promotor, koji obezbeđuje visok nivo ekspresije u mnogim tipovima ćelija sisara (Lin i sar., 2001). Zanimljivo je da u istoj ćelijskoj liniji promotor CMV pokazao 25 puta jaču aktivnost u odnosu na promotor PARP-1 gena miša (Dotsch, 2007). U insulinoma beta ćelijama zabeležena je manja aktivnost promotora *Cxcl12* u odnosu na njegovu aktivnost u fibroblastima (Slika 4.17C), što ukazuje da je različitom tipu ćelije potrebna različita količina CXCL12, što ukazuje da molekularni mehanizmi regulacije genske ekspresije uslovljavaju različit intenzitet transkripcije *Cxcl12* u zavisnosti od potrebe ćelije.

Promotor CXCL12 gena je prvobitno svrstavan u grupu konstitutivnih promotora, pošto je ekspresija gena za CXCL12 detektovana u gotovo svim organima, osim u leukocitima iz periferne krvi. Međutim, nedavna istraživanja, koja su pokazala da se pod dejstvom različitih stimulusa ekspresija CXCL12 gena može indukovati, navela su na

zaključak da se gen za CXCL12 ipak nalazi pod kontrolom inducibilnog promotora (Garcia-Moruja i sar., 2005).

5.2.2. INDUKCIJA TRANSKRIPCije *Cxcl12* GENA

Indukcija CXCL12 gena je zabeležena nakon zračenja ćelija γ zracima i tretmanom antibioticima (Ponomaryov i sar., 2000), u uslovima hipoksije i zaustavljanja ćelijskog ciklusa (Santiago i sar., 2011), nakon stimulacije ćelija citokinima i u uslovima ćelijske konfluentnosti (Calonge i sar., 2010), nakon tretmana ćelija sa faktorom kojim se stimuliše diferencijacija granulocita (ATRA) (Kim i sar., 2007), kao i u odgovoru na povredu ćelije (Olive i sar., 2008; Liu i sar., 2011). Različiti dijabetogeni agensi kao što su glukotoksičnost, proinflamatorni citokini, STZ i induktor stresa endoplazmatičnog retikuluma (tapsigargin) indukuju ekspresiju gena za CXCL12 u Langerhansovim ostrvcima pankreasa miša i čoveka (Liu i sar., 2011). Naši rezultati pokazali su da se nakon 6 h tretmana STZ-om indukuje transkripcija *Cxcl12* (Slika 4.24, kolona 5) u beta ćelijama pankreasa. U ovoj tački tretmana zabeležena su i najveća oštećenja na DNK (Slika 4.23, kolona 5). Imajući u vidu da manja oštećenja na DNK nisu izazvala pojačanu transkripciju *Cxcl12* (Slika 4.23 i 4.24), može se zaključiti da je za indukciju ekspresije *Cxcl12*, potrebno primeniti jak stresogeni stimulus. Mogućnost da se indukuje ekspresija CXCL12 gena tokom intenzivnog oksidativnog stresa izazvanog dijabetogenim stimulusom je veoma značajna za ulogu CXCL12 kao terapijskog agensa u tretmanu dijabetesa. Naime, sintetisani CXCL12 se izlučuje i vezuje za svoj receptor CXCR4 na površini beta ćelije i tako autokrinim i parakrinim putem aktivira antiapoptotski signalni put čime se sprečava odumiranje beta ćelija. Pored toga, sekretovani CXCL12 se vezuje za receptor na susednim alfa ćelijama, čime izaziva njihovu de-diferencijaciju u pro-alfa ćelije, što predstavlja prvi korak u procesu transdiferencijacije alfa u beta ćelije (Habener i Stanojevic, 2012a). Sprečavanjem odumiranja postojećih i stimulacijom nastanka novih beta ćelija, CXCL12 obezbeđuje prisustvo funkcionalnih beta ćelija, što ukazuje da bi njegova pojačana ekspresija tokom nastanka dijabetesa mogla da predstavlja odbrambeni mehanizam organizma. O ulozi CXCL12 u sprečavanju dijabetesa je bilo više reči u poglavlju Uvod,

1.2.2. Prema Liu i sar. (2011) kratkotrajan tretman egzogenim CXCL12 autokrinim mehanizmom indukuje sopstvenu ekspresiju u beta ćelijama Langerhansovih ostrvaca. Sa druge strane, u ovoj doktorskoj tezi je pokazano suprotno, tj. da pojačano prisustvo CXCL12 u Rin-5F ćelijama klona #1 ne utiče na sopstvenu gensku transkripciju (Slika 4.2A i Slika 4.19). Izostanak autoregulatornog transkripcionog potencijala u ćelijama Rin-5F klona #1 je verovatno mehanizam kojim ćelija održava homeostazu, imajući u vidu hronično pojačano prisustvo CXCL12 proteina u ovim ćelijama (Slika 4.1).

5.2.3. TRANSKRIPCIONI FAKTORI UKLJUČENI U TRANSKRIPCIONU REGULACIJU *Cxcl12* U BETA ĆELIJAMA PANKREASA PACOVA

Korišćenjem *in vitro* (EMSA) i *in vivo* (ChIP) tehnika pokazano je da više transkripcionih faktora vezuje promotor *Cxcl12*, što ukazuje na njihovo učešće u regulaciji transkripcije *Cxcl12*. Za neke od tih transkripcionih faktora je pomoću tehnike koimunoprecipitacije proteina, utvrđeno da međusobno interaguju, što ukazuje na formiranje nukleoproteinskih kompleksa, odgovornih za regulaciju aktivnosti *Cxcl12* promotora.

Rezultati iz doktorske teze pokazuju da su transkripcioni faktori PARP-1, YY1, C/EBP β , C/EBP α , STAT3, p53, FOXO3a, Sp1 i HMG I/Y uključeni u transkripcionu regulaciju *Cxcl12* u beta ćelijama pankreasa pacova. Svi navedeni transkripcioni faktori poseduju vezujuće motive u okviru promotora *Cxcl12* (Slika 4.9) i imaju potencijal za vezivanje promotora.

Jedini transkripcioni faktor koji ne vezuje promotor *Cxcl12*, a ima potencijalno mesto vezivanja je NF- κ B (Slika 4.9 i 4.11, kolona 12). Odsustvo interakcije između transkripcionog faktora NF- κ B i promotora *Cxcl12* je krajnje neočekivano, imajući u vidu da NF- κ B ima ključnu ulogu u regulaciji ekspresije hemokina i hemokinskih receptora (Yang i Richmond, 2009). Za razliku od promotora pacova, promotor humanog CXCL12 gena ne poseduje NF- κ B motiv (Garcia-Moruja i sar., 2005). U promotoru *Cxcl12* nalaze se dva potencijalna mesta vezivanja za NF- κ B, jedno u prvom, a drugo u drugom promotorskom fragmentu (Slika 4.12). Oba NF- κ B motiva se poklapaju sa HMG I/Y

motivom. U slučaju prvog promotorskog fragmenta, uprkos pojavi preklapajućih vezivnih mesta ne radi se o kompeticiji transkripcionih faktora, pošto HMG I/Y ne vezuje prvi fragment (Slika 4.13A). Sa druge strane, HMG I/Y vezuje drugi promotorski fragment, u kome se pored NF- κ B/HMG I/Y preklapajućeg vezivnog mesta, nalaze još dva HMG I/Y motiva, tako da se ni u slučaju drugog fragmenta ne može sa sigurnošću tvrditi da HMG I/Y interaguje sa NF- κ B/HMG I/Y motivom. Ovi rezultati ukazuju da u prvom, a postoji mogućnost i u drugom promotorskom fragmentu, prisustvo drugog proteina ne sprečava vezivanje NF- κ B za promotor. Postavlja se pitanje da li su bazalni uslovi tj. odsustvo stimulusa, u kojima je ispitan afinitet vezivanja NF- κ B za promotor *Cxcl12* odgovorni za izostanak interakcije, pošto je poznato da se NF- κ B proteini u ćelijama aktiviraju pod dejstvom različitih stimulusa, među kojima se nalaze IL-1 β , TNF- α , IL-11, IL-17, LPS (Barnes, 1997). Međutim, rezultat Garcia-Moruja i sar. (2005) u kom tretman ćelija sa TNF- α , aktivatorom NF- κ B proteina, nije doveo do promene u bazalnoj aktivnosti promotora CXCL12 gena potvrđuje da se transkripciona regulacija gena za CXCL12 ne nalazi pod kontrolom NF- κ B.

Činjenica da transkripcioni faktor Sp1 vezuje prvi promotorski fragment *Cxcl12*, koji ne sadrži Sp1 motiv (Slika 4.12 i Slika 4.13A), sugeriše da se Sp1 nalazi u interakciji sa nekim drugim transkripcionim faktorom asosovanim sa prvim fragmentom. Metodom ko-imunoprecipitacije proteina pokazano je da Sp1 interaguje sa STAT3, PARP-1 i FOXO3a transkripcionim faktorima (Slika 4.14). Sva tri transkripciona faktora imaju vezujuća mesta i vezuju prvi promotorski fragment (Slika 4.12 i Slika 4.13A), što ukazuje bi Sp1 mogao sa nekim od njih da formira heterodimerni ili multi-subjedinični transkripcioni kompleksa i tako veže prvi promotorski fragment. Moguće je čak formiranje i trimernog transkripcionog kompleksa Sp1/FOXO3a/PARP1, pošto se u prvom fragmentu PARP-1 (-448/-444 bp) i FOXO3a (-446/439 bp) motivi delimično poklapaju (Slika 4.12), a detektovana je i direktna interakcija između PARP-1 i FOXO3a (Slika 4.14). Iz literature je poznato da Sp1 fizički interaguje sa PARP-1, nezavisno od vezivanja za DNK u ćelijama fibroblasta (Zaniolo i sar., 2007). Svi Sp1 motivi u okviru promotora *Cxcl12* se nalaze oko nekanonskog TATA elementa. Sp1 vezuje drugi i treći promotorski fragment, koji poseduju

više Sp1 vezivnih mesta, drugi fragment četiri dok treći čak sedam, što ukazuje da bi Sp1 mogao direktno da interaguje sa ova dva fragmenta (Slika 4.12 i 4.13). Tome u prilog ide i činjenica da su Garcia-Moruja i sar. (2005) pokazali da Sp1 direktno interaguje sa promotorom humanog CXCL12 gena, pošto se mutacijom Sp1 motiva koji se nalaze u blizini nekanonskog TATA elementa, bazalna transkripcija CXCL12 gena smanjila za više od 50%. U okviru trećeg promotorskog fragmenta Sp1 motiv na poziciji -13/-21 bp se delimično poklapa sa nekanonskom TATA sekvencom (Slika 4.9 i 4.12), što ukazuje na važnu ulogu Sp1 u inicijaciji transkripcije *Cxcl12*, imajući u vidu da je kod promotora koji ne sadrži TATA element, vezivanje TFIID za promotor omogućeno direktnom interakcijom Sp1 sa TBP proteinom (Chiang i Roeder 1995, Tanese i sar., 1996). Po analogiji sa drugim konstitutivno eksprimiranim genima koji poseduju nekanonski TATA i Int element, Sp1 može imati ključnu ulogu u inicijaciji i održavanju transkripcije CXCL12 gena, o čemu je bilo više reči u poglavlju Diskusija, 5.2.1. Vezivanje Sp1 za promotor prikazano je u okviru potencijalnog modela transkripcione regulacije *Cxcl12* na Slici 5.5.

Transkripcioni faktor C/EBP β vezuje sva tri promotorska fragmenta (Slika 4.13). U okviru prvog fragmenta nalaze se četiri C/EBP β motiva koja se poklapaju sa C/EBP α motivima (Slika 4.12). Preklapajuća vezivna mesta na DNK za C/EBP α i β su posledica visokog stepena strukturne i funkcionalne homologije baznog DNK-vezujućeg regiona C/EBP proteina, što uslovljava njihovu interakciju sa identičnim DNK motivima (Ramji i Foka, 2002). Pored toga, za vezivanje C/EBP proteina za DNK neophodna je homo- ili heterodimerizacija sa drugim članom iz C/EBP familije, pošto je u formi dimera, baznim regionima proteina omogućeno da ostvare specifičan kontakt sa DNK *cis*-elementima (Lamb i McKnight, 1991). Budući da i C/EBP α interaguje sa prvim fragmentom (Slika 4.13A) može se pretpostaviti da C/EBP α i β kao heterodimeri vezuju C/EBP α /C/EBP β motive. Poznato je da C/EBP α i C/EBP β u formi heterodimera vezuju *cis*-elemente u hepatocitima (Rana i sar., 1995, Poznanović i sar., 1999). U ovoj doktorskoj tezi međuproteinske interakcije su ispitivane metodom ko-imunoprecipitacije proteina, gde se nakon imunoprecipitacije ćelijskog lizata sa antitelom na protein od interesa, imunoblot analizom ispituje prisustvo interagujućih partnera. Velika količina lakih i teških lanaca imunoglobulina, poreklom od antitela na ispitivani protein, maskira signal na poziciji od 25

do 50 kDa, tako da imunoblot analizom nije moguće detektovati proteine čije se molekulske mase nalaze u ovom opsegu. Budući da se molekulske mase izoformi C/EBP α i C/EBP β kreću od 30 do 42 kDa (Slika 4.10), ko-immunoprecipitacijom nije bilo moguće ispitati interakciju između C/EBP α i β . U prvom promotorskom fragmentu C/EBP α /C/EBP β motiv na poziciji -449/-443 bp se poklapa i sa p53 i PARP-1 vezujućim mestima, a delimično i sa FOXO3a motivom (Slika 4.12). Za FOXO3a, p53 i PARP-1 preklapajuće vezivno mesto je ujedno i jedini DNK vezujući motiv u okviru prvog fragmenta. Imajući u vidu da sva tri transkripciona faktora vezuju prvi fragment (Slika 4.13A), verovatnije je da je DNK motiv na poziciji -449/-443 bp u interakciji sa nekim od tih faktora nego sa C/EBP α /C/EBP β dimerom, koji pored pomenutog poseduje još tri vezivna mesta u prvom promotorskom fragmentu. C/EBP β vezuje drugi fragment, koji poseduje jedan C/EBP β motiv (Slika 4.12 i 4.13B), što ukazuje da bi C/EBP β mogao direktno da interaguje sa ovim promotorskim fragmentom. C/EBP α , takođe vezuje drugi fragment (Slika 4.13B), iako ovaj fragment ne sadrži C/EBP α vezujuće mesto. Jedno od mogućih objašnjenja za vezivanje C/EBP α za drugi fragment je da C/EBP α ima sposobnost da veže C/EBP β motiv, uzimajući u obzir da transkripcioni faktori iz C/EBP familije prepoznaju identične DNK sekvence. U tom slučaju bi C/EBP α i β u formi heterodimera vezali drugi fragment. Druga opcija je da C/EBP α indirektno, interakcijom sa nekim drugim transkripcionim faktorom vezuje drugi promotorski fragment. U tom slučaju bi C/EBP β kao homodimer vezao drugi promotorski fragment. Treći fragment poseduje dva C/EBP α /C/EBP β motiva, od kojih se jedan, na poziciji +41/+47 bp, delimično preklapa sa PARP-1 i p53 motivima, dok se drugi na poziciji +171/+177 bp poklapa sa p53 motivom (Slika 4.12). C/EBP β i PARP-1 vezuju treći promotorski fragment, dok C/EBP α i p53 ne vezuju (Slika 4.12C). Preklapajuće vezivno mesto predstavlja jedini PARP-1 motiv u trećem fragmentu. Postoji mogućnost da motiv na poziciji +41/+49 bp PARP-1 i C/EBP β vezuju u formi heterodimera, pošto su PARP-1 i C/EBP β interagujući partneri u beta ćelijama (Slika 4.14). Iz literature je poznato da C/EBP β ima sposobnost da interaguje i sa transkripcionim faktorima koji ne poseduju motiv leucinskog zatvarača. Međutim, tako formirani heterodimeri imaju različit *trans*-aktivacioni potencijal i afinitet vezivanja za

DNK u odnosu na C/EBP dimere (Ramji i Foka, 2002). Druga mogućnost je da u okviru trećeg fragmenta C/EBP β vezuje jedino motiv na poziciji +171/+177, i u tom slučaju bi preklapajuće vezivno mesto (+41/+49 bp) PARP-1 vezivao u formi monomera. S obzirom da je izostala interakcija C/EBP α sa trećim fragmentom, C/EBP β ili vezuje motiv na poziciji +171/+177 u formi homodimera ili se heterodimerizuje sa nekim drugim članom iz C/EBP familije, pošto svi C/EBP proteini, osim C/EBP ζ , interaguju sa identičnim DNK motivima (Singh i sar., 2007). Iz literature je poznato da C/EBP β pored svoje uloge u transkripcionoj regulaciji CXCL12 gena u bazalnim uslovima, indukuje ekspresiju CXCL12 gena pod dejstvom različitih stimulusa (Kim i sar., 2007; Calonge i sar., 2010). Aktivaciono dejstvo C/EBP β na CXCL12 transkripciju pokazano je u ćelijama promijelocitne leukemije nakon tretmana ćelija sa faktorom kojim se stimuliše diferencijacija granulocita (ATRA) (Kim i sar., 2007), dok u astrocitima i ćelijama strome C/EBP β indukuje transkripciju CXCL12 gena nakon tretmana ćelija sa proinflamatornim citokinima IL-1 β i IL-6, kao i u uslovima ćelijske konfluentnosti (Calonge i sar., 2010). Liu i sar. (2011) su pokazali da se tretmanom proinflamatornim citokinima, koji imaju ključnu ulogu u autoimunoj destruktiji beta ćelija pankreasa tokom insulitisa, indukuje transkripcija CXCL12 gena u ćelijama Langerhansovih ostrvaca miša i čoveka. Imajući u vidu da C/EBP β aktivira transkripciju CXCL12 gena u odgovoru na proinflamatorne citokine u različitim tipovima ćelija i da je u ovoj tezi pokazano da je C/EBP β uključen u transkripcionu regulaciju *Cxcl12* u beta ćelijama, može se pretpostaviti da C/EBP β ima ključnu ulogu u indukciji transkripcije CXCL12 gena u beta ćelijama pankreasa tokom citokinskog tretmana i razvoja insulitisa. Za razliku od C/EBP β čijom pojačanom ekspresijom se indukovala aktivnost promotora CXCL12 gena, pojačano prisustvo C/EBP α nije izazvalo promenu u aktivnosti promotora (Kim i sar., 2007). S obzirom da je u ovoj tezi pokazano da je u bazalnim uslovima C/EBP α prisutan na promotoru *Cxcl12*, i to najverovatnije u formi heterodimera sa C/EBP β , postoji mogućnost da C/EBP α /C/EBP β dimer ima ulogu u održavanju bazalnog nivoa transkripcije *Cxcl12*, i da zbog toga pojačano prisustvo C/EBP α ne izaziva promenene u aktivnosti promotora. Poznato je da je u bazalnim uslovima C/EBP α vezan u formi homo- ili heterodimera sa C/EBP β za promotore

mnogih gena koji kodiraju akutno fazne proteine, čime se održava nizak nivo transkripcije ovih gena. Međutim, nakon tretmana sa citokinima IL-1 β i IL-6, gubi se interakcija između C/EBP α i promotora i umesto njega se vezuje C/EBP β za C/EBP motive, što rezultira snažnom indukcijom gena za akutno fazne proteine (Mackey i Darlington, 2004). Po analogiji sa genima za akutno fazne proteine može se pretpostaviti da u slučaju transkripcione regulacije *Cxcl12* u beta ćelijama, u fiziološkim uslovima C/EBP α /C/EBP β heterodimeri vezuju prvi i drugi promotorski fragment, dok treći promotorski fragment vezuje C/EBP β kao homodimer ili u interakciji sa nekim drugim transkripcionim faktorom, održavajući tako bazalan nivo transkripcije. Nakon tretmana ćelija sa proinflamatornim citokinima, svi C/EBP α /C/EBP β motivi su okupirani C/EBP β homodimerima, što rezultira aktivacijom transkripcije *Cxcl12*. Interakcije C/EBP α i C/EBP β transkripcionih faktora sa promotorom, predstavljene su u okviru potencijalnog modela transkripcione regulacije *Cxcl12* na Slici 5.5.

Protein p53 vezuje samo prvi promotorski fragment, uprkos činjenici da sva tri fragmenta sadrže p53 motive (Slika 4.13). U prvom fragmentu p53 ima jedno vezivno mesto koje se poklapa sa PARP-1 i C/EBP α /C/EBP β motivima, a delimično i sa FOXO3a motivom (Slika 4.12). Hromatinska imunoprecipitacija je pokazala da svih pet transkripcionih faktora interaguje sa prvim fragmentom (Slika 4.13A), ali budući da je za p53, PARP-1 i FOXO3a ovo jedino vezivno mesto u okviru prvog fragmenta, pretpostavka je da su pomenuta tri transkripciona faktora u interakciji sa preklapajućim vezivnim mestom. Štaviše, ko-imuoprecipitacijom je pokazano da sva tri transkripciona faktora međusobno interaguju u beta ćelijama (Slika 4.14), što ukazuje na činjenicu da bi se u interakciji sa prvim fragmentom mogao nalaziti trimerni transkripcioni kompleks p53/PARP-/FOXO3a. Iz literature je poznato da su p53 i FOXO3a interagujući partneri u fibroblastima miša (Brunet i sar., 2004; Miyaguchi i sar., 2009), dok je za p53 i PARP-1 pokazano da interaguju u embrionalnim ćelijama pacova (Wesierska-Gadek i sar., 2005). Poznato je da je p53 represor transkripcije *CXCL12* gena u fibroblastima miša i čoveka (Moskovits i sar., 2006), a u doktorskoj tezi je pokazano da PARP-1 ostvaruje delimično inhibitorno dejstvo na *Cxcl12* transkripciju (Slika 4.19, 4.20 i 4.21), dok uticaj FOXO3a na

transkripciju *Cxcl12* nije poznat, ali njegova uloga tumor supresora ukazuje da on najverovatnije inhibitorno deluje na transkripciju jednog antiapoptotskog gena, kao što je CXCL12. Uzevši u obzir potencijalne efekte koje bi tri transkripciona faktora mogla da imaju na transkripciju *Cxcl12*, može se pretpostaviti da inhibitorni trimerni transkripcioni kompleks formiran 450 bp uzvodno od TSS, može imati ulogu u delimičnoj inhibiciji transkripcije *Cxcl12*, čime bi se obezbedio nizak bazalni nivo ekspresije u fiziološkim uslovima. Drugi promotorski fragment sadrži pet p53 motiva od kojih se četiri delimično ili potpuno preklapaju sa Sp1 motivima, dok se u okviru trećeg fragmenta nalazi deset p53 motiva od koji se sedam poklapa sa Sp1 vezujućim mestima, jedan sa C/EBP β /C/EBP α i PARP-1 motivima i jedan sa C/EBP β /C/EBP α motivom (Slika 4.12). Budući da se od petnaest p53 motiva čak deset poklapa sa Sp1 motivima, može se zaključiti da se dva transkripciona faktora nalaze u kompeticiji. Tome ide u prilog i činjenica da p53 vezuje jedino prvi promotorski fragment koji ne sadrži Sp1 motiv. U fiziološkim uslovima vezivanje Sp1 za Sp1/p53 motive omogućuje bazalnu transkripciju *Cxcl12*. Sa druge strane, nakon primene apoptotskog stimulusa, kada je neophodno utišati transkripciju jednog antiapoptotskog gena kao što je CXCL12, verovatno dolazi do zamene transkripcionih faktora i vezivanja p53 za Sp1/p53 motive. Prisustvo proteina p53 na promotoru prikazano je u okviru pretpostavljenog modela transkripcione regulacije *Cxcl12* na Slici 5.5.

FOXO3a vezuje prvi promotorski fragment (Slika 4.13A), koji sadrži jedan FOXO3a motiv, koje se delimično poklapa sa PARP-1/C/EBP β /C/EBP α /p53 vezivnim mestom (Slika 4.12). FOXO3a najverovatnije vezuje preklapajuće vezivno mesto kao član inhibitornog trimernog transkripcionog kompleksa p53/PARP-/FOXO3a, o čemu je bilo više reči ranije u ovom poglavlju. FOXO3a ne vezuje drugi promotorski fragment (Slika 4.13B), iako se u okviru njega nalaze dva FOXO3a motiva (Slika 4.12). Sa druge strane, FOXO3a se nalazi u interakciji sa trećim fragmentom, koji ne poseduje FOXO3a vezujuća mesta (Slika 4.13C i 4.12), što ukazuje da bi FOXO3a mogao vezati indirektno, preko interagujućeg partnera, treći promotorski fragment. Interagujući partneri bi mogli biti Sp1, C/EBP β , PARP-1 i YY1, pošto sva četiri transkripciona faktora imaju vezivna mesta i vezuju treći fragment (Slika 4.12 i 4.13C), a ko-imunorecipientacijom je potvrđena njihva interakcija sa FOXO3a u beta ćelijama pankreasa (Slika 4.14). Interakcije FOXO3a sa Sp1,

C/EBP β , PARP-1 i YY1 transkripcionim faktorima su prvi put pokazane u ovoj doktorskoj tezi. Interakcije FOXO3a, faktora sa potencijalno inhibitornim efektom na transkripciju *Cxcl12*, sa transkripcionim aktivatorima CXCL12 gena: Sp1 (Garcia-Moruja i sar., 2005), C/EBP β (Kim i sar., 2007; Calonge i sar., 2010) i YY1 (Slika 4.22); i/ili transkripcionim represorom *Cxcl12*, PARP-1 (Slika 4.19, 4.20 i 4.21) u blizini TSS, koje se nalazi u okviru trećeg fragmenta, može imati ulogu u održavanju niskog bazalnog nivoa ekspresije *Cxcl12* u fiziološkim uslovima. U okviru potencijalnog modela transkripcione regulacije *Cxcl12* prikazano je vezivanje FOXO3a za promotor (Slika 5.5).

Hromatinska imunoprecipitacija je pokazala da HMG I/Y jedino vezuje drugi promotorski fragment (Slika 4.13). Drugi fragment poseduje tri vezivna mesta za HMG I/Y, od kojih se jedno poklapa sa NF- κ B motivom, a drugo se delimično poklapa sa Sp1/p53 motivom (Slika 4.12). Korišćenjem tehnike elektroforetskog zaostajanja utvrđeno je da HMG I/Y direktno vezuje promotor *Cxcl12*, pošto je nakon dodavanja antitela na HMG I/Y u EMSA reakciju, došlo do nestajanja protein-DNK kompleksa (Slika 4.11, kolona 14). Nestajanje protein-DNK kompleksa je posledica vezivanja antitela za DNK-vezujući domen proteina, čime se sprečava vezivanje proteina za DNK, što ukazuje da je ispitivani protein u direktnoj interakciji sa DNK. Poznato je da se transkripcija gena za insulinski receptor odvija pod kontrolom HMG I/Y/Sp1/C/EBP β nukleoproteinskog kompleksa, pri čemu se HMG I/Y vezuje za promotor i istovremeno interaguje sa Sp1 i C/EBP β , olakšavajući njihovo vezivanje za promotor (Foti i sar., 2003). Imajući u vidu da HMG I/Y, Sp1 i C/EBP β imaju vezivna mesta i vezuju drugi promotorski fragment, po analogiji sa genom za insulinski receptor, postoji mogućnost da bi tri pomenuta transkripciona faktora mogla da formiraju kompleks i tako kontrolišu bazalnu transkripciju *Cxcl12*. Uprkos činjenici da je HMG I/Y RAM-vezujući protein, EMSA je pokazala da ovaj protein ne interaguje sa RAM 4 elementom, koji se nalazi uzvodno od promotora *Cxcl12* (Slika 4.6B, kolona 3). Vezivanje HMG I/Y za promotor prikazano je na Slici 5.5.

STAT3 vezuje prvi promotorski fragment (Slika 4.13A), koji poseduje jedno STAT3 vezivno mesto, koje se delimično poklapa sa HMG I/Y motivom (Slika 4.12). Budući da HMG I/Y ne interaguje sa prvim fragmentom, može se zaključiti da u bazalnim

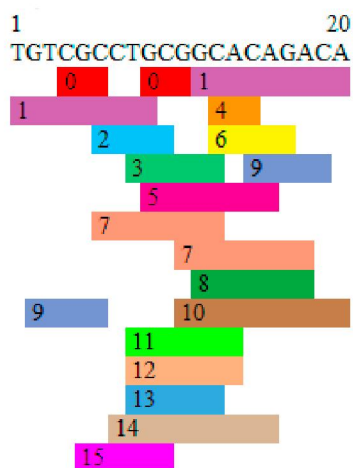
uslovima STAT3 vezuje poklapajuće mesto. Pored toga, STAT3 vezuje treći promotorski fragment, koji ne sadrži STAT3 motiv, što ukazuje da STAT3 indirektno, preko interagujućeg partnera, vezuje ovaj fragment. Potencijalni interagujući partner je transkripcioni faktor Sp1, za koji se pretpostavlja da direktno vezuje treći promotorski fragment (objašnjenje je dato ranije u ovom poglavlju), a pored toga metodom koimunoprecipitacije proteina pokazana je STAT3-Sp1 interakcija u beta ćelijama (Slika 4.14). Na sličan način regulisana je transkripcija gena za VEGF u ćelijama glioblastoma, gde je Sp1 direktno vezan za GC elemente u promotoru, a STAT3 preko interakcije sa Sp1 aktivira transkripciju ovog gena (Loeffler i sar., 2005). Pored interakcije STAT3 sa promotorom CXCL12 gena u fiziološkim uslovima, Olive i sar. (2008) su pokazali da STAT3 aktivira transkripciju CXCL12 gena nakon povrede glatkih mišićnih ćelija. Ovi podaci upućuju da bi STAT3 mogao da ima važnu ulogu u indukciji transkripcije CXCL12 gena u beta ćelijama tokom insulitisa, imajući u vidu da STAT3 aktivira transkripciju ciljnih gena u odgovoru na proinflamatorne citokine (Zhong i sar., 1994). O ulozi proinflamatornih citokina u insulitisu tokom DT1 bilo je više reči ranije u ovom poglavlju, dok je indukcija transkripcije CXCL12 gena pod dejstvom dijabetogenih stimulusa opisana u poglavlju Diskusija, 5.2.2. Interakcija STAT3 sa promotorom prikazana je u okviru potencijalnog modela transkripcione regulacije *Cxcl12* na Slici 5.5.

U doktorskoj tezi je pokazano da je YY1 važan regulator transkripcije *Cxcl12*. Hromatinskom imunoprecipitacijom je utvrđeno da je više molekula YY1 uključeno u transkripcionu regulaciju *Cxcl12*, pošto YY1 vezuje sva tri promotorska fragmenta *Cxcl12* (Slika 4.13). Prvi promotorski fragment poseduje dva, dok drugi i treći fragment poseduju po jedan YY1 motiv (Slika 4.12), što ukazuje da je YY1 u direktnoj interakciji sa sva tri fragmenta. YY1 motiv u trećem promotorskom fragmentu se poklapa sa Kozak sekvencom, o čemu je bilo više reči u poglavlju Diskusija, 5.2.1. YY1 je izuzetno jak aktivator transkripcije *Cxcl12*, pošto je pojačano prisustvo YY1 proteina u NIH3T3 ćelijama, pojačalo promotorsku aktivnost čak 196 puta (Slika 4.22). Uvođenjem iste koncentracije ekspresionog vektora za druge transkripcione aktivatore CXCL12 gena, zabeležena je znatno manja (oko deset puta) indukcija promotora CXCL12 gena (Kim i sar., 2007; Chen i sar., 2010). Na primer, pojačano prisustvo C/EBP β proteina pojačalo je aktivnost

promotora CXCL12 gena oko 18 puta (Kim i sar., 2007), dok je uvođenjem ekspresionog vektora za c-myb aktivnost promotora CXCL12 gena bila jača oko 20 puta (Chen i sar., 2010). U ranoj fazi oksidativnog stresa (tretman STZ-om u trajanju od 30 min) kada je transkripcija *Cxcl12* na bazalnom nivou (Slika 4.24, kolona 2) dolazi do smanjenja afiniteta vezivanja YY1 za promotor *Cxcl12*. YY1 je sa slabim afinitetom vezao prvi i treći promotorski fragment, dok je interakcija sa drugim fragmentom izostala (Slika 4.25). Jedno od mogućih objašnjenja za gubitak afiniteta vezivanja YY1 za promotor *Cxcl12*, je da se YY1 nalazi u kompeticiji za vezivno mesto sa nekim drugim transkripcionim faktorom i da nakon 30 min tretmana STZ-om drugi transkripcioni faktor poseduje veći afinitet vezivanja i istiskuje YY1 sa promotora. Da bi se proverila ova hipoteza, pomoću kompjuterske predikcije ALGGEN-PROMO ispitano je da li se YY1 motiv poklapa sa vezivnim mestom za neki drugi transkripcioni faktor. ALGGEN-PROMO analiza je pokazala da se vezivna mesta za YY poklapaju sa velikim brojem drugih transkripcionih faktora, među kojima su ZF-5, Pax-2a, Pax-6, E2F-1, Smad3, p300, Elk-1, NF-E4, Pax-5, NF-1. Na Slici 5.4. prikazana su vezivna mesta za transkripcione faktore, koji se poklapaju sa YY1 motivima u sva tri promotorska fragmenta *Cxcl12* promotora. U ranoj fazi oksidativnog stresa (30 min tretman STZ-om) može doći do pojačane ekspresije gena za neki od pomenutih transkripcionih faktora, tako da postoji mogućnost da će se zbog pojačanog prisustva indukovani transkripcioni faktor pre vezati za promotor *Cxcl12* od YY1. Tome ide u prilog i činjenica da je transkripcija *Yy1* u ovoj tački tretmana nepromenjena tj. na bazalnom nivou (Slika 4.24C, kolona 2). Nasuprot tretmanu od 30 min, u kasnoj fazi oksidativnog stresa (STZ tretman u trajanju od 6 h), YY1 intenzivno vezuje sva tri promotorska fragmenta (Slika 4.25). Intenzivna interakcija YY1 sa *Cxcl12* promotorom je najverovatnije odgovorna za indukciju transkripcije *Cxcl12* u kasnoj fazi oksidativnog stresa (Slika 4.24A, kolona 5), imajući u vidu stimulatorno dejstvo YY1 na *Cxcl12* transkripciju. U ovoj tački tretmana takođe se indukuje transkripcija *Yy1* (Slika 4.24C, kolona 5), tako da pojačano prisustvo YY1 verovatno omogućuje istiskivanje transkripcionih kompetitora sa promotora, što rezultira aktivacijom transkripcije *Cxcl12*. Ovi rezultati potvrđuju da se gen za CXCL12 nalazi pod kontrolom inducibilog promotora.

A

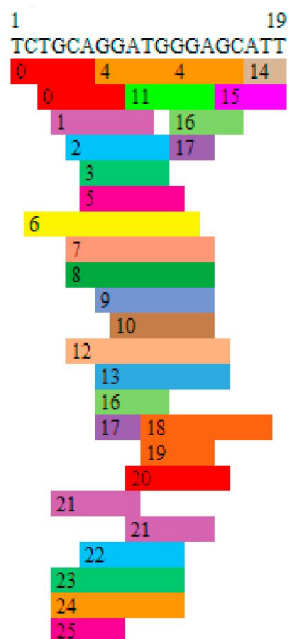
YY1 vezivna mesta u okviru prvog promotorskog fragmenta



0 ZF5 [T02349]	1 YY1 [T04970]	2 LVe [T00478]	3 C/EBP [T01386]
4 Msx-1 [T02072]	5 Zta [T00923]	6 HOXA3 [T00378]	7 TFIIIB [T00818]
8 Pax-2a [T00678]	9 Pax-6 [T00682]	10 Smad3 [T04096]	11 LF-A1 [T00467]
12 E2F-1 [T01542]	13 f(alpha)-f(epsilon) [T00287]	14 PEBP2alphaA1 [T01062]	15 AP-2alphaA [T00035]

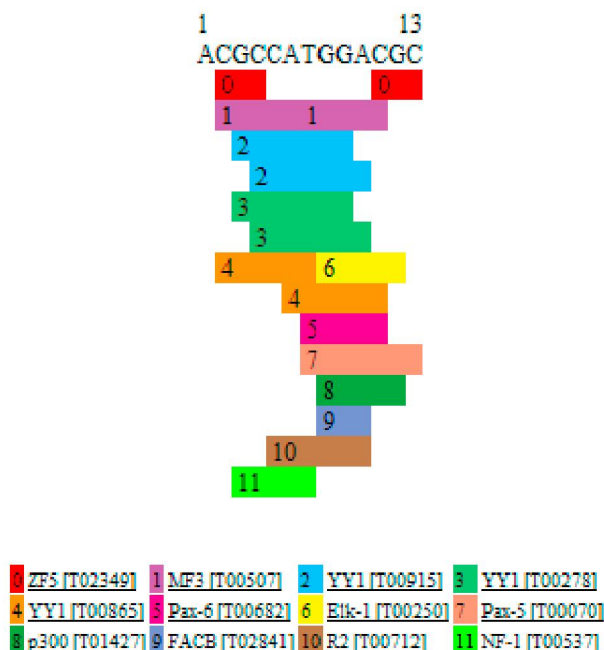
B

YY1 vezivno mesto u drugom promotorskom fragmentu



0 C/EBP [T01386]	1 Nr2f1/MafK [T05666]	2 Lvb-binding factor [T00477]	3 HELIOS [T06012]
4 Elk-1 [T00250]	5 YY1 [T00915]	6 Staf [T02247]	7 NF-E4 [T00560]
8 PTF1-beta [T00701]	9 PEA3 [T00685]	10 COE1 [T01112]	11 YY1 [T00865]
12 PTF1 [T01227]	13 LvF-1 [T00479]	14 C/EBPdelta [T00109]	15 BR-C Z2 [T01478]
16 p300 [T01427]	17 FACB [T02841]	18 COE2 [T05006]	19 MF3 [T00507]
20 EtsE-A [T00246]	21 R2 [T00712]	22 YY1 [T00278]	23 MCB1 [T06035]
24 MCB2 [T06036]	25 LVe [T00478]		

C YY1 vezivno mesto u okviru trećeg promotorskog fragmenta



Slika 5.4. ALGGEN-PROMO analiza potencijalnih mesta vezivanja za transkripcijske faktore koja se poklapaju sa YY1 motivima u okviru promotora *Cxcl12*.

Na osnovu prikazanih rezultata proističe da povreda beta ćelije izaziva pojačanu ekspresiju YY1, koja je praćena intenzivnim vezivanjem za promotor *Cxcl12*. Intenzivna interakcija YY1 sa promotorom *Cxcl12* rezultira ekspresijom CXCL12, koji ima protektivno dejstvo na beta ćelije. Indukcija ekspresije CXCL12 gena u odgovoru na primenu dijabetogenog stimulusa predstavlja mehanizam kojim se beta ćelija bori protiv intenzivnog oksidativnog stresa tokom nastanka i razvoja dijabetesa. Na sličan način YY1 učestvuje u transkripcionoj regulaciji gena za Grp78/Bip (Baumeister i sar., 2005). Šaperon Grp78/Bip je centralni regulator homeostaze endoplazmatičnog retikuluma (ER), koji ima ulogu u savijanju proteina, vezivanju kalcijuma poreklom iz ER i kontroli aktivacije transmembranskih senzora stresa ER. Pored toga, Grp78/Bip je glavni antiapoptotski protein u signalnoj kaskadi, koja se aktivira u odgovoru na prisustvo nepravilno savijenih proteina (eng. *unfolded protein response*, **UPR**) (Luo i sar., 2006). Kao i u slučaju regulacije transkripcije

Cxcl12, YY1 snažno indukuje transkripciju gena za Grp78/Bip, kada je ćelija izložena stresogenom stimulusu (Baumeister i sar., 2005). Međutim, za razliku od promotora *Cxcl12* gde je u bazalnim uslovima detektovana interakcija YY1 sa sva tri promotorska fragmenta (Slika 4.13), YY1 veoma slabo vezuje promotor Grp78/Bip gena u fiziološkim uslovima. Tome ide u prilog i činjenica da uvođenjem ekspresionog vektora za YY1 nije došlo do promene aktivnosti promotora Grp78/Bip gena u kontrolnim uslovima, za razliku od ćelija tretiranih sa tapsigarginom, induktorom stresa ER, gde se aktivnost promotora višestruko povećala. Nasuprot tome, u našim eksperimentima pojačano prisustvo YY1 je i u fiziološkim uslovima znatno (čak 196 puta) pojačalo aktivnost promotora *Cxcl12* (Slika 4.22). Baumeister i sar. (2005) su takođe pokazali da dva hromatin modifikujuća enzima, metiltransferaza histona H4 PRMT1 (Protein arginin N-metiltransferaza 1) i histon acetiltransferaza (HAT) p300 doprinose indukciji transkripcije gena za Grp78/Bip od strane YY1 nakon stresa ER tj. da sva tri proteina imaju sinergističko dejstvo na aktivaciju transkripcije Grp78/Bip gena. Indukciji transkripcije *Cxcl12* od strane YY1 nakon oksidativnog stresa izazvanog STZ-om, takođe bi mogla da doprinese interakcija YY1 sa HAT p300, pošto je ALGGEN-PROMO analiza pokazala da se YY1 motivi u drugom i trećem promotorskom fragmentu *Cxcl12* delimično poklapaju sa p300 vezivnim mestima (Slika 5.4). Motiv YY1/p300 bi mogao da predstavlja kompozitno sinergističko vezivno mesto, koje vezuje dimer YY1/p300, imajući u vidu da YY1 interakcijom sa p300 aktivira transkripciju ciljnih gena (Lee i sar., 1998; Thomas i Seto, 1999). To znači da bi u kasnoj fazi oksidativnog stresa dimer YY1/p300 vezao drugi i treći promotorski fragment, a prisustan p300 bi acetilacijom histona omogućio dekonenzaciju hromatina i aktivnu transkripciju. Na kraju se može zaključiti da je YY1 važan transkripcioni faktor za preživljavanje ćelije, pošto u odgovoru na stresogeni stimulus indukuje ekspresiju antiapoptotskih proteina (CXCL12, Grp78/Bip). Iz literature je poznato da hipoksija indukuje ekspresiju gena za CXCL12 i YY1 (Tarnowski i sar., 2010; Santago i sar., 2011), što je u saglasnosti sa rezultatima dobijenim u doktorskoj tezi, gde je pokazano da je ekspresija oba gena indukovana pod dejstvom oksidativnog stresa (Slika 24A i C). Ovi podaci ukazuju da bi inudukcija ekspresije YY1 u odgovoru na različite vrste stresogenog stimulusa, mogla da bude praćena njegovim vezivanjem za promotor CXCL12 gena i

aktivacijom transkripcije. Nasuprot ulozi u regulaciji transkripcije *Cxcl12*, YY1 inhibira transkripciju za oba njegova receptora, CXCR4 i CXCR7, vezujući se za regulatorne elemente koji se nalaze uzvodno od promotora (Tarnowski i sar., 2010). Suprotni efekti koje YY1 ostvaruje na transkripciju gena za CXCL12 i njegove receptore, mogu predstavljati negativnu povratnu spregu za kontrolu CXCL12/CXCR4 i CXCL12/CXCR7 osa. Na ovaj način YY1 ne utiče samo na ekspresiju CXCL12, već i na njegove fiziološke efekte. Pored *Cxcl12*, YY1 je uključen u transkripcionu regulaciju još jednog gena, čiji proteinski produkt ima protektivno dejstvo u dijabetesu. Guo i sar. (2001) su pokazali da YY1 aktivira transkripciju gena za antiinflamatorni citokin IL-4. IL-4 sprečava Th1 ćelije da produkuju proinflamatorne citokine, koji u DT1, doprinose autoimunoj destrukciji beta ćelija pankreasa (Berman i sar., 1996). Uloga YY1 u transkripcionoj regulaciji *Cxcl12* u bazalnim i u uslovima oksidativnog stresa predstavljena je potencijalnim modelima koji su prikazani na Slikama 5.5 i 5.6.

U bazalnim uslovima više molekula PARP-1 je uključeno u transkripcionu kontrolu *Cxcl12*, pošto je pomoću ChIP metode utvrđeno da PARP-1 vezuje sva tri promotorska fragmenta (Slika 4.13). Tehnika EMSA je pokazala da PARP-1 direktno vezuje promotor *Cxcl12*, pošto je nakon inkubacije rekombinovanog PARP-1 sa promotorom *Cxcl12*, zapaženo formiranje kompleksa PARP-1 – promotor *Cxcl12*, koji je „zaostajao“ u gelu u odnosu na sam promotor (Slika 4.11, kolona 2). Svaki promotorski fragment poseduje po jedan PARP-1 motiv. Za razliku od ostalih ispitivanih transkripcionih faktora, za koje su kompjuterske predikcije dale potencijalna mesta vezivanja, PARP-1 motivi preuzeti su iz literaturnih podataka. Sposobnost PARP-1 da veže specifične *cis*-regulatorne DNK sekvence je relativno skoro otkrivena, tako da se u bazama podataka kompjuterskih programa za identifikaciju potencijalnih mesta vezivanja transkripcionih faktora još uvek ne nalaze PARP-1 motivi. Vidaković i sar. (2009) su pokazali da PARP-1 interaguje sa sekvencom 5'-GGCCT-3', koja se nalazi u promotoru PARP-1 gena. Isti DNK motiv je prisutan i u okviru drugog fragmenta promotora *Cxcl12*. Činjenica da PARP-1 interaguje sa drugim promotorskim fragmentom (Slika 4.13B), ukazuje da PARP-1 vezuje iste motive u sopstvenom i *Cxcl12* promotoru. PARP-1 učestvuje u transkripcionoj regulaciji gena za Reg protein, vezivanjem sekvence 5'-TGCCC-3' (Akiyama i sar., 2001). Pomenuta DNK

sekvenca nalazi se i u prvom i trećem promotrskom fragmentu *Cxcl12*. Budući da PARP-1 vezuje prvi i treći fragment promotora *Cxcl12*, može se zaključiti da PARP-1 preko istih *cis*-regulatornih elemenata reguliše transkripciju gena, čiji proteinski produkti imaju protektivno dejstvo u dijabetesu: Reg protein stimuliše proliferaciju, dok CXCL12 sprečava odumiranje beta ćelija pankreasa. Činjenica da PARP-1 interaguje sa nekoliko transkripcionih regulatora *Cxcl12* u beta ćelijama (Slika 4.14) ukazuje da bi PARP-1 mogao regulisati transkripciju *Cxcl12* kao sastavni deo nukleoproteinskog transkripcionog kompleksa. Interakcije PARP-1, kao transkripcionog inhibitora sa aktivatorima (YY1, Sp1 i C/EBP β) i inhibitorima (p53 i FOXO3a) transkripcije *Cxcl12*, mogu imati ulogu u održavanju niskog bazalnog nivoa transkripcije *Cxcl12*. Iz literature je poznata interakcija između PARP-1 i YY1 u epitelnim ćelijama cervikalnog karcinoma. Interakcijom sa YY1 stimuliše se sinteza PAR-ova, čime se ubrzava popravka DNK nakon primene genotoksičnog stimulusa (Oei i Shi, 2001). Pored toga, interakcija između PARP-1 i Sp1 je detektovana u fibroblastima (Zaniolo i sar., 2007), a interakcija p53-PARP-1 u embrionalnim ćelijama pacova (Wesierska-Gadek i sar., 2005). Više nezavisnih eksperimenata prolazne transfekcije je nedvosmisleno pokazalo da je PARP-1 inhibitor transkripcije *Cxcl12* (Slika 4.19, 4.20, 4.21). U odsustvu PARP-1 promotor *Cxcl12* je pokazivao dva puta veću aktivnost (Slika 4.19), dok se usled pojačanog prisustva PARP-1 aktivnost promotora *Cxcl12* smanjila oko dva puta (Slika 4.20 i 4.21). Ovi rezultati jasno pokazuju da PARP-1 ima centralnu ulogu u utišavanju transkripcije *Cxcl12*, čime je omogućen nizak nivo konstitutivne ekspresije *Cxcl12*. Pored direktnog vezivanja i smanjenja aktivnosti promotora *Cxcl12*, u doktorskoj tezi je pokazano da PARP-1 interaguje i sa RAM 4 elementom koji se nalazi uzvodno od promotora na poziciji -1725/-1592 bp. Korišćenjem dva različita anti-PARP-1 antitela, analiza super-pomaka je pokazala da se PARP-1 vezuje za RAM 4 (Slika 4.6A, kolone 4 i 5), dok je interakcija rekombinovanog PARP-1 sa RAM 4 elementom potvrdila da se PARP-1 nalazi u direktnoj interakciji sa RAM 4 *in vitro* (Slika 6A, kolona 2). Hromatinskom imunoprecipitacijom je potvrđena interakcija PARP-1–RAM 4 *in vivo* (Slika 4.8). Vidaković i sar. (2009) su pokazali da PARP-1 na sličan način reguliše transkripciju sopstvenog gena. PARP-1 vezuje promotor svog gena i dva RAM elementa koja se nalaze uzvodno od promotora.

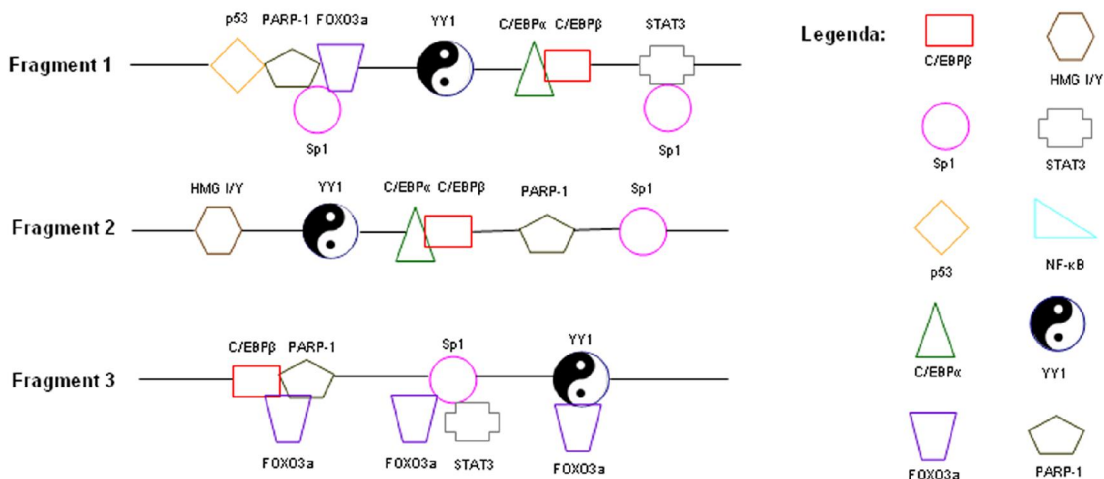
Interakcijom sa proksimalnim RAM elementom i promotorom PARP-1 inhibira sopstvenu transkripciju, što predstavlja negativnu povratnu spregu u regulaciji ekspresije *Parp-1*. Iako je funkcionalni efekat interakcije PARP-1-RAM 4 element na transkripciju *Cxcl12* nepoznat, po analogiji sa transkripcionom regulacijom *Parp-1*, može se pretpostaviti da bi vezivanje PARP-1 za RAM 4 moglo doprineti inhibitornom dejstvu koje PARP-1 ostvaruje na transkripciju *Cxcl12*. To bi značilo da promotor i proksimalni uzvodni RAM element sinergistički regulišu transkripciju *Cxcl12*, kao što je slučaj i sa *Parp-1*. U ranoj fazi oksidativnog stresa (STZ tretman u trajanju od 30 min), PARP-1 interaguje sa prvim i drugim promotorskim fragmentom kao u kontrolnim uslovima, dok treći fragment vezuje sa smanjenim afinitetom (Slika 4.25). Ovi rezultati su u saglasnosti sa podatkom da je u ovoj tački tretmana nivo transkripcije *Cxcl12* kao u bazalnim uslovima (Slika 4.24A, kolona 2), što navodi na zaključak da se u ranoj fazi oksidativnog stresa promotor *Cxcl12* još uvek nalazi pod inhibitornim dejstvom PARP-1. Nasuprot tome, u kasnoj fazi oksidativnog stresa (6 h tretmana STZ-om), PARP-1 vezuje samo prvi promotorski fragment, dok je interakcija sa drugim i trećim fragmentom izostala (Slika 4.25). Gubitak interakcije između PARP-1 i drugog i trećeg fragmenta je najverovatnije posledica automodifikacije, pošto je pokazano da je nakon 6 h tretmana STZ-om, PARP-1 intenzivno PARilovan (Slika 4.29, kolona 2). Činjenica da je nivo ekspresije *Parp-1* u ovoj tački tretmana kao u kontrolnim uslovima (Slika 4.24B, kolona 5), ide u prilog pretpostavci da je za izostanak pomenutih interakcija odgovorna ADP-ribozilacija, a ne smanjeno prisustvo PARP-1. Iz literature je poznato da automodifikacija koja prati aktivaciju PARP-1, sprečava vezivanje PARP-1 za DNK (Wacker i sar., 2007). U kasnoj fazi oksidativnog stresa, gubitkom interakcije između PARP-1 i promotora *Cxcl12* uklanja se negativan efekat PARP-1 na transkripciju, što rezultira indukcijom transkripcije *Cxcl12* (Slika 4.24A, kolona 5). Uticaj automodifikacije PARP-1 na transkripciju *Cxcl12* potvrđen je qPCR metodom. Inhibicija enzimske aktivnosti PARP-1 sa specifičnim inhibitorom, rezultirala je nižim nivoom transkripcije *Cxcl12* u odgovoru na stresogeni stimulus (tretman STZ-om) u odnosu na nivo transkripcije *Cxcl12* kod ćelija tretiranih samo sa STZ-om (Slika 28A, kolone 3 i 4), što ukazuje da inhibiran, ne-automodifikovan PARP-1 može intenzivno da veže promotor i ostvari svoje negativno dejstvo na transkripciju *Cxcl12*. Na osnovu

prikazanih rezultata može se zaključiti da oksidativni stres nastao u insultu tokom DT1 ili hiperglikemiji tokom DT2, dovodi do aktivacije i automodifikacije PARP-1, što rezultira u odvajanju PARP-1 od promotora *Cxcl12*, čime je omogućena pojačana ekspresija ovog antiapoptotskog hemokina. Na sličan način PARP-1 inhibira transkripciju *Tracp* gena u ćelijama pre-osteoklasta (Beranger i sar., 2008). Ovaj gen kodira enzim – fosfatazu, koja ima važnu ulogu u metabolizmu proteina u diferenciranim osteoklastima. U ćelijama pre-osteoklasta, vezivanjem za promotor *Tracp* gena, PARP-1 inhibira transkripciju. Tokom diferencijacije u osteoklaste, PARP-1 se odvaja od promotora, čime se uklanja inhibitoran uticaj i omogućuje ekspresija *TRACP* fosfataze, čija enzimatska funkcija je neophodna za normalno funkcionisanje diferenciranih ćelija. Zanimljivo je da je kao u slučaju indukcije *Cxcl12* promotora, pored uklanjanja inhibitornog efekta PARP-1, za stimulaciju transkripcije *Tracp* gena neophodno vezivanje YY1 za promotor. Na osnovu izloženih podataka može se zaključiti da indukcija gena za *Tracp* predstavlja još jedan primer različitih i međusobno zavisnih efekata YY1 i PARP-1 u aktivaciji transkripcije. PARP-1 ostvaruje negativno dejstvo na transkripciju još jednog hemokina iz CXC familije – CXCL1 (Amiri i sar., 2006). Kao i u slučaju *Cxcl12*, u fiziološkim uslovima PARP-1 vezuje specifičnu sekvencu u promotoru CXCL1 gena i utišava transkripciju, čime je omogućen nizak nivo konstitutive ekspresije CXCL1. U promotoru CXCL1 gena PARP-1 motiv nalazi se u blizini NF- κ B vezivnog mesta, pri čemu vezivanje PARP-1 za svoj motiv u bazalnim uslovima sprečava interakciju NF- κ B sa promotorom. Međutim, nakon aktivacije PARP-1 koja je praćena njegovom enzimatskom aktivnošću, gubi se afinitet vezivanja PARP-1 za promotor, što omogućuje NF- κ B da veže svoj motiv, rezultujući aktivacijom transkripcije CXCL1 gena. Uzimajući u obzir ulogu PARP-1 u regulaciji transkripcije CXCL1 gena, postavlja se pitanje da li u kasnoj fazi oksidativnog stresa, kada se se gubi interakcija PARP-1 sa promotorom *Cxcl12* (Slika 4.25), neki transkripcioni aktivator vezuje PARP-1 motiv i doprinosi indukciji ekspresije *Cxcl12*. To bi mogao da bude C/EBP β , pošto je analizom vezivnih mesta transkripcionih faktora u promotoru *Cxcl12*, uočeno da se u trećem promotorskom fragment PARP-1 motiv delimično poklapa sa C/EBP β vezivnim mestom (Slika 4.12). Tome idu u prilog i činjenice da je C/EBP β dokazani aktivator *Cxcl12* transkripcije u odgovoru na različite stimulse (Kim i sar., 2007;

Calonge i sar., 2010), kao i da se u kasnoj fazi oksidativnog stresa u potpunosti gubi interakcija između PARP-1 i trećeg promotorskog fragmenta *Cxcl12* (Slika 4.25). Nasuprot rezultatima Amiri i sar. (2006), Nirodi i sar. (2001) su objavili da bi PARP-1 mogao biti aktivator transkripcije CXCL1 gena. Nirodi i sar. (2001) su ovaj zaključak izveli na osnovu rezultata koji ukazuju na smanjenja aktivnosti promotora i utišavanju transkripcije CXCL1 gena, nakon tretmana inhibitorom PARP-1. Ovi podaci bi mogli zapravo da ukažu da inhibiran, ne-automodifikovan PARP-1 može intenzivnije da veže promotor CXCL1 gena i tako efikasnije inhibira transkripciju, što bi značilo da je PARP-1 represor ekspresije CXCL1 gena i da smanjenjem njegove enzimatske aktivnosti, efikasnije osvaruje svoje dejstvo. Tretman inhibitorom PARP-1 je isti efekat ostvario i na transkripciju *Cxcl12* (4.28A, kolona 4). Pored *Cxcl12*, PARP-1 je uključen u transkripcionu regulaciju još jednog gena, čiji proteinski produkt ima važnu ulogu u sprečavanju dijabetesa – gena za Reg protein (Akiyama i sar., 2001). Reg protein indukuje replikaciju beta ćelija i ublažava eksperimentalno izazvan dijabetes. PARP-1 vezuje specifičnu sekvencu u okviru promotora Reg gena, a njegovom automodifikacijom gubi se afinitet vezivanja za promotor. Inhibicijom enzimske aktivnosti PARP-1 omogućuje se formiranje aktivnog transkripcionog kompleksa, što rezultira ekspresijom gena za Reg protein. Vezivanje PARP-1 za promotor u bazalnim i u uslovima oksidativnog stresa prikazano je u okviru potencijalnih modela transkripcione regulacije *Cxcl12* u beta ćelijama (Slika 5.5 i 5.6).

Na osnovu prikazanih rezultata i prodiskutovanih literaturnih podataka na Slici 5.5 je predstavljen model transkripcione regulacije *Cxcl12* u fiziološkim uslovima. Za prvi, proksimalni promotorski fragment direktno se vezuju p53, PARP-1, FOXO3a, C/EBP α , C/EBP β , YY1 i STAT3. Na osnovu dobijenih rezultata možemo pretpostaviti da su PARP-1, p53 i FOXO3a vezani za DNK u formi trimernog nukleoproteinskog kompleksa, dok se C/EBP α i C/EBP β vezuju u formi dimera. Sp1 vezuje prvi promotorski fragment indirektno, preko interakcije sa PARP-1, FOXO3a i STAT3. Sa drugim promotorskim fragmentom u direktnoj interakciji se nalaze transkripcioni faktori: Sp1, HMG I/Y, PARP-1, YY1 i heterodimer C/EBP α /C/EBP β . Treći promotorski fragment, koji sadrži osnovni promotor, direktno vezuju Sp1, C/EBP β , PARP-1 i YY1. STAT3 i FOXO3a su indirektno, preko

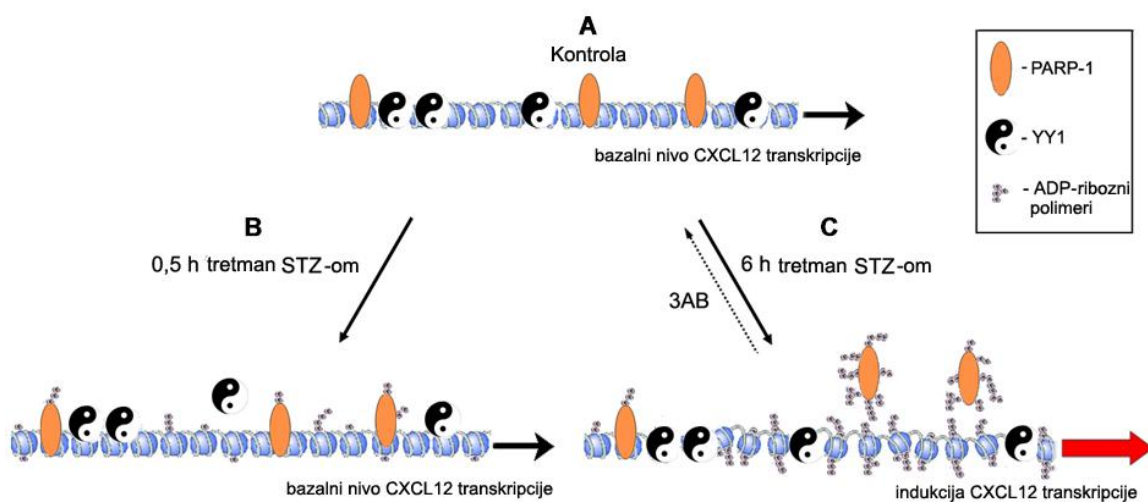
interagujućih partnera vezani za treći fragment. Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da STAT3 interaguje sa Sp1, a FOXO3a sa Sp1, C/EBP β , PARP-1 i YY1.



Slika 5.5. Potencijalni model transkripcione regulacije *Cxcl12* u beta ćelijama pankreasa u fiziološkim uslovima.

Funkcionalni efekti PARP-1 i YY1 na transkripciju *Cxcl12* u bazalnim uslovima i u ranoj i kasnoj fazi oksidativnog stresa predstavljani su u okviru modela prikazanog na Slici 5.6. U fiziološkom stanju vezivanje YY1 i ne-automodifikovanog PARP-1 za promotor, omogućuje konstitutivu ekspresiju *Cxcl12*. Budući da je enzimatska aktivnost PARP-1 slaba u bazalnim uslovima, veliki procenat ne-automodifikovanog PARP-1 je sposoban da veže promotor, čime je sprečena pojačana transkripcija *Cxcl12*, za koju je odgovoran YY1 vezan za konsenzus sekvence u okviru promotora (Slika 5.6A). U odgovoru na kratkotrajnu primenu citotoksičnog stimulusa koji dovodi do oštećenja na DNK, dolazi do enzimatske aktivacije PARP-1 i njegove automodifikacije, što ima za posledicu delimično uklanjanje vezanog PARP-1 sa promotora *Cxcl12* usled neto povećanja negativnog naelektrisanja svakog automodifikovanog molekula PARP-1. Uklanjanjem inhibitornog uticaja PARP-1 na promotorsku aktivnost, omogućena je pojačana transkripcija *Cxcl12*. Međutim, u ranoj fazi oksidativnog stresa YY1, takođe vezuje promotor ali sa smanjenim afinitetom, čime se gubi i pozitivan efekat na transkripciju *Cxcl12* (Slika 5.6B). Delimično uklanjanje i

pozitivnog i negativnog regulatora promotorske aktivnosti rezultira nepromenjenim nivoom transkripcije *Cxcl12* (Slika 4.24A, kolona 2). Sa druge strane, u kasnoj fazi oksidativnog stresa dolazi do intenzivne automodifikacije PARP-1 što izaziva smanjenje njegovog afiniteta za vezivanje promotora (Slika 5.6C). Nasuprot tome, u odgovoru na dugotrajnu primenu citotoksičnog stimulusa, pojačano se eksprimira *Yy1*, što ima za posledicu ponovno vezivanje YY1 za promotor. Intenzivna interakcija između promotora i YY1 rezultira indukcijom ekspresije *Cxcl12* (Slika 4.24A, kolona 5). Aktivaciji transkripcije *Cxcl12* doprinosi i relaksirana konformacija hromatina nastala usled ADP-ribozilacije hromatinskih proteina. Pojačano ekspimiran CXCL12 ima važnu ulogu u očuvanju funkcionalnih beta ćelija, što ga čini potencijalnim terapijskim agensom u prevenciji i lečenju dijabetesa.



Slika 5.6. Potencijalni model regulacije transkripcije *Cxcl12* od strane PARP-1 i YY1 u bazalnim uslovima (A) i u ranoj (B) i kasnoj (C) fazi oksidativnog stresa u beta ćelijama pankreasa.

5.3. POVRATNI EFEKAT: KAKO CXCL12 UTIČE NA TRANSKRIPCIONE FAKTORE KOJI REGULIŠU NJEGOVU EKSPRESIJU?

U doktorskoj tezi je pokazano da pored uloge koju transkripcioni faktori ostvaruju u regulaciji ekspresije *Cxcl12*, CXCL12 povratno, utiče na transkripcione faktore modulišući njihovu ekspresiju i raspodelu između ćelijskih odeljaka.

Imunoblot analiza je pokazala prisustvo degradacionog fragmenta YY1 u Rin-5F wt ćelijskoj liniji insulinoma beta ćelija pacova (Slika 4.10A, kolone 1 i 3). Iz literaurnih podataka poznato je da je degradacioni fragment YY1 prisutan u različitim ćelijskim tipovima: ćelijskoj liniji fibroblasta (Doetsch i sar., 2012), ćelijskoj liniji karcinoma kože (Pajunk i sar., 1997), ćelijskim linijama osteosarkoma i ćelijama ovarijuma (Klar i sar., 2005) i u ćelijskoj liniji splenocita (Gordon i sar., 2003). Za razliku od Rin-5F wt ćelija, u ćelijama Rin-5F klona #1, kod koga je CXCL12 protein pojačano prisutan nije detektovan degradacioni produkt YY1 (Slika 4.10A, kolone 2 i 4). Ovi rezultati ukazuju da CXCL12 aktivira signalne puteve u ćeliji, koji štite YY1 od degradacije. Imajući u vidu da je YY1 jak aktivator *Cxcl12* transkripcije, ovaj mehanizam može predstavljati pozitivnu povratnu spregu u kojoj CXCL12 sprečava degradaciju važnog regulatora svoje ekspresije. Očuvanje funkcionalnog YY1 proteina može doprineti bržoj reparaciji DNK nakon primene genotoksičnog stresa, pošto je poznato da YY1 interakcijom sa PARP-1 stimuliše sintezu PAR-ova koji su odgovorni za međuproteinske interakcije čime se regrutuju proteini uključeni u popravku oštećenja na DNK i ubrzava popravka prekida (Oei i Shi, 2001). Ovi podaci su u saglasnosti sa rezultatima komet eseja, koji je pokazao manji stepen DNK oštećenja u ćelijama klona #1 u odnosu na wt ćelije tokom oksidativnog stresa (Slika 4.4). Pored toga, odsustvo degradacionog fragmenta YY1 u ćelijama klona #1 potvrđuje antiapoptotske efekte CXCL12, pošto se YY1 u odgovoru na primenu apoptotskog stimulusa, brzo translocira u jedro, gde se proteolitički degraduje od strane kaspaza (Krippner-Heidenreich i sar., 2005).

U Rin-5F wt ćelijama prisutni su protein p53 i njegova izoforma p44, kojoj nedostaje N-terminalni transaktivacioni domen, dok se u ćelijama klona #1 nalazi samo p53 (Slika 4.10K). Ovi rezultati ukazuju da CXCL12 aktivira signalne puteve koji će sprečiti

alternativno splajsovanje gena za p53 protein i nastanak izoforme p44. Izoforma p44 predstavlja dominantan inhibitor p53 proteina, pošto ima sposobnost da ga kompetitivno „istisne“ sa promotora ciljnih gena (Marcel i Hainaut, 2009; Hafsi i sar., 2013). Imajući u vidu da je p53 glavni aktivator transkripcije WAF1/CIP1 gena, koji kodira p21 protein (detaljno objašnjenje je dato u poglavlju Uvod, 1.3.6.1), inhibicija ekspresije p21 proteina u prisustvu izoforme p44 je očekivana (Hafsi i sar., 2013). Ovi podaci su u saglasnosti sa neobjavljenim rezultatima dobijenim u našoj laboratoriji, gde je pokazano da je p21 prisutan samo u ćelijama klona #1, dok Rin-5F wt ćelije ne ekspimiraju ovaj protein. Prisustvo p21 u ćelijama klona #1, može biti odgovorno za smanjeno oštećenje DNK u ovim ćelijama u odnosu na wt ćelije nakon tretmana STZ-om (Slika 4.4), imajući u vidu da je p21 protein odgovoran za zaustavljanje ćelijskog ciklusa na prelasku iz G1 u S fazu, kada se vrši popravka oštećene DNK pre replikacije.

Smanjenom DNK oštećenju u ćelijama klona #1 može doprineti pojačano prisustvo PARP-1 u ovim ćelijama u odnosu na Rin-5F wt (Slika 4.10D). Veoma važna uloga PARP-1 u reparaciji oštećene DNK ogleda se u činjenici da je PARP-1 protein koji poseduje sposobnost detekcije i vezivanja za oštećenu DNK, što rezultira aktivacijom PARP-1 i reakcijom auto- i heteromodifikacije. Heteromodifikacijom histona stabilise se otvorena struktura hromatina, što omogućuje prilaz reparacione mašinerije mestu nastalog oštećenja (Ko i Ren, 2012).

Sa Slike 4.10B uočava se različita raspodela transkripcionog faktora Sp1 između ćelijskih odeljaka kod ćelija wt i klona #1. U ćelijama klona #1 Sp1 se nalazi u jedru, dok je u wt ćelijama njegovo prisustvo zabeleženo i u jedru i u citosolu. Ovi rezultati ukazuju da CXCL12 aktivira signalne puteve, koji će favorizovati translokaciju Sp1 u jedro.

Imunoblot analiza je pokazala smanjeno prisustvo transkripcionih faktora koji se aktiviraju u odgovoru na proinflamatorne citokine, STAT3, C/EBP β i NF- κ B, u ćelijama klona #1 u odnosu na wt (Slika 4.10C, F i I). Smanjeno prisustvo transkripcionih faktora koji predstavljaju ključne molekule u putu prenosa proinflamatornih signala u uslovima pojačanog prisustva CXCL12 može da ukaže da CXCL12 smanjuje kapacitet inflamatornog odgovora. To dalje ukazuje na potencijalni protektivni efekat CXCL12 u razvoju DT1, s

obzirom da proinflamatorni citokini imaju ključnu ulogu u nastanku inflamacije u insulitisu.

U ćelijama Rin-5F klona #1 uočeno je odsustvo C/EBP α transkripcionog faktora (Slika 4.10G). Ovaj rezultat može da ukaže da u uslovima pojačanog prisustva CXCL12, ulogu C/EBP α može da preuzme C/EBP β ili neki drugi transkripcioni faktor iz C/EBP familije. C/EBP familija se sastoji od šest članova: C/EBP α , C/EBP β , C/EBP γ , C/EBP δ , C/EBP ϵ i C/EBP ζ , od kojih svi sem C/EBP ζ interaguju sa C/EBP motivima. Poznato je da u odgovoru na specifične stimulse, kao i u odsustvu nekog C/EBP člana, on biva zamenjen drugim C/EBP faktorom (Singh i sar., 2007).

Na osnovu izloženih rezultata može sa pretpostaviti da CXCL12 doprinosi efikasnijoj reparaciji DNK u uslovima oksidativnog stresa aktivacijom signalnih puteva koji će sprečiti ekspresiju p44 izoforme proteina p53 i time omogućiti ekspresiju regulatora ćelijskog ciklusa p21; usloviti pojačanu ekspresiju PARP-1 i očuvati funkcionalan YY1, koji doprinosi efikasnoj reparaciji oštećene DNK od strane PARP-1. Sa druge strane, uticaj CXCL12 na smanjenje ekspresije transkripcionih faktora koji učesvuju u putu prenosa proinflamatornih signala mogao bi ublažiti inflamaciju tokom nastanka i razvoja DT1.

Imajući u vidu da je stabilna ekspresija CXCL12 u uslovima oksidativnog stresa važan faktor za preživljavanje beta ćelija, u budućim istraživanjima bi se razmotrila njegova uloga u prevenciji razvoja dijabetesa i održavanju funkcionalnim preostalih ostrvaca kod već razvijenog dijabetesa. S obzirom da CXCL12 ostvaruje mnogobrojne funkcije u organizmu, kao što su hemoatrakcija T limfocita i monocita tokom njihove recirkulacije (Bleul i sar., 1996), prognitora B limfocita (D'Apuzzo i sar., 1997), dendritskih ćelija (Sozzani i sar., 1997) i progenitora hematopoetskih stem ćelija, kao i uloga u razvoju centralnog nervnog sistema (Lazarini i sar., 2003), egzogenom aplikacijom CXCL12 ili njegovih analoga, postoji rizik od narušavanja homeostaze organizma. Ciljanom indukcijom ekspresije CXCL12 isključivo u beta ćelijama pankreasa, mogao bi se sprečiti ili ublažiti dijabetes i njegove posledice, bez narušavanja homeostaze organizma.

Poznato je da CXCL12 ostvaruje efekte na još jedan tip ćelija poreklom iz Langerhansovih ostrvaca pankreasa – alfa ćelije. Vezivanjem za svoj receptor na površini alfa ćelije, CXCL12 izaziva njihovu de-diferencijaciju u pro-alfa ćelije, što predstavlja inicijalni korak u procesu transdiferencijacije alfa u beta ćelije pankreasa. Pro-alfa ćelije zatim sintetišu GLP-1 i njegov receptor, koji su odgovorni za finalni korak transdiferencijacije alfa u beta ćelije (Habener i Stanojevic, 2012a). Nije poznato da li CXCL12 ima uticaja na delta i PP ćelije Langerhansovi ostrvaca, pošto je zbog male količine pomenute ćelije teško ispitati.

Na osnovu rezultata dobijenih u ovoj tezi može se zaključiti da bi se stabilna ekspresija CXCL12 u beta ćelijama mogla obezbediti indukcijom i/ili supresijom transkripcionih faktora uključenih u regulaciju njegove ekspresije u beta ćelijama.

6. ZAKLJUČCI

1. CXCL12 doprinosi očuvanju DNK integriteta i pospešuje preživljavanje beta ćelija pankreasa nakon tretmana dijabetogenim agensom.
2. PARP-1 vezuje RAM 4 element, koji se nalazi na poziciji -1725/-1592 bp uzvodno od promotora gena za CXCL12 pacova (*Cxcl12*), *in vitro* i *in vivo*.
3. Analizom promotorskog regiona *Cxcl12* identifikovana su potencijalna mesta za vezivanje sledećih transkripcionih faktora: PARP-1, YY1, C/EBP β , C/EBP α , STAT3, p53, FOXO3a, Sp1, HMG I/Y i NF- κ B.
4. Korišćenjem tehnike elektroforetskog zaostajanja ustanovljeno je da PARP-1, YY1, C/EBP β , C/EBP α , STAT3, p53, FOXO3a, Sp1 i HMG I/Y vezuju promotor *Cxcl12 in vitro*.
5. Prilikom korišćenja tehnike hromatinske imunoprecipitacije promotor je podeljen na tri fragmenta, što je omogućilo da se detaljnije utvrde mesta vezivanja transkripcionih faktora u okviru promotora *Cxcl12 in vivo*:
 - I. Prvi, distalni promotorski fragment vezuju: PARP-1, FOXO3a, p53, Sp1, YY1, C/EBP α , C/EBP β i STAT3.
 - II. Sa drugim promotorskim fragmentom interaguju: HMG I/Y, YY1, C/EBP α , C/EBP β , PARP-1 i Sp1.
 - III. Treći promotorski fragment koji sadrži osnovni promotor vezuju: C/EBP β , PARP-1, Sp1, YY1, FOXO3a i STAT3.
6. Metodom ko-imunoprecipitacije proteina detektovane su sledeće međuproteinske interakcije u beta ćelijama pankreasa: YY1 - PARP-1, FOXO3a - PARP-1, Sp1 - PARP-1, p53 - PARP-1, C/EBP β - PARP-1, YY1 - p53, YY1 - FOXO3a, p53 - FOXO3a, Sp1 - FOXO3a, C/EBP β - FOXO3a, C/EBP α - FOXO3a i Sp1 - STAT3.

7. Primenom luciferaznog eseja nakon eksperimenata prolazne transfekcije utvrđeno je da je PARP-1 inhibitor, a YY1 jak aktivator transkripcije *Cxcl12*.
8. Indukcija transkripcije *Cxcl12* u beta ćelijama je zabeležena nakon 6 h tretmana dijabetogenim agensom. U istoj tački tretmana PARP-1 sa smanjenim afinitetom vezuje promotor, dok se YY1 nalazi u intenzivnoj interakciji sa promotorom, na osnovu čega je izveden zaključak da su za indukciju transkripcije *Cxcl12*, odgovorni stimulatorno dejstvo YY1 i uklanjanje inhibitornog efekta PARP-1.
9. Inhibicijom enzimatske aktivnosti PARP-1 zabeležena je delimična represija transkripcije *Cxcl12*, na osnovu čega je izveden zaključak da je za uočeno smanjenje nivoa transkripcije odgovorno intenzivno vezivanje ne-automodifikovanog PARP-1 za promotor.
10. Pojačano prisustvo CXCL12 sprečava degradaciju YY1, stimuliše translokaciju Sp1 u jedro, sprečava ekspresiju C/EBP α , izaziva pojačanu ekspresiju PARP-1, sprečava ekspresiju izoforme p44 proteina p53, izaziva smanjenu ekspresiju FOXO3a, NF- κ B, C/EBP β i STAT3.

7. LITERATURA

- Adachi Y, Käs E, Laemmli UK. (1989) Preferential cooperative binding of DNA topoisomerase II to scaffold-association regions. *EMBO J* 8:3997-4006.
- Adolph KW, Song MK. (1985) Decrease in ADP-ribosylation of HeLa non-histone proteins from interphase to metaphase. *Biochemistry* 24:345-352.
- Aiuti A, Webb I, Bleul C, Springer T, Gutierrez-Ramos J. (1997) The chemokine SDF-1 is a chemoattractant for human CD34+ hematopoietic progenitor cells and provides a new mechanism to explain the mobilization of CD34+ progenitors to peripheral blood. *J Exp Med* 185:111–120.
- Akira S, Nishio Y, Inoue M, Wang XJ, Wei S, Matsusaka T, Yoshida K, Sudo T, Naruto M, Kishimoto T. (1994) Molecular cloning of APRF, a novel IFN-stimulated gene factor 3 p91-related transcription factor involved in the gp130-mediated signaling pathway. *Cell* 77(1):63-71.
- Akira S. (2000) Roles of STAT3 defined by tissue-specific gene targeting. *Oncogene* 19:2607-2611.
- Akiyama T, Takasawa S, Nata K, Kobayashi S, Abe M, Shervani NJ, Ikeda T, Nakagawa K, Unno M, Matsuno S, Okamoto H. (2001) Activation of Reg gene, a gene for insulin-producing beta -cell regeneration: poly(ADP-ribose) polymerase binds Reg promoter and regulates the transcription by autopoly(ADP-ribosyl)ation. *Proc Natl Acad Sci USA* 98(1):48-53.
- Althaus FR, Richter C. (1987) *ADP-Ribosylation of Proteins: Enzymology and Biological Significance*, Springer-Verlag, Berlin.
- Ambrose HE, Papadopoulou V, Beswick RW, Wagner SD. (2007) Poly-(ADP-ribose) polymerase-1 (Parp-1) binds in a sequence-specific manner at the Bcl-6 locus and contributes to the regulation of Bcl-6 transcription. *Oncogene* 26:6244–6252.
- Amiri KI, Ha HC, Smulson ME, Richmond A. (2006) Differential regulation of CXC ligand 1 transcription in melanoma cell lines by poly(ADP-ribose) polymerase-1. *Oncogene*. 25(59):7714-7722.
- An W, Kim J, Roeder RG. (2004) Ordered cooperative functions of PRMT1, p300, and CARM1 in transcriptional activation by p53. *Cell* 117:735–748.

- Ariumi Y, Masutani M, Copeland TD, Mimori T, Sugimura T, Shimotohno K, Ueda K, Hatanaka M, Noda M. (1999) Suppression of the poly(ADP-ribose) polymerase activity by DNA-dependent protein kinase in vitro. *Oncogene* 18:4616–4625.
- Aunis D. (1991) Chromogranin A. Prohormonal function and synthesis regulation in neuroendocrine cells. *Ann Endocrinol (Paris)* 52(5):348-354.
- Baggiolini M, Dewald B, Moser B. (1994) Interleukin-8 and related chemotactic cytokines, CXC and CC chemokines. *Advan Immunol* 55:97–179.
- Balabanian K, Lagane B, Infantino S, Chow KY, Harriague J, Moepps B, Arenzana-Seisdedos F, Thelen M, Bachelier F. (2005) The chemokine SDF-1/CXCL12 binds to and signals through the orphan receptor RDC1 in T lymphocytes. *J Biol Chem* 280(42):35760-35766.
- Barahmand-Pour F, Meinke A, Groner B, Decker T. (1998) Jak2-Stat5 interactions analyzed in yeast. *J Biol Chem* 273:12567-12575.
- Barlev NA, Liu L, Chehab NH, Mansfield K, Harris KG, Halazonetis TD, Berger SL (2001) Acetylation of p53 activates transcription through recruitment of coactivators/histone acetyltransferases. *Mol Cell* 8:1243–1254.
- Barnes PJ. (1997) Nuclear Factor- κ B. *Int J Biochem Cell Biol* 29:867-870.
- Barre B, Avril S, Coqueret O. (2003) Opposite regulation of myc and Serum-starved MDA-MB-468 cells were treated with 100 ng/ml EGF for 30 p21waf1 transcription by STAT3 proteins. *J Biol Chem* 278:2990–2996.
- Barthel A, Schmoll D, Unterman TG. (2005) FoxO proteins in insulin action and metabolism. *Trends in Endocrinology and Metabolism*. 16183–16189.
- Batemann E. (1998) Autoregulation of eucaryotic transcription factors. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology* 60:133-168.
- Baumeister P, Luo S, Skarnes WC, Sui G, Seto E, Shi Y, Lee AS. (2005) Endoplasmic reticulum stress induction of the Grp78/BiP promoter: activating mechanisms mediated by YY1 and its interactive chromatin modifiers. *Mol Cell Biol* 25(11):4529-4540.
- Beranger GE, Momier D, Rochet N, Carle GF, Scimeca JC. (2008) Poly(adp-ribose) polymerase-1 regulates Tracp gene promoter activity during RANKL-induced osteoclastogenesis. *J Bone Miner Res* 23:564-571.

- Berman MA, Sandborg CI, Wang Z, Imfeld KL, Zaldivar F Jr, Dadufalza V, Buckingham BA. (1996) Decreased IL-4 production in new onset type I insulin-dependent diabetes mellitus. *J Immunol* 157(10):4690-4696.
- Bhatia K, Pommier Y, Giri C, Fornace AJ, Imaizumi M, Breitman TR, Cherney BW, Smulson ME. (1990) Expression of poly(ADP-ribose) polymerase gene following natural and induced DNA strand breakage and effect of hyperexpression on DNA repair. *Carcinogenesis* 11:123–128.
- Bleul CC, Farzan M, Choe H, Parolin C, Clark-Lewis I, Sodroski J, Springer TA. (1996) The lymphocyte chemoattractant SDF-1 is a ligand for LESTR/fusin and blocks HIV-1 entry. *Nature* 382(6594):829-833.
- Bode J, Kohwi Y, Dickinson L, Joh T, Klehr D, Mielke C, Kohwi-Shigematsu T. (1992) Biological significance of unwinding capability of nuclear matrix-associated DNAs. *Science* 255:195–197.
- Bonner-Weir S, Baxter LA, Schuppin GT, Smith FE. (1993) A second pathway for regeneration of adult exocrine and endocrine pancreas. A possible recapitulation of embryonic development. *Diabetes* 42:1715–1720.
- Bonner-Weir S. (1994) Regulation of pancreatic beta-cell mass in vivo. *Recent Prog Horm Res* 49:91–104.
- Botella LM, Sánchez-Elsner T, Rius C, Corbí A, Bernabéu C. (2001) Identification of a critical Sp1 site within the endoglin promoter and its involvement in the transforming growth factor-beta stimulation. *J Biol Chem* 276(37):34486-34494.
- Bouwens L. (1999) Neogenesis of beta cells and islet formation. *Journ Annu Diabetol, Hotel Dieu*:1–12.
- Bouwman P, Philipsen S. (2002) Regulation of the activity of Sp1-related transcription factors. *Mol. Cell Endocrinol* 195:27–38.
- Bowman T, Garcia R, Turkson J, Jove R. (2000) STATs in oncogenesis. *Oncogene* 19:2474-2488.
- Bromberg JF, Horvath CM, Wen Z, Schreiber RD and Darnell JE (1996) Transcriptionally active Stat1 is required for the antiproliferative effects of both interferon and interferon A. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:7673-7678.
- Bromberg JF, Wrzeszczynska MH, Devgan G, Zhao Y, Pestell RG, Albanese C, Darnell Jr JE. (1999) Stat3 as an oncogene. *Cell* 98(3):295-303.

- Brunet A, Sweeney LB, Sturgill JF, Chua KF, Greer PL, Lin Y, Tran H, Ross SE, Mostoslavsky R, Cohen HY, Hu LS, Cheng HL, Jedrychowski MP, Gygi SP, Sinclair DA, Alt FW, Greenberg ME. (2004) Stress-dependent regulation of FOXO transcription factors by the SIRT1 deacetylase. *Science* 303(5666):2011-2015.
- Bruttomesso D, Pianta A, Mari A, Valerio A, Marescotti MC, Avogaro A, Tiengo A, Del Prato S. (1999) Restoration of early rise in plasma insulin levels improves the glucose tolerance of type 2 diabetic patients. *Diabetes* 48(1):99-105.
- Burkle A. (2001) Physiology and pathophysiology of poly(ADP-ribosyl)ation. *Bioessays* 23:795–806.
- Butler AE, Janson J, Bonner-Weir S, Ritzel R, Rizza RA, Butler PC. (2003) Beta-cell deficit and increased beta-cell apoptosis in humans with type 2 diabetes. *Diabetes* 52:102–110.
- Butler AJ, Ordahl CP. (1999) Poly(ADP-ribose)polymerase binds with transcription enhancer factor 1 to MCAT1 elements to regulate muscle-specific transcription. *Mol Cell Biol* 19:296–306.
- Cahill CM, Tzivion G, Nasrin N, Ogg S, Dore J, Ruvkun G, Alexander-Bridges M. (2001) Phosphatidylinositol 3-kinase signaling inhibits DAF-16 DNA binding and function via 14-3-3-dependent and 14-3-3-independent pathways. *J Biol Chem* 276:13402–13410.
- Calkhoven CF, Müller C, Leutz A. (2000) Translational control of C/EBPalpha and C/EBPbeta isoform expression. *Genes Dev* 14(15):1920-1932.
- Calkhoven CF, Muller C, Leutz A. (2002) Translational control of gene expression and disease. *Trends Mol Med* 8:577–583.
- Calonge E, Alonso-Lobo JM, Escandón C, González N, Bermejo M, Santiago B, Mestre L, Pablos JL, Caruz A, Alcamí J. (2010) c/EBPbeta is a major regulatory element driving transcriptional activation of the CXCL12 promoter. *J Mol Biol* 396(3):463-472.
- Ceradini DJ, Kulkarni AR, Callaghan MJ, Tepper OM, Bastidas N, Kleinman ME, Capla JM, Galiano RD, Levine JP, Gurtner GC. (2004) Progenitor cell trafficking is regulated by hypoxic gradients through HIF-1 induction of SDF-1. *Nat Med* 10(8):858-864.
- Cervellera MN, Sala A. (2000) Poly(ADP-ribose) polymerase is a B-MYB coactivator. *J Biol Chem* 275:10692–10696.

- Chaitanya GV, Steven AJ, Babu PP. (2010) PARP-1 cleavage fragments: signatures of cell-death proteases in neurodegeneration. *Cell Commun Signal* 22;8:31.
- Chen CJ, Chang WC, Chen BK. (2008) Attenuation of c-Jun and Sp1 expression and p300 recruitment to gene promoter confers the trichostatin A-induced inhibition of 12(S)-lipoxygenase expression in EGF-treated A431 cells. *Eur J Pharmacol* 591:36–42.
- Chen L, Xu S, Zeng X, Li J, Yin W, Chen Y, Shao Z, Jin W. (2010) c-myc activates CXCL12 transcription in T47D and MCF7 breast cancer cells. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 42(1):1-7.
- Chen X, Vinkemeier U, Zhao Y, Jeruzalm D, Darnell Jr JE, Kuriyan J. (1998) Crystal structure of a tyrosine phosphorylated STAT-1 dimer bound to DNA. *Cell* 93:827–839.
- Chiacchiera F, Matrone A, Ferrari E, Ingravallo G, Lo Sasso G, Murzilli S, Petruzzelli M, Salvatore L, Moschetta A, Simone C. (2009) p38alpha blockade inhibits colorectal cancer growth in vivo by inducing a switch from HIF1alpha- to FoxO-dependent transcription. *Cell Death Differ* 16(9):1203-1214
- Chiacchiera F, Simone C. (2010) The AMPK-FoxO3A axis as a target for cancer treatment. *Cell Cycle* 9(6):1091-1096.
- Chiang CM, Roeder RG. (1995) Cloning of an intrinsic human TFIID subunit that interacts with multiple transcriptional activators. *Science* 267:531–536.
- Cho YJ, Gorina S, Jeffrey PD, Pavletich NP. (1994) Crystal structure of a p53 tumor suppressor DNA complex: understanding tumorigenic mutations. *Science* 265:346-355.
- Choy L, Derynck R. (2003) Transforming growth factor-beta inhibits adipocyte differentiation by Smad3 interacting with CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP) and repressing C/EBP transactivation function. *J Biol Chem* 278(11):9609-9619.
- Chu S, Xu H, Ferro TJ, Rivera PX. (2007) Poly(ADP-ribose) polymerase-1 regulates vimentin expression in lung cancer cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 293:L1127–1134.
- Chupreta S, Du M, Todisco A, Merchant JL. (2000) EGF stimulates gastrin promoter through activation of Sp1 kinase activity. *Am J Physiol Cell Physiol* 278(4):C697-708.
- Cicatiello L, Addeo R, Sasso A, Altucci L, Petrizzi VB, Borgo R, Cancemi M, Caporali S, Caristi S, Scafoglio C, Teti D, Bresciani F, Perillo B, Weisz A. (2004) Estrogens and

progesterone promote persistent CCND1 gene activation during G1 by inducing transcriptional derepression via c-Jun/c-Fos/estrogen receptor (progesterone receptor) complex assembly to a distal regulatory element and recruitment of cyclin D1 to its own gene promoter. *Mol Cell Biol* 24(16):7260-7274.

Ciftci O, Ullrich O, Schmidt CA, Diestel A, Hass R. (2001) Regulation of the nuclear proteasome activity in myelomonocytic human leukemia cells after adriamycin treatment. *Blood* 97:2830–2838.

Cohen-Armon M, Visochek L, Rozensal D, Kalal A, Geistrikh I, Klein R, Bendetz-Nezer S, Yao Z, Seger R. (2007) DNA-independent PARP-1 activation by phosphorylated ERK2 increases Elk1 activity: a link to histone acetylation. *Mol Cell* 25:297-308.

Collum RG, Brutsaert S, Lee G, Schindler C. (2000) A Stat3-interacting protein (StIP1) regulates cytokine signal transduction. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:10120–10125.

D'Amours D, Desnoyers S, d'Silva I, Poirier G. (1999) Poly(ADP-ribosyl)ation reactions in the regulation of nuclear functions. *Biochem J* 342:249-268.

D'Amour KA, Bang AG, Eliazzer S, Kelly OG, Agulnick AD, Smart NG, Moorman MA, Kroon E, Carpenter MK, Baetge EE. (2006) Production of pancreatic hormone-expressing endocrine cells from human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 24(11):1392-1401.

D'Apuzzo M, Rolink A, Loetscher M, Hoxie JA, Clark-Lewis I, Melchers F, Baggiolini M, Moser B. (1997) The chemokine SDF-1, stromal cell-derived factor 1, attracts early stage B cell precursors via the chemokine receptor CXCR4. *Eur J Immunol* 27(7):1788-1793.

Darlington GJ, Wang N, Hanson RW. (1995) C/EBP α : a critical regulator of genes governing integrative metabolic processes. *Curr Opin Genet Dev* 5:565–570.

Darnell JE. (1997) STATs and gene regulation. *Science* 277:1630-1635.

Darnell Jr JE, Kerr IM, Stark GR. (1994) Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science* 264:1415–1421.

Darnell Jr JE. (1997) STATs and gene regulation. *Science* 277:1630-1635.

Davydov IV, Krammer PH, Li-Weber M. (1995). Nuclear factor-IL6 activates the human IL-4 promoter in T cells. *J Immunol* 155(11):5273–5379.

- De Murcia JM, Niedergang C, Trucco C, Ricoul M, Dutrillaux B, Mark M, Oliver FJ, Masson M, Dierich A, LeMeur M. (1997) Requirement of poly(ADP-ribose) polymerase in recovery from DNA damage in mice and in cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:7303–7307.
- Decker T, Kovarik P. (2000) Serine phosphorylation of STATs. *Oncogene* 19:2628–2637.
- Deffie A, Wu H, Reinke V, Lozano G. (1993) The tumor suppressor p53 regulates its own transcription. *Mol Cell Biol* 13:3415-3423.
- Delpuech O, Griffiths B, East P, Essafi A, Lam EW, Burgering B, Downward J, Schulze A. (2007) Induction of Mxi1-SR alpha by FOXO3a contributes to repression of Myc-dependent gene expression. *Mol Cell Biol* 27(13):4917-4930.
- Deniaud E, Baguet J, Chalard R, Blanquier B, Brinza L, Meunier J, Michallet MC, Laugraud A, Ah-Soon C, Wierinckx A, Castellazzi M, Lachuer J, Gautier C, Marvel J, Leverrier Y. Overexpression of transcription factor Sp1 leads to gene expression perturbations and cell cycle inhibition. *PLoS One* 4(9):e7035.
- Descombes P, Chojkier M, Lichtsteiner S, Falvey E, Schibler U. (1990) LAP, a novel member of the C/EBP gene family, encodes a liver-enriched transcriptional activator protein. *Genes Dev* 4:1541-1551.
- Descombes P, Schibler U. (1991) A liver-enriched transcriptional activator protein, LAP, and a transcriptional inhibitory protein, LIP, are translated from the same mRNA. *Cell* 67:569-579.
- Doetsch M, Gluch A, Poznanović G, Bode J, Vidaković M. (2012) YY1-binding sites provide central switch functions in the PARP-1 gene expression network. *PLoS One* 7(8):e44125.
- Doetsch M. (2007) The influence of Yin Yang 1 on Poly(ADP-ribose) polymerase-1 promoter activity, Master thesis, Technical University Braunschweig, Braunschweig, Germany.
- Donohoe ME, Zhang X, McGinnis L, Biggers J, Li E, Shi Y. (1999) Targeted disruption of mouse Yin Yang 1 transcription factor results in peri-implantation lethality. *Mol Cell Biol* 19(10):7237-7244.
- Dubois-Laforgue D, Hendel H, Caillat-Zucman S, Zagury JF, Winkler C, Boitard C, Timsit J. (2001) A common stromal cell-derived factor-1 chemokine gene variant is associated with the early onset of type 1 diabetes. *Diabetes* 50(5):1211-3.

- El Khamisy SF, Masutani M, Suzuki H, Caldecott KW. (2003) A requirement for PARP-1 for the assembly or stability of XRCC1 nuclear foci at sites of oxidative DNA damage. *Nucleic Acids Res* 31:5526-5533.
- El-Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE. (1993) WAF-1, a protein mediator of p53 tumor suppressor. *Cell* 75:817-825.
- Engelman JA, Lisanti MP, Scherer PE. (1998) Specific inhibitors of p38 mitogen-activated protein kinase block 3T3-L1 adipogenesis. *J Biol Chem* 273:32111-32120.
- Espinosa JM, Emerson BM. (2001) Transcriptional regulation by p53 through intrinsic DNA/chromatin binding and site-directed cofactor recruitment. *Mol Cell* 8:57-69.
- Fashena SJ, Reeves R, Ruddle NH. (1992) A poly(dA-dT) upstream activating sequence binds high-mobility group I protein and contributes to lymphotoxin (tumor necrosis factor-beta) gene regulation. *Mol Cell Biol* 12(2):894-903.
- Feng Y, Broder CC, Kennedy PE, Berger EA. (1996) HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science* 272(5263):872-877.
- Firestone GL. (1998) Role of the CCAAT/enhancer binding protein-alpha transcription factor in the glucocorticoid stimulation of p21waf1/cip1 gene promoter activity in growth-arrested rat hepatoma cells. *J Biol Chem* 273:2008-2014.
- Flodby P, Barlow C, Kylefjord H, Ahrlund-Richter L, Xanthopoulos KG. (1996). Increased hepatic cell proliferation and lung abnormalities in mice deficient in CCAAT/enhancer binding protein α . *J Biol Chem* 271:24753-24760.
- Foster LC, Wiesel P, Huggins GS, Pañares R, Chin MT, Pellacani A, Perrella MA. (2000) Role of activating protein-1 and high mobility group-I(Y) protein in the induction of CD44 gene expression by interleukin-1beta in vascular smooth muscle cells. *FASEB J* 14(2):368-378.
- Foti D, Iuliano R, Chiefari E, Brunetti A. (2003) A nucleoprotein complex containing Sp1, C/EBP beta, and HMGI-Y controls human insulin receptor gene transcription. *Mol Cell Biol* 23(8):2720-2732.
- Fried M, Crothers DM. (1981) Equilibria and kinetics of lac repressor-operator interactions by polyacrylamide gel electrophoresis. *Nucleic acid Research* 9(23):6505-6525.
- Fu XY. (1999) From PTK-STAT signaling to caspase expression and apoptosis induction. *Cell Death Differ* 6:1201-1208.

- Furuyama T, Nakazawa T, Nakano I, Mori N. (2000) Identification of the differential distribution patterns of mRNAs and consensus binding sequences for mouse DAF-16 homologues. *Biochem J* 349:629-634.
- García-Moruja C, Alonso-Lobo JM, Rueda P, Torres C, González N, Bermejo M, Luque F, Arenzana-Seisdedos F, Alcamí J, Caruz A. (2005) Functional characterization of SDF-1 proximal promoter. *J Mol Biol* 348(1):43-62.
- Garner M, Revzin A. (1981) A gel electrophoresis method for quantifying the binding of proteins to specific DNA regions: application to components of the *Escherichia coli* lactose operon regulatory system. *Nucleic Acid Research* 9(13):3047-3060.
- Gerich JE. (1998) The genetic basis of type 2 diabetes mellitus: impaired insulin secretion versus impaired insulin sensitivity. *Endocr Rev* 19:491–503.
- Geyer RK, Yu ZK, Maki CG. (2000) The MDM2 RING-finger domain is required to promote p53 nuclear export. *Nat Cell Biol* 2:569–573.
- Gill G, Pascal E, Tseng ZH, Tjian R. (1994) A glutamine-rich hydrophobic patch of Sp1 contacts the dTAFIII110 component of the *Drosophila* TFIID complex and mediates transcriptional activation. *PNAS* 91:192–196.
- Giraud S, Bienvenu F, Avril S, Gascan H, Heery DM, Coqueret O. (2002) Functional interaction of STAT3 transcription factor with the coactivator NcoA/SRC1a. *J Biol Chem* 277(10):8004-8011.
- Glauser DA, Schlegel W. (2007) The emerging role of FOXO transcription factors in pancreatic beta cells. *J Endocrinol* 193(2):195-207.
- Gleichmann M, Gillen C, Czardybon M, Bosse F, Greiner-Petter R, Auer J, Müller HW. (2000) Cloning and characterization of SDF-1gamma, a novel SDF-1 chemokine transcript with developmentally regulated expression in the nervous system. *Eur J Neurosci* 12(6):1857-1866.
- Gomez M, Wu J, Schreiber V, Dunlap J, Dantzer F, Wang Y, Liu Y. (2006) PARP1 Is a TRF2-associated poly(ADP-ribose)polymerase and protects eroded telomeres. *Mol Biol Cell* 17(4):1686-1696.
- Gordon S, Akopyan G, Garban H, Bonavida B. (2006) Transcription factor YY1: structure, function, and therapeutic implications in cancer biology. *Oncogene* 25(8):1125-1142.
- Gordon SJ, Saleque S, Birshtein BK. (2003) Yin Yang 1 is a lipopolysaccharide-inducible activator of the murine 3' enhancer, hs3. *J Immunol* 170:5549–5557.

- Grdović N. (2012) CXCL12 and PARP-1 are potential key molecules in the promotion of β -cell survival and diabetes attenuation. Proc. of 2nd conference of Serbian Biochemical Society “Molecular Bioscience”. Belgrade, Serbia. p. 97-114.
- Greenwel P, Tanaka S, Penkov D, Zhang W, Olive M, Moll J, Vinson C, Di Liberto M, Ramirez F. (2000) Tumor Necrosis Factor Alpha Inhibits Type I Collagen Synthesis through Repressive CCAAT/Enhancer-Binding Proteins. *Mol Cell Biol* 20(3):912–918.
- Gu L, Zhu N, Findley HW, Woods WG, Zhou M. (2004) Identification and characterization of the IKK α promoter: positive and negative regulation by ETS-1 and p53, respectively. *J Biol Chem* 279:52141–52149.
- Guo J, Casolaro V, Seto E, Yang WM, Chang C, Seminario MC, Keen J, Georas SN. (2001) Yin-Yang 1 activates interleukin-4 gene expression in T cells. *J Biol Chem* 276(52):48871-48878.
- Guo S, Cichy SB, He X, Yang Q, Ragland M, Ghosh AK, Johnson PF, Unterman TG. (2001) Insulin suppresses transactivation by CCAAT/enhancer-binding protein β (C/EBP β). *J Biol Chem* 276:8516-8523.
- Gupta S, Yan H, Wong LH, Ralph S, Krolewski J, Schindler C. (1996) The SH2 domains of Stat1 and Stat2 mediate multiple interactions in the transduction of IFN- α signals. *EMBO J* 15:1075–1084.
- Gurung RL, Balakrishnan L, Bhattacharjee RN, Manikandan J, Swaminathan S, Hande MP. (2010) Inhibition of poly (ADP-Ribose) polymerase-1 in telomerase deficient mouse embryonic fibroblasts increases arsenite-induced genome instability. *Genome Integr* 1(1):5.
- Habener JF, Stanojevic V. (2012a) α -cell role in β -cell generation and regeneration. *Islets*. 4(3):188-198.
- Habener JF, Stanojevic V. (2012b) Alpha cells come of age. *Trends Endocrinol Metab*. doi: 10.1016/j.tem.2012.10.009.
- Hafsi H, Santos-Silva D, Courtois-Cox S, Hainaut P. (2013) Effects of Δ 40p53, an isoform of p53 lacking the N-terminus, on transactivation capacity of the tumor suppressor protein p53. *BMC Cancer* 13:134.
- Halazonetis TD, Kandil N. (1993) Conformational shifts propagate from the oligomerization domain of p53 to its tetrameric DNA binding domain and restore DNA binding to select p53 mutants. *EMBO J* 12:5057–5064.

- Harrison SM, Houzelstein D, Dunwoodie SL, Beddington RS. (2000) Sp5, a new member of the Sp1 family, is dynamically expressed during development and genetically interacts with Brachyury. *Dev Biol* 227:358–372.
- Haupt Y, Barak Y, Oren M. (1996). Cell type-specific inhibition of p53-mediated apoptosis by mdm2. *EMBO J* 15:1596-1606.
- Haupt Y, Maya R, Kazaz A, Oren M. (1997) Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature* 387:296–299.
- Haupt Y, Rowan S, Shaulian E, Vousden KH, Oren M. (1995) Induction of apoptosis in HeLa cells by trans-activation-deficient p53. *Genes Dev* 9:2170-2183.
- Heckman CA, Wheeler MA, Boxer LM. (2003) Regulation of Bcl-2 expression by C/EBP in t(14;18) lymphoma cells. *Oncogene* 22(39):7891-7899.
- Hellerstrom C, Swenne I. (1991) Functional maturation and proliferation of fetal pancreatic beta-cells. *Diabetes* 40 (Suppl 2):89–93.
- Himes SR, Reeves R, Attema J, Nissen M, Li Y, Shannon MF. (2000) The role of high-mobility group I(Y) proteins in expression of IL-2 and T cell proliferation. *J Immunol* 164(6):3157-3168.
- Hinz B, Dugina V, Ballestrem C, Wehrle-Haller B, Chaponnier C. (2003) Alpha-smooth muscle actin is crucial for focal adhesion maturation in myofibroblasts. *Mol Biol Cell* 14(6):2508-2519.
- Ho JS, Ma W, Mao DY, Benchimol S. (2005) p53-Dependent transcriptional repression of c-myc is required for G1 cell cycle arrest. *Mol Cell Biol* 25:7423–7431.
- Ho KK, Myatt SS, Lam EW. (2008) Many forks in the path: cycling with FoxO. *Oncogene* 27:2300-2311.
- Hoey T, Weinzierl RO, Gill G, Chen JL, Dynlacht BD, Tjian R. (1993) Molecular cloning and functional analysis of *Drosophila* TAF110 reveal properties expected of co-activators. *Cell* 72:247–260.
- Hoh J, Jin S, Parrado T, Edington J, Levine AJ, Ott J. (2002) The p53 MH algorithm and its application in detecting p53-responsive genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:8467–8472.
- Honda R, Tanaka H, Yasuda H. (1997) Oncoprotein MDM2 is ubiquitin ligase E3 for tumor suppressor p53. *FEBS Lett* 420:25–27.

- Horuk R. (2001) Chemokine receptors. *Cytokine Growth Factor Rev* (4):313-335.
- Hsu CH, Chang MD, Tai KY, Yang YT, Wang PS, Chen CJ, Wang YH, Lee SC, Wu CW, Juan LJ. (2004) HCMV IE2-mediated inhibition of HAT activity downregulates p53 function. *EMBO J* 23:2269–2280.
- Huletsky A, de Murcia G, Muller S, Hengartner M, Menard L, Lamarre D, Poirier GG. (1989) The effect of poly(ADP) ribosylation on native and H1-depleted chromatin. A role of poly- (ADP-ribosylation) on core nucleosome structure. *J Biol Chem* 264:8878–8886.
- Ide A, Kawasaki E, Abiru N, Sun F, Fukushima T, Takahashi R, Kuwahara H, Fujita N, Kita A, Oshima K, Uotani S, Yamasaki H, Yamaguchi Y, Kawabata Y, Fujisawa T, Ikegami H, Eguchi K. (2003) Stromal-cell derived factor-1 chemokine gene variant is associated with type 1 diabetes age at onset in Japanese population. *Hum Immunol* 64(10):973-978.
- Ihle JN. (1995) Cytokine receptor signaling. *Nature* 377:591-594.
- Ilhan A, Nabokikh A, Maj M, Vidakovic M, Nielsen JH, Prikoszovich T, Niederle B, Base W, Luger A, Wagner L. (2009) CXCL12/SDF-1 over-expression in human insulinomas and its biological relevance. *Mol Cell Endocrinol* 298(1-2):1-10.
- Johnson FP. (2005) Molecular stop signs: regulation of cell-cycle arrest by C/EBP transcription factors. *Journal of Cell Science* 118:2545-2555.
- Johnson KR, Lehn DA, Reeves R. (1989) Alternative processing of mRNAs encoding mammalian chromosomal high-mobility-group proteins HMG-I and HMG-Y. *Mol Cell Biol* 9(5):2114-23.
- Johnson RA, Ince TA, Scotto KW. (2001) Transcriptional repression by p53 through direct binding to a novel DNA element. *J Biol Chem* 276:27716–27720
- Juarez J, Bendall L, Bradstock K. (2004) Chemokines and their receptors as therapeutic targets: the role of the SDF-1/CXCR4 axis. *Curr Pharm Des* 10(11):1245-1259.
- Kaestner KH, Knochel W, Martinez DE. (2000) Unified nomenclature for the winged helix/forkhead transcription factors. *Genes and Development* 14:142–146.
- Kalin TV, Meliton L, Meliton AY, Zhu X, Whitsett JA, Kalinichenko W. (2008) Pulmonary mastocytosis and enhanced lung inflammation in mice heterozygous null for the Foxf1 gene. *Am J Respir Cell Mol Biol* 39:390-399.
- Kannan P, Yu Y, Wankhade S, Tainsky MA. (1999) PolyADP-ribose polymerase is a coactivator for AP-2-mediated transcriptional activation. *Nucl Acid Res* 27:866–874.

- Karni R, Jove R, Levitzki A. (1999) Inhibition of pp60c-Src reduces Bcl-XL expression and reverses the transformed phenotype of cells overexpressing EGF and HER-2 receptors. *Oncogene* 18:4654–4662.
- Käs E, Izzaurralde E, Laemmli UK (1989) Specific inhibition of DNA binding to nuclear scaffolds and histonH1 by distamycin: the role of oligo(dA)-oligo(dT) tracts. *J Mol Biol* 210:587-599.
- Kaufmann J, Smale ST. (1994) Direct recognition of initiator elements by a component of the transcription factor IID complex. *Genes and Development* 8:821–829.
- Kayali AG, Lopez AD, Hao E, Hinton A, Hayek A, King CC. (2012) The SDF-1 α /CXCR4 axis is required for proliferation and maturation of human fetal pancreatic endocrine progenitor cells. *PLoS One*. 2012;7(6):e38721.
- Kayali AG, Van Gunst K, Campbell IL, Stotland A, Kritzik M, Liu G, Flodström-Tullberg M, Zhang YQ, Sarvetnick N. (2003) The stromal cell-derived factor-1 α /CXCR4 ligand-receptor axis is critical for progenitor survival and migration in the pancreas. *J Cell Biol*. 163(4):859-869.
- Kendall DM, Sutherland DE, Najarian JS, Goetz FC, Robertson RP. (1990) Effects of hemipancreatectomy on insulin secretion and glucose tolerance in healthy humans. *N Engl J Med* 322:898–903.
- Kim KJ, Kim HH, Kim JH, Choi YH, Kim YH, Cheong JH. (2007) Chemokine stromal cell-derived factor-1 induction by C/EBP β activation is associated with all-trans-retinoic acid-induced leukemic cell differentiation. *J Leukoc Biol* 82:1332-1339.
- Kisseleva T, Bhattacharya S, Braunstein J, Schindler CW. (2002) Signaling through the JAK/STAT pathway, recent advances and future challenges. *Gene* 285:1–24.
- Kiuchi N, Nakajima K, Ichiba M, Fukada T, Narimatsu M, Mizuno K, Hibi M, Hirano T. (1999) STAT3 is required for the gp130-mediated full activation of the c-myc gene. *J Exp Med* 189(1):63-73.
- Kjos SL, Buchanan TA. (1999) Gestational diabetes mellitus. *N Engl J Med* 341:1749–1756.
- Klar M, Stellamanns E, Ak P, Gluch A, Bode J. (2005) Dominant genomic structures: detection and potential signal functions in the interferon-beta domain. *Gene* 364:79-89.
- Klein-Hessling S, Schneider G, Heinfling A, Chuvpilo S, Serfling E. (1996) HMG I(Y) interferes with the DNA binding of NF-AT factors and the induction of the interleukin 4 promoter in T cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 93(26):15311-15316.

- Ko HL, Ren EC. (2012) Functional Aspects of PARP1 in DNA Repair and Transcription. *Biomolecules* 2(4):524-548.
- Ko JL, Liu HC, Loh HH. (2003) Role of an AP-2-like element in transcriptional regulation of mouse micro-opioid receptor gene. *Brain Res Mol Brain Res* 112:153–162.
- Ko LJ, Prives C. (1996) p53: puzzle and paradigm. *Genes Dev* 10:1054–1072.
- Koh HS, Lee C, Lee KS, Ham CS, Seong RH, Kim SS, Jeon SH. (2008) CD7 expression and galectin-1-induced apoptosis of immature thymocytes are directly regulated by NF-kappaB upon T-cell activation. *Biochem Biophys Res Commun* 370(1):149-153.
- Kohwi-Shigematsu T, Kohwi Y. (1990) Torsional stress stabilizes extended base unpairing in suppressor sites flanking immunoglobulin heavy chain enhancer. *Biochemistry* 29:9551-9560.
- Kovács KA, Steinmann M, Magistretti PJ, Halfon O, Cardinaux JR. (2006) C/EBPbeta couples dopamine signalling to substance P precursor gene expression in striatal neurones. *J Neurochem* 98(5):1390–1399.
- Kozak M. (1984) Compilation and analysis of sequences upstream from the translational start site in eukaryotic mRNAs. *Nucleic Acids Res* 12:857-872.
- Krippner-Heidenreich A, Walsemann G, Beyrouthy MJ, Speckgens S, Kraft R, Thole H, Talanian RV, Hurt MM, Lüscher B. (2005) Caspase-dependent regulation and subcellular redistribution of the transcriptional modulator YY1 during apoptosis. *Mol Cell Biol* 25(9):3704-3714.
- Krupitza G, Cerutti P. (1989) ADP-ribosylation of ADPR-transferase and topoisomerase I in intact mouse epidermal cells JB6. *Biochemistry* 28:2034-2040.
- Kryczek I, Wei S, Keller E, Liu R, Zou W. (2007) Stroma-derived factor (SDF-1/CXCL12) and human tumor pathogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol* 292(3):C987-995.
- Kucia M, Reza R, Miekus K, Wanzeck J, Wojakowski W, Janowska-Wieczorek A, Ratajczak J, Ratajczak MZ. (2005) Trafficking of normal stem cells and metastasis of cancer stem cells involve similar mechanisms: pivotal role of the SDF-1-CXCR4 axis. *Stem Cells*. 23(7):879-894.
- Kutlu B, Burdick D, Baxter D, Rasschaert J, Flamez D, Eizirik DL, Welsh N, Goodman N, Hood L. (2009) Detailed transcriptome atlas of the pancreatic beta cell. *BMC Med Genomics* 2:3.

- Laemmli UK. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
- Lagergren A, Månsson R, Zetterblad J, Smith E, Basta B, Bryder D, Akerblad P, Sigvardsson M. (2007) The Cxcl12, periostin, and Ccl9 genes are direct targets for early B-cell factor in OP-9 stroma cells. *J Biol Chem* 282(19):14454-14462.
- Lalić N., rukovodilac radne grupe za izradu vodiča (2012) Nacionalni vodič dobre kliničke prakse za dijagnostikovanje i lečenje diabetes mellitusa. Drugo izdanje. Republička stručna komisija za izradu i implementaciju vodiča dobre kliničke prakse. Ministarstvo zdravlja Republike Srbije.
- Lamb P, McKnight SL. (1991) Diversity and specificity in transcriptional regulation: the benefits of heterotypic dimerization. *Trends Biochem Sci* 16:417-422.
- Lane DP. (1992) P53, guardian of the genome. *Nature* 358:15-16.
- Langelier MF, Servent KM, Rogers EE, Pascal JM. (2008) A third zinc-binding domain of human poly(ADP-ribose) polymerase-1 coordinates DNAdependent enzyme activation. *J Biol Chem* 283:4105-4114.
- Laptenko O, Prives C. (2006) Transcriptional regulation by p53: one protein, many possibilities. *Cell Death Differ* 13(6):951-961.
- Lazarini F, Tham TN, Casanova P, Arenzana-Seisdedos F, Dubois-Dalcq M. (2003) Role of the alpha-chemokine stromal cell-derived factor (SDF-1) in the developing and mature central nervous system. *Glia* 42:139-148.
- Lee HY, Chaudhary J, Walsh GL, Hong WK, Kurie JM. (1998) Suppression of c-Fos gene transcription with malignant transformation of human bronchial epithelial cells. *Oncogene* 16(23):3039-3046.
- Lee I, Kim MK, Choi EY, Mehl A, Jung KC, Gil MC, Rowe M, Park SH. (2001) CD99 expression is positively regulated by Sp1 and is negatively regulated by Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 through nuclear factor-kappaB. *Blood* 97(11):3596-3604.
- Lewis H, Kaszubska W, DeLamararter JF, Whelan J. (1994) Cooperativity between two NF-kappa B complexes, mediated by high-mobility-group protein I(Y), is essential for cytokine-induced expression of the E-selectin promoter. *Mol Cell Biol* 14(9):5701-5709.

- Li B, Lee MY. (2001) Transcriptional regulation of the human DNA polymerase delta catalytic subunit gene POLD1 by p53 tumor suppressor and Sp1. *J Biol Chem* 276:29729–29739.
- Li L, He S, Sun JM, Davie JR. (2004) Gene regulation by Sp1 and Sp3. *Biochem Cell Biol* 82(4):460-471.
- Lin FT, MacDougald OA, Diehl AM, Lane MD. (1993) A 30 kDa alternative translation product of the CCAAT/enhancer binding protein α message: transcriptional activator lacking antimitotic activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:9606-9610.
- Lin MT, Wang F, Uitto J, Yoon K. (2001) Differential expression of tissue-specific promoters by gene gun. *Br J Dermatol* 144(1):34-39.
- Liu Z, Habener JF. (2009) Stromal cell-derived factor-1 promotes survival of pancreatic beta cells by the stabilisation of beta-catenin and activation of transcription factor 7-like 2 (TCF7L2). *Diabetologia* 52(8):1589-1598.
- Liu Z, Stanojevic V, Avadhani S, Yano T, Habener JF. (2011) Stromal cell-derived factor-1 (SDF-1)/chemokine (C-X-C motif) receptor 4 (CXCR4) axis activation induces intraislet glucagon-like peptide-1 (GLP-1) production and enhances beta cell survival. *Diabetologia* 54:2067-2076.
- Loeffler S, Fayard B, Weis J, Weissenberger J. (2005) Interleukin-6 induces transcriptional activation of vascular endothelial growth factor (VEGF) in astrocytes in vivo and regulates VEGF promoter activity in glioblastoma cells via direct interaction between STAT3 and Sp1. *Int J Cancer* 115(2):202-213.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-275.
- Lu SY, Rodriguez M, Liao WS. (1994) YY1 represses rat serum amyloid A1 gene transcription and is antagonized by NF-kappa B during acute-phase response. *Mol Cell Biol*. 14(9):6253-6263.
- Luo S, Mao C, Lee B, Lee AS. (2006) GRP78/BiP is required for cell proliferation and protecting the inner cell mass from apoptosis during early mouse embryonic development. *Mol Cell Biol* 26(15):5688-5697.
- Mackey SL, Darlington GJ. (2004) CCAAT enhancer-binding protein alpha is required for interleukin-6 receptor alpha signaling in newborn hepatocytes. *J Biol Chem* 279(16):16206-16213.

- Macleod D, Charlton J, Mullins J, Bird AP. (1994) Sp1 sites in the mouse aprt gene promoter are required to prevent methylation of the CpG island. *Genes and Development* 8:2282–2292.
- Majumdar GA, Harrington J, Hungerford A, Martinez-Hernandez IC, Gerling R, Raghoebarak, Solomon S. (2006) Insulin dynamically regulates calmodulin gene expression by sequential o-glycosylation and phosphorylation of sp1 and its subcellular compartmentalization in liver cells. *J Biol Chem* 281:3642–3650.
- Manzano-Winkler B, Novina CD, Roy AL. (1996) TFII is required for transcription of the naturally TATA-less but initiator-containing Vbeta promoter. *J Biol Chem* 271(20):12076-12081.
- Marcel V, Hainaut P. (2009) p53 isoforms - a conspiracy to kidnap p53 tumor suppressor activity?. *Cell Mol Life Sci* 66(3):391-406.
- Marius Clore G, Omnichinski JG, Sakaguchi K, Zambrano N, Sakamoto H, Appella E, Gronenborn AM. (1995) Interhelical angels in the solution structure of the oligomerization domain of p53: correction. *Science* 267:1515-1516.
- Marković J, Grdović N, Dinić S, Karan-Djurašević T, Uskoković A, Arambašić J, Mihailović M, Pavlović S, Poznanović G, Vidaković M. (2013) PARP-1 and YY1 Are Important Novel Regulators of CXCL12 Gene Transcription in Rat Pancreatic Beta Cells. *PLoS One* 8(3):e59679.
- Mashima H, Ohnishi H, Wakabayashi K, Mine T, Miyagawa J, Hanafusa T, Seno M, Yamada H, Kojima I. (1996) Betacellulin and activin A coordinately convert amylase-secreting pancreatic AR42J cells into insulin-secreting cells. *J Clin Invest* 97:1647–1654.
- Masson M, Niedergang C, Schreiber V, Muller S, Menissier-de Murcia J, de Murcia G. (1998) XRCC1 is specifically associated with poly(ADP-ribose) polymerase and negatively regulates its activity following DNA damage. *Mol Cell Biol* 18:3563-3571.
- Mathis G, Althaus FR. (1987) Release of core DNA from nucleosomal core particles following (ADP-ribose)_n-modification in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 143:1049–1054.
- Matschinsky F, Liang Y, Kesavan P, Wang L, Froguel P, Velho G, Cohen D, Permutt MA, Tanizawa Y, Jetton TL. (1993) Glucokinase as pancreatic beta cell glucose sensor and diabetes gene. *J Clin Invest* 92(5):2092-2098.
- Matsumoto M, Accili D. (2005) All roads lead to FoxO. *Cell Metabolism* 1215–1216.

- Matsushita K, Hagihara M, Sugiura Y. (1998) Participation of oligomerization through C-terminal D domain region of Sp1 in DNA binding. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 21:1094–1097.
- May P, May E. (1999) Twenty years of p53 research: structural and functional aspects of the p53 protein. *Oncogene* 18:7621–7636.
- McBride KM, McDonald C, Reich NC. (2000) Nuclear export signal located within the DNA-binding domain of the STAT1 transcription factor. *EMBO J* 19:6196–6206.
- Mehta SA, Christopherson KW, Bhat-Nakshatri P, Goulet RJ Jr, Broxmeyer HE, Kopelovich L, Nakshatri H. (2007) Negative regulation of chemokine receptor CXCR4 by tumor suppressor p53 in breast cancer cells: implications of p53 mutation or isoform expression on breast cancer cell invasion. *Oncogene* 26(23):3329–3337.
- Meier JJ, Bhushan A, Butler PC. (2006) The potential for stem cell therapy in diabetes. *Pediatr Res* 59:65R–73R.
- Meier JJ, Butler PC. (2005) Insulin secretion. In: DeGroot LJ, Jameson JL (eds) *Endocrinology*, 5th edn. Elsevier Saunders, Philadelphia, p 961–973.
- Meier JJ. (2008) Beta cell mass in diabetes: a realistic therapeutic target?. *Diabetologia* 51(5):703–713.
- Meyer-Ficca ML, Meyer RG, Jacobson EL, Jacobson MK. (2005) Poly(ADP-ribose) polymerases: managing genome stability. *Int J Biochem Cell Biol* 37(5):920–926.
- Minami M, Inoue M, Wei S, Takeda K, Matsumoto M, Kishimoto T, Akira S. (1996) STAT3 activation is a critical step in gp130-mediated terminal differentiation and growth arrest of a myeloid cell line. *Proc Natl Acad Sci USA* 93(9):3963–3966.
- Mitchel JP, Tjian R. (1989) Transcriptional Regulation in Mammalian Cells by Sequence-specific DNA binding proteins. *Science* 245:371–378.
- Miyaguchi Y, Tsuchiya K, Sakamoto K. (2009) P53 negatively regulates the transcriptional activity of FOXO3a under oxidative stress. *Cell Biol Int* 33(8):853–860.
- Mohle R, Bautz F, Rafii S, Moore M, Brugger W, Kanz L. (1998) The chemokine receptor CXCR-4 is expressed on CD34+ hematopoietic progenitors and leukemic cells and mediates transendothelial migration induced by stromal cell-derived factor-1. *Blood* 91:4523–4530.
- Moriuchi M, Moriuchi H, Turner W, Fauci AS. (1997) Cloning and analysis of the promoter region of CXCR4, a coreceptor for HIV-1 entry. *J Immunol* 159(9):4322–4329.

- Moskovits N, Kalinkovich A, Bar J, Lapidot T, Oren M. (2006) p53 attenuates cancer cell migration and invasion through repression of SDF-1/CXCL12 expression in stromal fibroblasts. *Cancer Res* 66:10671-10676.
- Murphy M, Ahn J, Walker KK, Hoffman WH, Evans RM, Levine AJ, George DL. (1999) Transcriptional repression by wild-type p53 utilizes histone deacetylases, mediated by interaction with mSin3a. *Genes Dev* 13:2490–2501.
- Nagasawa T, Kikutani H, Kishimoto T. (1994) Molecular cloning and structure of a pre-B-cell growth-stimulating factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 2305-2309.
- Nagasawa T, Nakajima T, Tachibana K, Iizasa H, Bleul CC, Yoshie O, Matsushima K, Yoshida N, Springer TA, Kishimoto T. (1996) Molecular cloning and characterization of a murine pre-B-cell growth-stimulating factor/stromal cell-derived factor 1 receptor, a murine homolog of the human immunodeficiency virus 1 entry coreceptor fusin. *Proc Natl Acad Sci USA* 93(25):14726-14729.
- Nath DS, Gruessner AC, Kandaswamy R, Gruessner RW, Sutherland DE, Humar A. (2005) Outcomes of pancreas transplants for patients with type 2 diabetes mellitus. *Clin Transplant* 19:792–797.
- Natsuka S, Akira S, Nishio Y, Hashimoto S, Sugita T, Isshiki H, Kishimoto T. (1992) Macrophage differentiation-specific expression of NF-IL6, a transcription factor for interleukin-6. *Blood* 79(2):460–466.
- Nerlov C. (2007) The C/EBP family of transcription factors: a paradigm for interaction between gene expression and proliferation control. *Trends Cell Biol* 17:318–324.
- Nguyen N, Zhang X, Olashaw N, Seto E. (2004) Molecular cloning and functional characterization of the transcription factor YY2. *J Biol Chem* 279(24):25927-25934.
- Nirodi C, NagDas S, Gygi SP, Olson G, Aebersold R, Richmond A. (2001) A role for poly(ADP-ribose) polymerase in the transcriptional regulation of the melanoma growth stimulatory activity (CXCL1) gene expression. *J Biol Chem* 276(12):9366-9374.
- Nishiyama C, Yokota T, Nishiyama M, Ra C, Okumura K, Ogawa H. (2003) Molecular cloning of rat transcription factor YY1. *Biosci Biotechnol Biochem* 67(3):654-658.
- Niu X, Renshaw-Gegg L, Miller L, Guiltinan MJ. (1999) Bipartite determinants of DNA-binding specificity of plant basic leucine zipper proteins. *Plant Mol Biol* 41:1–13.

- Oei SL, Griesenbeck J, Schweiger M, Ziegler M. (1998) Regulation of RNA polymerase II-dependent transcription by poly(ADP-ribosylation) of transcription factors. *J Biol Chem* 273(48):31644-31647.
- Oei SL, Griesenbeck J, Schweiger M. (1997) The role of Poly(ADP-ribosylation). *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 131:4135-4137.
- Oei SL, Shi Y. (2001) Poly(ADP-ribosylation) of transcription factor Yin Yang 1 under conditions of DNA damage. *Biochem Biophys Res Commun* 285:27–31.
- Oelgeschläger T, Chiang CM, Roeder RG. (1996) Topology and reorganization of a human TFIIID-promoter complex. *Nature* 382(6593):735-738.
- Olabisi OA, Soto-Nieves N, Nieves E, Yang TT, Yang XY, Yu RY, Suk HY, Macian F, Chow CW. (2008) Regulation of transcription factor NFAT by ADP-ribosylation. *Mol Cell Biol* 28:2860-2871.
- Olive M, Mellad JA, Beltran LE, Ma M, Cimato T, Noguchi AC, San H, Childs R, Kovacic JC, Boehm M. (2008) p21Cip1 modulates arterial wound repair through the stromal cell-derived factor-1/CXCR4 axis in mice. *J Clin Invest* 118(6):2050-2061.
- Oliver FJ, Menissier de Murcia J, Nacci C, Decker P, Andriantsitohaina R, Muller S, de la Rubia G, Stoclet JC, de Murcia G. (1999) Resistance to endotoxic shock as a consequence of defective NF-kappaB activation in poly (ADP-ribose) polymerase-1 deficient mice. *EMBO J* 18:4446–4454.
- Ono T, Kaneda T, Muto A, Yoshida T. (2009) Positive transcriptional regulation of the human micro opioid receptor gene by poly(ADP-ribose) polymerase-1 and increase of its DNA binding affinity based on polymorphism of G-172 ->T. *J Biol Chem* 284:20175–20183.
- Osada S, Yamamoto H, Nishihara T, Imagawa M. (1997) DNA binding specificity of the CCAAT/enhancer-binding protein transcription factor family. *J Biol Chem* 271:3891-3896.
- Pajunk HS, May C, Pfister H, Fuchs PG. (1997) Regulatory interactions of transcription factor YY1 with control sequences of the E6 promoter of human papillomavirus type 8. *J Gen Virol* 78 (Pt 12):3287-3295.
- Paris M, Turrel-Cuzin C, Plachot C, Ktorza A. (2004) Review: pancreatic beta-cell neogenesis revisited. *Exp Diabetes Res* 5(2):111-121.
- Pascal E, Tjian R. (1991) Different activation domains of Sp1 govern formation of multimers and mediate transcriptional synergism. *Genes Dev* 5:1646–1656.

- Peralta-Leal A, Rodríguez-Vargas JM, Aguilar-Quesada R, Rodríguez MI, Linares JL, de Almodóvar MR, Oliver FJ. (2009) PARP inhibitors: new partners in the therapy of cancer and inflammatory diseases. *Free Radic Biol Med* 47(1):13-26.
- Peshavaria M, Larmie BL, Lausier J, Satish B, Habibovic A, Roskens V, Larock K, Everill B, Leahy JL, Jetton TL. (2006) Regulation of pancreatic beta-cell regeneration in the normoglycemic 60% partial-pancreatectomy mouse. *Diabetes* 55(12):3289-3298.
- Pfeifer GP, Tanguay RL, Steigerwald SD, Riggs AD. (1990) In vivo footprint and methylation analysis by PCR-aided genomic sequencing: comparison of active and inactive X chromosomal DNA at the CpG island and promoter of human PGK-1. *Genes and Development* 4:1277-1287.
- Pfeifer MA, Halter JB, Porte D Jr. (1981) Insulin secretion in diabetes mellitus. *Am J Med* 70:579-588.
- Philipsen S, Suske G. (1999) A tale of three fingers: the family of mammalian Sp/XKLF transcription factors. *Nucleic Acids Res* 27:2991-3000.
- Pieper AA, Brat DJ, Krug DK, Watkins CC, Gupta A, Blackshaw S, Verma A, Wang ZQ, Snyder SH. (1999) Poly(ADP-ribose) polymerase-deficient mice are protected from streptozotocin-induced diabetes. *Proc Natl Acad Sci USA* 96(6):3059-3064.
- Pierce KL, Premont RT, Lefkowitz RJ. (2002) Seven-transmembrane receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3(9):639-650.
- Plaza S, Aumercier M, Bailly M, Dozier C, Saule S. (1999) Involvement of poly (ADP-Ribose)-polymerase in the *Pax-6* gene regulation in neuroretina. *Oncogene* 18:1041-1051.
- Poli V. (1998) The role of C/EBP isoforms in the control of inflammatory and native immunity functions. *J Biol Chem* 273(45):29279-29282.
- Ponomaryov T, Peled A, Petit I, Taichman RS, Habler L, Sandbank J, Arenzana-Seisdedos F, Magerus A, Caruz A, Fujii N, Nagler A, Lahav M, Szyper-Kravitz M, Zipori D, Lapidot T. (2000) Induction of the chemokine stromal-derived factor-1 following DNA damage improves human stem cell function. *J Clin Invest* 106(11):1331-1339.
- Porksen N, Nyholm B, Veldhuis JD, Butler PC, Schmitz O. (1997) In humans at least 75% of insulin secretion arises from punctuated insulin secretory bursts. *Am J Physiol* 273:E908-E914.
- Pox C, Ritzel R, Büsing M, Meier JJ, Klempnauer J, Schmiegel W, Nauck MA. (2002) Combined pancreas and kidney transplantation in a lean type 2 diabetic patient.

- Effects on insulin secretion and sensitivity. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 110(8):420-424.
- Poznanović G, Vidaković M, Ivanović-Matić S, Grujić V. (1999) Identification of nuclear matrix and associated proteins that bind the haptoglobin gene cis-element. *IUBMB Life* 48(3):277-282.
- Ramji DP, Foka P. (2002) CCAAT/enhancer-binding proteins: structure, function and regulation. *Biochem J* 365(Pt 3):561-575.
- Ramos EA, Camargo AA, Braun K, Slowik R, Cavalli IJ, Ribeiro EM, Pedrosa Fde O, de Souza EM, Costa FF, Klassen G. (2010) Simultaneous CXCL12 and ESR1 CpG island hypermethylation correlates with poor prognosis in sporadic breast cancer. *BMC Cancer* 10:23.
- Ramsamooj P, Notario V, Dritschilo A. (1995) Modification of nucleolar protein B23 after exposure to ionizing radiation. *Radiat Res* 143:158–164.
- Rana B, Xie Y, Mischoulon D, Bucher NL, Farmer SR. (1995) The DNA binding activity of C/EBP transcription factor is regulated in the G1 phase of the hepatocyte cell cycle. *J Biol Chem* 270(30):18123-18132.
- Ranish JA, Hahn S. (1996) Transcription: basal factors and activation. *Current Opinion Genet Dev* 6: 151-158.
- Ratajczak MZ, Zuba-Surma E, Kucia M, Reza R, Wojakowski W, Ratajczak J. (2006) The pleiotropic effects of the SDF-1-CXCR4 axis in organogenesis, regeneration and tumorigenesis. *Leukemia* 20(11):1915-1924.
- Rawling JM, Alvarez-Gonzalez R. (1997) TFIIF, a basal eukaryotic transcription factor, is a substrate for poly(ADP-ribosylation). *Biochem J* 324 (Pt 1):249-253.
- Realini CA, Althaus FR. (1992) Histone shuttling by poly (ADP-ribosylation). *J Biol Chem* 267:18858–18865.
- Reaven GM. (1988) Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes* 37:1595–1607
- Reeves R, Leonard WJ, Nissen MS. (2000) Binding of HMG-I(Y) imparts architectural specificity to a positioned nucleosome on the promoter of the human interleukin-2 receptor alpha gene. *Mol Cell Biol* 20(13):4666-4679.
- Reeves R. (2000) Structure and function of the HMGI(Y) family of architectural transcription factors. *Environ Health Perspect* 108 Suppl 5:803-809.

- Robert I, Sutter A, Quirin-Stricker C. (2002) Synergistic activation of the human choline acetyltransferase gene by c-Myb and C/EBPbeta. *Brain Res Mol Brain Res* 106 (1–2):124–135.
- Rolli V, Ruf A, Augustin A, Schulz GE, Menissier de Murcia J, de Murcia G. (2000) Poly(ADP-ribose)polymerase structure and function and poly ADP-ribosylation reactions. In: de Murcia G, Shall S eds. *From DNA Damage and Stress Signaling to Cell Death*. New York, Oxford: Oxford University Press, Inc. p 35-57.
- Roos MD, Su K, Baker JR, Kudlow JE. (1997) O glycosylation of an Sp1-derived peptide blocks known Sp1 protein interactions. *Mol Cell Biol* 17:6472–6480.
- Roy AL, Meisterernst M, Pognonec P, Roeder RG. (1991) Cooperative interaction of an initiator-binding transcription initiation factor and the helix-loop-helix activator USF. *Nature* 354(6350):245-248.
- Runge D, Runge DM, Drenning SD, Bowen WC Jr, Grandis JR, Michalopoulos GK. (1998) Growth and differentiation of rat hepatocytes: changes in transcription factors HNF-3, HNF-4, STAT-3, and STAT-5. *Biochem Biophys Res Commun* 250(3):762-768.
- Rupprecht R, Reul JM, Trapp T, van Steensel B, Wetzel C, Damm K, Zieglgänsberger W, Holsboer F. (1993) Progesterone receptor-mediated effects of neuroactive steroids. *Neuron* 11(3):523-530.
- Sambrook J, Fritsch FE, Maniatis T. (1989) In: *Molecular Cloning. A Laboratory Manual* (N. Irwin, Ed.). Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor p1847-1860.
- Santiago B, Calonge E, Del Rey MJ, Gutierrez-Cañas I, Izquierdo E, Usategui A, Galindo M, Alcamí J, Pablos JL. (2011) CXCL12 gene expression is upregulated by hypoxia and growth arrest but not by inflammatory cytokines in rheumatoid synovial fibroblasts. *Cytokine*. 53(2):184-190.
- Scaglia L, Cahill CJ, Finegood DT, Bonner-Weir S. (1997) Apoptosis participates in the remodeling of the endocrine pancreas in the neonatal rat. *Endocrinology* 138:1736–1741.
- Schägger H, von Jagow G. (1987) Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem* 166(2):368-379.
- Schmidt M, Fernandez de Mattos S, van der Horst A, Klompmaker R, Kops GJ, Lam EW, Burgering BM, Medema RH. (2002) Cell cycle inhibition by FoxO forkhead

transcription factors involves downregulation of cyclin D. *Mol Cell Biol* 22(22):7842-7852.

Schreiber V, Hunting D, Trucco C, Gowans B, Grunwald D, de Murcia G, de Murcia JM. (1995) A dominant-negative mutant of human poly(ADP-ribose) polymerase affects cell recovery, apoptosis and sister chromatid exchange following DNA damage. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:4753–4757.

Scovassi AI, Mariani C, Negroni M, Negri C, Bertazzoni U. (1993) ADP-ribosylation of nonhistone proteins in HeLa cells: modification of DNA topoisomerase II. *Exp Cell Res* 206:177-181.

Semple RK. (2009) From bending DNA to diabetes: the curious case of HMGA1. *J Biol* 8(7):64.

Shi Y, Lee JS, Galvin KM. (1997) Everything you have ever wanted to know about Yin Yang 1. *Biochim Biophys Acta*. 1332(2):F49-66.

Shieh WM, Ame JC, Wilson MV, Wang ZQ, Koh DW, Jacobson MK, Jacobson EL. (1998) Poly(ADP-ribose) polymerase null mouse cells synthesize ADP-ribose polymers. *J Biol Chem* 273:30069–30072.

Shimizu R, Kikuchi J, Wada T, Ozawa K, Kano Y, Furukawa Y. (2010) HDAC inhibitors augment cytotoxic activity of rituximab by upregulating CD20 expression on lymphoma cells. *Leukemia* 24(10):1760-1768.

Shirozu M, Nakano T, Inazawa J, Tashiro K, Tada H, Shinohara T, Honjo T. (1995) Structure and chromosomal localization of the human stromal cell-derived factor 1 (SDF 1) gene. *Genomics* 28:495–500.

Shuai K, Horvath CM, Huang LH, Qureshi SA, Cowburn D, Darnell Jr JE. (1994) Interferon activation of the transcription factor Stat91 involves dimerization through SH2-phosphotyrosyl peptide interactions. *Cell* 76:821–828.

Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. (1988) A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 175(1):184-191.

Singh PP, Voleti B, Agrawal A. (2007) A novel RBP-J kappa-dependent switch from C/EBP beta to C/EBP zeta at the C/EBP binding site on the C-reactive protein promoter. *J Immunol* 178(11):7302-7309.

Smale ST. (1997) Transcription initiation from TATA-less promoters within eukaryotic protein-coding genes. *Biochim Biophys Acta* 1351:73–88.

- Smith S. (2001) The world according to PARP. *Trends Biochem Sci* 26:174–179.
- Soldatenkov VA, Chasovskikh S, Potaman VN, Trofimova I, Smulson ME, Dritschilo A. (2002) Transcriptional repression by binding of poly(ADP-ribose) polymerase to promoter sequences. *J Biol Chem* 277:665–670.
- Sorenson RL, Brelje TC. (1997) Adaptation of islets of Langerhans to pregnancy: beta-cell growth, enhanced insulin secretion and the role of lactogenic hormones. *Horm Metab Res* 29:301–307.
- Sozzani S, Luini W, Borsatti A, Polentarutti N, Zhou D, Piemonti L, D'Amico G, Power CA, Wells TN, Gobbi M, Allavena P, Mantovani A. (1997) Receptor expression and responsiveness of human dendritic cells to a defined set of CC and CXC chemokines. *J Immunol* 159(4):1993-2000.
- Spengler ML, Kennett SB, Moorefield KS, Simmons SO, Brattain MG, Horowitz JM. (2005) Sumoylation of internally initiated Sp3 isoforms regulates transcriptional repression via a trichostatin A-insensitive mechanism. *Cell Signal* 17:153–166.
- St Clair S, Giono L, Varmeh-Ziaie S, Resnick-Silverman L, Liu WJ, Padi A, Dastidar J, DaCosta A, Mattia M, Manfredi JJ. (2004) DNA damage-induced downregulation of Cdc25C is mediated by p53 via two independent mechanisms: one involves direct binding to the cdc25C promoter. *Mol Cell* 16:725–736.
- Stoffers DA, Kieffer TJ, Hussain MA, Drucker DJ, Bonner-Weir S, Habener JF, Egan JM. (2000) Insulinotropic glucagon-like peptide 1 agonists stimulate expression of homeodomain protein IDX-1 and increase islet size in mouse pancreas. *Diabetes* 49(5):741-748.
- Suarez-Pinzon WL, Mabley JG, Power R, Szabo C, Rabinovitch A. (2003) Poly (ADP-ribose) polymerase inhibition prevents spontaneous and recurrent autoimmune diabetes in NOD mice by inducing apoptosis of islet-infiltrating leukocytes. *Diabetes* 52:1683-1688.
- Subramanian SV, Polikandriotis JA, Kelm RJ Jr, David JJ, Orosz CG, Strauch AR. (2004) Induction of vascular smooth muscle alpha-actin gene transcription in transforming growth factor beta1-activated myofibroblasts mediated by dynamic interplay between the Pur repressor proteins and Sp1/Smad coactivators. *Mol Biol Cell* 15(10):4532-4543
- Sugimura K, Takebayashi S, Taguchi H, Takeda S, Okumura K. (2008) PARP-1 ensures regulation of replication fork progression by homologous recombination on damaged DNA. *J Cell Biol* 183(7):1203-1212.

- Surjana D, Halliday GM, Damian DL.(2010) Role of nicotinamide in DNA damage, mutagenesis, and DNA repair. *J Nucleic Acids pii*: 157591.
- Suske G. (1999) The Sp-family of transcription factors. *Gene* 238:291–300.
- Szabó C. (2005) Roles of poly(ADP-ribose) polymerase activation in the pathogenesis of diabetes mellitus and its complications. *Pharmacol Res* 52(1):60-71.
- Tachibana K, Hirota S, Iizasa H, Yoshida H, Kawabata K, Kataoka Y, Kitamura Y, Matsushima K, Yoshida N, Nishikawa S, Kishimoto T, Nagasawa T. (1998) The chemokine receptor CXCR4 is essential for vascularization of the gastrointestinal tract. *Nature* 393(6685):591-594.
- Takasawa S, Okamoto H. (2002) Pancreatic beta-cell death, regeneration and insulin secretion: roles of poly(ADP-ribose) polymerase and cyclic ADP-ribose. *Int J Exp Diabetes Res* 3(2):79-96.
- Takeda K, Noguchi K, Shi W, Tanaka T, Matsumoto M, Yoshida N, Kishimoto T, Akira S. (1997) Targeted disruption of the mouse Stat3 gene leads to early embryonic lethality. *Proc Natl Acad Sci USA* 94(8):3801-3804.
- Takiguchi M. (1998) The C/EBP family of transcription factors in the liver and other organs. *Int J Exp Pathol* 79:369–391.
- Tan NY, Khachigian LM. (2009) Sp1 phosphorylation and its regulation of gene transcription. *Mol Cell Biol* 29(10):2483-2488.
- Tan S, Richmond TJ. (1998) Eukaryotic transcription factors. *Current Opinion in Structural Biology*. 8(1):41-48.
- Tanese N, Saluja D, Vassallo MF, Chen JL, Admon A. (1996) Molecular cloning and analysis of two subunits of the human TFIID complex: hTAFII130 and hTAFII100. *PNAS* 93:13611–13616.
- Taranenko N, Krause DS. (2000) Regulation of CD34 transcription by Sp1 requires sites upstream and downstream of the transcription start site. *Exp Hematol* 28(8):974-984.
- Tarnowski M, Grymula K, Reza R, Jankowski K, Maksym R, Tarnowska J, Przybylski G, Barr FG, Kucia M, Ratajczak MZ. (2010) Regulation of expression of stromal-derived factor-1 receptors: CXCR4 and CXCR7 in human rhabdomyosarcomas. *Mol Cancer Res* 8(1):1-14.
- Tashiro K, Tada H, Heilker R, Shirozu M, Nakano T, Honjo T. (1993) Signal sequence trap: a cloning strategy for secreted proteins and type I membrane proteins. *Science* 261(5121):600-603.

- Teta M, Long SY, Wartschow LM, Rankin MM, Kushner JA. (2005) Very slow turnover of β -cells in aged adult mice. *Diabetes* 54:2557–2567.
- Thomas MJ, Seto E. (1999) Unlocking the mechanisms of transcription factor YY1: are chromatin modifying enzymes the key?. *Gene*. 236(2):197-208.
- Thut CJ, Chen JL, Klemm R, Tjian R. (1995) p53 transcriptional activation mediated by coactivators TAFII40 and TAFII60. *Science* 267:100–104.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 76:4350-4354.
- Truant R, Xiao H, Ingles CJ, Greenblott J. (1993) Direct interaction between the transcriptional activation domain of human p53 and the TATA box-binding protein. *Oncogene* 7:1635-1643.
- Tsai KL, Sun YJ, Huang CY, Yang JY, Hung MC, Hsiao CD. (2007) Crystal structure of the human FOXO3a-DBD/DNA complex suggests the effects of post-translational modification. *Nucleic Acids Res* 35(20):6984-6994.
- Ullrich O, Grune T. (2001) Proteasomal degradation of oxidatively damaged endogenous histones in K562 human leukemic cells. *Free Radic Biol Med* 31:887–893.
- Ungefroren H, Krull NB. (1996) Transcriptional regulation of the human biglycan gene. *J Biol Chem* 271(26):15787-15795.
- Usheva A, Shank T. (1994) TATA-binding protein-independent initiation: YY1, TFIIB, and RNA polymerase II direct basal transcription on supercoiled template DNA. *Cell* 76:1115-1121.
- Usheva A, Shenk T. (1996) TFIIB and the large subunit of RNAPolymerase II bind directly to YY1 to mediate transcription initiation. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:13571–76.
- Van Assche FA, Aerts L, De Prins F. (1978) A morphological study of the endocrine pancreas in human pregnancy. *Br J Obstet Gynaecol* 85:818–820.
- Van Dijk TB, Baltus B, Raaijmakers JA, Lammers JW, Koenderman L, de Groot RP. (1999) A composite C/EBP binding site is essential for the activity of the promoter of the IL-3/IL-5/granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor beta c gene. *J Immunol* 163(5):2674–2680.

- Vidaković M, Gluch A, Qiao J, Oumard A, Frisch M, Poznanović G, Bode J. (2009) PARP-1 expression in the mouse is controlled by an autoregulatory loop: PARP-1 binding to an upstream S/MAR element and to a novel recognition motif in its promoter suppresses transcription. *J Mol Biol* 388(4):730-750.
- Vogelstein B, Kinzler KW. (1992) p53 function and dysfunction. *Cell* 70:523-526.
- Vousden KH, Lane DP. (2007) p53 in health and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8:275–283.
- Wacker DA, Ruhl DD, Balagamwala EH, Hope KM, Zhang T, Kraus WL. (2007) The DNA binding and catalytic domains of poly(ADP-ribose) polymerase 1 cooperate in the regulation of chromatin structure and transcription. *Mol Cell Biol* 27:7475-7485.
- Wang J, Liu Z, Groopman J. (1998) The alpha-chemokine receptor CXCR4 is expressed on the megakaryocytic lineage from progenitor to platelets and modulates migration and adhesion. *Blood* 92:756–764.
- Wedel A, Ziegler-Heitbrock HWL. (1995) The C/EBP family of transcription factors. *Immunobiol* 193:171–185.
- Weintraub H, Hauschika S, Tapscott SJ. (1991) The MCK enhancer contains a p53 responsive element. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:4570-4571.
- Wen Z, Zhong Z, Darnell Jr JE. (1995) Maximal activation of transcription by Stat1 and Stat3 requires both tyrosine and serine phosphorylation. *Cell* 82(2):241-250.
- Wesierska-Gadek J, Ranftler C, Schmid G. (2005) Physiological ageing: role of p53 and PARP-1 tumor suppressors in the regulation of terminal senescence. *J Physiol Pharmacol* 56 Suppl 2:77-88.
- Williams SC, Baer M, Dillner AJ, Johnson PF. (1995) CRP2 (C/EBP β) contains a bipartite regulatory domain that controls transcriptional activation, DNA binding and cell specificity. *EMBO J* 14:3170–3183.
- Wu X, Bayle JH, Olson D, Levine AJ. (1993) The p53 mdm-2 autoregulatory feedback loop. *Genes Dev* 7:1126-1132.
- Wu Z, Biro PA, Mirakian R, Curcio F, Ambesi-Impiombato FS, Bottazzo GF (2000). Transcriptional regulation of the MHC II gene DRA in untransformed human thyrocytes. *Int Immunol* 12:405-413.

- Xi H, Yu Y, Fu Y, Foley J, Halees A, Weng Z. (2007) Analysis of overrepresented motifs in human core promoters reveals dual regulatory roles of YY1. *Genome Res* 17:798-806.
- Xing J, Sheppard HM, Corneillie SI, Liu X. (2001) p53 Stimulates TFIID-TFIIA promoter complex assembly, and p53-T antigen complex inhibits TATA binding protein-TATA interaction. *Mol Cell Biol* 21:3652–3661.
- Xu X, Murdoch FE, Curran EM, Welshons WV, Fritsch MK. (2004) Transcription factor accessibility and histone acetylation of the progesterone receptor gene differs between parental MCF-7 cells and a subline that has lost progesterone receptor expression. *Gene* 328:143-151.
- Yang J, Richmond AJ. (2009) Monitoring NF-kappaB mediated chemokine transcription in tumorigenesis. *Methods Enzymol* 460:347-355.
- Yang L, Li S, Hatch H, Ahrens K, Cornelius JG, Petersen BE, Peck, AB. (2002) In vitro transdifferentiation of adult hepatic stem cells into pancreatic endocrine hormone-producing cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:8078–8083.
- Yang WM, Inouye C, Zeng Y, Bearss D, Seto E. (1996) Transcriptional repression by YY1 is mediated by interaction with a mammalian homolog of the yeast global regulator RPD3. *Proc Natl Acad Sci USA* 93(23):12845-50.
- Yang X, Su K, Roos MD, Chang Q, Paterson AJ, Kudlow JE. (2001) O-linkage of N-acetylglucosamine to Sp1 activation domain inhibits its transcriptional capability. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:6611–6616.
- Yano T, Liu Z, Donovan J, Thomas KM, Habener FJ. (2007) Stromal Cell-Derived Factor-1 (SDF-1/CXCL12) Attenuates Diabetes in Mice and Promotes Pancreatic Beta-Cell Survival by Activation of the Prosurvival Kinase Akt. *Diabetes* 56:2946-2957.
- Ying W, Alano CC, Garnier P, Swanson RA. (2005) NAD⁺ as a metabolic link between DNA damage and cell death. *J Neurosci Res* 79(1-2):216-223.
- Yingbiao J, Tulin AV. (2010) The roles of PARP1 in gene control and cell differentiation. *Curr Opin Genet Dev* 20(5):512–518.
- Yoo JY, Wang W, Desiderio S, Nathans D. (2001) Synergistic activity of STAT3 and c-Jun at a specific array of DNA elements in the alpha 2-macroglobulin promoter. *J Biol Chem* 276(28):26421-26429.
- You H, Pellegrini M, Tsuchihara K, Yamamoto K, Hacker G, Erlacher M, Villunger A, Mak TW. (2006) FOXO3a-dependent regulation of Puma in response to cytokine/growth factor withdrawal. *J Exp Med* 203(7):1657-1663.

- Yu L, Cecil J, Peng SB, Schrementi J, Kovacevic S, Paul D, Su EW, Wang J. (2006) Identification and expression of novel isoforms of human stromal cell-derived factor 1. *Gene* 374:174-179.
- Zaniolo K, Desnoyers S, Leclerc S, Guerin SL. (2007) Regulation of poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) gene expression through the post-translational modification of Sp1: a nuclear target protein of PARP-1. *BMC Mol Biol* 8:96.
- Zhang X, Darnell Jr JE. (2001) Functional importance of Stat3 tetramerization in activation of the alpha 2-macroglobulin gene. *J Biol Chem* 276(36):33576-33581.
- Zhang X, Krutchinsky A, Fukuda A, Chen W, Yamamura S, Chait BT, Roeder RG. (2005) MED1/TRAP220 exists predominantly in a TRAP/Mediator subpopulation enriched in RNA polymerase II and is required for ER-mediated transcription. *Mol Cell* 19:89-100.
- Zhang Y, Xiong YA. (2001) p53 amino-terminal Nuclear Export Signal inhibited by DNA damage-induced phosphorylation. *Science* 292:1910-1915.
- Zhao K, Käs E, Gonzalez E, Laemmli UK. (1993) SAR-dependent mobilization of histone H1 by HMG-I/Y in vitro: HMG-I/Y is enriched in H1-depleted chromatin. *EMBO J* 12(8):3237-3247.
- Zhong Z, Wen Z, Darnell JE. (1994) Stat3: a STAT family member activated by tyrosine phosphorylation in response to epidermal growth factor and interleukin-6. *Science* 264:95-98.
- Zhou H, Tran PO, Yang S, Zhang T, LeRoy E, Oseid E, Robertson RP. (2004) Regulation of alpha-cell function by the beta-cell during hypoglycemia in Wistar rats: the "switch-off" hypothesis. *Diabetes* 53(6):1482-1487.
- Zhu N, Gu L, Findley HW, Zhou M. (2005) Transcriptional repression of the eukaryotic initiation factor 4E gene by wild type p53. *Biochem Biophys Res Commun* 335:1272-1279.
- Zhu S, Yoon K, Sterneck E, Johnson PF, Smart RC. (2002) CCAAT/enhancer binding protein- β is a mediator of keratinocyte survival and skin tumorigenesis involving oncogenic ras signalling. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:207-212.
- Zou YR, Kottmann AH, Kuroda M, Taniuchi I, Littman DR. (1998) Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development. *Nature* 393: 595-599.

BIOGRAFIJA

Jelena Marković rođena je 11. 04. 1984. godine u Novom Sadu. Prirodno-matematički fakultet, Univerziteta u Novom Sadu, smer Diplomirani biolog-molekularni biolog, završila je 2007. godine sa prosečnom ocenom 9,66. Diplomski rad pod naslovom: „Alelna varijabilnost *Glu-1* lokusa pšenice (*Triticum aestivum* L.)“ uradila je u laboratoriji za genetiku Departmana za biologiju i ekologiju, Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Novom Sadu i odbranila ga 24. 09. 2007. godine sa ocenom 10. Master studije na Prirodno-matematičkom fakultetu, Univerziteta u Novom Sadu, smer Diplomirani molekularni biolog-master, završila je 2008. godine sa prosečnom ocenom 9,75. Eksperimentalni deo master rada pod naslovom „Varijabilnost mikrosatelita populacije zeca (*Lepus europaeus*) Srbije“ uradila je u laboratoriji za molekularnu genetiku Naučnog Instituta za ekologiju divljih životinja, Veterinarsko – medicinskog Univerziteta u Beču i odbranila ga 30. 09. 2008. Iste godine započela je doktorske studije na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu na smeru Molekularna biologija eukariota. Zvanje Istaživač saradnik stiče 2012. godine. Eksperimentalni deo doktorske teze uradila je u Laboratoriji za molekularnu biologiju, Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ pod rukovodstvom dr Melite Vidaković, a u okviru projekta „Signalni molekuli u dijabetesu: identifikacija potencijalnih bioloških markera uključenih u modifikaciju i integraciju signalnih puteva u cilju predikcije i intervencije u dijabetesu“ (br. 173020) finansiranog od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.

Jelena Marković je do danas objavila 9 radova u časopisima međunarodnog značaja, ima 12 saopštenja na međunarodnim naučnim skupovima i 1 na domaćem naučnom skupu.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а _____ Јелена Марковић _____

број уписа _____ М3001/2008 _____

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Молекуларни механизми регулације експресије гена за CXCL12 у бета ћелијама панкреаса пацова

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

Потпис докторанда

У Београду, _____

J. Marković

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

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

Молекуларни механизми регулације експресије гена за CXCL12 у бета ћелијама панкреаса пацова

која је моје ауторско дело.

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

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

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

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

Потпис докторанда

У Београду, _____

J. Marković

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

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

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

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

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

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