

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ  
ХЕМИЈСКИ ФАКУЛТЕТ

Милош Б. Шундерић

Молекулски облици везујућег протеина 2  
за факторе раста сличне инсулину и  
њихова заступљеност у различитим  
патофизиолошким стањима

Докторска дисертација

Београд, 2016.

UNIVERSITY OF BELGRADE  
FACULTY OF CHEMISTRY

Miloš B. Šunderić

Molecular forms of IGF binding protein 2 and  
their presence in various pathophysiological  
states

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2016.

**Ментор:** др Марија Гавровић-Јанкуловић, редовни професор

Хемијски факултет, Универзитет у Београду

**Ментор:** др Олгица Недић, научни саветник

Институт за примену нуклеарне енергије (ИНЕП), Универзитет у Београду

**Чланови комисије:**

др Марија Гавровић-Јанкуловић, редовни професор

Хемијски факултет, Универзитет у Београду

др Олгица Недић, научни саветник

Институт за примену нуклеарне енергије (ИНЕП), Универзитет у Београду

др Милан Николић, доцент

Хемијски факултет, Универзитет у Београду

др Весна Маленковић, научни сарадник

Клиничко-болнички центар “Бежанијска Коса”

Институт за онкологију и радиологију Србије, Универзитет у Београду

**Датум одбране докторске тезе :** \_\_\_\_\_

## Молекулски облици везујућег протеина 2 за факторе раста сличне инсулину и њихова заступљеност у различитим патофизиолошким стањима

### Извод

Везујући протеин 2 за факторе раста сличне инсулину (IGFBP-2) у циркулацији се може јавити у три облика: као комплекс, мономер и фрагмент различитих молекулских маса. У оквиру ове докторске дисертације је утврђено да IGFBP-2 гради комплексе са  $\alpha$ -2-макроглобулином ( $\alpha$ 2M).

Релативни удео комплекса IGFBP-2/ $\alpha$ 2M у укупном IGFBP-2 не зависи директно од концентрације IGFBP-2 и  $\alpha$ 2M, већ зависи од различитих (пато)физиолошких услова у којима се организам налази. У овом раду су испитане различите методе за изоловање, мерење и карактеризацију комплекса IGFBP-2/ $\alpha$ 2M. Такође је испитана промена и могућа улога комплекса код пацијената са тумором.

Познато је да мономер IGFBP-2 везује IGF лиганде са великим афинитетом и транспортује их до ткива где се, након протеолизе IGFBP-2, отпуштају и везују за специфичне ћелијске рецепторе. Осим као носач IGF пептида, IGFBP-2 испољава и независна метаболичка и митогена дејства. Везујући се за интегринске рецепторе (првенствено за  $\alpha$ 5 $\beta$ 1), IGFBP-2 стимулише покретљивост ћелије и њено одвајање од околине, доприносећи метастатском потенцијалу. Неки фрагменти могу слабо везати IGF лиганде и интераговати са ћелијама. О комплексима IGFBP-2 у циркулацији до сада није било података у литератури.

У раду је показано да се врста молекулских облика IGFBP-2 не мења под утицајем различитих (пато)физиолошких фактора, као што су старење, активно бављење спортом, оксидативни стрес, повећана концентрација липида или глукозе, измењена протеолитичка активност, али се мења њихова количина и међусобни однос. Старењем се повећава концентрација мономера и фрагмената IGFBP-2 у циркулацији, као и  $\alpha$ 2M, а смањује се концентрација комплекса IGFBP-2/ $\alpha$ 2M. Јони цинка (II) подстичу олигомеризацију  $\alpha$ 2M, али не утичу на стварање комплекса. Пептидна секвенца RGD, која је важна за интеракцију IGFBP-2 са интегрином, није контактна секвенца за интеракцију IGFBP-2 са  $\alpha$ 2M.

Код пацијената са тумором дебелог црева је измерена повећана концентрација укупног IGFBP-2 у циркулацији у односу на здраве људе, као и измењен међусобни однос молекулских форми. Повећана је концентрација мономера и фрагмената, а смањена комплекса. У ткиву дебелог црева су нађени само мономер и фрагменти.

Упоредивањем спарених узорака исте особе (нетуморског и туморског ткива), констатовано је да има случајева са сличном концентрацијом IGFBP-2 у оба узорка, са већом концентрацијом у туморском узорку или обрнуто. Може се претпоставити да стадијум тумора и/или врста и број ћелија које укључује утичу на експресију. Мономер IGFBP-2 код пацијената је додатно оксидован (карбонилован). Присуство матриксне металопротеазе-7 (MMP-7), за коју се зна да протеолизује IGFBP-2, али и разлаже ванћелијски матрикс у напредовању тумора, је слично у циркулацији здравих људи и пацијената, односно у нетуморском и туморском ткиву црева, што упућује на закључак да додатну протеолизу IGFBP-2 код пацијената изазива неки други ензим или је активност MMP-7 повећана. Присуство интегрина у чијем је саставу  $\alpha 5$  подјединица, је слично на ћелијама нетуморског и туморског ткива црева, односно није повећана експресија рецептора за IGFBP-2 код тумора. Реактивност IGFBP-2 према  $^{125}\text{I}$ -IGF-I је око десет пута већа код пацијената него код здравих људи, а концентрација IGFBP-2 је већа два пута. Ова разлика се може објаснити структурном променом IGFBP-2 која условљава промену афинитета.

Молекул  $\alpha 2\text{M}$  у циркулацији пацијената са тумором дебелог црева је више гликозилован, садржи више  $\alpha 2,6$  Sia, GlcNAc и Man остатака, и поседује више мулти-антенарних комплексних типова N-гликана у односу на протеин здравих људи.

Анализом узорака пацијената са осам различитих врста тумора, констатован је најчешћи образац молекулске промене IGFBP-2 у циркулацији у односу на здраве људе: концентрација укупног и мономерног IGFBP-2 се повећава, а концентрација IGFBP-2/ $\alpha 2\text{M}$  комплекса се најчешће смањује. У овом моменту се не може рећи да ли је промена структуре (оксидација IGFBP-2 и измењено гликозиловање  $\alpha 2\text{M}$ ) примарни догађај код пацијената са тумором, а смањено комплексирање последица, или је повећана потреба за мономерним IGFBP-2 (у циљу транспорта IGF пептида и/или интеракције са ћелијама) примарни патофизиолошки захтев, који се испуњава смањењем стварања комплекса, тако што се партнери структурно мењају.

Грађење комплекса IGFBP-2 са  $\alpha 2\text{M}$ , који контролише степен слободе IGFBP-2, упућује на постојање новог нивоа његове регулације. Према досадашњим сазнањима, регулација IGFBP-2 је обезбеђивана брзином синтезе (у јетри и локално) и разградње, док је комплекс IGFBP-2/ $\alpha 2\text{M}$  већ присутан у циркулацији. Повећана потреба за IGFBP-2 (макар она била штетна по организам) се може брзо задовољити отпуштањем из комплекса, променом међусобне реактивности IGFBP-2 и  $\alpha 2\text{M}$ .

**Кључне речи:** IGFBR-2, молекулски облици,  $\alpha$ 2M, оксидација, гликозиловање, старење, тумор

**Научна област:** Биохемија

**Ужа научна област:** Биохемија протеина

**УДК број:** 577.112

## **Molecular forms of IGF binding protein 2 and their presence in various pathophysiological states**

### **ABSTRACT**

In circulation, insulin-like growth factor binding protein 2 (IGFBP-2), can be found in three main forms: as a complex, monomer and assembly of fragments of different molecular masses. In making this dissertation it was found that IGFBP-2 forms complexes with  $\alpha$ -2-macroglobulin ( $\alpha$ 2M).

Relative amount of IGFBP-2/ $\alpha$ 2M complex in total IGFBP-2 concentration does not depend on concentrations of IGFBP-2 and  $\alpha$ 2M, but from various (patho)physiological conditions in organism. In this work, different methods for isolation, measurement and characterisation of IGFBP-2/ $\alpha$ 2M complex were examined. An investigation on potential role of these complexes in patients with tumor was also conducted.

It is known that IGFBP-2 monomer binds IGF ligands with high affinity and transports them to tissues where, after proteolysis, they are released, and bound to specific receptors. Except being the IGF carrier, IGFBP-2 exerts IGF-independent metabolic and mitogenic actions. It can bind to integrin receptors (primarily to  $\alpha$ 5 $\beta$ 1) and stimulate cell motility and detachment from their surroundings, contributing to metastatic potential. Some fragments can loosely bind IGF ligands and interact with cells. Until now, there was no literature data about IGFBP-2 complexes in circulation.

In this work, it was shown that the distribution of molecular species of IGFBP-2 does not change under the influence of different (patho)physiological factors, such as aging, intensive physical activity, oxidative stress, increased concentration of lipids and glucose, impaired proteolytic activity, but by the quantity and their mutual ratio change. With aging, the concentration of IGFBP-2 monomers and fragments, and  $\alpha$ 2M, in circulation increases, while the concentration of IGFBP-2/ $\alpha$ 2M complex decreases. Zinc ions encourage the  $\alpha$ 2M oligomerisation, but have no influence on complex formation. RGD peptide sequence, which is important for IGFBP-2 interaction with integrins, is not a contact sequence for interaction between IGFBP-2 and  $\alpha$ 2M.

In serum of patients with colon cancer, increased concentration of IGFBP-2 was detected, as well as different relation of molecular forms. The concentration of monomer and fragments increased, while the concentration of complexes decreased. In colon tissue,

only fragments and monomers were found. By comparing matched samples from same person (tumor and non-tumor tissue), it was concluded that there were cases with similar concentration of IGFBP-2 in both samples, with higher concentration in tumor sample and vice versa. It can be assumed that the tumor stadium and/or kind and number of cells it includes, influence the expression of IGFBP-2. In serum of patients with colorectal cancer, the IGFBP-2 monomer is additionally oxidized (carbonylated). The presence of matrix metalloprotease-7 (MMP-7), for which is known to proteolyse IGFBP-2, but also to degrade extracellular matrix during tumor progression, is similar in serum of healthy controls and patients, and in non-tumor and tumor colon tissue, which suggests that additional proteolysis of IGFBP-2 in patients' serum is caused by some other enzyme or increased activity of MMP-7. The presence of integrins, part of which may be  $\alpha 5$  subunit, is similar on the surface of cells in tumor and non-tumor colon tissue, that is, the expression of integrin receptor is not increased in tumor. The reactivity of IGFBP-2 toward  $^{125}\text{I}$ -IGF-I is about ten times higher with patients than controls, and the concentration of IGFBP-2 is two times higher. This difference could be explained by structural change of IGFBP-2 which causes the change of affinity.

The  $\alpha 2\text{M}$  molecules in circulation of patients with colorectal cancer are more glycosylated, contain more  $\alpha 2,6$  Sia, GlcNAc and Man residues, and possess more multi-antennary complex type N-glycans relative to controls.

Serum analysis of patients with eight different types of tumor, showed the most frequent patterns of IGFBP-2 molecular change in circulation, relative to controls: concentration of total and monomer IGFBP-2 increases, and concentration of IGFBP-2/ $\alpha 2\text{M}$  complex decreases. In this moment it can not be said if the change in structure (IGFBP-2 oxidation and impaired  $\alpha 2\text{M}$  glycosylation) is the primary event with tumor patients, and decreased complex formation the consequence, or the increased need for IGFBP-2 monomers (in order to transport IGF peptides and/or interact with cells) primary pathophysiological demand, which is met by complex formation decrease, due to structural change of interacting partners.

The formation of IGFBP-2/ $\alpha 2\text{M}$  complex, which controls the level of free IGFBP-2, suggests the existence of new level of its regulation. According to current knowledge, the regulation of IGFBP-2 was provided through synthesis (in liver and locally) and degradation rate, while the IGFBP-2/ $\alpha 2\text{M}$  complex formation is already present in circulation. The increased need for IGFBP-2 (although it could be harmful for organism), can be readily satisfied by realising it from complex, through change in reactivity between IGFBP-2 and  $\alpha 2\text{M}$ .



**Keywords:** IGFBP-2, molecular forms,  $\alpha$ 2M, oxidation, glycosylation, aging, tumor

**Scientific field:** Biochemistry

**Special scientific field:** Biochemistry of proteins

**UDK number:** 577.112

## СКРАЋЕНИЦЕ

AAL- лектин из *Aleuria aurantia*

ALS- подјединица нестабилна у киселој средини

AOL- лектин из *Aspergillus oryzae*

BCA- бицинхонинска киселина

ConA- конканавалин А

DNP- динитрофенилхидразин

EDTA- динатријум-етилендиамин-тетрасирћетна киселина

ELISA- имуносорбентни есеј повезан са ензимом

Gal- галактоза

GH- хормон раста

GlcNAc- N-ацетилглукозамин

GLUT-4- транспортер глукозе типа 4

GNL- лектин из *Galanthus nivalis*

GnT- N-ацетилглукозаминилтрансфераза

GSL-II- лектин из *Griffonia simplicifolia* II

HBD- домен који се везује за хепарин

HBS- физиолошки раствор пуферован са HEPES

HDL- липопротеин високе густине

HEPES- 4-(2-хидроксиетил)-1-пиперазин-етансулфонска киселина

HHL- лектин из *Hipperastrum hybrid*

HIF-1 $\alpha$ - фактор- 1 $\alpha$  индулован хипоксијом

IAC- имуноафинитетна хроматографија

IGF- фактори раста слични инсулину  
IGF-1R- IGF рецептор типа 1  
IGF-2R- IGF рецептор типа 2  
IGFBP- везујући протеини за факторе раста сличне инсулину  
IP- имунопреципитација  
IR- инсулински рецептор  
IRS- супстрат инсулинског рецептора  
K<sub>d</sub>- константа дисоцијације  
LAC- лектинска афинитетна хроматографија  
LCA- лектин из *Lens culinaris*  
LDL- липопротеин ниске густине  
MAL-II- лектин из *Maackia amurensis* II  
Man- маноза  
MMP- матриксна металопротеаза  
PBS- физиолошки раствор пуферован са фосфатом  
PHA-E- лектин из *Phaseolus vulgaris*-E  
PHA-L- лектин из *Phaseolus vulgaris*-L  
PI-3K- фосфатидил-инозитол-3-киназа  
PNA- лектин из кикирикија  
PSA- антиген специфичан за простату  
PTEN- хомолог фосфатазе и тензина  
RCA-I- лектин из *Ricinus communis*  
RGD- аргинил-глицил-аспартат  
RGE- аргинил-глицил-глутамат

SDS- натријум- додецил-сулфат

Shc- протеин који садржи домен 2 хомологан Src

Sia- сијалинска киселина

SNA- лектин из зове

TBS- физиолошки раствор пуферован са Tris

TBST- физиолошки раствор пуферован са Tris коме је додат Tween детергент

TCA- трихлорсирћетна киселина

TEMED- тетраметилен-диамин

Tris- трис(хидроксиметил)-аминометан

VLDL- липопротеин веома ниске густине

WGA- аглутинин из пшенице

$\alpha$ 2M- алфа-2-макроглобулин

ПЗУ- пуфер за узорке

в- везано

ж- жена

з- здрав

м- мушкарац

н- невезано

т- тумор

Тф- трансферин

## САДРЖАЈ

1. Увод.....	1
2. Преглед литературе.....	4
2.1 Систем фактора раста сличних инсулину .....	4
2.2 Структурне карактеристике елемената IGF система.....	5
2.2.1 Фактори раста слични инсулину (IGF-I и IGF-II) .....	5
2.2.2 IGF рецептори (IGF-1R и IGF-2R) .....	6
2.2.3 Везујући протеини за факторе раста сличне инсулину (IGFBP) .....	8
2.2.4 IGFBP протеазе.....	10
2.3 Регулација синтезе и биолошка активност елемената IGF система .....	11
2.3.1 Фактори раста слични инсулину (IGF-I и IGF-II) .....	11
2.3.2 IGF рецептори (IGF-1R и IGF-2R) .....	17
2.3.3 Везујући протеини за IGF пептиде (IGFBP) .....	18
2.4 Молекулска карактеризација IGFBP-2 и његова улога у физиолошким и патолошким променама у организму.....	22
2.4.1 Структурне карактеристике IGFBP-2.....	22
2.4.2 Регулација синтезе IGFBP-2.....	24
2.4.3. Фрагменти и комплекси IGFBP-2 у циркулацији .....	25
2.4.3.1 Фрагменти IGFBP-2.....	25
2.4.3.2 Комплекси IGFBP-2.....	26
2.4.4 Улога IGFBP-2 у физиолошким процесима.....	28
2.4.4.1 IGFBP-2 и старење.....	28
2.4.4.2 IGFBP-2 и метаболизам угљених хидрата и липида .....	30

2.4.4.3 IGFBR-2 и физичка активност .....	32
2.4.4.4 IGFBR-2 и оксидативни стрес.....	32
2.4.4.5 IGFBR-2 и катаболичка стања .....	33
2.4.4.6 IGFBR-2 и тумор .....	33
2.4.4.6.1 IGFBR-2 и терапија тумора .....	38
2.4.4.6.2 IGFBR-2 и тумор дебелог црева.....	39
2.4.4.6.3 Промена образаца гликозиловања код неопластично трансформисаних ћелија .....	40
<b>3. Материјал и методе .....</b>	<b>42</b>
3.1 Основне хемикалије.....	42
3.2 Пуфери и раствори.....	45
3.3 Смоле.....	47
3.4 Антитела .....	47
3.5 Уређаји и апарати .....	47
3.6 Узорци серума и ткива .....	48
3.7 Одређивање концентрације протеина.....	49
3.8 Одређивање концентрације IGFBR-2 .....	50
3.9 Одређивање специфичности антитела.....	50
3.10 Молекулска филтрација .....	50
3.11 Имуноафинитетна хроматографија (IAC) .....	51
3.12 Лектинска афинитетна хроматографија (LAC).....	51
3.13 Имунопреципитација (IP).....	52
3.14 Дериватизација протеина са DNP.....	52
3.15 Изоловање ћелијских мембрана из ткива дебелог црева .....	53

3.16	Електрофореза (SDS-PAGE) и имуноблот .....	54
3.17	Лектински блот .....	55
3.18	Лиганд блот .....	55
3.19	Лектински микроереј .....	55
3.20	Дензитометријска анализа .....	56
3.21	Статистичка обрада података .....	56
<b>4.</b>	<b>Резултати и дискусија.....</b>	<b>57</b>
4.1	Молекулски облици IGFBP-2 у циркулацији одраслих људи .....	58
4.1.1	Одређивање укупне концентрације IGFBP-2 у здравој популацији методом ELISA.....	58
4.1.2	Одређивање молекулских облика IGFBP-2 имуноблотом .....	59
4.1.3	Утицај различитих (пато)физиолошких фактора на расподелу молекулских облика IGFBP-2 .....	61
4.1.3.1	Испитивање утицаја пола .....	61
4.1.3.2	Испитивање утицаја старости .....	62
4.1.3.3	Испитивање утицаја активног бављења спортом.....	65
4.1.3.4	Испитивање утицаја липидног статуса.....	67
4.1.3.5	Испитивање утицаја концентрације глукозе.....	68
4.1.3.6	Утицај протеаза.....	69
4.1.4	Испитивање постојања фосфорилованог облика IGFBP-2 .....	71
4.2	Изоловање и раздвајање молекулских облика IGFBP-2 .....	73
4.2.1	Молекулска филтрација.....	73
4.2.2	Имуноафинитетна хроматографија .....	74
4.2.3	Имунопреципитација .....	75
4.2.4	Лектинска хроматографија .....	76

4.3 Карактеризација IGFBP-2/ $\alpha$ 2M комплекса.....	78
4.3.1 Детекција IGFBP-2/ $\alpha$ 2M комплекса .....	78
4.3.2 Молекулски облици IGFBP-2/ $\alpha$ 2M комплекса.....	80
4.3.3 Утицај различитих чинилаца на формирање IGFBP-2/ $\alpha$ 2M комплекса.....	82
4.3.3.1 Утицај концентрације IGFBP-2 и $\alpha$ 2M .....	82
4.3.3.2 Утицај супрафизиолошке концентрације цинка.....	84
4.3.3.3 Утицај супрафизиолошке концентрације RGD(E)S .....	85
4.3.3.4 Утицај старења.....	86
4.4 Молекулски облици IGFBP-2 код пацијената са тумором дебелог црева.....	88
4.4.1 Одређивање укупне концентрације IGFBP-2 у циркулацији пацијената са тумором дебелог црева методом ELISA .....	88
4.4.2 Одређивање молекулских облика IGFBP-2 у циркулацији и у ткиву дебелог црева пацијената са колоректалним карциномом имуноблотом .....	89
4.4.3. Испитивање присуства IGFBP-2 протеазе MMP-7 у циркулацији и ткиву дебелог црева пацијената са колоректалним карциномом имуноблотом.....	92
4.4.4 Испитивање оксидативног статуса IGFBP-2 у циркулацији и ткиву дебелог црева пацијената са колоректалним карциномом .....	94
4.4.5 Испитивање реактивности IGFBP-2 у циркулацији пацијената са колоректалним карциномом.....	97
4.4.6 Испитивање експресије $\alpha$ 5 подјединице интегринa у ткиву дебелог црева пацијената са колоректалним карциномом.....	99
4.4.7 Испитивање обрасца гликозиловања $\alpha$ 2M у циркулацији пацијената са колоректалним карциномом.....	101
4.5 Молекулски облици IGFBP-2 код пацијената са различитим врстама тумора.	108
5. <b>Закључци</b> .....	111
6. <b>Литература</b> .....	114



## 1. Увод

Систем фактора раста сличних инсулину, IGF (insulin-like growth factor), састоји се од два пептида, IGF-I и IGF-II, шест везујућих протеина (IGFBP-1 до IGFBP-6) и њихових протеаза, два основна типа рецептора (IGF-1R и IGF-2R), а у ширем смислу се делом система сматрају инсулински рецептор (IR) и хибридни рецептор (IR/IGF-1R). IGF пептиди су митогени који стимулишу деобу, раст и диференцијацију ћелија, а поседују и анти-апоптотско дејство. Своју биолошку функцију остварују везивањем за IGF-1R и IR/IGF-1R, док се у супрафизиолошким концентрацијама могу везати за IR, када испољавају метаболичку улогу као инсулин (унутарћелијски транспорт глукозе, посебно у скелетним мишићима). Концентрација IGF у циркулацији и ткивима је строго контролисана везујућим протеинима, чији је афинитет за ове пептиде већи од афинитета рецептора. Да би се IGF-I и IGF-II ослободили из комплекса са IGFBP, делују протеазе које делимично разграђују IGFBP, смањујући њихов афинитет за IGF молекуле.

IGFBP-2 је други по заступљености везујући протеин у циркулацији, после IGFBP-3, са просечном концентрацијом 2,7-27,8 nM. У циркулацији се може наћи у три главна облика, као мономер, комплекс са другим протеин(ом)има и као скуп фрагмента различитих молекулских маса. Контрола његове синтезе је комплексна и на њу утиче велики број фактора. IGFBP-2 нема значајније дневне флукуације у концентрацији. Концентрација је повећана као последица дугорочне калоријске и/или протеинске рестрикције, а краткорочно повећање се среће код особа које се баве интензивном физичком активношћу. IGFBP-2 може интераговати са алфа-2-макроглобулином ( $\alpha 2M$ ) у циркулацији, што је утврђено кроз експерименте изведене у оквиру ове дисертације. Физиолошка функција те интеракције још није утврђена.

IGFBP-2, поред IGFBP-1, представља најзаступљенији везујући протеин током феталног развића. Његова концентрација у неонаталном периоду опада и IGFBP-3 постаје доминантан. Концентрација IGFBP-2 наставља да опада током пубертета, са старењем постепено расте, да би после шездесете године раст постао изражен.

Испитивање улоге IGFBP-2 у старијем животном добу дало је контроверзне резултате. Са једне стране, повећана концентрација IGFBP-2 код старих штити од гојазности и дијабетеса типа 2, док са друге стране, доводи до слабења мишићно-скелетног система и појаве тумора. Ове, наизглед противречне активности, би се могле протумачити као ткивно специфична дејства IGFBP-2. Свакако да су потребна додатна истраживања и она су у току.

Пошто повећана концентрација IGFBP-2 у старијем добу штити од појаве дијабетеса типа 2, то значи да овај молекул има значајну улогу у метаболизму угљених хидрата. Показано је да се везивањем IGFBP-2 за елементе ванћелијског матрикса, првенствено за  $\alpha 5\beta 1$  интергин, покреће сигнална каскада чији је крајњи циљ инхибиција негативног регулатора сигнализације посредством инсулина. Такође је утврђено да IGFBP-2 штити од гојазности тако што инхибира стварање масних ћелија, везујући за себе IGF пептиде, који су стимулатори њихове диференцијације. Даље је показано да постоји веза између производње VLDL (*very low density lipoproteins*- липопротеини веома ниске густине) молекула и IGFBP-2, односно повећана концентрација VLDL у крви је праћена смањеном концентрацијом IGFBP-2.

У катаболичким стањима, која су последица процеса који преусмеравају метаболизам са синтетских ка процесима разградње, концентрација IGFBP-2 у циркулацији се повећава. У тим случајевима укупна концентрација IGF пептида превазилази способност IGFBP-3 да их веже за себе (концентрација IGFBP-3 се смањује). Пошто бинарни комплекси (IGF/IGFBP-2), за разлику од терцијарних (IGF/IGFBP-3/ALS), могу напустити крвне судове, пораст концентрације IGFBP-2 је последица стања у коме је потребна већа количина IGF у ткивима, у циљу одржања основних метаболичких процеса и испољавања анти-апоптотског дејства.

Повећана концентрација IGFBP-2 у крви је измерена код пацијената са готово свим врстама тумора. Прогресиван раст IGFBP-2 прати раст самог тумора, што IGFBP-2 чини кандидатом за туморски маркер. Иако не игра улогу у раним фазама туморогенезе, IGFBP-2 стимулише инвазивност туморских ћелија, утиче на дисеминацију тумора и појаву метастазе.

Циљ ове дисертације је била анализа молекулских облика IGFBP-2 у циркулацији и ткиву црева (фрагменти, мономер и комплекси са  $\alpha 2M$ ) код здравих људи и пацијената са тумором. Одређиван је однос одређених форми IGFBP-2 и испитиван утицај пола, старења, физичке активности, оксидативног стреса, поремећаја у метаболизму угљених хидрата и липида, као и присуства тумора. Прва истраживања су урађена на модел систему тумора дебелог црева. Као узорци су коришћени серуми и исечци ткива дебелог црева добијени после хируршког захвата. Запажене промене су даље испитиване (у циљу потврде или негације) у узорцима добијених од пацијената са дијагностификованих седам других врста тумора.

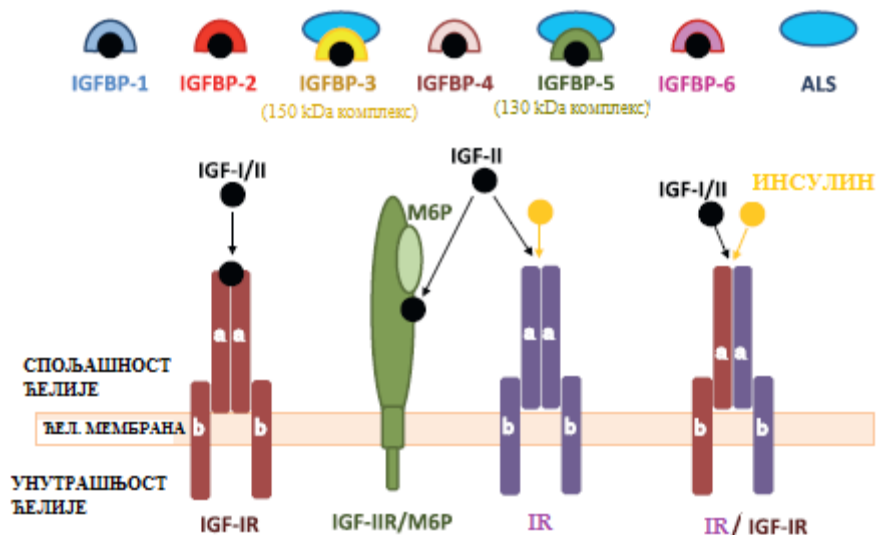
Резултати дисертације су подељени у неколико области, у складу са појединачним задацима: а) оптимизација поступка детекције свих молекулских облика IGFBP-2 (тестирање различитих анти-IGFBP-2 антитела), б) испитивање утицаја патофизиолошких параметара на расподелу молекулских облика IGFBP-2 у циркулацији (пол, старост, физичка активност и њен интензитет, оксидативни стрес, повећана концентрација липида, повећана концентрација глукозе), в) испитивање постојања фосфорилваног и оксидованог облика IGFBP-2, г) оптимизација поступка изоловања и раздвајања различитих молекулских облика IGFBP-2 (хроматографским и афинитетним методама), д) откриће и карактеризација комплекса IGFBP-2/ $\alpha 2M$  у серуму, као и испитивање утицаја патофизиолошких параметара на формирање комплекса (концентрација IGFBP-2,  $\alpha 2M$ , јона цинка, RGD(E) пептида, старење, физичка активност), ђ) испитивање молекулских облика IGFBP-2 у серуму и дебелом цреву пацијената са тумором дебелог црева, е) испитивање промене обрасца гликозиловања  $\alpha 2M$  у серуму пацијената са тумором дебелог црева и ж) анализа заступљености мономера IGFBP-2 и комплекса IGFBP-2/ $\alpha 2M$  код пацијената оболелих од различитих врста тумора, у циљу разумевања могуће улоге комплекса и њихове повезаности са старењем, појавом тумора и регулацијом концентрације слободне форме (мономера) IGFBP-2 у самој циркулацији, а не на нивоу синтезе.

## 2. Преглед литературе

### 2.1 Систем фактора раста сличних инсулину

Систем фактора раста сличних инсулину, IGF (insulin like growth factor) чине молекули који имају кључну улогу у биолошким процесима важним за преживљавање организма, као што су раст ћелија, њихово умножавање, диференцијација, миграција, програмирана смрт и метаболизам. Састоји се од два IGF пептида (IGF-I и IGF-II), шест IGF везујућих протеина (IGFBP-1 до IGFBP-6) и два рецептора (IGF-1R и IGF-2R). Иако директно не припадају IGF систему, инсулински рецептор (IR) и хибридни рецептор (IR/IGF-1R), због своје структурно-функционалне хомологије са IGF-1R, се обично сагледавају као део заједничког система (*Le Roith, 2003*).

На [слици 1](#) су шематски приказане компоненте које сачињавају IGF систем.



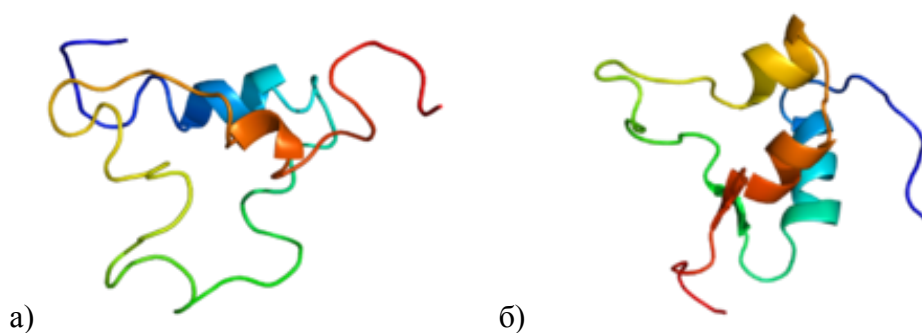
**Слика 1.** Шематски приказ компоненти IGF система (*Russo et al., 2014*)

## 2.2 Структурне карактеристике елемената IGF система

### 2.2.1 Фактори раста слични инсулину (IGF-I и IGF-II)

Молекул IGF-I човека је једноланчани базни пептид, масе око 7,5 kDa, који је изграђен од 70 аминокиселина и састоји се из 4 домена (Б, Ц, А и Д). Структура му је слична структури проинсулина који такође садржи Б, Ц и А домен (Д домен је карактеристичан за IGF пептиде). IGF-II је једноланчани пептид од 67 аминокиселина, масе и просторне организације сличне IGF-I (*Humbel, 1990*). У структури IGF пептида доминирају три  $\alpha$  хеликса, који се налазе у домену А (слика 2). Просторни распоред пептидног ланца је условљен постојањем три дисулфидне везе (*Denley et al., 2005*).

Домени Б и А поседују 50 % структурне хомологије са истим доменима на инсулину (*Rinderknecht & Humbel, 1978*). Главне структурне разлике између IGF пептида и инсулина су у постојању домена Ц, кога садржи и проинсулин, и додатног домена Д. Друга велика разлика испољава се у постојању аминокиселинских остатака у IGF молекулима (а нема их у инсулину) који омогућавају везивање за транспортне молекуле, IGFBP (*Annunziata et al., 2011*).



Слика 2. Просторни распоред молекула IGF-I (а) и IGF-II (б) (*Denley et al., 2005*)

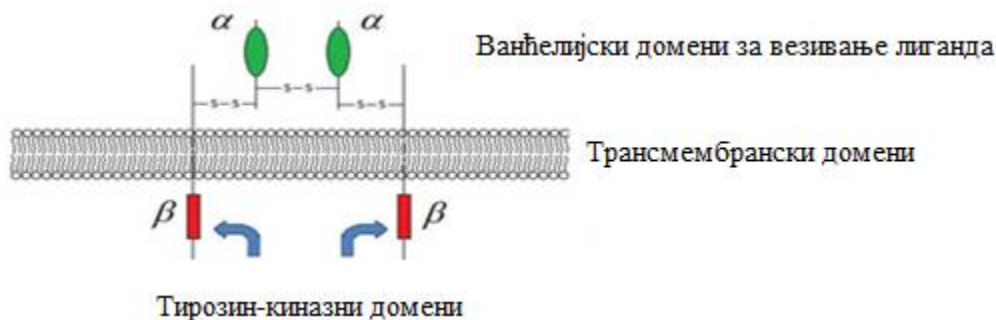
### 2.2.2 IGF рецептори (IGF-1R и IGF-2R)

Биолошко деловање IGF пептида се остварује након везивања за рецепторе на површини ћелија. Они се могу везати за четири типа рецептора: IGF-1R, IGF-2R, IR и IR/IGF-1R. Иако постоји одређени степен укрштене реактивности између различитих лиганда и њихових рецептора, литературни подаци указују да се већина ефеката IGF-I и IGF-II на раст и диференцијацију ћелија испољава преко IGF-1R. IGF-2R, који уједно везује и протеине који поседују маноза-6-фосфатне (М6Р) остатке, је углавном укључен у рециклирање лизозомских ензима који садрже М6Р и његова улога у преносу сигнала након везивања IGF-II до сада је потврђена у само неколико случаја (*Kronenberg: Williams Textbook of Endocrinology, 11th ed., 2008*).

Како постоји структурна сличност између IGF пептида и инсулина, тако постоји и између IGF-1R и IR (*Nakae et al., 2001*). Инсулин се може везати за IGF-1R, али са мањим афинитетом него IGF пептиди. Највећи афинитет за IGF-1R има IGF-I ( $K_d = 0,2 \text{ nM}$ ), док се IGF-II везује са три пута мањим ( $K_d = 0,6 \text{ nM}$ ) и инсулин са 500 пута мањим афинитетом ( $K_d >100 \text{ nM}$ ) (*Denley et al., 2004*). IGF-1R се, слично IR, експримира у скоро свим ћелијама у организму (*Le Roith et al., 2001*).

IGF-1R и IR су трансмембрански рецептори тирозин-киназног типа, који функционишу као тетрамери, састављени од два типа подјединица,  $\alpha$  и  $\beta$ , међусобно ковалентно повезаних (*Adams et al., 2000*). IGF-1R полурецептор се синтетише као један полипептидни ланац, а потом се пост-транслационо модификује исечањем, дајући ванћелијску  $\alpha$  подјединицу (око 135 kDa) и трансмембранску  $\beta$  подјединицу (95 kDa). Подјединице су везане дисулфидним везама ( $\alpha\beta$  полурецептор). Два  $\alpha\beta$  полурецептора формирају „зрели“  $\alpha_2\beta_2$  холорецептор (слика 3), грађењем дисулфидних веза између  $\alpha$  подјединица (*Jacobs et al., 1983*).

Места за везивање лиганда се налазе на  $\alpha$  подјединицама (*Schaefer et al., 1990; Brandt et al., 2001*), док се тирозин-киназна активност испољава преко  $\beta$  подјединица (*Kasuga et al., 1982*). Везивање лиганда за ванћелијске домене доводи до конформационе промене која за последицу има фосфориловање остатака тирозина на  $\beta$  подјединицама, што активира киназну активност рецептора (*Rubin et al., 1983*).



Слика 3. Структура IGF-1R

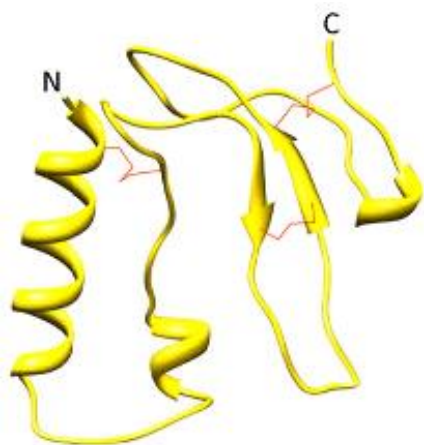
Због структурне хомологије, IR и IGF-1R могу формирати хибридни рецептор, кога чини по један  $\alpha\beta$  полурецептор оба типа (*Kasuga et al., 1983*). Они везују оба IGF пептида са великим афинитетом и понашају се слично као IGF-1R. Са друге стране, инсулин се везује са десет пута мањим афинитетом за овај рецептор него за IR (*Soos et al., 1993*). Физиолошка улога хибридних рецептора још увек није позната (*Belfiore et al., 2009*).

IGF-2R са високим афинитетом везује IGF-II ( $K_d = 0,2 \text{ nM}$ ), док се IGF-I везује са значајно мањим афинитетом ( $K_d = 0,4 \times 10^{-3} \text{ nM}$ ) (*Lee et al., 1986; Ewton et al., 1987; Tong et al., 1988*). IGF-2R је бифункционални рецептор, масе око 300 kDa. Ванћелијски регион IGF-2R се састоји од 15 хомологих домена, од којих сваки садржи око 150 аминокиселина (*Morgan et al., 1987*). Као што је речено, он за себе везује лизозомске ензиме и друге протеине који имају М6Р као маркер препознавања и IGF-II, али на различитим везујућим местима (*Devi et al., 1998; Tong et al., 1989; Westlund et al., 1991*). Скоро све ћелије сисара на својој површини експримирају овај рецептор. Његова главна улога је да усмери кретање протеина са М6Р ка лизозому и да уклони IGF-II из циркулације, интернализујући га и, такође, усмеравајући ка лизозому у циљу разградње (*Mac Donald et al., 1988; Kornfeld, 1987*).

### 2.2.3 Везујући протеини за факторе раста сличне инсулину (IGFBP)

Молекули IGF се у циркулацији налазе у комплексу са везујућим протеинима (IGFBP), који им продужавају полуживот, транспортују их до циљних ћелија и контролишу њихову интеракцију са рецепторима. Све наведене улоге IGFBP су у функцији регулације активности IGF пептида. IGFBP, међутим, испољавају и дејства независна од IGF лиганата. Под термином независна дејства се убрајају она која не доводе до активације неког од IGF рецептора, мада IGF може бити везан за IGFBP (Rechler, 1993; Jones & Clemmons, 1995).

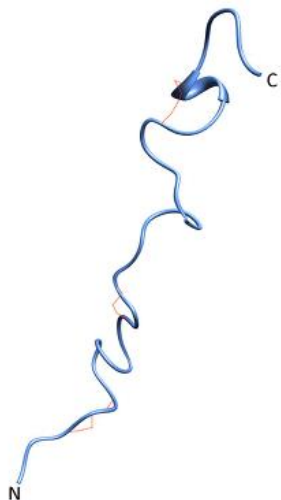
До данас је описано шест припадника IGFBP породице, који везују лиганде са великим афинитетом (Rechler, 1993). Осим ових шест, у литератури се спомиње и IGFBP-7 (Swisshelm et al., 1995), али је он структурно различит и не везује лиганде са великим афинитетом (Oh et al., 1996). Он се не сматра “правим” IGFBP и о њему неће бити више речи. Масе IGFBP молекула се крећу од 24 до 45 kDa, а протеини имају сличну структурну организацију од три домена, са јасно дефинисаним N (терминалним) и C (терминалним) доменом (слика 4), између којих је повезујући L (linker) домен, променљиве структуре (Forbes et al., 2012).



Слика 4. Доменска структура и образац увијања IGFBP-1 до IGFBP-5 (Forbes et al., 2012)



Аминокиселинска секвенца различитих IGFBP је слична. У оквиру исте врсте, IGFBP молекули испољавају 50 % хомологије. Највећа сличност у структури се види кроз скоро исти број и положај остатака цистеина на N и C крају ланца. Молекули IGFBP-1 до IGFBP-5 поседују шест очуваних дисулфидних веза у N домену, док IGFBP-6, поседује пет, због чега му је и образац увијања у том домену другачији (слика 5). Сви C домени поседују три очуване дисулфидне везе, што значи да молекули укупно садрже девет дисулфидних веза (осим IGFBP-6 који има осам и IGFBP-4 који има десет, услед додатне дисулфидне везе у L региону) (Neumann & Bach, 1999; Chelius et al., 2001). Грађење дисулфидних веза је суштински важно за формирање места за везивање IGF пептида; њиховом редукцијом се везујућа места губе. Са друге стране, средишњи регион је променљивог састава и одговоран је за испољавање специфичних улога IGFBP, као што је везивање за ћелијске структуре, интеракција са другим протеинима и деловање независно од IGF пептида (Bach et al., 2005).



Слика 5. Образац увијања IGFBP-6 молекула (Forbes et al., 2012)

Кристална структура слободних IGFBP, као и оних са везаним IGF пептидима, још увек није одређена. Иако је метода дводимензионалне NMR веома успешна за одређивање структуре малих протеина, њена примена код IGFBP молекула се није

показала подесном, због склоности IGFBP да агрегирају у условима NMR анализе (Galea et al., 2012), као и због превелике флексибилности L домена, што омета стварање стабилне кристалне структуре (Siwanowicz et al., 2005; Sitar et al., 2006). Међутим, познате су кристалне структуре терцијарних комплекса IGF-I са изолованим N и C доменима IGFBP-2, односно IGFBP-4, у раствору (Kuang et al., 2007).

Константе афинитета IGF пептида за IGFBP се налазе у наномолском опсегу. Изоловани N и C домени имају значајно мањи афинитет за IGF молекуле од целог IGFBP (N домен до сто пута, а C домен и до хиљаду пута) (Payet et al., 2003; Kuang et al., 2007). Показано је да домени кооперативно везују IGF, тј. присуство оба домена повећава шансу за везивање лиганда, односно афинитет (Kuang et al., 2007). IGFBP-1, IGFBP-3 и IGFBP-4 везују сличним афинитетом оба IGF пептида, док IGFBP-2, IGFBP-5 и IGFBP-6 имају већи афинитет за IGF-II (Firth & Baxter, 2002).

#### 2.2.4 IGFBP протеазе

Протеазе које делују на IGFBP молекуле су први пут откривене у серуму трудница као протеолитички агенси који разлажу IGFBP-3 (Binoux et al., 1994). До сада су описане три класе IGFBP протеаза, укључујући каликреине, катепсине и матриксне металопропротеазе. За IGFBP-2, IGFBP-3, IGFBP-4 и IGFBP-5 пронађене су специфичне протеазе, док за IGFBP-1 и IGFBP-6 нису (Rajah et al., 1995).

Протеолиза IGFBP игра кључну улогу у комплексној регулацији концентрације слободног, физиолошки активног IGF. Фрагменти IGFBP имају мањи афинитет за IGF молекуле, што доводи до отпуштања лиганда и њиховог везивања за ћелијске рецепторе, чији је афинитет већи него фрагмената (Collett-Solberg & Cohen, 1996). У последњих неколико година, показано је и да фрагменти IGFBP могу имати биолошку активност, независну од IGF (Lalou et al., 1996).

Прва идентификована IGFBP протеаза је била антиген специфичан за простату (PSA) који се налази у семиналној течности. Он је серин протеаза слична каликреину. Ова протеаза доводи до разлагања IGFBP-3 и IGFBP-5, али не и осталих везујућих

протеина (*Cohen et al., 1992*). Друге протеазе сличне каликреину укључују  $\gamma$ -нервни фактор раста, који има заједнички домен са PSA и показује јаку протеолитичку активност према IGFBP-4 и IGFBP-6 (*Rajah et al., 1995*). Синергистичко деловање овог фактора раста и IGF важно је за ћелијски раст, развој и обнову у мозданом и другим ткивима.

Катепсини су лизозомске протеазе, активне у киселој средини, на рН између 4 и 5,5. Учествују у многим физиолошким и патолошким процесима, укључујући и неопластичну инфилтрацију. Катепсини су протеазе свих IGFBP осим IGFBP-6 (*Conover & De Leon, 1994; Conover et al., 1995*).

Матриксне металопротеазе (ММР) су пептидне хидролазе које за своју активност захтевају присуство металног јона. Породица ММР укључује велики број ензима као што су интерстицијална колагеназа (ММР-1), желатиназа А (ММР-2), стромолизин 1 (ММР-3), желатиназа Б (ММР-7) и друге (*Rajah et al., 1995*). Откриће ових IGFBP протеаза је започето открићем IGFBP протеазне активности фибробласта зависне од  $Zn^{2+}$ , *in vitro* и у серуму трудних женки мишева (*Fowlkes et al., 1994*).

## **2.3 Регулација синтезе и биолошка активност елемената IGF система**

### **2.3.1 Фактори раста слични инсулину (IGF-I и IGF-II)**

Главнина синтезе IGF је у јетри, док скоро свака ћелија има могућност локалне синтезе ових пептида, који могу имати троструко дејство: ендокрино (као хормони), аутокрينو и паракрино (као локални ткивни фактори) (*D'Ercole et al., 1980*).

Експресија IGF-I у јетри је под контролом хормона раста (GH). Преко система негативне повратне спреге, повећана концентрација IGF-I доводи до супресије производње GH (*Bermann et al., 1994*). Полни хормони, посебно естрогени, чији се нагли пораст дешава у пубертету, директно утичу на IGF-I и GH синтезу (*Mauras et*

*al., 1996*). Цитокини и катаболички процеси (сепса, повреде, старење) смањују производњу IGF-I (*Puche & Castilla-Cortasar, 2012*).

Укупна концентрација IGF молекула у циркулацији одраслих људи је у опсегу 20-80 nM (*Humbel, 1990*). Концентрација IGF-I у крви зависи од старости, односно постепено се повећава од рођења до пубертета, нагло расте током пубертета (*Cara et al., 1987*) и потом полако опада (*Rudman et al., 1990*). IGF-I је фундаментални хормон органогенезе и веома важан хормон за пост-натални раст и развој (*Annunziata et al., 2011*). По рођењу, концентрација IGF-II у крви износи 50 % концентрације одраслих, али до прве године достиже вредност која се практично не мења током живота и 3 до 4 пута је већа од концентрације IGF-I у сваком животном добу (*Livingstone & Borai, 2014*).

IGF пептиди су јаки митогени за многе типове ћелија и имају централну улогу у расту и развоју (*Stewart & Rotwein, 1996*). Осим системске улоге, IGF имају и локално дејство, у регенерацији ткива и зацељивању рана (*Werner & Grose, 2003*). Сви ови процеси захтевају стимулацију ћелијске деобе и морају бити строго контролисани, због чега постоји велики број регулаторних механизма који управљају њиховом биолошком активношћу.

Повећан унос протеина повећава концентрацију IGF-I у циркулацији, уз одређени минимални калоријски унос (*Isley et al., 1983*). Фактори за које је познато да узрокују промене у концентрацији IGF-I су и концентрација инсулина (*Pao et al., 1992*), године старости (*Livingstone & Borai, 2014*), пол (*Jørgensen et al., 2004*), физичка активност (*Nishida et al., 2010*), ниво стреса, присуство болести (*Van den Berghe, 2000*).

Степен ухрањености такође представља важан фактор који утиче на експресију IGF-I (*Hintz et al., 1978; Grant et al., 1973*). Наиме, већ после недељу дана гладовања, концентрација IGF-I у циркулацији се толико смањује да одговара оној која се среће код стања хипопитуитаризма (*Campillo et al., 2000*). Пад концентрације може бити последица смањене производње свих протеина у јетри, али указује и на начин на који се постојећи хранљиви састојци прераспоређују. У моменту неухрањености циљ организма је одржавање основних метаболичких процеса, а не

раст и обнова ткива (*Livingstone 2000*). Концентрација IGF-I се враћа на нормалу по успостављању нормалног режима исхране и постепено се повећава са добитком на тежини (*Clemmons et al., 1981; Hill et al., 1993*). Кратак период полуживота чини га осетљивим на краткорочне промене у нутритивном статусу, што се показало корисним у надгледању исхрањености и опоравка пацијената (*Unterman et al., 1985*). Због овакве осетљивости на унос хране, IGF-I би се могао користити као нутритивни маркер при процени степена исхрањености појединаца (*Livingstone, 2012*).

Синтеза IGF-I започиње у феталном периоду, када IGF-I обезбеђује раст организма, утичући на скелет, млечне жлезде, простату и мишиће (*Nakae et al., 2001; Baker et al., 1993*). У одраслом организму, посебно је значајна улога IGF-I у одржавању мишићног, нервног и кардио-васкуларног система (*Clemmons, 2009; Torres-Aleman 2010; Colao, 2008*). На ћелијском нивоу, IGF-I стимулише раст, деобу и диференцијацију, а поседује и анти-апоптотско дејство (*Pollak et al., 2004*). Деловање углавном остварује везујући се за IGF-1R (*Le Roith, 2003*).

Епидемиолошке студије су показале да је ризик за добијање тумора простате (*Chan et al., 1998*), дојке (*Peyrat et al., 1993*) и дебелог црева (*Manousos et al., 1999*) повећан код појединаца који имају већу концентрацију IGF-I у циркулацији, него код оних код којих су оне мање од просечних вредности. IGF-I стимулише деобу ћелија везивањем за IGF-1R. Повећана биодоступност IGF-I може бити резултат смањене производње IGFBP молекула или њихове интензивније протеолизе. Повећан степен протеолизе IGFBP-3 нађен је код тумора простате, услед дејства PSA (*prostate specific antigen*- антиген специфичан за простату) (*Cohen et al., 1992*), катепсина D (*Nunn et al., 1997*) и урокиназе (*Angelloz-Nicoud & Binoux, 1995*).

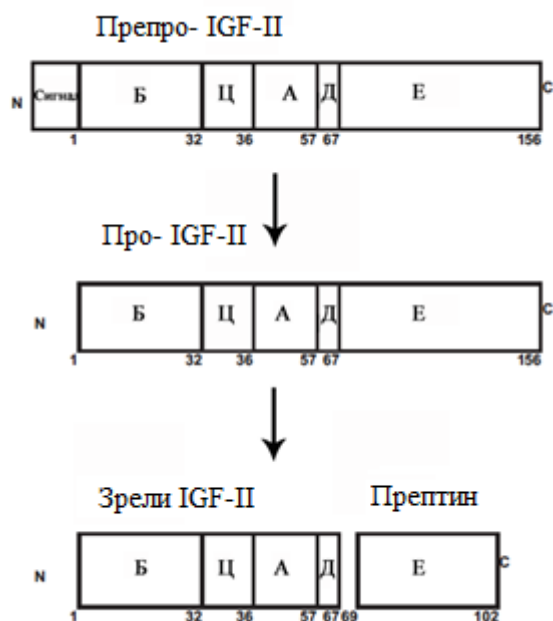
Осим митогеног, IGF-I испољава и метаболичко дејство. Због структурне хомологије са (про)инсулином, он се може везати за IR, IGF-1R или IR/IGF-1R и утицати на хомеостазу глукозе и инслинску осетљивост (*Clemmons, 2006; Yuen & Dunger, 2007*). Показано је да инфузија IGF-I, у комбинацији са IGFBP-3 (заједно са инсулином), пацијентима са дијабетесом тип 1 доводи до додатног смањења глуконеогенезе у јетри и повећаног преузимања глукозе од стране ткива, у односу на инфузију самог инсулина (*Clemmons et al., 2000*). Осим везивањем за рецепторе,

ефекат IGF-I се испољава и кроз инхибицију лучења GH који има анти-инсулинско дејство, односно смањује осетљивост јетре на инсулин (*Ohlsson et al., 2009*). До сличних открића се дошло и код оболелих од дијабетеса типа 2 (*Clemmons et al., 2005*). Овакве терапеутске процедуре се још увек испитују, пошто је концентрација слободног IGF-I потребна да изазове ефекат и до 20 пута већа од физиолошке, што представља опасност за остала ткива, посебно ако се имају у виду митогени и анти-апоптозни ефекти IGF-I (*Clemmons, 2006*).

Што се тиче метаболизма липида, IGF-I, за разлику од GH, испољава анти-липолитичко дејство у масном ткиву. Давање рекомбинантног IGF-I (за разлику од рекомбинантног GH) не утиче значајно на смањење централне гојазности (*Taaffe et al., 2001*), што је последица постојања GH рецептора и одсуства IGF-1R на зрелим адипоцитима. Са друге стране, прекурсори масних ћелија садрже велики број IGF-1R и везивање IGF-I за њих је неопходно за диференцијацију у зреле адипоците (*Scavo et al., 2004*).

Даље анаболичко дејство IGF-I се испољава кроз позитивни азотни биланс, повећану синтезу протеина и инхибицију протеолизе, посебно у мишићном ткиву (*Le Roith & Yakar, 2007; Mauras & Heymond, 2005*). GH и IGF-I се, због овог ефекта, користе у медицинске сврхе код лечења катаболичких стања за које је карактеристичан губитак мишићне масе (*Le Roith et al., 2001*).

IGF-II се у циркулацији налази у два облика, као "зрели" IGF-II масе 7,5 kDa и као тзв. "велики" IGF-II масе 10-18 kDa (заправо, више молекулских врста). "Велики" IGF-II настаје делимичном пост-транслационом обрадом примарног транскрипта (слика 6), тј. садржи само делимично уклоњене делове E домена. Ова форма IGF-II чини и до 20 % IGF-II у крви, а његова физиолошка улога није позната (*O'Dell & Day, 1998*). При обради (протеолизи) примарног транскрипта IGF-II, издваја се још један пептид од 34 аминокиселине, назван прептин, који је осим у јетри нађен и у панкреасу, где се лучи заједно са инсулином из  $\beta$  ћелија. Прептин подстиче излучивање инсулина (*Buchanan et al., 2001*).



**Слика 6.** Структура IGF-II и његова пост-транслациона обрада (*Livingstone & Borai 2014*).

Контрола синтезе IGF-II је веома комплексна. Транскрипција *IGF-2* гена је делимично под епигенетском контролом. Наиме, механизмом „утискивања“ (imprinting) експримира се само једна варијанта гена, и то очева (мајчина варијанта је „утишана“ метиловањем одређених региона на гену). Сматра се да се овим механизмом спречава превелика производња IGF-II. Он важи за сва ткива осим за јетру, где се експримирају оба алела (*Giannoukakis et al., 1993*). Као и код IGF-I, производња IGF-II је контролисана и исхраном. Концентрација IGF-II у циркулацији је смањена у стању неухрањености (*Livingstone & Borai 2014*). GH је слаб позитивни регулатор производње IGF-II, тако да не утиче значајно на његову синтезу (*Wolf et al., 1994*).

IGF-II има најзначајнију улогу у феталном периоду развоја, када му је концентрација и до десет пута већа од концентрације IGF-I (*Moralli et al., 2000*). Његово дејство у пре-наталном развоју је углавном посредовано рецепторима IGF-1R и IR. IGF-II је и у плаценти више заступљен од IGF-I где је, такође, најважнији

регулатор раста. IGF-II стимулише транспорт хранљивих састојака до фетуса, утиче на инвазију и пролиферацију трофобласта, специјализованих ћелија које имају важну улогу у имплантацији ембриона и његовој интеракцији са ткивом материце (*Irwin et al., 1993*). У одраслом добу, IGF-II учествује у процесу ангиогенезе (*Piecewicz et al., 2012*), диференцијацији ћелија имунског система (*Schwartz et al., 1993*) и у диференцијацији и одржавању мишићно-коштаног система (*Wilson & Rotwein, 2006; Conover et al., 1996*).

Као и IGF-I, IGF-II испољава метаболички ефекат на масно ткиво, мишиће и јетру. У јетри, он сузбија глуконеогенезу и стимулише синтезу гликогена. У периферним ткивима, стимулише преузимање и оксидацију глукозе, и подстиче синтезу липида и протеина. Пошто му је концентрација неколико пута већа од концентрације IGF-I, а може стимулисати ћелијско преузимања глукозе, поремећај у његовој синтези (повећање) може довести до хипогликемије (*Murphy, 2003*). Локално произведени IGF-II у јајницима стимулише производњу естрадиола, прогестерона и андрогена (*Cara, 1994*).

Током старења ћелија, долази до губитка регулације механизма „утискивања“ на мајчином хромозому (loss of imprinting, LOI) који почиње да експримира IGF-II, што доводи до његове прекомерне производње (*Fu et al., 2004; Kaneda et al., 2007*). Ово излаже ћелије повећаној количини IGF-II, који стимулише њихов раст и инхибира апоптозу (*Gallagher & Le Roith, 2010*). Постоје обимни докази да је, код људи, појава тумора праћена губитком регулације експресије IGF-II. LOI је уобичајена епигенетска аномалија код тумора дојке (*Hartmann et al., 2005*), једњака (*Zhao et al., 2009*) и јајника (*Murphy et al., 2006*).

Велики или метастатски тумори могу бити праћени ретким синдромом названим „туморска хипогликемија која не потиче од  $\beta$  ћелија острваца“ (non-islet cell tumour hypoglycaemia, NSAIL) (*Marks & Teale, 1998*), чији је главни узрок прекомерна експресија IGF-II, где „велики“ облик чини и до 60 % укупног IGF-II (*Hizuka et al., 1998*). Различити фактори утичу на степен доступности IGF-II у овом поремећају. „Велики“ облик IGF-II везује се истим афинитетом за IGFBP молекуле као и „зрели“ облик. За разлику од њега, мање ефикасно формира терцијарни



комплекс, због смањеног афинитета за протеин назван “подјединица нестабилна у киселој средини” (acid-labile subunit, ALS) (Daughaday, 1996). Тиме се подстиче стварање бинарних комплекса IGF-II/IGFBP, који могу проћи кроз зидове капилара (Bond et al., 2000). Додатно се „зрели“ IGF-II из терцијарног комплекса замењује „великим“ IGF-II, тако да се концентрација слободног “зрелог” IGF-II у циркулацији повећава и до 20 пута (Frystyk et al., 1998). Невезани “зрели” IGF-II делује као инсулин и доводи до хипогликемије (Daughaday et al., 1988). Хипогликемија би, код здравих, стимулисала производњу GH који би, заузврат, имао дејство супротно инсулину. Код NSAIL, међутим, велика концентрација IGF-II супримира производњу GH (Le Roith & Butler, 1999). Мала концентрација GH утиче на смањење производње свих компонената терцијарног комплекса (IGFBP и ALS), чиме се додатно одржава велика концентрација слободног IGF-II, стварајући „зачарани круг” у контроли метаболизма глукозе (de Groot et al., 2007).

### 2.3.2 IGF рецептори (IGF-1R и IGF-2R)

По везивању лиганда за IGF-1R, активира се унутрашња тирозин киназа, што доводи до аутофосфориловања остатака тирозина у унутарћелијском делу  $\beta$  подјединице. Фосфорилувани тирозински остатак служи као место за „укотвљавање“ неколико супстрата, укључујући и супстрате инсулинског рецептора (insulin receptor substrate, IRS) 1 до 4, као и Shc (Src homology 2 domain-containing) протеине (Butler et al., 1998; Samani & Brodt, 2001). Ови протеини даље регрутују друге супстрате, активирајући различите сигналне каскаде. Крајњи резултат је активација једарних фактора, који доводе до индукције ћелијске пролиферације (Hermanto et al., 2000; Grey et al., 2003).

IGF-1R је један од регулатора ћелијског циклуса кроз „надзор“ већег броја контролних тачака. Активирање сигналне каскаде доводи до повећања броја рибозома унутар ћелије, који су неопходни за улазак у синтетски, G1 циклус (Dupont et al., 2003). Такође, стимулише прелаз из G1 у S фазу циклуса, повећањем експресије циклина D1, CDK4 и E (Rosenthal & Cheng, 1995; Dupont et al., 2000).

За разлику од IGF-1R, који преноси сигнал по везивању лиганда, IGF-2R то углавном не ради. Већ је речено да он транспортује протеине који имају М6Р и IGF-II до лизозома. Већина ћелија садржи овај рецептор у цитосолу, док се свега 10 % налази на површини. Унутарћелијски рецептори служе као пратиоци лизозомских ензима који носе М6Р, од места синтезе до прелизозомског дела, где на малом рН долази до дисоцијације комплекса и даљег транспорта ензима до лизозома. Површински рецептори служе за интернализацију ванћелијских лизозомских ензима и IGF-II, а по везивању, комплекси улазе у ћелију, транспортују се до лизозома и разлажу (*Kornfeld, 1992*).

Физиолошки разлог за везивање два врло различита типа супстрата за IGF-2R за сада није познат. За разлику од IGF-1R, који оба своја лиганда везује са приближно истим афинитетом, IGF-2R везује само IGF-II са великим афинитетом ( $K_d = 0,2 \text{ nM}$ ), а IGF-I са неупоредиво мањим ( $K_d = 0,4 \times 10^{-3} \text{ nM}$ ) (*Denley et al., 2004*). Показано је да два лиганда IGF-2R (М6Р и IGF-II) показују реципрочно инхибиторни ефекат при везивању, односно везивање IGF-II за своје место смањује афинитет за везивање лизозомских ензима (*Rosenfeld et al., 1987*).

### 2.3.3 Везујући протеини за IGF пептиде (IGFBP)

IGF пептиди у циркулацији су скоро у потпуности везани за IGFBP молекуле ( $K_d \sim 10^{-10}$ - $10^{-11}$ М) и само је око 1 % укупног IGF слободно (*Oh et al., 1993*). Код одраслих људи, 75-80 % IGF пептида се транспортује у терцијарним комплексима који се састоје из IGF-I или IGF-II, IGFBP-3 (или IGFBP-5) и протеина ALS (*Boisclair et al., 2001; Twigg & Baxter, 1998*). Ови комплекси су масе 150 kDa (код IGFBP-5, 130 kDa), не пролазе кроз ендотелну баријеру крвних судова и продужавају полуживот IGF пептида на 12-15 h (полуживот слободног IGF је око 10 min) (*Guler et al., 1989*). Синтезу IGFBP-3 и ALS позитивно регулише GH (*Rosenfeld et al., 1994*). Већ је речено да је афинитет IGFBP за IGF пептиде већи него афинитет IGF-1R, што обезбеђује контролу активност ових фактора раста (*Oh et al., 1993*). Остали IGFBP молекули формирају бинарне комплексе (40-50 kDa) који могу проћи кроз ендотелну

бариијеру и служе као посредници у међућелијском распоређивању IGF пептида (*Livingstone & Borai, 2014*).

IGFBP су и сами биоактивни молекули који испољавају функције независне од IGF дејства. Непосредно утичу на раст ћелија (*Oh et al., 1995; Conover et al., 2000*), индукцију програмиране ћелијске смрти (*Rajah et al., 2000*) и регулишу деловања других фактора раста. Ове биолошке активности и њихова контрола зависе од пост-транслационих модификација (гликозиловање, фосфориловање) (*Firth & Baxter, 2002; Graham et al., 2007*), интеракција са другим молекулима у крви, везивања за рецепторе на површини ћелија (*Firth & Baxter, 2002*) и протеине ванћелијског матрикса (*Russo et al., 2005*), као и за јоне метала (*Huq et al., 2009*).

За IGFBP-2, IGFBP-3, IGFBP-5 и IGFBP-6 је показано да могу интераговати са елементима ванћелијског матрикса тј. са гликозаминогликанима (*Booth et al., 1995; Fowlkes et al., 1997; Firth et al., 1998; Russo et al., 2005; Kuang et al., 2006*). Пошто је изучавање IGFBP-2 предмет ове дисертације, о њему ће бити више речи. У С терминалном делу, он поседује домен који се везује за хепарин (heparin-binding domain, HBD), а чине га остаци шест аминокиселина (два остатка лизина, два хистидина и по један остатак аспарагина и леуцина) (*Kuang et al., 2006*). Интеракција између IGFBP-2 и хепарина зависи од рН. На рН мањем од физиолошког (рН 6), остаци хистидина постају позитивно наелектрисани, што обезбеђује јаку електростатичку интеракцију са хепарином. Ова зависност од рН долази до изражаја у физиолошким стањима када је рН у делу организма смањена, као што је у случају зацељивања рана или код метаболички активних ћелија тумора. За IGFBP-2 је карактеристично да поседује још један домен за везивање хепарина (X-B-B-X-B-X, где је В базни остатак, а Х хидрофобни) у L домену (*Russo et al., 2005*). За везивање IGFBP-2 за гликозаминогликане је некад потребно присуство IGF пептида, а некад не, што зависи од специфичног физиолошког стања и/или типа ткива/органа (*Arai et al., 1996a; Russo et al., 2005*). Интеракција IGFBP молекула са гликозаминогликанима ванћелијског матрикса регулише отпуштања IGF пептида, с обзиром да се HBD налази одмах поред аминокиселина важних за везивање IGF (*Song et al., 2000; Kuang et al., 2006*). Када се IGFBP вежу за гликозаминогликане, њихов афинитет за IGF се

значајно смањује, ослобађајући их и омогућавајући им да се вежу за IGF-1R (*Jones et al., 1993b; Arai et al., 1994*). IGFBP-2 и IGFBP-6 се везују за више различитих гликозаминогликана, док се IGFBP-3 и IGFBP-5 везују искључиво за хепарин, хепаран-сулфат и дерматан-сулфат (*Fowlkes & Serra, 1996*).

У одређеним случајевима, IGFBP-2, IGFBP-3, IGFBP-5 и IGFBP-6 могу ући у једро ћелије, где утичу на експресију гена и унутарћелијско преношење сигнала (*Xu et al., 2004; Miyako et al., 2009; Azar et al., 2011; Lee et al., 2011*).

IGFBP-1 и IGFBP-2 имају карактеристичну секвенцу аргинин-глицин-аспартат (RGD), која им омогућава везивање за  $\alpha 5\beta 1$  интегрин (*Jones et al., 1993c*). Овај тип интеракције смањује ћелијску адхезију и размножавање, а стимулише миграцију, што су све процеси укључени у неопластичну трансформацију ћелија и метастазе (*Schiütt et al., 2004; Russo et al., 2005; Wang et al., 2006*).

IGFBP молекули подлежу пост-транслационој обради и то најчешће гликозиловању, фосфориловању и протеолизи. Гликозиловање не утиче на афинитет за IGF молекуле (*Firth & Baxter, 1999*), али његово изостајање на IGFBP-3 повећава афинитет везивања за ћелијску мембрану (*Firth & Baxter, 1999*). Гликозиловање IGFBP-5 повећава његов афинитет за хепарин (*Graham et al., 2007*). Гликозиловање IGFBP-6 штити протеин од протеолизе (*Neumann et al., 1998*), и тако продужава полуживот у циркулацији. Фосфориловање IGFBP-1 повећава његов афинитет за IGF, а дефосфориловање је основни регулаторни механизам за отпуштање IGF (*Jones et al., 1993a*). Фосфориловање IGFBP-3 не мења његов афинитет за IGF, али га штити од протеолизе, смањује афинитет за мембранске структуре и ALS (*Coverely et al., 2000*). Фосфориловање IGFBP-5 омета везивање за хепарин (*Graham et al., 2007*).

IGFBP-3 има домен за везивање јона метала, који обично није изложен и засићен. Присуство јона метала на IGFBP-3 утиче на његову интеракцију са интегринима и трансферином, као и на унутарћелијски унос преко трансферинских рецептора (*Singh et al., 2004; Huq et al., 2009*). Јони цинка утичу на интеракцију IGF пептида са IGFBP-3 и IGFBP-5 који су претходно везани на површини ћелија, чиме регулишу њихову биолошку доступност. Наиме, показано је да присуство цинка

смањује афинитет ова два IGFBP за IGF пептиде, чиме се олакшава предаја лиганда рецепторима (*Sackett & McKusker, 1998*).

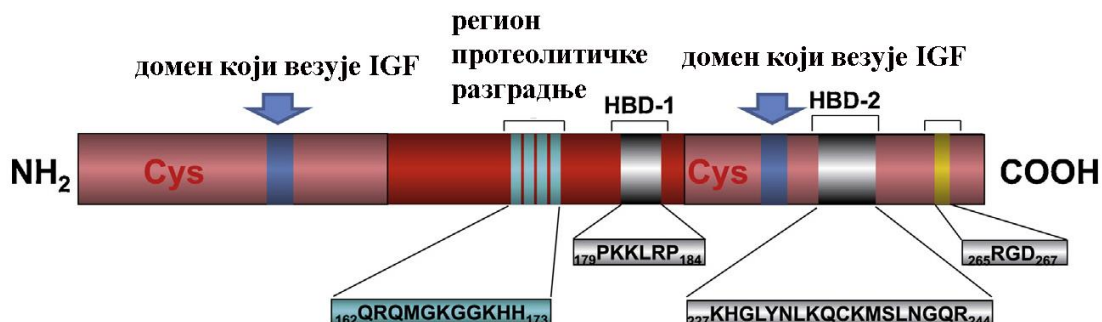
IGFBP молекули у свом L региону поседују места на која делују протеазе и разграђују их (*Firth & Baxter, 2002; Bunn & Fowlkes, 2003*). Ово је најважнији процес за контролу отпуштања IGF (*Bunn & Fowlkes, 2003*). Брзина протеолизе IGFBP је регулисана преко неколико механизма. Један је промена концентрације протеаза и/или њихових инхибитора. Други обухвата структурне измене на IGFBP, претежно гликозиловање и фосфориловање (додатне групе су обично заштита од приступа протеаза, због стерних или електростатичких сметњи). Трећи механизам се ослања на нековалентне интеракције, као што су везивање лиганда и интеракција са ванћелијским матриксом (*Neumann, et al., 1998; Gibson et al., 2001; Coverley et al., 2000*). Више истраживања је показало да протеолизу IGFBP-3, IGFBP-4 и IGFBP-5 могу инхибирати други IGFBP молекули или фрагменти, посебно они фрагменти који садрже базне домене који се везују за хепарин (*Fowlkes, J.L. et al., 1997*). IGFBP-4 много брже подлеже деградацији од стране своје протеазе (pregnancy-associated plasma protein A, PAPP-A) ако је за њега везан IGF-II, него када је везан IGF-I, или ако уопште није везан лиганд (*Lawrence, et al., 1999*). Са друге стране, везивање IGF-II за IGFBP-3 смањује осетљивост IGFBP-3 на протеазе (*Fowlkes, J.L. 1994*), у односу на IGF-I, или на одсуство везаног лиганда. Из овога се може закључити да IGF молекули везани за IGFBP могу имати и стимулаторни и инхибиторни ефекат на деловање протеаза, у зависности од конформационе промене која уследи по везивању лиганда (*Bunn & Fowlkes, 2003*). Конформационе промене се догађају и везивањем IGFBP за протеогликане ванћелијског матрикса, а последице су различите и зависе од једног до другог IGFBP. Примера ради, IGFBP-5 везан за матрикс је мање подложен дејству протеаза које производе фибробласти (*Jones et al., 1993*), док је IGFBP-3 везан за матрикс и инкубиран са фибробластима подложнији деградацији (*Conover, 1991*).

Промене у укупној протеазној активности, првенствено IGFBP-3, су забележене код већег броја патолошких стања организма, као што су дијабетес тип 1 (*Zachrisson et al., 2000*) и тип 2 (*Bang et al., 1994*), разне врсте повреда (*Griffiths et al., 1999*), артритис (*de Benedetti et al., 2001*) и тумор (*Helle et al., 2001*).

## 2.4 Молекулска карактеризација IGFBP-2 и његова улога у физиолошким и патолошким променама у организму

### 2.4.1 Структурне карактеристике IGFBP-2

Везујући протеин 2 за факторе раста сличне инсулину (IGFBP-2) је протеин молекулске масе око 36 kDa, који је у значајној мери експримиран током феталног развића, а у одраслом добу је углавном експримиран у јетри, масним ћелијама, репродуктивном систему и централном нервном систему (*Shimasaki & Ling, 1991*). Са IGF пептидима гради бинарне комплексе масе око 43 kDa (*Firth & Baxter, 2002*). Структура IGFBP-2 је приказана на [слици 7](#).



**Слика 7.** Структура и функционални домени IGFBP-2 (*Russo et al., 2014*)

IGFBP-2 се састоји од N и C домена, који су богати цистеином (12 остатака у N региону и 6 у C региону), а између је L домен који не садржи остатке цистеина (*Firth & Baxter, 2002; Forbes et al., 1998*). N и C домени, као и код других везујућих протеина, учествују у везивању IGF пептида, док појединачно изоловани показују знатно мањи афинитет за IGF (*Forbes et al., 1998; Ho & Baxter, 1997; Russo et al., 1999; Hobba et al., 1996*). Савремене методе анализе (NMR) су показале да C домен

има кључну улогу у везивању IGF, с обзиром да се IGF пептиди за њега везују истим регионима којима се везују за IGF-1R (Carrick et al., 2005). IGFBP-2 није гликозилован и, иако има места за потенцијано фосфориловање, најчешће се налази у нефосфорилваном облику (Firth & Baxter, 2002; Graham et al., 2007; Coverley et al., 1997).

IGFBP-2 поседује карактеристичну RGD (Arg-Gly-Asp) секвенцу, која је присутна и на многим протеинима ванћелијског матрикса (нпр. фибронектин, витронектин). Ова секвенца им омогућава да се вежу за адхезионе рецепторе на површини ћелија, као што су интегрини. RGD у оквиру IGFBP-2 обезбеђује интеракцију IGFBP-2 са интегринима  $\alpha\nu\beta 3$  и  $\alpha 5\beta 1$  (Song et al., 2003; Frommer et al., 2006; Pereira et al., 2004; Perks et al., 2007; Foulstone et al., 2013).

Средишњи регион IGFBP-2 садржи секвенцу PKKLRP, која је типа X-B-B-X-B-X, или како се још зове HBD, за везивање хепарина (Cardin & Weintraub, 1989). Овај домен омогућава IGFBP-2 да се веже за елементе ванћелијског матрикса и да утиче на пролиферацију и миграцију ћелија (Russo et al., 2005). Недавна истраживања су показала да HBD, у ствари, представља два региона HBD1 и HBD2. HBD1 посредује у везивању IGFBP-2 за површински рецептор протеинске тирозин фосфатазе  $\beta$  (receptor protein tyrosine phosphatase  $\beta$ , RPTP $\beta$ ) и доводи до њене инхибиције (Shen et al., 2012). Везивање HBD2 зависи од рН средине. За његову активност су пресудна два остатка хистидина који се протонују у рН опсегу 5,5-6,0, док су на рН 7,4 неактивни. До сада није утврђено да ли се овај домен активира/деактивира у зависности од рН и да ли у киселој средини има одређену биолошку функцију (Kuang et al., 2006). Интеракцијом IGFBP-2 са елементима ванћелијског матрикса или са ћелијским рецепторима обезбеђује се локално концентровање IGF и отпуштање (Arai et al., 1996; Russo et al., 1995; Russo et al., 1997). Према једној групи истраживача, везивање IGFBP-2 за ванћелијски матрикс у *in vitro* условима зависи од тога да ли је за њега везан IGF, односно везивање IGF доводи до конформационе промене IGFBP-2 којом се излаже HBD (Arai et al., 1996). Према другим истраживачима, интеракција IGFBP-2 са IGF није неопходна (Russo et al., 1997; Russo et al., 2005).

Постоје јаки докази да повећана експресија IGFBP-2 може довести до активације про-туморског програма експресије, пресудног догађаја који је потребан за отпочињање или стимулацију агресивног понашања ћелија рака (*Azar et al., 2011*), и то уласком IGFBP-2 у једро ћелије (*Azar et al., 2014*). У L региону IGFBP-2 се налази специфична секвенца за једарну локализацију (nuclear localization sequence, NLS), структуре PKKLRPP, која је потребна за интеракцију са импортином  $\alpha$  (импортини припадају класи протеина који се зову кариоферини и који су укључени у транспорт молекула између цитоплазме и једра). Оно што је интересантно је да се NLS секвенца поклапа са HBD1 секвенцом. Неоваскуларизација је важан рани догађај у напредовању тумора, а показано је да IGFBP-2 стимулише производњу васкуларног ендотелног фактора раста (vascular endothelial growth factor, VEGF), након унутарћелијске /унутарједарне локализације IGFBP-2 (*Azar et al., 2011*).

#### 2.4.2 Регулација синтезе IGFBP-2

Код одраслих особа, концентрација IGFBP-2 (2,7-27,8 nM) (*Ranke et al., 2000*) подлеже малим дневним флукуацијама, углавном после оброка богатог угљеним хидратима и протеинима, кад се повећава. Главнина IGFBP-2 у циркулацији потиче из јетре. GH и IGF-I значајно утичу на производњу IGFBP-2. GH се понаша као инхибитор синтезе IGFBP-2, док је IGF-I стимулатор (*Clemmons et al., 1991*). Забележена је и позитивна корелација између серумских концентрација IGFBP-2 и IGF-II, тако да и овај пептид утиче на експресију IGFBP-2 (*Blum et al., 1993*). Тестостерон блокира негативне ефекте које GH испољава на производњу IGFBP-2 (*Münzer et al., 2006*). Концентрација IGFBP-2 у циркулацији се може повећати додатним уносом угљених хидрата и протеина (*Vrieling et al., 2004; Crowe et al., 2009; Pucilowska et al., 1993*). Ликопен врши стимулацију IGFBP-2 синтезе код људи (*Vrieling et al., 2007*), а витамин D супресује код туморских ћелијских линија (*Stewart & Weigel, 2005*). Гладовање повећава концентрацију IGFBP-2, а повратак уобичајеној исхрани доводи до његове нормализације (*Counts et al., 1992*).



На експресију IGFBP-2 у великој мери утиче функционални статус тумор супресорног гена PTEN (phosphatase and tensin homolog) (Levitt et al., 2005; Mehriani-Shai et al., 2007). Губитак његове функције је често праћен повећањем концентрације IGFBP-2 у крви и обрнуто, односно индукција PTEN супримира синтезу IGFBP-2 (Levitt et al., 2005). Други тумор супресорни ген који утиче на концентрацију IGFBP-2 је p53, који се везује за интронску регулаторну секвенцу на IGFBP-2 гену (Grimberg et al., 2006). Његова инактивација доводи до редукције производње IGFBP-2 (видети касније у тексту). Фактор који је индукован хипоксијом 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ), такође, подстиче експресију IGFBP-2 (Feldser et al., 1999). Он се активира када се ћелија нађе у средини са малом концентрацијом кисеоника, што се дешава код туморске ћелије у фази брзе деобе. Хипоксични услови неопластично измењених ћелија доводе до активирања адаптивних механизма, чија је последица и повећана производња HIF-1 $\alpha$ , што даље стимулише ангиогенезу и формирање нове мреже крвних судова (Harris, 2002; Semenza, 1999).

### **2.4.3. Фрагменти и комплекси IGFBP-2 у циркулацији**

#### 2.4.3.1 Фрагменти IGFBP-2

Протеолиза је главни пут пост-транслационе регулације концентрације IGFBP-2 у циркулацији и његове функционалности (Mark et al., 2005). Фрагментација се врши у средишњем региону молекула (Firth & Baxter, 2002). Фрагменти IGFBP-2 су детектовани у разним телесним течностима као што су серум (McCusker et al., 1991), фоликуларна течност (Giudice et al., 1990), цереброспинална течност (Roghani et al., 1989) и млеко (Ho & Baxter, 1997). Протеолизом настају фрагменти различитих маса. У серуму људи је детектовано осамнаест фрагмената IGFBP-2 молекулских маса у опсегу 4-21 kDa (Mark et al., 2005).

Повећана концентрација фрагмената IGFBP-2 је запажена у трудноћи и у катаболичким стањима (гладовање, запаљенски процес, тумор) (Pucilowska et al., 1993; Brandt et al., 2011; de Graff et al., 2007). Неки од фрагмената задржавају

способност везивања IGF пептида, али са знатно мањим афинитетом (*Russo et al., 1999; Ho & Baxter, 1997*).

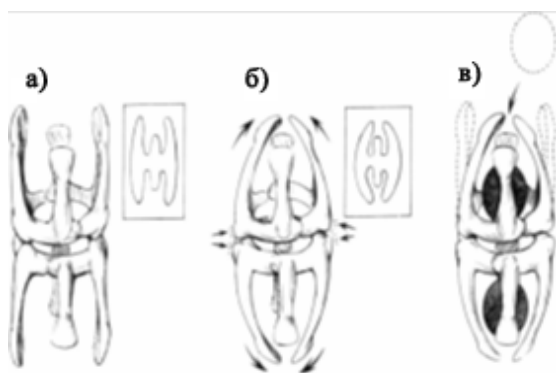
#### 2.4.3.2 Комплекси IGFBP-2

До недавно је било познато да у циркулацији IGFBP-2 гради комплексе само са IGF пептидима (*Firth & Baxter, 2002*). Међутим, део резултата ове дисертације је откриће да IGFBP-2 може градити комплексе и са алфа-2-макроглобулином.

Алфа-2-макроглобулин ( $\alpha 2M$ ) је главни инхибитор протеаза који се налази у крви свих кичмењака. Његова концентрација у циркулацији се креће у рапону 2,7-5,5  $\mu M$  (*Sheikh et al., 2003*). Он је универзални инхибитор протеаза, без обзира на њихову специфичност, порекло или механизам деловања (*Khan & Khan, 2004; Lin et al., 2012*). По структури је гликозиловани хомотетрамер молекулске масе око 720 kDa (*Sheikh et al., 2003*). Коришћењем интегративног приступа обраде узорка (комбинацијом неколико физичко-хемијских метода) и масене спектрометрије, анализирано је шест од осам потенцијалних места N-гликозиловања на  $\alpha 2M$ . Већина гликана је биантенарног, комплексног типа са терминалном сијалинском киселином (Sia), галактозом (Gal) и уметнутим N-ацетилглукозамином (GlcNAc) (*Lin et al., 2012*).

Овај тетрамер се сматра „димером димера“, пошто се састоји од парова подјединица везаних дисулфидним везама, које прво граде димере, а димери даље нековалентно асосују у тетрамер (*Wyatt et al., 2012*). Близу средине полипептидног ланца сваке подјединице налази се секвенца од двадесет пет аминокиселина која је подложна разградњи од стране било које ендопептидазе (регион ”мамца”) (*Meyer et al., 2012*). Раскидањем веза у овом „мамцу“ долази до конформационе промене у структури  $\alpha 2M$ , до заробљавања протеазе (слика 8) и формирања структуре „кавеза“ (*Marrero et al., 2012*). Структурна трансформација  $\alpha 2M$  доводи до повећане електрофоретске покретљивости молекула и прелаза из дотадашњег “спорог” у “брзи” облик (*Shi et al., 2011*). Конформациона промена излаже унутрашњи тиоестар који се формира између  $\beta$  SH групе цистеина и  $\gamma$  карбонилне групе

глутамин/глутамата у свакој подјединици. Тиоестар подлеже хидролизи дајући реактивне глутамил и цистеинил остатке, који даље граде ковалентне везе са заробљеном протеазом (*Barrera et al., 2007; Lin et al., 2008*). Структурна промена  $\alpha 2\text{M}$  открива, до тада скривени, регион на карбоксилном крају сваке подјединице, познат и као домен везивања за рецептор (*Holtet et al., 1994; Craig-Barnes et al., 2010; Petersen et al., 2010; Qin et al., 2010*). Комплексе  $\alpha 2\text{M}$ /протеаза убрзо препознају  $\alpha 2\text{M}$  рецептори, који припадају рецепторима сличним онима за липопротеине ниске густине (low-density lipoprotein receptor related protein, LRP/ $\alpha 2\text{M}$ -R). Рецептори се налазе на површини ћелија (највише у јетри) и процесом ендоцитозе уклањају комплексе из крви (*Travis & Salvesen, 1983; Bond et al., 2007; Armstrong, 2010*). Комплекси се са великим афинитетом везују за рецепторе ( $K_d = 10^{-8}$ - $10^{-10}$  M) (*Chiabrando et al., 2002; Mann, 2007; Bahhady et al., 2008; Bowers et al., 2009*), а време њиховог полуживота у циркулацији је свега неколико минута.



**Слика 8.** Модел  $\alpha 2\text{M}$ : а) нативни облик  $\alpha 2\text{M}$ , б) конформациона промена  $\alpha 2\text{M}$  по везивању протеазе (стрелице показују места на  $\alpha 2\text{M}$  која препознаје рецептор) и в) “заробљавање” протеазе (*Feldman et al., 1985*)

Иако се састоји из четири подјединице, од којих свака садржи регион „мамца“, молекул  $\alpha 2\text{M}$  поседује два везивна места за протеазе, која су идентична и међусобно независна (*Pochon et al., 1981; Gerritsen et al., 2001*).

Осим протеаза,  $\alpha 2\text{M}$  везује велики број других протеина из крви, као што су фактори раста, цитокини и хормони (*Peslova et al., 2009; Bowers et al., 2012; Birkenmeier et al., 1998*). Може интераговати и са елементима IGF система, и то са IGFBP-1 (*Westwood et al., 2001*) и IGFBP-2 (резултат ове дисертације). Механизам интеракције и њене физиолошке последице нису познати. Претпоставља се да би ово могао бити пут којим се IGFBP, а посредно и IGF пептиди, допремају до свог места деловања (*Westwood et al., 2001*). Наиме, за интеракцију  $\alpha 2\text{M}$  са неким молекулима потребно је присуство протеазе, односно прво се мора конформационо изменити сам  $\alpha 2\text{M}$ , док за интеракцију са другим није (*Valnickova et al., 1996; Fisker, 2006*). У случају конформационо измењеног  $\alpha 2\text{M}$ , долази до везивања за LRP/ $\alpha 2\text{M}$ -R и уклањања, а у другом случају то није нужни догађај. У првом случају молекул везан за  $\alpha 2\text{M}$  се усмерава ка ткиву и ћелијама које имају LRP/ $\alpha 2\text{M}$ -R (јетра, фибробласти, моноцити, синциотиотрофобласти) (*Bowers et al., 2009; Ho et al., 2009; Ludvigsen et al., 2009; Craig-Barnes et al., 2010*). Овај сценарио би могао важити и за IGFBP-2. Евентуална ендоцитоза комплекса би олакшала улаз IGFBP-2 у ћелију, где би могао остварити физиолошко дејство (нпр. као транскрипциони регулатор). Са друге стране, формирање комплекса IGFBP-2/ $\alpha 2\text{M}$  би могло заштитити сам IGFBP-2 од деловања протеаза. Додатна истраживања су неопходна да би се разјаснили наведени механизми.

#### **2.4.4 Улога IGFBP-2 у физиолошким процесима**

##### 2.4.4.1 IGFBP-2 и старење

IGFBP-2, поред IGFBP-1, је најзаступљенији везујући протеин током феталног развића. Његова концентрација у неонаталном периоду опада и IGFBP-3 постаје доминантан (*Rajaram et al., 1997*). Концентрација IGFBP-2 наставља да пада током пубертета, проласком адолесценције полако почиње да расте, а после шездесете расте интензивније (*Rajaram et al., 1997; Mattsson et al., 2008*).

У процесу старења, до изражаја долази ткивно специфично дејство IGFBP-2. Мала концентрација IGFBP-2 у старијим годинама је добар показатељ мишићно-

скелетног здравља, код оба пола. Особе са већом концентрацијом IGFBP-2 су чешће испољавале неки степен инвалидитета, мању густину коштаног ткива, смањену мишићну масу и смањену покретљивост (*van den Beld et al., 2003*). Студије на животињама су показале да се са старењем смањује пренос сигнала преко IGF-I, што има позитиван ефекат на дуговечност (*Tatar et al., 2003*) и адаптацију на оштећење ДНК (*Niedernhofer et al., 2006*). На ткивном нивоу, IGFBP-2 допрема IGF-I до IGF-1R, повећавајући активност рецептора (*Russo et al., 2005*). Сходно томе, повећана концентрација IGFBP-2 код старијих људи би могла бити показатељ повећаног дејства IGF-I.

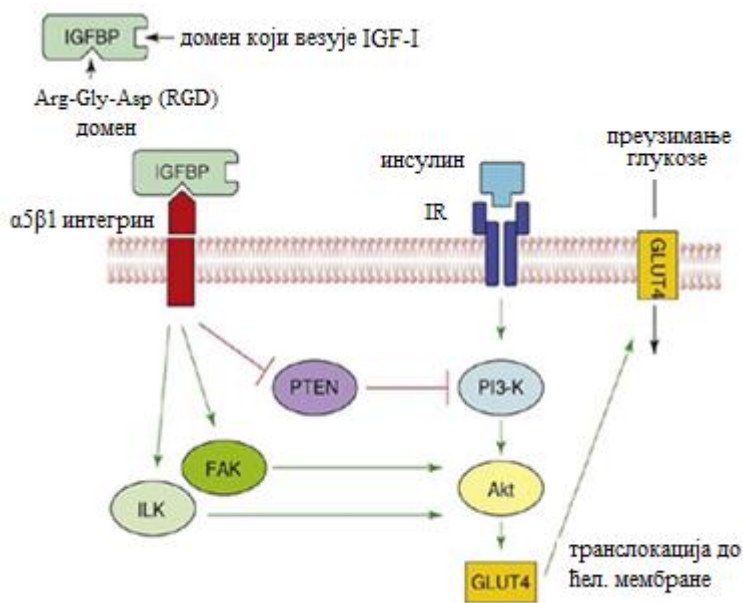
Улога IGFBP-2 у процесу старења, међутим, може бити и позитивна. Мала концентрација IGFBP-2 утиче негативно на метаболизам. Наиме, показано је да су гојазност (*Nam et al., 1997*) и дијабетес тип 2 (*Frydryk et al., 1999*) праћени смањеном концентрацијом IGFBP-2, као и да индукована експресија IGFBP-2 код лабораторијских мишева обезбеђује заштиту од гојазности и дијабетеса, чак и са хиперкалоријским дијетама (*Wheatcroft et al., 2007*).

Овакву противречност између утицаја IGFBP-2 на морталитет и осетљивост на инсулин донекле могу објаснити истраживања на животињским моделима. Мишеви којима је инактивиран ген који кодира IRS-1 (преко кога се испољава дејство IGF-I), са једне стране показују све метаболичке особености неосетљивости на инсулин, док са друге стране испољавају одложено старење и дуже живе (*Selman et al., 2008*). Мишеви са смањеним дејством IRS-2 у мозгу, такође, показују знаке неосетљивости на инсулин, али и повећану отпорност на стрес и дужи живот (*Taguchi et al., 2007*). У овом случају се показало да неосетљивост на инсулин и одложен морталитет могу коегзистирати. Смањење преноса сигнала посредством IGF-I, изгледа, да истовремено смањује и пренос сигнала посредством инсулина (односно, доводи до инсулинске резистенције) (*Hu et al., 2009*).

#### 2.4.4.2 IGFBP-2 и метаболизам угљених хидрата и липида

IGFBP-2 има значајну улогу у метаболичкој хомеостази. Иако је инсулин примарни регулатор концентрације глукозе у циркулацији, постоје докази да и IGF-I има значајну улогу. Он се везује за IGF-1R и даље може довести до ефеката сличних оним које изазива инсулин, активирајући фосфоинозитол-3-киназни пут (phosphoinositide-3-kinase, PI3K) и стимулишући транслокацију транспортера глукозе 4 (GLUT-4) до ћелијске мембране скелетних мишића и масног ткива (слика 9). Пошто IGFBP-2 има већи афинитет за IGF-I него IGF-1R, он смањује концентрацију слободног, биолошки активног IGF-I и инхибира његово везивање за рецептор (Frystyk, 2004; Wheatcroft & Kearney, 2009). Као што је раније речено, овај ефекат може бити модификован везивањем IGFBP-2 за елементе ванћелијског матрикса или површину ћелије, чиме се афинитет мења (Wheatcroft & Kearny, 2009).

IGFBP-2 може утицати на инсулинску осетљивост ћелије независно од IGF, везивањем за  $\alpha 5\beta 1$  интегрински рецептор (преко своје RGD секвенце). Ово везивање инхибира активност PTEN молекула (Perks et al., 2007), који је негативни регулатор инсулинске сигналне трансдукције у мишићним (Hu et al., 2007) и масним ћелијама (Tang et al., 2005). Инхибицијом PTEN повећава се активност PI3K и транслокација GLUT-4 до ћелијске мембране (слика 9). Према томе, IGFBP-2 модификује осетљивост ћелије на инсулин мењањем активности PI3K, делујући независно од IGF пептида (Wheatcroft & Kearny, 2009).



Слика 9. Механизам утицаја IGFBP-2 на инсулинску осетљивост независан од интеракције са IGF (*Wheatcroft & Kearny, 2009*)

Поремећај метаболизма липида (дислипидемија) често претходи (и до неколико година) појави дијабетеса тип 2. Из тога се може закључити да је дисфункција у метаболизму липида један од првих елемената кардио-васкуларних компликација код дијабетичара. Данас је познато да различити аспекти дијабетичне дислипидемије не представљају изоловане абнормалности, већ су метаболички повезане и делимично зависне од прекомерне синтезе триацилглицерола и липопротеина веома ниске густине (VLDL) (*Ginsberg et al., 2006*). Прекомерна производња ових липида доводи до промена у унутарваскуларном метаболизму липопротеина, што се повезује са повећаним ризиком од кардио-васкуларних болести (смањен садржај HDL, а повећан LDL честица) (*Adiels et al., 2006*).

За IGFBP-2 је показано да је у негативној корелацији са концентрацијом триацилглицерола и холестерола у циркулацији (*Heald et al., 2006; Narayanan et al., 2013*). Истраживања су утврдила везу између производње VLDL и IGFBP-2, односно повећана концентрација VLDL у серуму је праћена смањеном концентрацијом IGFBP-2. Из ове релације би се могло претпоставити да би IGFBP-2 могао бити

биомаркер ране појаве дислипидемије, међутим ову хипотезу треба даље експериментално проверити (*Carter et al., 2014*).

#### 2.4.4.3 IGFBP-2 и физичка активност

Физичка активност (вежбање) је, такође, у извесној мери повезана са концентрацијом IGFBP-2 у крви. До таквог закључка се дошло проучавањем промене у IGF/IGFBP систему при екстремним физичким активностима код мушкараца и жена, које су довеле до значајног повећања IGFBP-2 у циркулацији код оба пола. Једна студија је показала да је концентрација IGFBP-2 само код жена остала повећана и 24 h после активности. Сматра се да је последица овог повећања IGFBP-2 смањена концентрација естрадиола (*Berg et al., 2008*). Раст концентрације IGFBP-2 је запажен независно од година и режима вежбања - код умереног и дуготрајног, као и код краткотрајног интензивног, код адолесцената, одраслих и старијих особа.

#### 2.4.4.4 IGFBP-2 и оксидативни стрес

Утицај оксидативног стреса на производњу IGFBP-2 до сад није детаљније испитиван. Постоји неколико истраживања која су показала да се у одређеним условима, који подразумевају излагање ћелије оксидативном стресу, повећава производња IGFBP-2. Епителне ћелије алвеола, које се и даље могу делити и диференцирати, изложене хиперфизиолошким концентрацијама кисеоника производе веће количине IGFBP-2, који се углавном транспортује у једро. Карактеристично за ове ћелије је да након оксидативне повреде улазе у стање мировања, односно привременог одлагања ћелијског циклуса, док се не утврди је ли дошло до оштећења наследног материјала. Може се претпоставити да се IGFBP-2 у овом случају понаша као транскрипциони регулатор, који мења степен експресије гена који контролишу ћелијски циклус (*Cazals et al., 1999*). Такође, код туморских ћелија коре надбубрежне жлезде мишева, као и код туморских ћелија дебелог црева људи, за које се зна да пре-експримирају IGFBP-2, повећана је производња антиоксидативног ензима каталазе. Способност туморских ћелија да производе повећану количину антиоксидативног



ензима омогућава им прелаз у високо малигни фенотип, преко до сада непознатог механизма (*Hoeflich et al., 2003*).

#### 2.4.4.5 IGFBP-2 и катаболичка стања

У катаболичким стањима преовладавају процеси разградње (катаболизам) над процесима синтезе нових молекула (анаболизма), па самим тим и изградње нових ћелија или ткива. „Пропадање“ ткива у катаболичким поремећајима (неухраћеност, инфламација, инфекција, сепса, стрес, траума) је повезано са смањеном имунском функцијом, запаљенским процесом, одложеном поправком ткива, смањеном брзином зацељивања рана и смањеном функцијом скелетних мишића (*Botfield et al., 1997*). Катаболизам доводи до мобилизације масти и протеина, а смањују се концентрације анаболичких хормона, као што су GH и IGF-I (*Van de Berghe, 2000*). Концентрација IGFBP-2 у циркулацији се повећава у случајевима када укупна концентрација IGF пептида превазилази способност IGFBP-3 да их веже за себе, што и јесте случај у критичним стањима, када се смањују концентрације IGFBP-3 и ALS. Пошто бинарни комплекси (IGF/IGFBP-2), за разлику од терцијарних (IGF/IGFBP-3/ALS), могу изаћи из крвних судова, пораст концентрације IGFBP-2 је логична последица стања у коме је потребна већа количина IGF у ткивима, а у циљу одржања основних метаболичких процеса и испољавања анти-апоптотског дејства (*Baxter, 2001*). И даље је непознато да ли је концентрација IGFBP-2 повећана због неодговарајуће исхране, првенствено недовољног уноса протеина, или је у питању деловање цитокина. Експериментално убризгавање ендотоксина бактерије *E. coli* добровољцима довело је до повећања концентрације IGFBP-2 у циркулацији у периоду од неколико сати (*Lang et al., 1997*).

#### 2.4.4.6 IGFBP-2 и тумор

Тумором се сматра абнормални скуп ћелија, који може бити бенигни (ћелије остају унутар ткива) или малигни (ћелије се одвајају од примарног места настанка и шире даље по организму). Малигни тумор се још назива и рак (канцер). Рак настаје као последица измењеног фенотипа ћелија, који им омогућава да се неконтролисано деле, расејавају (дисеминација) и насељавају друга ткива по организму (метастаза)

<http://www.cancer.gov/about-cancer/what-is-cancer>). Сама способност дисеминације доводи до разградње пријемних ткива, која је незаустављива и после одређеног времена доводи до смрти оболелог. Фенотипска трансформација ћелије је вишестепени процес. Сваки степен карактеришу измене на генима које доводе до прелаза нормалне ћелије у малигну. Познато је да се у току трансформације у ћелији губе многи контролни механизми, што увећава потенцијал раста, доводи до измена на ћелијским мембранама, кариотипских абнормалности, морфолошких и биохемијских измена (*Harley et al., 1994*).

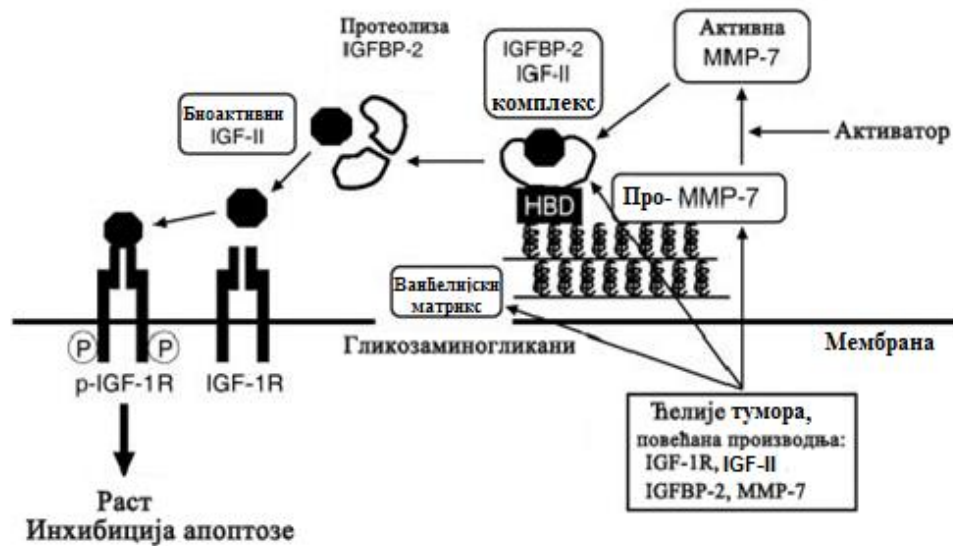
Дефинисане су опште карактеристике туморских ћелија и оне би се могле представити у неколико главних одлика (*Hanahan & Weinberg, 2011*):

1. Самодовољност пролиферативних сигнала (могућност деобе у одсуству спољних сигнала);
2. Неосетљивост на анти-пролиферативне сигнале (губитак контактне инхибиције, туморске ћелије се деле упркос ограниченом простору);
3. Инвазија и метастаза (расејавање туморских ћелија у друга ткива у организму);
4. Неограничена деоба (неизмењене ћелије имају могућност ограниченог броја деоба, најчешће не више од 70 циклуса; за разлику од њих туморске ћелије су бесмртне);
5. Континуирана ангиогенеза (услед хроничне активације про-ангиогених сигнала);
6. Избегавање апоптозе (туморске ћелије заобилазе механизме програмиране ћелијске смрти и преживљавају деловање сигнала „смрти“);
7. Промена у метаболизму (репрограмирање метаболизма у циљу постизања малигног фенотипа);
8. Избегавање дејства имуног система (туморске ћелије стичу способност да избегну природну имуну реакцију од стране Т и В ћелија, макрофага и ћелија убица);
9. Нестабилност генома и мутације (убрзана мутација и повећана осетљивост на мутагене агенсе);

10. Стимулација запаљенских процеса (ћелије урођеног имуног одговора, које се у нормалним условима боре против инфекција и доводе до зарастања ткивних повреда, на неадекватан начин учествују у стимулацији ширења туморских ћелија).

Већи број студија је показао да би IGFBP-2 могао функционисати као стимулатор пролиферације и покретач миграције и инвазије туморских ћелија (*de Kort, 2010*). Позитивна корелација између повећане концентрације IGFBP-2 у крви и инвазивне склоности ћелија нађена је код тумора дебелог црева (*El Atiq et al., 1994*), јажника (*Karasik et al., 1994*), простате (*Cohen et al., 1993*), коре надбубрежне жлезде (*Bouille et al., 1998*), дојке (*Busund et al., 2005; So et al., 2008*), глиома (*Fuller et al., 1999; Song et al., 2003; Wang et al., 2003*) и разних врста леукемија (*Mohnike et al., 1996*). Ови *in vivo* добијени резултати су потврђени у *in vitro* студијама, које су показале да прекомерна експресија IGFBP-2 испољава туморогени потенцијал (*de Kort, 2010*).

Утицај IGFBP-2 на напредовање тумора се може објаснити кроз неколико механизма. Већ је речено да се IGFBP-2 везује за протеогликане ванћелијског матрикса и за интегринске рецепторе (*Arai et al., 1996; Schütt et al., 2004*). Ванћелијски матрикс може бити разнолике структуре и састава. Он обавља велики број функција, као што је обезбеђивање подршке ћелији, раздвајање ткива једног од другог и регулисање међућелијске комуникације (*Kumar et al., 2005*). Изграђен је од мреже фибриларних протеина, као што су колаген и гликозаминогликани, од којих је најчешћи хепарин (*Plopper, 2007*). Ванћелијски матрикс везује велики број различитих фактора раста, служећи као њихов депо. Физиолошке промене могу активирати протеазе које разлажу и ремоделују матрикс, локално отпуштајући факторе раста, без потребе за њиховом синтезом (*Kumar et al., 2005*). Врло је вероватно да кроз овај механизам делује IGFBP-2, који по везивању за ванћелијски матрикс подлеже протеолизи и отпуштању IGF.



**Слика 10.** Механизам сарадње IGF/IGFBP-2 комплекса, MMP-7 и елемената ванћелијског матрикса (Miyamoto et al., 2007)

За разлику од нормалних ћелија, туморске ћелије епитела дебелог црева производе специфичну протеазу MMP-7, која директно учествује у процесима инвазије и метастазе, испољавајући протеазну активност према многобројним елементима ванћелијског матрикса. MMP-7 делује као активатор цитокина и фактора раста, разлажући њихове прекурсоре или инхибиторе. Елементи ванћелијског матрикса прво везују про-ензимски облик MMP-7, а затим настаје активна форма. Другим речима, IGF/IGFBP-2 и про-MMP-7 би могли коегзистирати у ванћелијском матриксу, близу један другом, и само у одређеним околностима би могли ефикасно интераговати (слика 10) (Miyamoto et al., 2007) .

Други механизам дејства IGFBP-2 код тумора се испољава кроз интеракцију са интегринима (Schütt et al., 2004). Интегрини су трансмембрански рецептори који посредују у реакцијама везивања између ћелија и околине (Burke, 1999). Учествују у преносу сигнала којима се доставља информација о хемијском и механичком саставу ванћелијског матрикса. По саставу су хетеродимери који садрже две подјединице,  $\alpha$  и  $\beta$ . Постоји осамнаест типова  $\alpha$  и осам типова  $\beta$  подјединица. Кроз различите

комбинације  $\alpha$  и  $\beta$  подјединица до сада су откривена двадесет и четири различита интегрин (Hynes, 2002). Најчешће се везују за гликопротеине ванћелијског матрикса, укључујући колаген, фибронектин, ламинин и за ћелијске рецепторе (Hynes, 2002; Plow et al., 2000). Интегрини учествују у организацији актинског цитоскелета и у координацији сигналних путања којима се контролише адхезија, миграција, пролиферација и апоптоза ћелија (Schwartz et al. 1995). Специфичност везивања интегрин за лиганде је условљена типом ванћелијских домена  $\alpha$  и  $\beta$  подјединица. По везивању лиганда за интегрин, преносе се сигнали из ванћелијске средине у унутрашњост ћелије. Унутарћелијски сигнали подстичу склапање тзв. комплекса фокалне адхезије (focal adhesion complex, FA), који је динамична мултипротеинска структура од преко сто педесет протеина и служи као посредник за даљи пренос сигнала кроз неколико комплексних каскада (Zaidel-Bar et al. 2007). Интегрин  $\alpha 5\beta 1$  може да веже IGFBP-2, чиме се активира горе наведена сигнална путања (Schütt et al., 2000).

Једна од првих фосфатаза која је повезана са појавом тумора је PTEN. Ген за PTEN лако подлеже мутацијама, што може довести до иницијације тумора (Stambolić et al., 1998). Има антагонистичко дејство на пролиферативно деловање многих фактора раста (Mehrian-Shai et al., 2007). Она врши дефосфориловање PI3K и супримира сигнализацију преко MAPK (mitogen activated protein kinase) путање (Weng et al., 2002; Mehrian-Shai et al., 2007). Уколико се, из неког разлога, инхибира експресија гена за овај протеин, ћелија губи кључни прекидач којим се спречава наставак деобе. Испитивањем ћелија рака дојке, дошло се до сазнања да IGF-II у мањим концентрацијама инхибира његову експресију, док у већим активира. Показано је да IGFBP-2 у већој концентрацији инхибира експресију PTEN. Ово дејство не зависи од IGF пептида, већ се испољава по везивању IGFBP-2 за интегрински рецептор (Perks et al., 2007).

Раније је већ речено да је експресија IGFBP-2, такође, регулисана и транскрипционим фактором HIF-1 $\alpha$  (Feldser et al., 1999). Овај фактор се активира при излагању ћелије малој концентрацији кисеоника, као део процеса адаптације (Semenza, 1999). У једном тренутку, услед брзе деобе, туморским ћелијама понестаје

кисеоника и услови постају хипоксични, јер је маса новоформираних ћелија сувише удаљена од најближег капилара (*Semenza, 2003*). Хипоксија је токсична и за здраве и за туморске ћелије, међутим ћелије тумора су способне да се прилагоде недостатку кисеоника и чак да наставе да се деле (*Harris, 2002*). Оне енергетски метаболизам заснивају на анаеробним процесима ферментације (Варбургов ефекат), а не на оксидативном фосфориловању, што им даје селективну предност при деоби и ширењу по организму (*Warburg, 1923*). Хипоксија индукује синтезу HIF-1 $\alpha$ , а он IGFBP-2 који, преко претходно описаних механизма, потпомаже деобу ћелија.

#### 2.4.4.6.1 IGFBP-2 и терапија тумора

Улога IGF система у етиологији тумора је више пута доказана, те су елементи овог система постали главни кандидати за терапију тумора (*Mohanraj & Oh, 2011*). Већ је објашњено да IGF пептиди стимулишу раст туморских ћелија преко IGF-1R. Биодоступност IGF контролишу IGFBP, од којих је за контролу раста тумора најважнији IGFBP-2. Додатно, IGFBP-2 има и самосталну улогу у процесу туморогенезе (*Russo et al., 2014*). Један од путева циљане инактивације IGFBP-2 јесте коришћење специфичних антитела (*Li et al., 2012*). Наиме, IGFBP-2 кога лучи тумор, изазива имуни одговор организма, што је забележено код пацијената са тумором дебелог црева, јајника или дојке (*Piura & Piura, 2010*). На основу ових сазнања, процењено је да би IGFBP-2 или његов део могли да се користе као потенцијалне мете имунотерапије. То је недавно и демонстрирано *in vivo*, на животињском моделу рака дојке. Дизајнирана је вакцина чији су састојци (антитела) циљано деловали на пре-експримиран IGFBP-2, што је спречило даље напредовање тумора (*Disis et al., 2013*). Од недавно се истражује потенцијална терапеутска улога мутантних облика IGFBP-2, који су резистентни на деловање протеаза и који се не везују за матрикс (*Soh et al., 2014*). Такође се ради и на инхибиторима раста тумора, који би директно деловали на производњу IGFBP-2 (РНК интерференција), онемогућавајући интеракције које не зависе од IGF пептида (*Fukushima et al., 2007*).

#### 2.4.4.6.2 IGFBP-2 и тумор дебелог црева

Тумор (рак) дебелог црева (колоректални канцер или карцином) настаје на слузокожи црева. Појави рака најчешће претходе неопластичне, пре-канцерозне израслине у виду полипа и/или аденома (*Moser et al., 1992*). Велики број ћелија овог тумора (преко 80 %) има мутацију на карактеристичном тумор супресорном гену APC (adenomatous polyposis coli), што изазива поремећај регулације раста ћелија и онкогене трансформације (*Burgess, 1998; Rowan et al., 2000*). Мутације на APC гену утичу на регулацију и деградацију  $\beta$  катенина, протеина који контролише међућелијску адхезију (*Valenta, 2012*).  $\beta$  катенин може ући и у једро, где модификује експресију великог броја гена укључујући и оног за IGFBP-2 (*Naishiro et al., 2005*).  $\beta$  катенин повећава експресију IGFBP-2 и подстиче инвазивност ћелија, како системски, у циркулацији, тако и локално, у периферном ткиву.

Иако су концентрације појединих елемената IGF система значајно повећане код тумора дебелог црева, постоје неслагања око улоге IGFBP-2. Према неким истраживачима, IGFBP-2 остварује активаторну, а према другим инхибиторну улогу. Одређени *in vitro* експерименти су показали да IGFBP-2 може инхибирати пролиферацију ћелијских линија рака дебелог црева које су осетљиве на IGF (*Hoeflich et al., 1998; Corkins et al., 1995*). Инхибиторна улога IGFBP-2 је показана и на трансгеним мишевима који производе IGFBP-2 у великој концентрацији, а који су били изложени канцерогеним условима заједно са дивљим сојем. Иако је учесталост појаве тумора била упоредива код оба соја, запремина формираних аденома је била значајно мања код мишева мутаната, а концентрација IGFBP-2 у крви је била у негативној корелацији са запремином тумора (*Diehl et al., 2009*). Друга студија је, међутим, показала да и нормалне и измењене ћелије дебелог црева производе IGFBP-2, али је он протеолизован само у измењеном ткиву (*Michell et al., 1997*). У овом случају протеолиза IGFBP-2 доводи до отпуштања IGF, првенствено IGF-II, који се везује за IGF-1R, стимулишући деобу ћелија (*Miyamoto et al., 2007*).

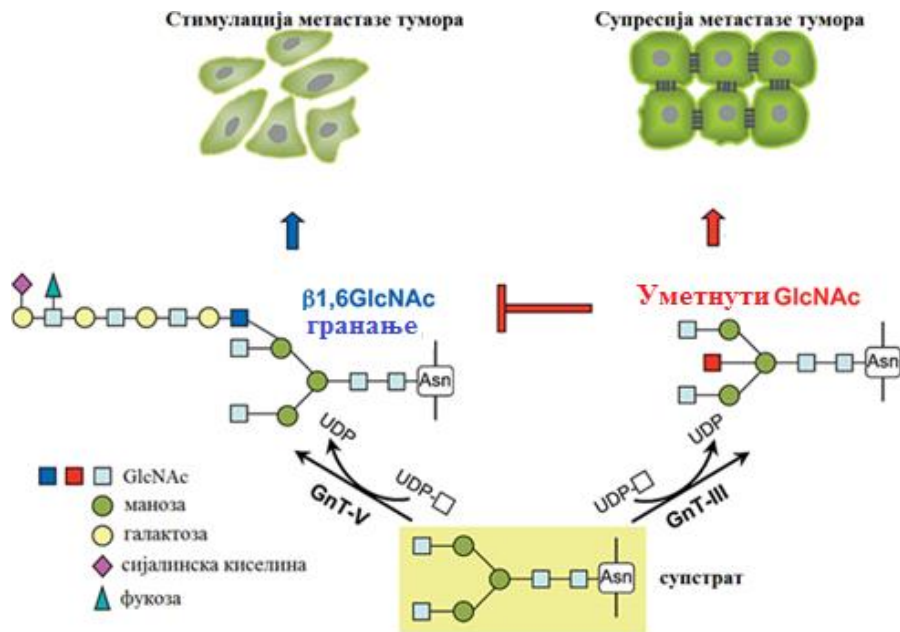
#### 2.4.4.6.3 Промена образаца гликозиловања код неопластично трансформисаних ћелија

Пошто су у оквиру ове дисертације проучавани комплекси IGFBR-2/ $\alpha$ 2M, као и фактори који утичу на њихово формирање, гликозиловање  $\alpha$ 2M би могло бити један од тих фактора. Промена образаца гликозиловања се сматра универзалном фенотипском променом која захвата ћелије тумора (*Kim & Varki, 1997*). Малигна трансформација је често повезана са растом масе мембранских гликопротеина (*Buck et al., 1971*), као и са појавом олигосахаридних структура које до тада нису постојале на површини ћелија или су постојале само у феталном развоју (*Dennis & Laferte, 1987*). У туморским ћелијама се повећава експресија одређених гликозилтрансфераза, које мењају гликане у циљу подстицања метастазе и инвазивности тумора (нпр. N-ацетилглюкозаминилтрансфераза V, GnT-V), а истовремено се инхибирају гликозилтрансферазе одговорне за синтезу сахараида који врше супресију раста тумора (нпр. N-ацетилглюкозаминилтрансфераза III, GnT-III) (*Gu et al., 2009*).

Показано је да одређене туморе карактеришу специфично измењени обрасци гликозиловања. Код тумора панкреаса је повећано фукозиловање N-гликана хаптоглобина у крви (*Okuyama et al., 2006; Miyoshi & Nakano, 2008*), код тумора простате је повећано присуство остатака Sia на PSA (*Sarrats et al., 2010*) а код тумора јајника и дојке је већа експресија Луисових структура (*Saldova et al., 2007; Saldova et al., 2011*). Ови измењени обрасци гликозиловања би могли послужити као биомаркери, уколико се даљим клиничким испитивањем испостави да су специфични за одређену врсту тумора.

GnT-III врши трансфер GlcNAc на манозу (Man) N-гликана уз формирање „уметнуте“ везе, као што је приказано на **слици 11**. Увођење уметнутих GlcNAc онемогућава  $\beta$ 1,6GlcNAc гранање (које катализује GnT-V), а које је повезано са инвазивношћу тумора (*Gu et al., 2009*). Код измењених ћелија епитела дебелог црева нађен је смањен садржај N-гликана са уметнутим GlcNAc (*Balog et al., 2012*).





Слика 11. Реакције гликозиловања катализоване глукозилтрансферазама GnT-III и GnT-V. Прекомерна експресија GnT-V код епителних ћелија доводи до промене структуре гликана која онемогућава међућелијске везе и повећава миграцију. Прекомерна експресија GnT-III ојачава међућелијске контакте и инхибира миграцију (Gu et al., 2009).

### 3. Материјал и методе

#### 3.1 Основне хемикалије

У раду су коришћене хемикалије набављене од следећих произвођача:

Abcam, Кембриџ, Велика Британија

ELISA комплет за одређивање концентрације IGFBP-2

Рекомбинантни хумани IGFBP-2

BCA Protein Quantification Kit

Bio-Rad laboratories, Хертфордшир, Велика Британија

Молекулски маркери за електрофорезу

Biotium, Хејвард, Калифорнија, САД

CF-155 флуоресцентна боја конјугована за стрептавидин

ICN Biomedicals, Коста Меса, САД

Акриламид

Натријум-азид

Трис(хидроксиметил)-аминометан (Tris)

KODAK, Париз, Француска

Хемикалије за развијање и фиксирање рендген филмова

Рендген филм МХВ (100 NIF – 13 x 18)

Merck, Дармштад, Немачка

Сахароза

Tween-20

Merck-Alkaloid, Скопје, Македонија

Манган-хлорид

Натријум-дихидрогенфосфат

Натријум-хидрогенфосфат

PerkinElmer Life and Analytical Sciences, Бостон, САД

Нитроцелулозна мембрана (0,45  $\mu\text{m}$ ), Whatman protran

Pierce, Минеаполис, САД

ECL реагенс

Pierce Biotechnology, Рокфорд, САД

Комплет за имунопреципитацију – Pierce Coimmunoprecipitation kit

Sigma-Aldrich, Сент Луис, САД

Амонијум-персулфат

Arg-Gly-Asp-Ser (RGDS) пептид

Arg-Gly-Glu-Ser (RGES) пептид

Динитрофенилхидразин (DNP)

Етаноламин

Глицин

4-(2-хидроксиетил)-1-пиперазин-етансулфонска киселина (HEPES)

Коктел инхибитора протеаза

Молекулски маркери за електрофорезу

N,N' – метилен бисакриламид

N,N,N',N' – тетраметилен-диамин (TEMED)

Натријум-додецил-сулфат (SDS)

Ponceau S

Табела 1. Списак лектина набављених од Vector Laboratories, Бурлингем, САД

Лектин	Порекло	Специфичност
<b>AAL<sup>+</sup></b>	<i>Aleuria aurantia</i>	Fuca(1,6)GlcNAc Fuca1,3(Gal β1,4)GlcNAc
<b>ConA<sup>*+</sup></b>	<i>Concanavalin A</i>	Високо-манозни типови N-гликана Manα1,6(Man α1,3)Man
<b>GNL<sup>+</sup></b>	<i>Galanthus nivalis</i>	Високо-манозни типови N-гликана Manα(1,6)(Manα1,3)Man
<b>GSL-II<sup>+</sup></b>	<i>Griffonia simplicifolia</i>	Агалактизовани три/тетра-антенарни N-гликани који се завршавају са GlcNAc
<b>HHL<sup>+</sup></b>	<i>Hippeastrum hybrid</i>	Високо-манозни типови N-гликана, Manα(1,3)Man, Manα(1,6)Man
<b>LCA<sup>*+</sup></b>	<i>Lens culinaris</i>	α-D-глукоза, α-D-маноза код N-гликана са Fuca(1,6) GlcNAc
<b>MAL-II<sup>+</sup></b>	<i>Maackia amurensis</i>	Завршна α2,3Sia везана за галактозу
<b>PNA<sup>+</sup></b>	Кикирики (peanut)	Galβ(1,3)GalNAc
<b>PHA-E<sup>*+</sup></b>	<i>Phaseolus vulgaris</i> еритроаглутинин	Би/три-антенарни N-гликани комплексног типа са завршном Gal и уметнутим GlcNAc
<b>PHA-L<sup>+</sup></b>	<i>Phaseolus vulgaris</i> леукоаглутинин	Три/тетра-антенарни N-гликани комплексног типа
<b>RCA-I<sup>*+</sup></b>	<i>Ricinus communis</i>	Три/тетра-антенарни N-гликани комплексног типа, Galβ(1,4)GlcNAc GlcNAcβ(1,4) GlcNAc, олигомери хитина
<b>WGA<sup>+</sup></b>	Пшеничне клице (wheat-germ)	сијалинска киселина
<b>SNA<sup>*+</sup></b>	<i>Sambucus nigra</i> (зова) аглутинин	Завршна α2,6 Sia везана за Gal или GalNAc
<b>AAL<sup>+</sup></b>	<i>Aleuria aurantia</i>	Fuca(1,6)GlcNAc, Fuc α1,3(Gal β1,4)GlcNAc

Табела 2. Лектин набављен од TCI Еуроге, Цвијндрахт, Белгија

Лектин	Порекло	Специфичност
<b>AOL<sup>+</sup></b>	<i>Aspergillus oryzae</i>	Fuca(1,6)GlcNAc (језгарна фукоза)

\*- лектини имобилизовани на агарози

+ - биотиниловани лектини

Zorka Pharma, Шабац, Србија

Динатријум-етилендиамин-тетрасирћетна киселина (EDTA)

Глицерол

Хлороводонична киселина

Калцијум-хлорид

Метанол

Натријум-хидроксид

Натријум-хлорид

Цинк-хлорид

### **3.2 Пуфери и раствори**

#### Имуноафинитетна хроматографија (IAC)

TBS пуфер (основни) – 10 mM Tris-HCl / 1,5 M NaCl, pH 7,4

Елуциони пуфер (ЕП) – 0,1 M глицин-HCl, pH 2,5

Неутрализациони пуфер (НП) – 1M Tris-HCl, pH 8,0

#### Имунопреципитација

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

Елуциони пуфер (ЕП) – 0,1 M глицин, pH 2,8

Неутрализациони пуфер (НП) – 2M Tris-HCl, pH 8,9

#### Лектинска афинитетна хроматографија (LAC)

HBS пуфери (основни):

ConA (пуфер А) – 20 mM HEPES / 0,5 M NaCl / 0,08 % NaN<sub>3</sub> / 1mM CaCl<sub>2</sub>/ 1mM MgCl<sub>2</sub> / 1mM MnCl<sub>2</sub>, pH 7,5

LCA (пуфер В) – 10 mM HEPES / 0,08 % NaN<sub>3</sub> / 0,1 mM CaCl<sub>2</sub> / 0,01 mM MnCl<sub>2</sub>, pH 7,5

RCA-I (пуфер С) – 10 mM HEPES / 0,15 M NaCl / 0,08 % NaN<sub>3</sub>, pH 7,5

SNA (пуфер D) – пуфер C + 0,1 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7,5

РНА-Е (пуфер E) – пуфер C + 0,1 mM CaCl<sub>2</sub> + 0,01 mM MnCl<sub>2</sub>, pH 8,0

Неутрализациони пуфер (НП) – 2 М Tris-HCl, pH 8,9

#### Електрофореза и имуноблот

30 % акриламид – акриламид / бисакриламид

Пуфер за прављење гела за концентровање (stacking buffer) – 0,5 М Tris-HCl, pH 6,8

Пуфер за прављење гела за раздвајање (running buffer) – 1,5 М Tris-HCl, pH 8,8

PBS – 50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> / NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> / 0,15 М NaCl, pH 7,5

Пуфер за узорке (ПЗУ) – 0,125 М Tris-HCl / 4 % (m/V) SDS / 20 % глицерол / 0,01 % бром-фенол плаво / 10 % β меркаптоетанол, pH 6,8

Пуфер за електрофорезу – 25 mM Tris-HCl / 0,19 М глицин / 10 % (m/V) SDS, pH 8,3

Пуфер за електротрансфер (пуфер за „блотованье“) – 25 mM Tris-HCl / 0,19 М глицин / 20 % метанол / pH 8,3

TBST пуфер – 10 mM Tris-HCl / 0,15 М NaCl / 0,1 % Tween-20, pH 7,4

#### Изоловање хелијских мембрана из здравог и туморског ткива дебелог црева

Раствор за узорке – 250 mM сахароза, инхибитори протеаза

HBS – 50 mM HEPES / 0,15 М NaCl / 1 g NaN<sub>3</sub>, pH 7,5

1 % Triton X-100

#### Дериватизација протеина са DNP

10 % трихлорсирћетна киселина (ТСА)

0,01 М 2,4 динитрофенилхидразин (DNP) у 2 М HCl

1:1 етанол:етил-ацетат

2 % SDS у 0,1 М фосфатном пуферу

2 М HCl

### 3.3 Смоле

AminoLink Plus Coupling Resin – Pierce Biotechnology, Рокфорд, САД

IAC смола – Proteomlab IgY-12 High Capacity Proteome Partitioning Kit, Beckman Coulter, Фулerton, САД

### 3.4 Антитела

Поликлонско анти- $\alpha$ 2М антитело (кунић), AbD Serotec, Кидлингтон, Велика Британија

Поликолонско анти-DNP антитело (кунић), Sigma-Aldrich, Сент Луис, САД

Поликлонско анти-IGFBP-2 антитело (кунић), GroPer, Аделаид, Аустралија

Поликлонско анти-IGFBP-2 антитело (коза), DSL, Вебстер, САД

Поликлонско анти-IGFBP-2 антитело (коза), Santa Cruz Biotechnology Inc, Санта Круз, САД

HRP-конјуговано анти-козје IgG антитело (свиња), Biosource, Камарило, САД

HRP-конјуговано анти-кунић IgG антитело (овца), AbD Serotec, Кидлингтон, Велика Британија

### 3.5 Уређаји и апарати

Вага аналитичка, Tehnica, Марибор, Словенија

Вага техничка, Чуо, Micro Precision Calibration Inc, Грас Вели, САД

Вортекс ZX3, Velp, Усмат, Италија

Кинетор MR-1, ЛКВ, Беч, Аустрија

InnoScan 710 laser fluorescent scanner, Innopsys, Карбон, Француска

Комбиновани рН/кондуктометар InoLab 720, WTW, Минхен, Немачка

Магнетна мешалица, ARE, Velp, Усмат, Италија

Систем за електрофорезу Mini-PROTEAN Tetra Cell, Bio-Rad Laboratories, Херкулес, Калифорнија

SpotBot 3 Personal Microarrayer Protein Edition, Arrayit Corporation, Санивејл, САД-  
*уређај је коришћен у Словачкој, у оквиру сарадње са Словачком Академијом наука*

Стаклене плочице - чипови Nexterion Slide E, Schott, Јена, Немачка

Ултрацентрифуга, Beckman-Coulter, Нион, Швајцарска

Филтри за ултрафилтрацију од 10, 30, 50 и 100 kDa, Microcon, Merck Milipore,  
Дармштат, Немачка

Центрифуга MiniSpin plus, Eppendorf, Хамбург, Немачка

Центрифуга ЛЦ-321, Tehnica, Марибор, Словенија

### **3.6 Узорци серума и ткива**

У извођењу експеримената коришћени су узорци серума одраслих особа. У студији су, као контролна група, коришћени серуми 150 добровољаца, распона година од 20 до 80, који су по потреби узимани у зависности од тренутних параметара који су се пратили у одређеном експерименту. Донори су били здрави, што је потврђено стандардним биохемијским испитивањима, односно одређивањем параметара који су били у границама референтних вредности. Појединци од којих је узет серум су били непушачи, нису конзумирали велике количине алкохола и психоактивних супстанци, и нису били на посебном режиму исхране. Осим контролних серума, коришћени су и серуми особа са одређеним патолошким променама у организму, које су дијагностификоване у КБЦ „Бежанијска коса“.

Поред серума су коришћени и узорци ткива оболелих од рака дебелог црева. Код рада са ткивним узорцима, као контроле су коришћени делови ткива истих особа који нису били захваћени патолошким променама.

За одређене експерименте, коришћени су посебни типови узорака серума и ткива:

#### **1. Спортисти:**

n=17, старост 16-18 година, ВМІ 20-23 kg/m<sup>2</sup>. Сакупљани су узорци серума професионалних играчица рукомета, чланица прволигашког тима из Крагујевца и националне репрезентације.



## 2. Особе са измењеним липидним статусом:

n=17, старост 40-60 година. Концентрације триацилглицерола и укупног холестерола у серуму су биле значајно веће од референтних (референтна граница за триацилглицероле је до 2,3 mM, а у узорцима су измерене концентрације > 5 mM; за укупни холестерол граница је до 6,2 mM, у узорцима је измерено > 9 mM).

## 3. Особе са измењеним метаболизмом глукозе:

n=15, старост 40-60 година. Концентрација глукозе у серуму је била значајно већа у односу на референтни опсег (референтни опсег је 4,2-6,4 mM, а у узорцима је измерено > 10 mM).

## 4. Особе оболеле од рака дебелог црева:

n=29 за серуме и n=15 за ткивне исечке дебелог црева; старост оболелих 54-76 година, BMI 16-30 kg/m<sup>2</sup>. Узорци су сакупљени на дан операције, у КБЦ „Бежанијска коса“. Патолози су на лицу места диференцирали и одвајали здрав део ткива од туморског.

## 5. Особе оболеле од различитих типова тумора

n=14 за серуме оболелих од тумора јетре (6 мушкараца и 8 жена); n=15 за серуме оболелих од тумора панкреаса (7 мушкараца и 8 жена); n=14 за серуме оболелих од тумора плућа (8 мушкараца и 6 жена); n=15 за серуме оболелих од тумора простате; n=10 за серуме оболелих од тумора дојке; n=12 за серуме оболелих од тумора грлића материце; n=8 за серуме оболелих од тумора јајника.

### **3.7 Одређивање концентрације протеина**

За одређивање концентрације протеина у узорцима, коришћена је ВСА метода, тј. интеракција протеина са бицинхонинском киселином, по упутству произвођача (Absam).

### **3.8 Одређивање концентрације IGFBP-2**

Концентрација IGFBP-2 је одређена ELISA методом, при чему су референтне вредности за серум износиле 2,7-27,8 nM (100-1000 ng/ml) по упутству произвођача (Abcam).

### **3.9 Одређивање специфичности антитела**

Тема овог рада је испитивање расподеле молекулских облика IGFBP-2 у здравом организму и у одређеним патолошким стањима, насталим услед патолошких промена. Молекулски облици IGFBP-2 се могу детектовати реакцијом специфичних антитела са узорком. Иако теоријски, начин изоловања и извор антитела не би требало да утичу на способност детекције различитих молекулских облика протеина, у пракси то није увек тако. Наиме, показало се да антитела различитих произвођача не могу увек специфично да препознају све облике, те је стога потребно тестирати више антитела и изабрати она која то могу. Да би се утврдило која су антитела најбоља за анализу присуства свих облика IGFBP-2, тестиране су три врсте антитела од три различита произвођача, и то: GroPep, Santa Cruz и DSL. Као узорци су коришћени серум (1:10 у PBS) и семинална плазма као позитивна контрола за IGFBP-2.

После електрофорезе и трансфера протеина на мембрану, узорци су инкубирани са одговарајућим антителима на 4 °C преко ноћи. Следећег дана мембране су инкубирани у одговарајућим секундарним антителима обележеним са HRP и изложене деловању ECL супстрата, а хемилуминесцентни сигнал је детектован помоћу рендген филма.

### **3.10 Молекулска филтрација**

Један од начина изоловања молекулских облика IGFBP-2 је методом диференцијалне филтрације. Серуми су филтрирани центрифугирањем кроз

молекулска сита (сукцесивно) чије поре задржавају молекуле маса већих од 100, 50, 30, односно 10 kDa. Процес филтрације је изведен у складу са процедуром прописаном од стране произвођача (Merck Milipore).

### **3.11 Имуноафинитетна хроматографија (IAC)**

За имуноафинитетну хроматографију употребљена је IgY смола у микроспин колонама. Матрикс је садржао имобилизована антитела на једанаест најприсутнијих протеина у хуманом серуму: албумин, трансферин, имуноглобулин Г, имуноглобулин А, имуноглобулин М, HDL аполипопротеини I и II, хаптоглобин,  $\alpha$ 1-антитрипсин,  $\alpha$ 1-кисели гликопротеин и  $\alpha$ 2M. Матрикс (1,2 ml) је инкубиран са 0,5 ml серума разблаженог 1:25 у основном пуферу, рН 7,4 на собној температури, користећи ротатор. Невезани протеини су уклоњени центрифугирањем на 2000 x g у периоду од 30 s и потом је матрикс три пута испран са основном пуфером. Протеини који су се везали за имобилизована антитела су елуирани са 1,5 ml ЕП, у три порције по 0,5 ml. Елуиране фракције су неутралисане са НП, рН 8,0. Матрикс је потом неутралисан са 0,6 ml 2 M Tris-HCl рН 8,0 и три пута испран са основном пуфером пре доношења новог узорка.

### **3.12 Лектинска афинитетна хроматографија (LAC)**

Колоне у којима је била агароза са везаним лектинима (SNA, LCA, ConA, РНА-Е и RCA-I) уравнотежене су са HBS пуфером. Потом је на њих нанет 1 ml серума разблажен 1:10 у HBS пуферу и у наредних 1 h извршена је рецикулација узорка. Невезани протеини су уклоњени са 20 ml HBS пуфера. Везани протеини су елуирани хаптенским угљеним хидратом раствореним у 7 ml 0,1 M сирћетне киселине, рН 3,0. Елуирање са РНА-Е агарозе је извршено са 10 ml 0,1 M сирћетне киселине без присуства хаптена. Гликопротеини са осталих колона су елуирани коришћењем следећих хаптена: 0,5 M лактоза за SNA агарозу, смеша 0,2 M метил- $\alpha$ -глукопиранозида и 0,2 M метил- $\alpha$ -манопиранозида за LCA и ConA агарозу, и 0,2 M

лактоза за RCA-I агарозу. Фракције са највећом концентрацијом протеина су скупљене и неутралисане са НП пуфером, рН 8,9. Дијализа неутралисаних фракција је изведена наспрам 0,15 М NaCl на 4 °C преко ноћи. Фракције су сконцентроване до запремине 1 ml уз помоћ филтера за ултрафилтрацију лимита од 10 kDa.

### **3.13 Имунопреципитација (ИП)**

За имобилизацију антитела наспрам  $\alpha 2M$  или IGFBP-2 коришћена је комерцијална активирана смола. На 50  $\mu$ l матрикса је додата запремина раствора антитела која одговара количини од 5  $\mu$ g протеина. Са имуноафинитетним смолама је извршена инкубација 200  $\mu$ l серума разблаженог 1:20 у TBS пуферу, на 4 °C, преко ноћи. Невезани протеини су уклоњени центрифугирањем на 2000 x g у периоду од 30 s и матрикс је три пута испран са TBS пуфером. Везани протеини су елуирани коришћењем ЕП, прво инкубацијом са 10  $\mu$ l ЕП, 5 min на собној температури, а потом са 2 x 50  $\mu$ l ЕП, тако да је укупна запремина елуата износила 110  $\mu$ l. Елуати су неутралисани са НП, рН 8,9.

### **3.14 Дериватизација протеина са DNP**

За поступак дериватизације протеина серума коришћен је раствор протеина концентрације 10 mg/ml. Узорак серума (0,5 ml) је помешан са 0,25 ml 10 % TCA и после 5 min центрифугирања на 1500 x g, супернатант је одбачен. Раствор DNP (0,01 М 2,4-DNP у 2 М HCl; 0,25 ml) је додат талогу, суспензија је промешана на Vortex-у и инкубирана 30 min на 25 °C, уз периодично мешање. Поново је додат раствор TCA и суспензија је центрифугирана као и раније. Талог је два пута испран са 1 ml смеше етанол:етил ацетат (1:1), да би се уклонио DNP. Талог је растворен у 1,5 ml 2 % SDS у 0,1 М фосфатном пуферу, рН 8,0 и инкубиран на 37 °C током 10 min са периодичним мешањем, ради потпуне хомогенизације. Апсорбанција раствора је мерена на 370 nm насупрот 2 М HCl. Сваки узорак је третиран на исти начин без DNP у раствору HCl, да би се одредила и елиминисала неспецифична апсорбанција.

Садржај протеинских карбонила, PCO (protein carbonyles) је одређен коришћењем моларног екстинкционог коефицијента 22000 1/М cm. Дериватизација мембранских протеина је извршена на исти начин, с тим што је почетна концентрација протеина износила 1 mg/ml.

### **3.15 Изоловање ћелијских мембрана из ткива дебелог црева**

Исечци ткива дебелог црева добијени су из КБЦ „Бежанијска коса“. За сваког пацијента су коришћена два узорка уклоњеног црева: туморски узорак и узорак црева који није био захваћен променама, који је сматран здравим ткивом. Масе почетних узорака здравог ткива су биле 3-10 g, док је маса туморски измењеног ткива била 1-5 g. Анализа је рађена са укупно 15 узорака у пару, који су потицали од 15 различитих пацијената.

Циљ овог дела експеримента је било изоловање мембрана ћелија дебелог црева и испитивање присуства IGFBP-2, MMP-7 и  $\alpha 5$  подјединице интегрин на њиховој површини. Прва фаза изоловања подразумевала је грубу хомогенизацију ткива, које је предходно суспендовано у 250 mM сахарози, уз додатак коктела инхибитора протеаза, користећи штапни хомогенизер са ножевима. После грубе хомогенизације, уклоњени су крупнији остаци ткива и приступило се хомогенизацији хомогенизером са тефлонским наставком. Обе хомогенизације су урађене на хладно. По завршеној хомогенизацији, суспензија је центрифугирана на 3000 x g, на 10 °C , 20 min. Талог је одбачен, а супернатант је ултрацентрифугиран на 42 000 x g, на 10 °C, 70 min. После ултрацентрифугирања, добијени талог је садржао ћелијске мембране. Талог је испран хладним HBS пуфером, на тефлонском хомогенизеру. Суспензија је поново ултрацентрифугирана на 42 000 x g, 40 min. Супернатант је одбачен, а талог суспендован у HBS пуферу и хомогенизован на тефлонском хомогенизеру до добијања суспензије мембрана. У суспензију је додат нејонски детергент Triton X-100 и суспензија је мешана на магнетној мешалици у периоду од 1 h, у хладној соби. У овом кораку је урађена солубилизација ћелијских мембрана. Добијена суспензија је поново ултрацентрифугирана на 42 000 x g, на 10 °C, 90 min.

Супернатант, у коме су се налазили солубилизовани мембрански протеини, је чуван на  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Концентрација укупних протеина у изолатима мембрана је била 0,1-1 mg/ml, за здрава ткива, док је код туморских концентрација била 0,2-2,5 mg/ml.

### **3.16 Електрофореза (SDS-PAGE) и имуноблот**

Присуство и распоред протеина у узорцима су испитан методом SDS електрофорезе и имуноблота. Електрофоретско раздвајање протеина урађено је према стандардној процедури. Узорци серума су разблажени (1:20) у PBS пуферу, док узорци ткивних изолата нису разблаживани. Обе врсте узорака су помешане са ПЗУ у односу 1:1. Експреименти су извођени под редукујућим условима, уз додатак 10 %  $\beta$  меркаптоетанола у ПЗУ. Сам процес електрофорезе је урађен под напоном од 200 V. После електрофорезе, протеини су „пренети“ на нитроцелулозну мембрану методом „мокрог“ трансфера, при напону од 100 V, током 1 h. По завршетку трансфера, мембрана је „блокирана“ у 5 % раствору одмашћеног млека у 10 mM TBST пуферу, pH 7,4, током 45 min. Мембрана је неколико пута испрана са TBST-ом и инкубирана у раствору одговарајућих примарних антитела на  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ , преко ноћи. Мембрана је поново испрана неколико пута TBST-ом (6 x 5 min), а потом је инкубирана у раствору са секундарним антителима конјугованим са HRP, 30 min. Након још једног поступка испирања (6 x 5 min), мембрана је инкубирана у раствору ECL реагенса. После 5 min, мембрана је изложена интеракцији са рендген филмом. Време експозиције је варирано, у зависности од врсте и концентрације узорака, да би се добиле што чистије траке протеина, са што мањим позадинским сигналом (обично између 20 и 40 min). Филм је развијан према стандардној процедури, употребом комерцијалних реагенаса следећим редом: 5 min у развијачу, 1 min у 1 % сирћетној киселини и 10 min у фиксиру.

### 3.17 Лектински блот

После стандардне електрофорезе и трансфера протеина, мембрана је преко ноћи блокирана у 3 % раствору BSA. Даље је инкубирана у раствору биотинилованог лектина (РНА-L, РНА-E, SNA, LCA и RCA-I), на собној температури, 1 h. Мембрана је испрана TBST пуфером (4 x 5 min) и инкубирана у раствору HRP-авидина, на собној температури, 1 h. Мембрана је поново испрана у TBST пуферу (4 x 5 min) и дестилованом водом. Након инкубације са ECL реагенсом, обележени протеини на мембрани су остављени да интерагују са рендген филмом.

### 3.18 Лиганд блот

За потребе лиганд блота, нитроцелулозна мембрана, на коју су пренети протеини, „блокирана“ је у неколико сукцесивних фаза:

- пуфер за концентровање за електрофорезу + 3 % детергент NP-40, 30 min,
- пуфер за концентровање за електрофорезу + 0,1 % TWEEN-20, 30 min и
- пуфер за концентровање за електрофорезу, 4 x 5 min.

Мембрана је даље инкубирана у TBST пуферу који је садржао радиоизотопом обележени лиганд  $^{125}\text{I}$ -IGF-I или IGF-II, активности  $5 \times 10^6$  cpm, преко ноћи на 4 °C. Мембрана је испрана TBST-ом (2 x 30 min) и TBS-ом (3 x 30 min), а затим је изложена интеракцији са рендген филмом.

### 3.19 Лектински микроереј

Протеин  $\alpha 2\text{M}$ , који је изолован имунопреципитацијом (поглавље 3.13) из серума здравих особа и пацијената са тумором дебелог црева, је нанет на комерцијалне стаклене плочице (чипове) активирани епоксисиланом, користећи аутоматизован уређај, тзв. „спотер“ у комори са дефинисаним условима околине: 14 °C и степен влажности 60 %. Сваки појединачни узорак је нанет на 14 идентичних поља („агау“-а) на плочици. Унутар сваког поља, сваки узорак је нанет у

пентапликату. Узорци су остављени да интерагују са носачем у комори, на собној температури и при степену влажности 80 %, 1 h. Вишак узорака је испран, а неизреаговане епоксидне групе су блокиране 1 M етаноламином у PBST-у под истим условима околине, 1 h. Пластице су интензивно испране PBS-ом. Четрнаест биотиниланих лектина (наведених у Табели 1) у PBST-у је нането на 14 поља, користећи наменски калуп (слика 12). Концентрација сваког лектина је оптимизирана и кретала се у опсегу 50-150  $\mu\text{g/ml}$ . Лектини су инкубирани са узорцима 1 h. Пластица је испрана и инкубирана у раствору стрептавидина (5  $\mu\text{g/ml}$  у PBS) за који је коњугована флуоресцентна боја CF-555, на собној температури, 15 min. Након завршног испирања пластице дестилованом водом, она је осушена и анализирана флуоресцентним скенером.



Слика 12. Изглед калупа за наношење биотиниланих лектина у лектинском микроереју

### 3.20 Дензитометријска анализа

За дензитометријску анализу сигнала на рендген филму је коришћен програм Image Total Laboratory v2.01 (Amersham BioSciences, Бакингемшир, Велика Британија). Резултати су изражени у произвољним дензитометријским јединицама, ADU (arbitrary densitometric units). За анализу сигнала после лектинског микроереја је коришћен програм Marix 5.5.0 (Innopsys).

### 3.21 Статистичка обрада података

За статистичку обраду података коришћен је програм Excel. За утврђивање статистички значајне разлике између узорака коришћен је Студентов t-тест.



## 4. Резултати и дискусија

IGFBP-2 је молекул који обавља двојаку улогу: транспортер је IGF пептида важних за раст ћелија и интерагује са интегринима на површини ћелија изазивајући процесе који не обухватају пренос сигнала посредством IGF рецептора. Концентрација IGFBP-2 расте у многим катаболичким стањима, омогућавајући IGFBP-2 да преузме улогу главног везујућег протеина од IGFBP-3. Иако се још увек не знају све последице ове замене, утврђено је да раст IGFBP-2 указује на активацију неповољних механизма у организму. У току су испитивања IGFBP-2 као биомаркера катаболизма, а посебно као туморског биомаркера. Констатовано је његово повећано присуство код разних врста тумора. И даље је непознато у којој мери су његове IGF зависне и независне улоге изражене у катаболизму. Према до сада познатим подацима, IGFBP-2 испољава своју пуну функцију када је у облику мономера. Фрагменти IGFBP-2 не везују IGF лиганде или врло слабо, а до израде ове дисертације нису били познати комплекси са другим протеинима.

У овој дисертацији је анализирано присуство различитих молекулских облика IGFBP-2 у физиолошким условима и испитана је њихова потенцијална промена у измењеним метаболичким стањима у организму. Такође је испитана могућност грађења комплекса овог протеина са другим молекулима из циркулације, као и (супра)физиолошки услови који би могли утицати на међусобни афинитет молекула при формирању комплекса. Постојање комплекса би могло утицати на равнотежу различитих молекулских облика IGFBP-2, односно комплекси би могли имати улогу регулатора слободног, мономерног IGFBP-2. У раду је испитан утицај редовних физиолошких промена као што су старење и појачана физичка активност, потом разних метаболичких фактора (нпр. концентрација глукозе, липида и слободних радикала), као и патолошких стања, као што је тумор.

## 4.1 Молекулски облици IGFBP-2 у циркулацији одраслих људи

### 4.1.1 Одређивање укупне концентрације IGFBP-2 у здравој популацији методом ELISA

Пре него што се приступило испитивању молекулских облика IGFBP-2 у разним (пато)физиолошким стањима, одређен је његов опсег концентрација у општој, одраслој популацији. Као репрезентативни узорци, изабрани су појединци са уредним биохемијским и хематолошким налазима крви, на основу којих би се могли сматрати здравим.

Одређивање концентрације је урађено методом ELISA, коришћењем комерцијалних реагенаса. Укупан број узорака је износио 45, а распон година је био од 20 до 80. У популацији су подједнако били заступљени мушкарци и жене. Да би се показао евентуални утицај старења на концентрацију овог молекула, група је разврстана у три категорије, по годинама: у младе (20-40 година), особе средњих година (41-60 година) и старије особе (61-80 година). Добијени бројчани резултати, приказани су у Табели 3.

**Табела 3.** Концентрација IGFBP-2 у серуму одрасле, здраве популације, класификоване по годинама и полу, изражена у nM, изражена као средња вредност са стандардном девијацијом

Млади (20-40 година)	Средња генерација (41-60 година)	Старија генерација (61-80 година)	Мушкарци	Жене
10,8±7,0	9,8±7,4	14,0±10,1	11,1±7,6	12,1±9,0

Распон концентрација у популацији је доста велики, у нашим испитивањима од 2 до 28 nM, што је у сагласности са налазима других истраживача (нпр. 2,7-27,8 nM у раду *Ranke et al., 2000*). Концентрација IGFBP-2 расте са годинама, што је,

такође, у складу са литературним подацима (*Rajaram et al., 1997; Mattsson et al., 2008*), али разлика између група није била статистички значајна. Ни пол испитаника није био од утицаја на концентрацију IGFBP-2 (у укупној популацији нити након разврставања по старосним групама).

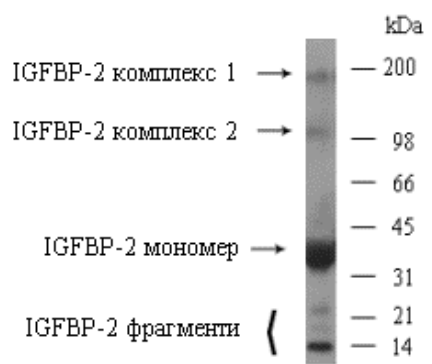
Наведеним ELISA тестом је одређена концентрација укупног IGFBP-2. У физиолошким условима, IGFBP-2 подлеже разградњи од стране протеаза, тако да осим мономера постоји и неколико фрагментисаних облика, који и даље могу бити препознати од стране антитела. Наиме, у серуму је пронађено осамнаест различитих фрагмената IGFBP-2 чије молекулске масе варирају у опсегу 4-21 kDa. Неки од њих задржавају одређени степен биолошке активности (поседују делимично очувану способност везивања IGF пептида и/или везивања за интегрине) (*Ho & Baxter, 1997; Kawai et al., 2011*). Биолошка улога фрагмената још увек није позната. Фрагменти у крви не потичу само од IGFBP-2 који је протеолизован у циркулацији, већ и од протеина који је ткивног порекла и чији фрагменти настају деловањем ткивних протеаза, а доспевају у циркулацију. Није искључено ни да IGFBP-2 у комплексу са неким другим протеином не може бити препознат од стране антитела и „учествовати“ у укупној концентрацији.

О свему наведеном треба водити рачуна при тумачењу добијених резултата мерења, с обзиром да доказану биолошку активност показује само мономерни облик IGFBP-2, чија је промена концентрације у различитим (пато)физиолошким стањима најважнија.

#### **4.1.2 Одређивање молекулских облика IGFBP-2 имуноблотом**

Откривање молекулских облика IGFBP-2 се радило посредним путем, њиховом интеракцијом са антителима, методом имуноблота. Да би се испитало која су антитела најбоља за детекцију свих молекулских форми, тестирана су три антитела различитих произвођача: GroPep, Santa Cruz Biotechnology и DSL. Детаљнији подаци о овим антителима могу се наћи у поглављу 3.4.

Тестирана су различита разблажења антитела и као оптимална су нађена 1:50 за GroPer, 1:1000 за Santa Cruz Biotechnology и 1:10000 за DSL. Електрофореза је рађена у редукујућим и нередукујућим условима. Показало се да антитела произвођача Santa Cruz Biotechnology дају специфичне траке за IGFBP-2 мономер и фрагменте, које су лако уочљиве при кратким експозицијама. Антитела произвођача DSL су дала специфичан одговор, али са великим позадинским сигналом, док су антитела произвођача GroPer идентификовала и већи број неспецифичних трака. Због тога је одлучено да се, за све остале експерименте, користе антитела произвођача Santa Cruz Biotechnology, у разблажењу 1:1000, као и да се ради у редукујућим условима. Резултат добијен коришћењем антитела овог произвођача приказан је на **слици 13**.



**Слика 13.** Имуноблот карактеристичних молекулских облика IGFBP-2 у серуму

На слици се могу видети три области у којима се јављају IGFBP-2 сигнали. На најмањим молекулским масама (између маркера 14 kDa и 31 kDa) се виде фрагменти IGFBP-2, на средњој молекулској маси (између маркера 31 kDa и 45 kDa) је трака која одговара мономеру IGFBP-2 (36 kDa), док се на већим молекулским масама (преко 98 kDa) запажају траке које би могле потицати од комплекса IGFBP-2 са другим протеинима. Молекулске врсте које би одговарале комплексима дају две траке, што говори у прилог томе да IGFBP-2 прави или комплексе са два различита протеина, или са олигомерним обликом неког протеина који у редукујућим условима

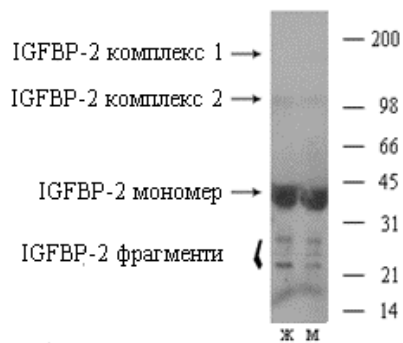
делимично дисосује, али задржава могућност интеракције са IGFBP-2. Ова недоумица је предмет истраживања у даљим експериментима.

#### 4.1.3 Утицај различитих (пато)физиолошких фактора на расподелу молекулских облика IGFBP-2

Као протеин који има (не)посредну улогу у одржавању интегритета ћелија и ткива, на деловање и синтезу IGFBP-2 утичу сви процеси у организму који на неки начин регулишу ћелијску и ткивну хомеостазу.

##### 4.1.3.1 Испитивање утицаја пола

Примарна улога полних хормона је обликовање полних карактеристика и регулација производње полних ћелија (андрогени и естрогени), као и одржавање трудноће (прогестогени). Међутим, полни хормони имају многе специфичне улоге у метаболизму. Једна од њих је и регулисање концентрације компоненти IGF система (*Hoeflich et al., 2014*). У овом раду је испитан могући утицај пола на расподелу молекулских облика IGFBP-2 у серуму. Урађен је имуноблот већег броја узорка серума жена и мушкараца, чији је репрезентативни резултат приказан на [слици 14](#).



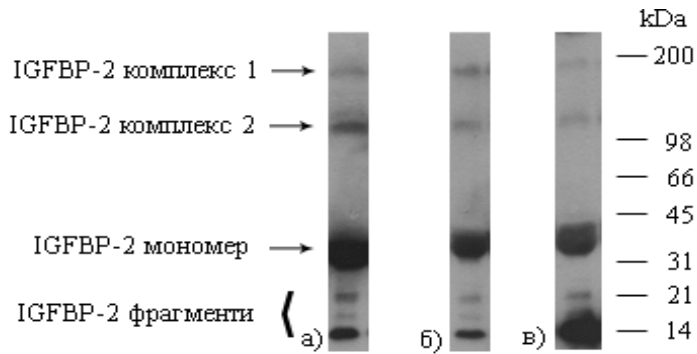
**Слика 14.** Расподела молекулских облика IGFBP-2 у репрезентативним серумима жене (Ж) и мушкараца (М)

Дензитометријска анализа трака је показала да између две групе узорака, односно мушкараца и жена, не постоји статистички значајна разлика и да је распоред и интензитет трака врло сличан (резултати нису приказани). Ранија истраживања су показала да полни хормони, као што су естрадиол, прогестерон и тестостерон, могу утицати на смањење или повећање производње IGFBP-2 у ткивима која су осетљива на ове хормоне (јајници на естрадиол и прогестерон, а простата на тестостерон) (Heald et al., 2005; Lee et al., 2006). Међутим, оно што треба имати на уму је да се локална, ткивна производња овог молекула не мора одразити на његову концентрацију у системској циркулацији. Наиме, произведени IGFBP-2 се може ”потрошити” у локалној средини, без ”преливања” у крвоток, испољавајући своја паракрина/аутокрин дејства. Према резултатима овог експеримента, утицај пола на расподелу молекулских облика IGFBP-2 у циркулацији је занемарљив. Оно што би било интересантно испитати је да ли овакав образац експресије важи и за локалну производњу у ткивима која су осетљива на дејство полних хормона.

#### 4.1.3.2 Испитивање утицаја старости

Концентрација IGFBP-2 у крви се смањује у периоду између рођења и пубертета, после чега постепено расте, а посебно после шездесете године (Rajaram et al., 1997; Mattsson et al., 2008). Пошто укупна концентрација IGFBP-2 расте са старењем, сасвим је могуће да се мења и расподела молекулских облика у којима се овај протеин налази. Да би се проверила ова претпоставка, урађен је имуноблот узорака серума одраслих особа разних животних доба, које су класификоване у три категорије: млади (20-40 година), средњих година (41-60 година) и старији (61-80 година). На **слици 15** су приказани типични IGFBP-2 профили.

На слици се може видети да је распоред молекулских облика IGFBP-2 исти код свих испитаних људи и независан од годишта, али је интензитет трака различит и зависи од годишта.



**Слика 15.** Распореда молекуларних облика IGFBP-2 код одраслих: а) 20-40 година, б) 41-60 година и в) 61-80 година

**Табела 4.** Релативна заступљеност молекуларних облика IGFBP-2 у узорцима серума особа различитих старосних категорија, изражена као средња вредност са стандардном девијацијом

Група (n=15)	20-40 година		41-60 година		61-80 година	
<b>IGFBP-2 комплекс 1</b> (ADU, %)	20±1	5,0±1,0	18±1	6,2±0,7	14±2 <sup>об</sup>	2,8±1,2 <sup>об</sup>
<b>IGFBP-2 комплекс 2</b> (ADU, %)	21±1	5,2±0,9	18±1	6,2±1,1	14±2 <sup>об</sup>	2,6±0,8 <sup>об</sup>
<b>IGFBP-2 мономер</b> (ADU, %)	270±4	65,6±6,3	200±3 <sup>а</sup>	64,5±6,0	180±17 <sup>б</sup>	38,2±5,4 <sup>об</sup>
<b>IGFBP-2 фрагмент 1</b> (ADU, %)	24±1	6,6±0,6	19±1 <sup>а</sup>	6,9±0,9	23±3	4,6±1,3 <sup>б</sup>
<b>IGFBP-2 фрагмент 2</b> (ADU, %)	17±1	5,6±0,5	13±2 <sup>а</sup>	5,0±0,9	42±4 <sup>об</sup>	11,4±6,6 <sup>об</sup>
<b>IGFBP-2 фрагмент 3</b> (ADU, %)	42±1	12,0±0,8	35±5	11,2±3,1	212±51 <sup>об</sup>	40,4±4,1 <sup>об</sup>

Статистички значајне разлике (Студентов *t*-тест,  $p < 0,05$ ) између особа старосне категорије 20-40 година и 41-60 година означене су као <sup>а</sup>, између старосне категорије 41-60 и 61-80 као <sup>б</sup>, и између старосне категорије 20-40 и 61-80 као <sup>в</sup>

Резултати дензитометријске анализе трака су дати у Табели 4. У табели су приказане две врсте података: интензитет појединачних трака (изражен у ADU јединицама) и релативне заступљености појединачних молекулских врста у односу на укупну имунореактивност узорка (изражене у процентима).

Као што се може видети са [слике 15](#) и из [Табеле 4](#), количина мономера IGFBP-2 је највећа код младих особа и чини отприлике 2/3 укупне количине IGFBP-2. Ова заступљеност постепено опада са годинама, до 1/3 укупне количине IGFBP-2 код старијих појединаца. У исто време, удео фрагмената расте са годинама живота. Када се израчуна релативна количина (%) фрагмената, разлике међу групама су веома изражене. У старосној категорији 61-80 година, фрагментисани облици IGFBP-2 доприносе са скоро 60 % укупној количини IGFBP-2, што је више него двострука вредност пронађена код млађих и средовечних особа. Комплексни облици представљају 10-12 % укупног IGFBP-2 у прве две групе, а потом опадају до двоструко мање количине код најстарије старосне категорије.

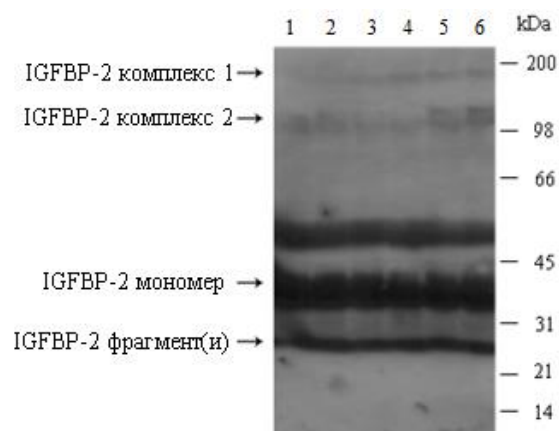
Мерењем укупне концентрације IGFBP-2 у општој, здравој популацији, установљено је да са старењем расте концентрација укупног IGFBP-2 (поглавље 4.1.1). Међутим, тај раст прати смањење мономерног и комплексног облика IGFBP-2, а повећање фрагментисаних врста. Према томе, са старењем се повећава протеолиза IGFBP-2, како мономерних, тако и комплексних облика. Знања о улози IGFBP-2 у процесу старења су контраверзна. Познато је да повећане концентрације овог молекула у старијем добу могу довести до слабљења мишићно-скелетног система и до појаве малигних трансформација ћелија (*van den Beld et al., 2003; Barton-Hay et al., 2004*). Са друге стране, његово смањење представља фактор ризика за појаву инсулинске резистенције и гојазности (*Wheatcroft et al., 2007*). Оно што је у експериментима изведеним у оквиру ове дисертације откривено је да се са старењем интензивира фрагментација IGFBP-2 и да тај догађај може довести до прекомерног отпуштања биоактивних IGF пептида или IGFBP-2 фрагмената који задржавају биолошку активност. Отпуштени IGF пептиди би могли вршити митогену активност на ћелијама и на тај начин додатно стимулирати неопластичну трансформацију, што би ишло у прилог учесталијој појави рака са старењем. Са друге стране, пошто и



сами фрагменти IGFBP-2 (барем неки од њих) могу испољити дејство које је независно од IGF пептида, они представљају агенсе који могу додатно стимулисати патолошке промене у ћелијама. Повећана активност IGF молекула би могла стимулисати и процес стварања додатних масних ћелија, као депоа за складиштење масти (*Scavo et al., 2004*), а недовољна количина целовитог IGFBP-2 би могла утицати на смањење осетљивост ћелија на инсулин (*Wheatcroft & Kearny., 2009*). Повезаност IGFBP-2 и инсулина објашњена је у Прегледу литературе, поглавље 2.4.4.2.

#### 4.1.3.3 Испитивање утицаја активног бављења спортом

Активно бављење спортом представља одређену врсту стреса за организам и утиче на метаболичке процесе, првенствено на експресију хормона и цитокина укључених у његову регулацију. Један од тих хормона је и IGF-I, а важни су и протеини који га транспортују до циљних ткива. У једном од експеримената се желело испитати да ли, и на који начин, интензивна физичка активност утиче на садржај одређених облика IGFBP-2. Као група испитаника узете су чланице рукометног тима из Крагујевца, од којих су неке и чланице националне репрезентације. Крв им је узета после два различита периода тренинга: после редовне сезоне такмичења и после временаведеног у кампу за тренинг у трајању од четири недеље, пред међународно такмичење, када је и интензитет тренинга био двоструко већи. Рукометашице су радиле тест оптерећења трчањем на траци, а крв им је узимана три пута (користећи браунилу): пре почетка теста, током теста у моменту максималне потрошње кисеоника (одређивано је  $VO_{2max}$ ) и након кратког опоравка (10 min). Издвојени серуми су подвргнути SDS електрофорези под нередукуюћим условима и имуноблоту са анти-IGFBP-2 антителима. Добијени резултати, са по једним репрезентативним узорком за свако узорковање (свих шест узорака су припадали истој особи), дати су на [слици 16](#).



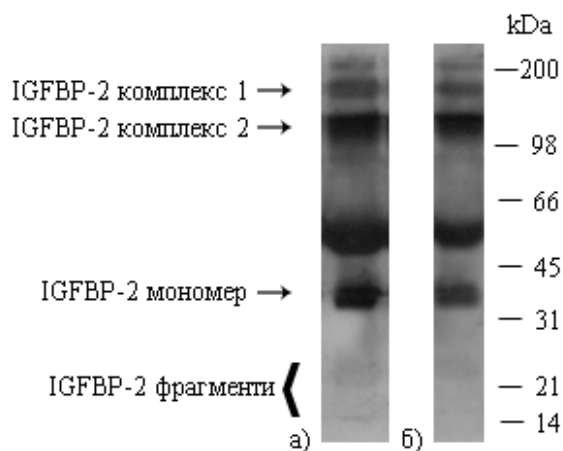
**Слика 16.** Расподела молекулских облика IGFBP-2 у серуму професионалних рукометашица: узорци 1-3 су узети после редовног тренинга, а 4-6 после припрема у кампу; узорци 1 и 4 су узете пре почетка теста оптерећења, 2 и 5 при  $VO_{2max}$ , а 3 и 6 после кратког опоравка

Дензитометријском и статистичком анализом је упоређено релативно присуство појединих облика IGFBP-2. Показано је да не постоји статистички значајна разлика у релативној заступљености молекулских облика IGFBP-2 (мономер, комплекси и фрагменти) у узорцима, без обзира да ли се упоређују узорци током једног теста оптерећења, или између тестова изведених после периода тренинга различитог интензитета.

Оно што је било интересантно у овом експерименту је појава додатне имунореактивне траке на маси између 45 и 66 kDa. Могло би се претпоставити да су антитела препознала молекулску врсту IGFBP-2 која би одговарала димерном облику. Пошто су услови припреме узорка за електрофорезу били нередукујући, вероватно су у већој мери очуване дисулфидне везе између мономерних молекула. До сада није показано у научним радовима да IGFBP-2 димеризује у организму, али пошто је познато да су спортисти изложени већем оксидативном стресу (*Powers & Jackson, 2008*) и да је код њих концентрација реактивних једињења кисеоника и других слободних радикала већа, могуће је да IGFBP-2 подлеже процесу димеризације услед интензивније оксидације.

#### 4.1.3.4 Испитивање утицаја липидног статуса

Претходне студије су показале да смањена концентрација IGFBP-2 у циркулацији негативно утиче на липидни профил. Особе чија је концентрација IGFBP-2 у крви испод одређене границе, имају повећану концентрацију укупних триацилглицерола, вишу вредност односа укупни холестерол/HDL-холестерол, као и већу концентрацију VLDL липопротеина (*Ginsberg et al., 2006*). У једном од експеримената је испитан могући утицај повећаних концентрација триацилглицерола и укупног холестерола на распоред молекулских облика IGFBP-2, односно на њихову релативну заступљеност. Упореди су серуми особа са нормалним (референтним) параметрима липидног статуса и особа које у исто време имају знатније повећану концентрацију укупних триацилглицерола (>5 mM) и холестерола (>10 mM). Распоред трака после имуноблота (и претходне електрофорезе под нередукујућим условима) са анти-IGFBP-2 антителом на репрезентативним узорцима је приказан на **слици 17**.



**Слика 17.** Расподела молекулских облика IGFBP-2 код: а) референтне и б) особе са измењеним липидним статусом (повећане концентрације)

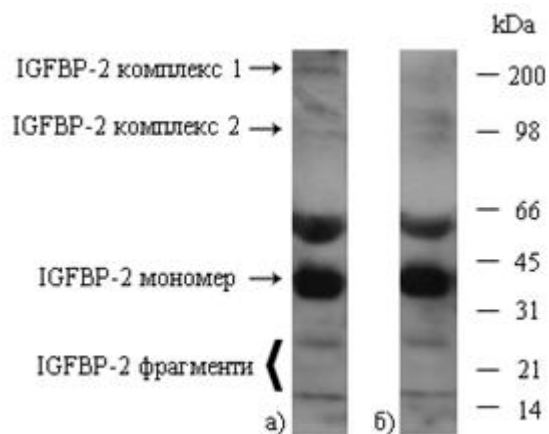
Дензитометријском анализом је утврђено да не постоји статистички значајна разлика између две групе узорака, односно да се распоред и интензитет трака које потичу од молекулских облика IGFBP-2 не разликују значајно код особа са

нормалним липидним статусом и оних са повећаним концентрацијама триацилглицерола и холестерола. Иако литературни подаци указују да повећане концентрације липида могу утицати на укупну концентрацију IGFBP-2, која је у том случају смањена (*Carter et al., 2014*), у нашем раду таква зависност није нађена. Пошто су у овом експерименту коришћени узорци у којима концентрације липида нису биле драстично повећане (око два пута у односу на горње референтне вредности), могуће је да се ефекат на IGFBP-2 може уочити тек код знатно већих концентрација липида.

#### 4.1.3.5 Испитивање утицаја концентрације глукозе

За IGFBP-2 се зна да је у позитивној корелацији са инсулинском осетљивошћу, односно да појединци који болују од дијабетеса типа 2 имају смањену концентрацију овог молекула у циркулацији (*Frystyk et al., 1999*). У складу са овим сазнањем, показано је да је код лабораторијских мишева код којих је трансгеним или аденовирусним техникама пре-експримиран IGFBP-2, ређа појава инсулинске неосетљивости изазване годинама и исхраном (*Wheatcroft et al., 2007*).

У наредном сету експеримената се желело испитати да ли повећана концентрација глукозе утиче на расподелу молекулских облика IGFBP-2 у циркулацији. Као контролни узорци, коришћени су серуми у којима је концентрација глукозе била у референтном опсегу, док се дијабетична група састојала од серума у којима је концентрација глукозе била знатно изнад горње референтне границе ( $> 10$  mM).



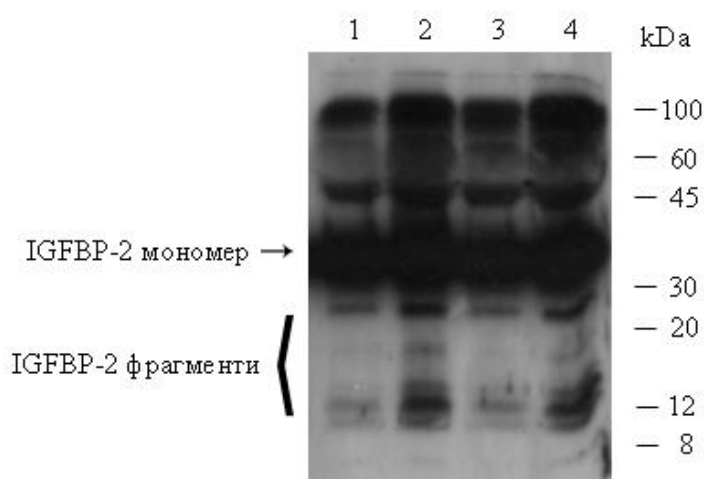
**Слика 18.** Расподела молекулских облика IGFBP-2 у репрезентативном: а) референтном и б) узорку дијабетичара

На **слици 18** су приказане имунореактивне траке за један репрезентативни референтни узорак и узорак једног дијабетичара. Распоред трака на електрофореграму показује да је број трака идентичан у оба узорка, а денситометријска обрада није указала на статистички значајне разлике између две групе узорака (резултати нису приказани). Иако литературни подаци наводе да код дијабетеса тип 2 може доћи до смањења концентрације IGFBP-2, у нашем случају то није забележено. Разлог може лежати у сличној чињеници као и код утицаја липидног статуса. Нису нам били познати подаци о дужини трајања болести, нити о стадијуму, па је могуће да се утицај дијабетеса на IGFBP-2 испољава тек после дужег периода изложености организма великим концентрацијама глукозе. Такође, пацијенти су периодично под бољом и лошијом контролом, те би ефекат могао бити уочљив тек после дужег периода ван или са смањеном контролом.

#### 4.1.3.6 Утицај протеаза

IGFBP-2 подлеже протеолизи од стране крвних и ткивних протеаза, чиме се смањује његов афинитет за IGF пептиде. Истраживања су показала да је код поремећаја ткивне хомеостазе, као у случају тумора, повећана синтеза протеазе

којима туморске ћелије себи обезбеђују селективну предност у преживљавању (*Koblinski et al., 2000*). У наредном експерименту се желело испитати да ли у туморски измењеним стањима IGFBP-2 подлеже повећаној протеолизи и да ли се на тај начин мења расподела молекулских облика у циркулацији. У контролне серуме здравих особа и серуме пацијената оболелих од тумора дебелог црева, додата је одређена количина егзогеног IGFBP-2 (рекомбинантног хуманог), тако да је његова концентрација значајно превазилазила физиолошку (неколико десетина пута). Тиме је поништен ефекат присуства ендогеног IGFBP-2 у серуму и могло се сматрати да протеазе делују на исту концентрацију IGFBP-2. У овом експерименту је испитивана активност MMP-7 протеазе, за коју је познато да специфично делује на IGFBP-2 у ткиву код тумора дебелог црева (*Miyamoto et al., 2007*). Урађена је електрофореза, трансфер протеина и имуноблот са анти-IGFBP-2 антителом. Добијени (репрезентативни) резултати дати су на **слици 19**.



**Слика 19.** Имуноблот са анти-IGFBP-2 антителом, који приказује расподелу молекулских облика IGFBP-2; 1: полазни серум здраве особе, 2: полазни серум пацијента са тумором дебелог црева, 3: серум здраве особе са додатим рекомбинантним IGFBP-2 и 4: серум пацијента са тумором дебелог црева са додатим IGFBP-2

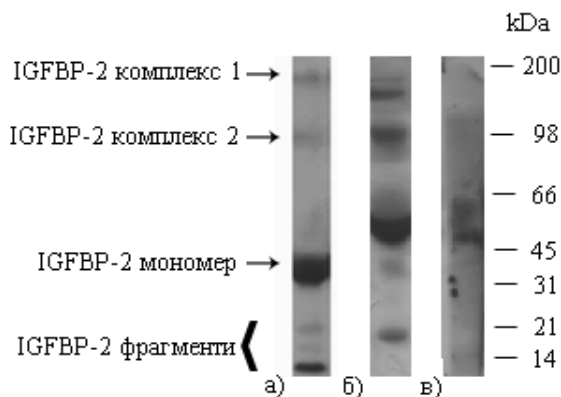
На слици се може запазити да се у серуму разликују три стандардне групе молекулских трака (комплекси, мономер и фрагменти IGFBP-2). Оно што разликује туморски узорак од здравог је повећан интензитет трака које потичу од фрагмената. Литературно је већ показано да је концентрација IGFBP-2 у крви већа код пацијената са тумором дебелог црева, што може бити последица повећане синтезе овог протеина, централно, у јетри, или локално, у малигну трансформисаним ћелијама (*Mishra et al., 1998*). Такође је литературно наведено и да је већа концентрација фрагмената у крви ових пацијената (*Michell et al., 1997*), што може бити последица повећане производње и/или активности протеаза код тумора. У случају повећане активности протеаза, очекивали би интензивнију фрагментацију рекомбинантног IGFBP-2 у серуму пацијента са тумором дебелог црева, него у серуму здраве особе. Анализом интензитета трака на имуноблоту то није могло да се потврди, односно иако је, можда, повећана протеазна активност у серуму, она није директно IGFBP-2 специфична.

#### **4.1.4 Испитивање постојања фосфорилваног облика IGFBP-2**

IGFBP-2 се сматра простим протеином који се не модификује пост-транслационо (*Collett-Solberg & Cohen, 1996*). Међутим, молекул у примарној структури садржи остатке серина (Ser), који могу бити потенцијална места фосфориловања. Фосфориловање, иначе, представља начин регулације активности протеина и могуће да је укључено и у регулацију активности IGFBP-2. IGFBP-1, који је по структури сличан IGFBP-2, подлеже фосфориловању на више места, што утиче на његов афинитет за IGF пептиде (*Clemmons, 1994*).

Методом масене спектрометрије је показано да IGFBP-2 може бити фосфорилван на остатку Ser<sup>106</sup> (*Graham et al., 2007*), али није познато на који би начин та модификација могла утицати на његову активност. У овој дисертацији је испитано присуство фосфо-IGFBP-2 након изоловања протеина имунопреципитацијом из серума, са анти-фосфосеринским антителом (као контрола

је коришћен узорак пуног серума). Према декларацији произвођача, антитело је поликлонско, препознаје само фосфосерин и не реагује са фосфотирозином.



**Слика 20.** Имуноблот IGFBP-2 молекулских облика: а) изолованог IGFBP-2 и имуноблот протеина који садрже фосфосерин: б) у серуму и в) у изолованом IGFBP-2

На **слици 20** су електрофореграми IGFBP-2 имунопреципитата и серума, који су инкубирани са анти-фосфосеринским антителом. Као показатељ положаја траке која би одговарала IGFBP-2 мономеру коришћен је IGFBP-2 имунопреципитат са анти-IGFBP-2 антителом.

Као што слика показује, мембрана са протеинима контролног серума даје већи број трака у складу са распоредом фосфопротеина у серуму, док се анти-фосфосеринско антитело везује за мембрану на којој се налази IGFBP-2 имунопреципитат на положају који не одговара мономеру IGFBP-2. У овом моменту се не може проценити да ли је у питању интеракција са другим облицима IGFBP-2 (димером или измењеним мономером?), или је реч о неспецифичној интеракцији услед присуства споредних протеина у IGFBP-2 изолату. Као имуноген који је коришћен у производњи антитела (према декларацији произвођача) употребљен је говеђи албумин везан за фосфорилувани транспортни протеин, те је могућа извесна унакрсна реактивност са албумином који се може налазити у имунопреципитату. У сваком случају, није доказано постојање фосфорилваног мономера IGFBP-2 у серуму, користећи методу имуноблота и наведених антитела.



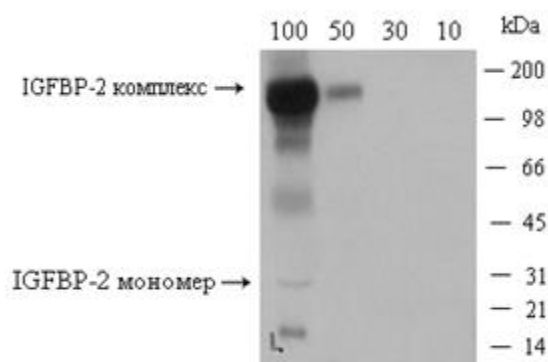
## 4.2 Изоловање и раздвајање молекулских облика IGFBP-2

Да би се појединачни облици IGFBP-2 могли проучити, било је неопходно развити методу њиховог раздвајања. Испробано је више техника, о којима ће бити речи у наредним поглављима.

### 4.2.1 Молекулска филтрација

Молекулска филтрација представља метод којим се смеша протеина раздваја на основу молекулских маса. Подразумева пролазак протеинског узорка кроз наменске филтере са мембранама које пропуштају, односно задржавају молекуле одређених маса. У овом експерименту коришћени су филтери који пропуштају молекуле маса мањих од 100, 50, 30 и 10 kDa, а пропуштање је изведено користећи центрифугалну силу. Полазни узорак је сукцесивно пропуштан кроз филтере (почев од 100 kDa), а филтрат добијен коришћењем мембране са већим порама је даље филтриран на следећој мембрани са мањим порама. Сврха овог експеримента је била да испита у ком степену се могу раздвојити молекулски облици IGFBP-2 директно из серума. После нередукујуће SDS електрофорезе урађен је имуноблот са анти-IGFBP-2 антителима. На [слици 21](#) је приказан имуноблот протеинских фракција задржаних на мембранама (ретенати).

Као што се са слике види, скоро целокупни IGFBP-2 је задржан на филтеру који пропушта молекуле маса мањих од 100 kDa. На филтеру од 50 kDa задржан је и уочљив био само комплекс, а у филтрату после ове мембране више није детектована IGFBP-2 имунорекативност.

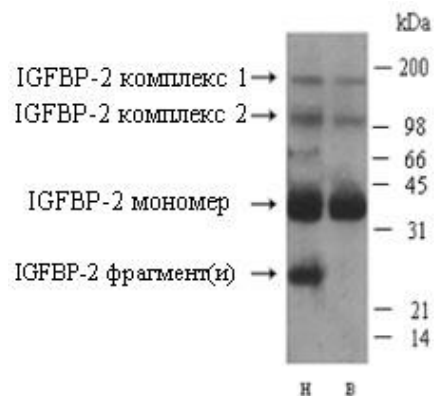


**Слика 21.** Детекција молекулских облика IGFBP-2 у ретенатима серума са молекулских филтера различите пропусне моћи (100, 50, 30 и 10 kDa)

Добијени резултати нису били у складу са очекиваним (према декларацији произвођача филтера). Пошто је мембрана, која је требала да задржи само протеине маса већих од 100 kDa, задржала и мале молекуле, могло би се претпоставити да су поре ове мембране биле мање од наведених.

#### 4.2.2 Имуноафинитетна хроматографија

Један од начина изоловања жељених молекула из смеше је путем њихове специфичне интеракције са антителима имобилизованим на одређену чврсту фазу. Једна од таквих метода је имуноафинитетна хроматографија. У наредном експерименту је коришћен имуноафинитетни матрикс за кога су била везана антитела која препознају једанаест најзаступљенијих протеина у серуму (видети у одељку Материјали и методе, поглавље 3.11). Међу тим антителима није било анти-IGFBP-2 антитело, што је омогућило испитивање да ли постоје комплекси између IGFBP-2 и неког од протеина за кога постоје имобилизована антитела. Овим експериментом се желела упознати природа комплекса IGFBP-2, који се на имуноблоту појављују на великим масама. Специфично елуирани и невезани протеини су анализирани методом имуноблота са анти-IGFBP-2 антителом. На **слици 22** је приказан добијени профил протеинских трака.



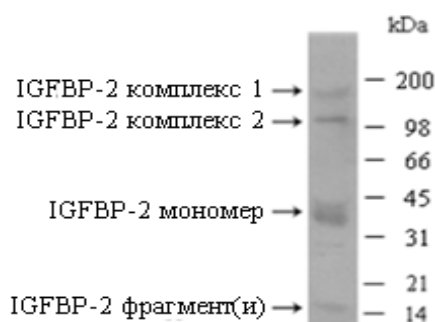
**Слика 22.** Имуноблот молекулских облика IGFBP-2 невезане (H) и везане (B) фракције елуиране са IAC колоне

Међу протеинима везаним за матрикс детектоване су три имунореактивне траке: трака маса од 31 и 45 kDa, која одговара мономеру IGFBP-2 и две траке на масама већим од 100 kDa. Исти протеини су уочени и у невезаној фракцији, заједно са фрагментима маса између 21 и 31 kDa, као и имунореактивна врста масе око 66 kDa. Резултати овог експеримента су потврдили закључак да постоје комплекси IGFBP-2 са другим протеином из крви. Пошто се у везаној фракцији нису уочили фрагменти, могло би се закључити да везивање IGFBP-2 за други молекул у циркулацији има функцију заштите IGFBP-2 од протеаза, и последичне разградње.

#### 4.2.3 Имунопреципитација

Имунопреципитација је метода која подразумева таложење антигена из раствора коришћењем антитела, везаног за чврсти носач. Идеја је била да се испита могућност диференцијалног раздвајања форми IGFBP-2 (уколико би анти-IGFBP-2 антитело препознавало епитопе само на неким облицима, не и на свим). У једном од експеримената, на комерцијални преактивирани матрикс је везано анти-IGFBP-2 антитело и нанет је узорак серума. Након имунопреципитације, елуирани су везани

протеини и урађен је имуноблот са анти-IGFBP-2 антителом. Протеински профил је приказан на [слици 23](#).



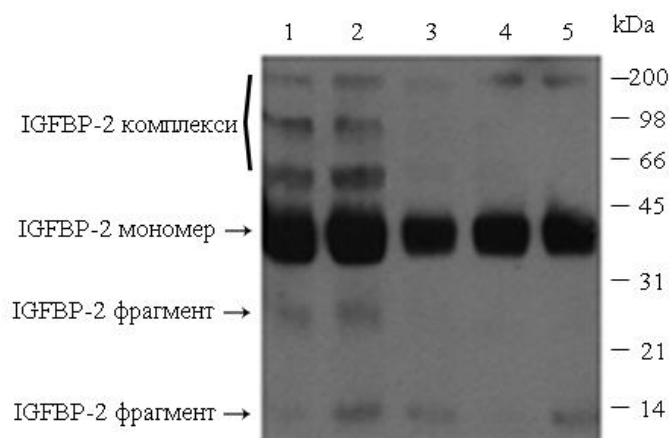
**Слика 23.** Имуноблот молекулских облика IGFBP-2 у елуату са матрикса на коме је имобилизовано анти-IGFBP-2 антитело

Као што се са слике може видети, са матрикса су елуирани комплекси IGFBP-2 са неким молекулом(има) из циркулације, мономер и фрагмент(и). Према томе, имунопреципитацијом нису изоловани само мономерни IGFBP-2, већ и други облици у којима се налази. Другим речима, сви молекулски облици IGFBP-2 који се налазе у крви имају епитопе које препознаје коришћени препарат анти-IGFBP-2 антитела.

#### 4.2.4 Лектинска хроматографија

У циркулацији се налази велики број гликопротеина и постоји могућност да IGFBP-2 гради комплекс са неким од њих. Уколико би то био случај, он би се заједно са гликопротеином везао за имобилизовани лектин који је специфичан за одређени угљени хидрат на површини гликопротеина (подсећања ради, IGFBP-2 није гликозилован). У наредном експерименту су коришћене колоне са пет врста имобилизованих лектина, са афинитетом за различите угљене хидрате (видети у одељку Материјал и методе, поглавље 3.12). На њих су наносени узорци серума, а

елуирани протеини су подвргнути имуноблоту са анти-IGFBP-2 антителом. Резултати имуноблота су приказани на **слици 24**.



**Слика 24.** IGFBP-2 имуноблот фракција протеина елуираних са колона имобилизованих лектина: SNA (1), ConA (2), RCA-I (3), LCA (4) и PHA-E (5)

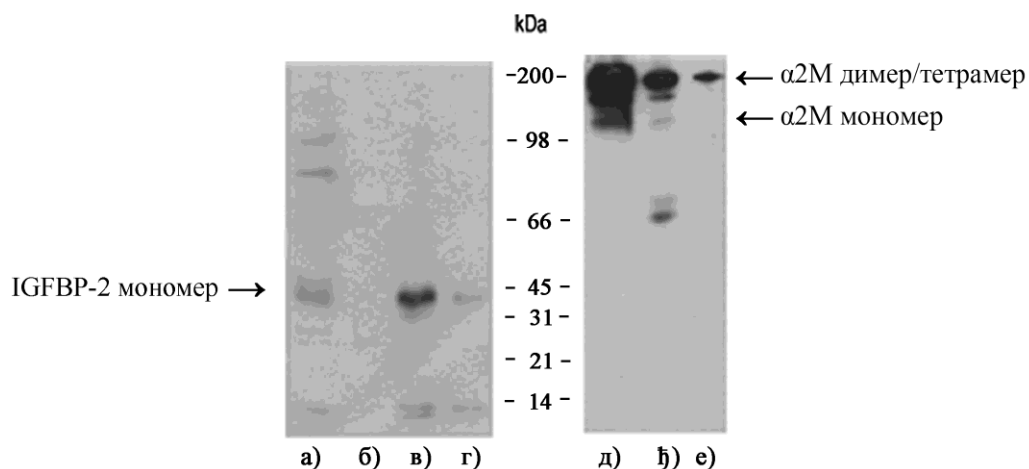
Према приказаним резултатима, свих пет лектина: SNA, ConA, RCA-I, LCA и PHA-E, интерагују са гликопротеином или гликопротеинима који за себе везују IGFBP-2. На **слици 24**, узорци 1 и 2 су елуати са колона на којима су имобилизовани SNA, односно ConA, који осим мономерног облика IGFBP-2, садрже комплексе IGFBP-2, као и трагове фрагмената. Фракције елуиране са осталих лектина садржале су мономер IGFBP-2 и трагове комплекса и фрагмената. Резултати овог експеримента су потврдили да IGFBP-2 гради комплексе са гликопротеинима.

## 4.3 Карактеризација IGFBP-2/ $\alpha$ 2M комплекса

### 4.3.1 Детекција IGFBP-2/ $\alpha$ 2M комплекса

Анализа имуноблотова елуата добијених имуноафинитетном и лектинском хроматографијом, као и имунопреципитацијом, указује на постојање комплекса IGFBP-2 маса око и изнад 100 kDa, а партнери у грађењу комплекса су гликопротеини. Познато је да IGFBP-1, који је структурни хомолог IGFBP-2, гради комплексе са алфа-2-макроглобулином ( $\alpha$ 2M), тако да је било логично претпоставити да то може и IGFBP-2. Такође, познато је да IGFBP-3 гради комплексе са трансферином (Тф) (*Weinzimer et al., 2001*), па би и он могао бити партнер за комплексе IGFBP-2. И  $\alpha$ 2M и Тф су гликозиловани, а антитела спрам ова два протеина су била међу имобилизованим антителима на имуноафинитетној колони. Да би се проверило да ли IGFBP-2 гради комплекс са неким од ова два протеина, урађен је имуноблот IGFBP-2 имунопреципитата са анти- $\alpha$ 2M и анти-Тф антителом. Резултати су показали да имунореактивност постоји само са анти- $\alpha$ 2M антителом (слика 25). У следећем кораку су узорци серума подвргнути имунопреципитацији са имобилизованим анти- $\alpha$ 2M антителом, а елуат је анализиран имуноблотом са анти-IGFBP-2 и анти- $\alpha$ 2M антителом. Резултати су приказани на слици 25.

Као што се са слике види, анти-IGFBP-2 антитело је препознало елуиране протеине са анти- $\alpha$ 2M матрикса (слика 25в) и обрнуто, анти- $\alpha$ 2M антитело је препознало елуиране протеине са анти-IGFBP-2 матрикса (слика 25е). Резултати имуноблота су потврдили да су антитела посредно препознала молекуле, преко протеина-партнера за који се везују.



**Слика 25.** Имуноблот са анти-IGFBP-2 антителом (а-г) и анти- $\alpha$ 2М антителом (д-е) узорака добијених имунопреципитацијом серума користећи имобилизовано анти-IGFBP-2 антитело (г и е), анти-Тф антитело (б) и анти- $\alpha$ 2М антитело (в и њ). Узорци а) и д) су полазни серуми

Занимљиво је да је интензитет траке која одговара мономеру IGFBP-2 у узорку елуираном са анти- $\alpha$ 2М матрикса, а потом инкубираном у анти-IGFBP-2 антителу, јачи од траке из узорка елуираног са анти-IGFBP-2 матрикса, док је интензитет фрагмената остао исти. Један од разлога би могао бити да се за анти- $\alpha$ 2М смолу везало више IGFBP-2, него што се везало за анти-IGFBP-2 смолу, због знатно веће концентрације  $\alpha$ 2М у циркулацији од IGFBP-2 (око 500-1000 пута) (*Sheikh et al., 2003; Fukushima & Kataoka, 2007*). Наравно, не треба изгубити из вида да је авидитет ова два антитела различит. Иако су оба антитела, према декларацији произвођача, предвиђена за имуноблот и за имобилизацију, познато је да ефикасност антитела није иста у различитим методама. Оно што се може закључити (не залазећи у квантитативне ефекте) је да се за  $\alpha$ 2М везује претежно мономер IGFBP-2, што је у складу са резултатима имуноафинитетне хроматографије (поглавље 4.2.2). Из слике имуноблота са анти- $\alpha$ 2М антителом елуата са анти-IGFBP-2 матрикса (**слика 25е**) се види само једна трака (на маси преко 200 kDa) која вероватно одговара тетрамерном

молекулу  $\alpha 2M$ . Из тога би се могло закључити да фрагменти  $\alpha 2M$  не граде комплексе са IGFBP-2.

Поставља се питање која би била функција везивања IGFBP-2 за  $\alpha 2M$ . Зна се да је  $\alpha 2M$  општи инхибитор протеаза и да штити молекуле из циркулације од њиховог дејства, посебно у условима када је производња протеолитичких ензима повећана, као код акутних повреда ткива или јаког запаљенског процеса (*Heumann et al., 1988*). У овим ситуацијама је важно да IGFBP-2 остане целовит до места повреде, као преносилац IGF пептида који имају зацелитељско дејство. Везивање IGFBP-2 за  $\alpha 2M$  обезбеђује заштиту од протеолизе, али и усмерено кретање до места на која не би стигао самостално. Наиме, када за себе веже протеазу или неки други лиганд,  $\alpha 2M$  подлеже конформационој промени која му омогућава да се веже за специфичне рецепторе на површини ћелија (углавном хепатоцита, али и фибробласта, адипоцита, моноцита, макрофага) (*Travis & Salvesen, 1983; Bond et al., 2007; Armstrong, 2010*). Молекулу IGFBP-2 (који може носити IGF пептид) у комплексу са  $\alpha 2M$  омогућен је долазак до површине ћелије где се могу налазити интегрини и IGF рецептори, или чак и улазак у ћелију, путем ендцитозе, и евентуално дејство у њеној унутрашњости. У овој дисертацији је први пут доказано постојање комплекса између IGFBP-2 и  $\alpha 2M$ , али је много питања на која још увек нема одговора. На пример, за који облик  $\alpha 2M$  се везује IGFBP-2, да ли за тзв. ”спори”, за који није везана протеаза, или за ”брзи” за који је она везана (поглавље 2.4.3.2)? Да ли се везивањем протеазе за  $\alpha 2M$  формира везивно место за IGFBP-2? Или су ова два молекула алостерни инхибитори? На крају, шта регулише отпуштање IGF пептида из комплекса?

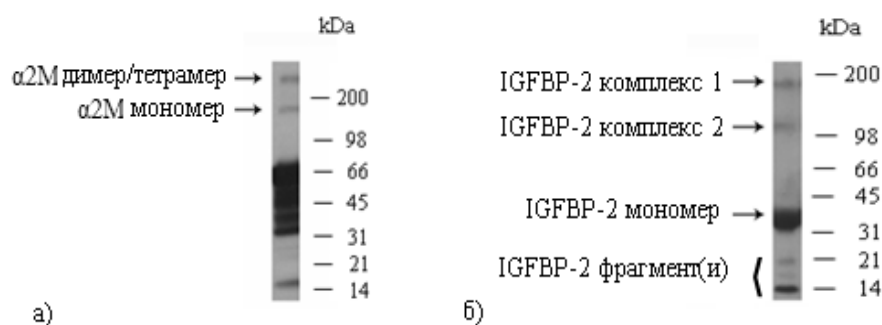
#### **4.3.2 Молекулски облици IGFBP-2/ $\alpha 2M$ комплекса**

Алфа-2-макроглобулин је по својој структури хомотетрамер молекулске масе око 720 kDa, чија је основна улога да штити друге молекуле у циркулацији од деловања протеаза, тиме што интерагује са самим протеазама и стерно их инхибира (*Khan & Khan, 2004; Lin et al., 2012*). Осим тога, показано је да може градити



комплексе и са другим молекулима из циркулације, контролишући њихову активност (Peslova et al., 2009; Bowers et al., 2012; Birkenmeier et al., 1998). Као што су претходни експерименти показали, он може везати и IGFBP-2 и, вероватно, утицати на његову судбину у циркулацији и ткивну дистрибуцију.

Алфа-2-макроглобулин се сматра „димером димера” који се састоји од пара идентичних подјединица спојених дисулфидним везама, а два таква димера су нековалентно спојена у целовити молекул (Wyatt et al., 2012). При редукујућим условима електрофорезе долази до дисоцијације тетрамера у смешу непотпуно редукованих тетрамерних, димерних и мономерних форми, што се и може видети на **слици 26**. Поред ових молекула, присутан је и већи број фрагмената.



**Слика 26.** Имуноблот а)  $\alpha 2\text{M}$  и б) IGFBP-2 имунореактивних врста у серуму

Две горње траке на **слици 26а** представљају мономерне/димерне/тетрамерне облике  $\alpha 2\text{M}$ , као и њихове комплексе са малим молекулима, док се на **слици 26б** виде комплекси које IGFBP-2 гради са њима. Положаји трака на два имуноблота се не поклапају потпуно, због разлике у умрежењу коришћених гелова. У циљу бољег раздвајања протеина, електрофореза за анти- $\alpha 2\text{M}$  имуноблот рађена на 8 % гелу, док је електрофореза за анти-IGFBP-2 имуноблот рађена на 10 % гелу. Резултати показују да дисосовани и редуковани облици (димери/мономер) могу градити комплексе са IGFBP-2, тј. асосовање мономера у тетрамер није нужно за интеракцију са IGFBP-2. Остаје непозната стехиометрија везивања IGFBP-2 за  $\alpha 2\text{M}$ , односно да ли свака подјединица може за себе везати један молекул IGFBP-2, и да ли постоји

кооперативни ефекат када се IGFBP-2 везује за тетрамерни молекул. Другим речима, да ли везивање IGFBP-2 за једну подјединицу ”олакшава” везивање за остале, односно да ли повећава њихов афинитет. Везивање по једног молекула IGFBP-2 за сваки мономер  $\alpha 2M$  би могло објаснити интензивну траку за мономер IGFBP-2 након имунопреципитације са анти- $\alpha 2M$  антителом (слика 25в).

### **4.3.3 Утицај различитих чинилаца на формирање IGFBP-2/ $\alpha 2M$ комплекса**

#### 4.3.3.1 Утицај концентрације IGFBP-2 и $\alpha 2M$

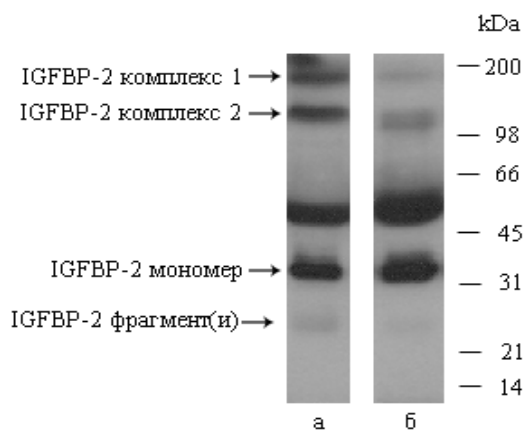
Уколико би се формирање комплекса IGFBP-2/ $\alpha 2M$  одиграло по хемијским законима, онда би концентрација IGFBP-2 утицала на концентрацију њиховог комплекса. Концентрација  $\alpha 2M$  у овом случају не би имала велики утицај, пошто је до хиљаду пута већа од концентрације IGFBP-2, тако да и релативно велике промене не би морале утицати на количину награђеног комплекса (лиганд кога има мање диктира динамику интеракције). Теоријски, са повећањем концентрације IGFBP-2 би се очекивало да се повећа концентрација IGFBP-2/ $\alpha 2M$  комплекса и обрнуто. То би можда био случај у *in vitro* условима где се молекули понашају по чисто хемијским законима, међутим у организму много фактора може утицати на равнотежу. Наши резултати одређивања концентрације IGFBP-2 ELISA тестом и резултати имуноблота указују на диспропорцију између укупне концентрације, удела мономера и комплекса IGFBP-2/ $\alpha 2M$  у циркулацији пацијената са тумором дебелог црева. Код ових пацијената је концентрација укупног и мономерног IGFBP-2 повећана, а концентрација IGFBP-2/ $\alpha 2M$  комплекса смањена (Табела 5 и слика 27).

**Табела 5.** Концентрација IGFBP-2 (одређена ELISA тестом) и релативна заступљеност мономера, фрагмената и комплекса (одређена дензитометријски након имуноблота) у серуму здравих људи и пацијената оболелих од тумора дебелог црева, изражени као средња вредност са стандардном девијацијом

	Здрави људи n=42	Пацијенти са тумором дебелог црева n=29
<b>Концентрација IGFBP-2 (nM)<sup>a</sup></b>	<b>12 ± 8</b>	<b>28 ± 10<sup>*</sup></b>
<b>Мономер IGFBP-2 (ADU)<sup>b</sup></b>	<b>796 ± 132</b>	<b>1087 ± 79<sup>*</sup></b>
<b>Фрагмент IGFBP-2 (ADU)<sup>b</sup></b>	<b>494 ± 84</b>	<b>982 ± 191<sup>*</sup></b>
<b>IGFBP-2/α2M комплекси (ADU)<sup>b</sup></b>	<b>342 ± 54</b>	<b>136 ± 54<sup>*</sup></b>

<sup>a</sup>ELISA, <sup>b</sup>дензитометрија након имуноблота

\* Статистички значајне разлике (Студентов *t*-тест,  $p < 0,05$ )



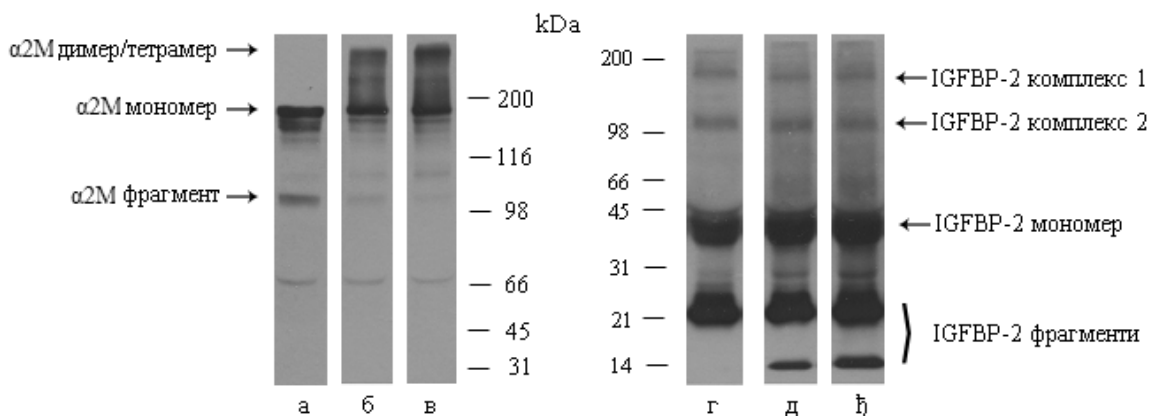
**Слика 27.** Имуноблот молекулских облика IGFBP-2 у серуму: а) здравих особа и б) пацијената са тумором дебелог црева

У *in vivo* условима IGFBP-2 и  $\alpha 2\text{M}$  нису усамљени већ окружени другим молекулима који на посредан и непосредан начин утичу на њихову концентрацију и доступност за интеракцију. У случају тумора дебелог црева, иако је производња IGFBP-2 повећана, повећана је и његова протеолиза. Такође је могуће да су и IGFBP-2 и  $\alpha 2\text{M}$  претрпели одређене пост-транслационе модификације због којих им је смањен међусобни афинитет. У експерименту са овим пацијентима је показано да понашање лиганда при формирању комплекса у *in vivo* условима зависи од више фактора и не може се објаснити само на основу њихових концентрационих односа.

#### 4.3.3.2 Утицај супрафизиолошке концентрације цинка

Осим грађења комплекса са биомолекулима,  $\alpha 2\text{M}$  везује јоне цинка у релативно великим количинама, скоро 15 % од укупне количине у циркулацији (Foote & Delves, 1984). Не постоје докази да цинк директно утиче на активност  $\alpha 2\text{M}$ , али утиче на његову конформацију (Adham *et al.*, 1977). Показано је да овај метал олакшава формирање комплекса са неким цитокинима, као што је интерлеукин-1 $\beta$ , утичући на просторни распоред реагујућих група, и на тај начин олакшава њихову интеракцију (Rehman *et al.*, 2012). У овој дисертацији испитали смо да ли јони цинка утичу на грађење и/или стабилизацију IGFBP-2/ $\alpha 2\text{M}$  комплекса. Узорак серума је изложен десет и двадест пута већој концентрацији цинка него што је физиолошка (7-23  $\mu\text{M}$ ) ([www.diameb.ua/manuals/eng/507240.pdf](http://www.diameb.ua/manuals/eng/507240.pdf)) и потом је праћен стварања комплекса IGFBP-2/ $\alpha 2\text{M}$  имуноблотом. Резултати експеримента су приказани на [слици 28](#).

Имуноблот са анти-IGFBP-2 антителом је показао да додатак цинка не утиче на количину награђеног комплекса ([слике 28д](#) и [28ђ](#)), али подстиче формирање и/или стабилизацију олигомерних облика  $\alpha 2\text{M}$  ([слике 28б](#) и [28в](#)). На већим молекулским масама у  $\alpha 2\text{M}$  имуноблоту могу се уочити траке које нису видљиве у полазном серуму. Пошто  $\alpha 2\text{M}$  има знатно више од IGFBP-2 у циркулацији, очигледно је да цинк, иако подстиче олигомеризацију  $\alpha 2\text{M}$ , не омета стварање комплекса IGFBP-2/ $\alpha 2\text{M}$ .

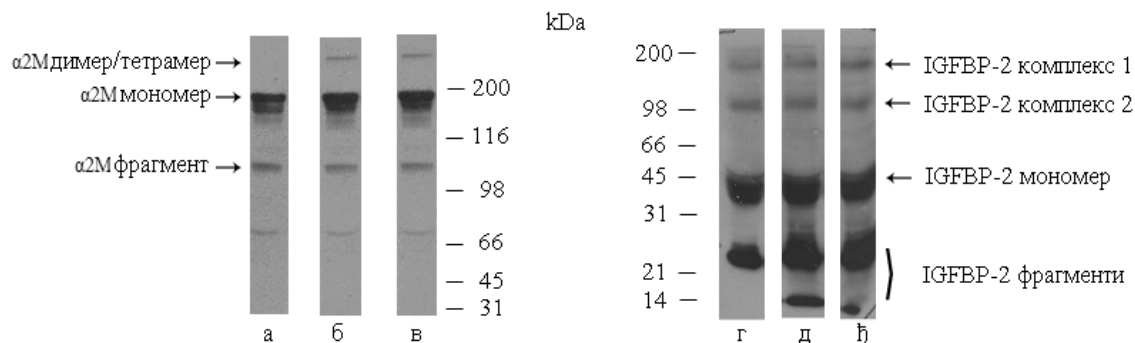


**Слика 28.** Дистрибуција  $\alpha 2M$  (б и в) и IGFBP-2 (д и њ) молекулских облика у узорцима серума после инкубације са 100  $\mu M$  (б и д) и 200  $\mu M$  (в и њ) цинк(II)-хлорида; узорци а) и г) су полазни серуми

#### 4.3.3.3 Утицај супрафизиолошке концентрације RGD(E)S

За IGFBP-2 је познато да садржи RGD секвенцу која му омогућава да се везује за интегрине и да на тај начин делује независно од IGF пептида (*Schütt et al., 2004*). Пошто и IGFBP-1 садржи исту секвенцу и може да гради комплексе са  $\alpha 2M$ , у наредним експериментима је испитана потенцијална улога ове секвенце у формирању IGFBP-2/ $\alpha 2M$  комплекса. Узорци серума су независно инкубирани са два пептида, једним који је имао RGD секвенцу (пуна секвенца RGDS) и другим који је имао RGE секвенцу (пуна секвенца RGES), у концентрацијама сто пута већим од концентрације IGFBP-2. Уколико би RGD секвенца била важна за интеракцију са  $\alpha 2M$ , од пептида који је поседује би се очекивало да са такмичи са IGFBP-2 у везивању за  $\alpha 2M$ . Самим тим би се очекивало да се смањи количина комплекса IGFBP-2/ $\alpha 2M$ . Електрофореза и имуноблот са анти-IGFBP-2 антителом, међутим, нису показали да и један од ова два пептида утиче на количину награђених IGFBP-2/ $\alpha 2M$  комплекса или на дистрибуцију молекулских врста IGFBP-2. Неочекивани феномен је примећен у имуноблоту са анти- $\alpha 2M$  антителом (слика 29). Наиме, у узорцима којима су додати егзогени пептиди (RGDS или RGES) сачувани су специфични олигомерни облици  $\alpha 2M$ , који нису детектовани после електрофорезе нативног серума. Пошто  $\alpha 2M$  не

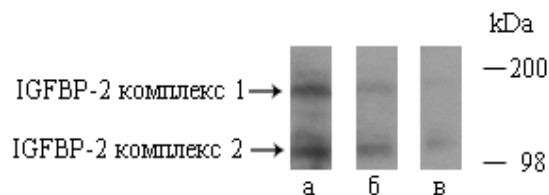
садржи ове секвенце, могуће је да су егзогени пептиди интераговали са неким аминокиселинама из  $\alpha 2\text{M}$ , повезујући мономерне подјединице у олигомере.



**Слика 29.** Дистрибуција  $\alpha 2\text{M}$  (б и в) и IGFBP-2 (д и h) молекулских облика у узорцима серума после инкубације са RGDS (б и д) и RGES (в и h); узорци а) и г) су полазни серуми

#### 4.3.3.4 Утицај старења

Раније је већ речено, елементи IGF система мењају се са старењем. Концентрација IGFBP-2 у циркулацији се смањује од рођења до пубертета, потом постепено расте, нарочито после шездесете године живота (*Rajaram et al., 1997; Mattsson et al., 2008*). Концентрација  $\alpha 2\text{M}$  је велика у млађим годинама, затим опада у средњем добу и поново благо расте са даљим старењем (*Tunstal et al., 1975*). Детаљније је испитана промена IGFBP-2/ $\alpha 2\text{M}$  комплекса са старењем. Бројчани подаци за три групе испитаника (20-40, 41-60 и 61-80 година) су већ приказани (са другим резултатима) у **Табели 4**, али су и овде поновљени, да би се додатни испитао утицај старења. Серуми су подвргнути електрофорези и имуноблоту са анти-IGFBP-2 антителом. На **слици 30** приказани су репрезентативни резултати за комплексе.



**Слика 30.** Расподела комплексних облика IGFBP-2 код: а) младих одраслих особа, б) особа средњих година и в) старијих особа

Дензитометријском анализом трака које одговарају IGFBP-2/ $\alpha$ 2M комплексима добијени су резултати приказани у Табели 6. Подаци су дати у дензитометријским јединицама и као процентуална заступљеност појединачних комплекса у целокупном имунореактивном одговору узорка.

**Табела 6.** Релативна заступљеност IGFBP-2/ $\alpha$ 2M комплекса у серуму људи различитих старосних категорија, изражена као средња вредност са стандардном девијацијом

Група (n=15)	20-40 година		41-60 година		61-80 година	
<b>IGFBP-2 комплекс 1</b> (ADU, %)	20 $\pm$ 1	5,0 $\pm$ 1,0	18 $\pm$ 1	6,2 $\pm$ 0,7	14 $\pm$ 2 <sup>ab</sup>	2,8 $\pm$ 1,2 <sup>ab</sup>
<b>IGFBP-2 комплекс 2</b> (ADU, %)	21 $\pm$ 1	5,2 $\pm$ 0,9	18 $\pm$ 1	6,2 $\pm$ 1,1	14 $\pm$ 2 <sup>ab</sup>	2,6 $\pm$ 0,8 <sup>ab</sup>

Статистички значајне разлике (Студентов *t*-тест,  $p < 0,05$ ) између особа старосне категорије 41-60 година и 61-80 година означене су као <sup>a</sup>, а између старосне категорије 20-40 и 61-80 као <sup>b</sup>

Статистички су значајне разлике у заступљености IGFBP-2/ $\alpha$ 2M комплекса између средовечних и старијих људи, као и између младих и старијих особа. Иако укупна концентрација IGFBP-2 расте са старењем, концентрација комплекса које прави са  $\alpha$ 2M опада. Један од разлога је што се са старењем интензивира фрагментација IGFBP-2, а смањује се удео мономера, који је једини облик који реагује са  $\alpha$ 2M (4.1.3.2). Други разлог може бити у измењеном међусобном афинитету. Наиме, оба партнера могу подлећи пост-транслационим модификацијама које могу утицати на конформацију везивних места.  $\alpha$ 2M изложен оксидативном стресу смањује афинитет према неким молекулима (нпр. факторима раста) (*Wu et al., 1998*). Пошто старење карактерише повећана производња слободних радикала и других реактивних врста, расте и удео оксидованих протеина, међу којима би могао бити и  $\alpha$ 2M. Евентуална промена у везивном месту (или у његовој близини) могла би се одразити кроз смањен афинитет за IGFBP-2.

#### **4.4 Молекулски облици IGFBP-2 код пацијената са тумором дебелог црева**

Тумор дебелог црева (колоректални карцином) је малигни тумор који се развија на унутрашњем зиду дебелог црева. Настаје као последица неконтролисане деобе ћелија слузокоже, које облажу унутрашњи лумен. Постоје докази да IGFBP-2 има улогу у напредовању тумора и да је експримиран у туморским, али не (или далеко мање) у околним, нетрансформисаним ћелијама (*Mishra et al., 1998*). Сматра се да испољава аутокрино деловање, утичући на ширење тумора. За испитивање утицаја тумора на расподелу молекулских форми IGFBP-2 изабран је колоректални карцином као модел систем, пошто је ова врста тумора веома распрострањена, смртни исход је чест и већи број студија је показао да је раст концентрације IGFBP-2 у крви редовна појава (*Reeve et al., 1992*).

##### **4.4.1 Одређивање укупне концентрације IGFBP-2 у циркулацији пацијената са тумором дебелог црева методом ELISA**

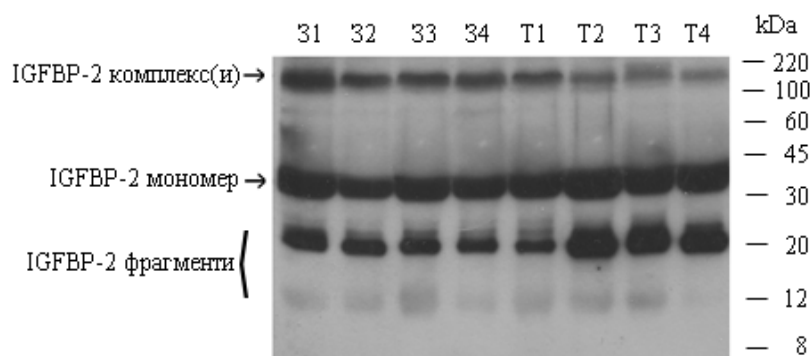
Концентрација IGFBP-2 у крви је повећана код пацијената оболелих од тумора дебелог црева и директно је повезана са повећаном смртношћу.

Методом ELISA је измерена концентрација IGFBP-2 у серуму пацијената. Најнижа забележена вредност је износила **12** nM, а највиша **45** nM. Средња вредност је износила **28** nM. Као што се може видети, и средња концентрација IGFBP-2 је већа од горње границе за здраву популацију (референтни опсег је **2,7-27,8** nM).



#### 4.4.2 Одређивање молекулских облика IGFBP-2 у циркулацији и у ткиву дебелог црева пацијената са колоректалним карциномом имуноблотом

Концентрација IGFBP-2 у серуму и релативна заступљеност мономера, фрагмената и комплекса IGFBP-2/ $\alpha$ 2M код здравих особа и пацијената са тумором дебелог црева дата је у Табели 5. На слици 31 приказан је распоред молекулских облика IGFBP-2 у репрезентативним узорцима серума здравих особа и пацијената са тумором дебелог црева.



Слика 31. Расподела молекулских облика IGFBP-2 у серуму здравих особа (31-34) и пацијената са тумором дебелог црева (Т1-Т4)

Са слике 31 се види да су концентрације укупног IGFBP-2 (одређена ELISA методом) и релативна заступљеност мономера IGFBP-2 и његових фрагмената (одређена дензитометријски) значајно веће у серумима пацијената, него у серумима здравих особа. Са друге стране, релативна количина IGFBP-2 у комплексу са  $\alpha$ 2M је смањена.

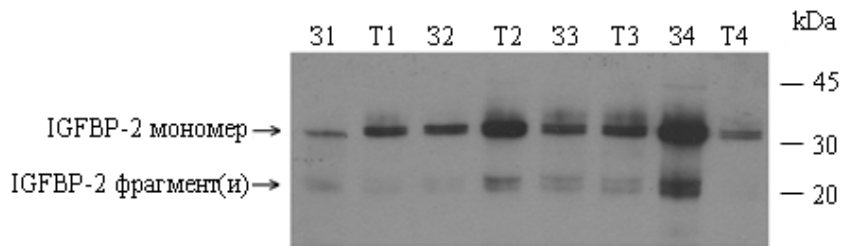
Пошто је из литературе познато да се код пацијената са тумором дебелог црева повећава и ткивна концентрација IGFBP-2, подстичући кретање туморских ћелија (Mishra *et al.*, 1998), циљ наредног експеримента је био испитивање расподеле IGFBP-2 молекулских облика у самом ткиву црева.

Сакупљени су узорци ткива (туморског и нетуморског) пацијената подвргнутих оперативном уклањању тумора. Ткивни препарати су, након диференцијалне дијагностике патолога у КБЦ “Бежанијска коса”, детаљно испрани, хомогенизовани и мембрански протеини солубилизовани. Даља анализа је урађена са солубилизатима, пошто се, према литературним подацима, IGFBP-2 везује за интегрине на површини ћелија (*Schütt et al., 2004*). Концентрација IGFBP-2 у ткивним солубилизатима је била врло мала и испод границе осетљивости ELISA теста, те је концентрација IGFBP-2 у овим препаратима одређена посредним путем. Електрофоретски су анализирани узорци солубилизата (туморског и нетуморског, здравог ткива), као и узорак серума познате концентрације IGFBP-2 у различитим разблажењима (1:50 – 1:500). По завршеном имуноблоту са анти-IGFBP-2 антителом, урађена је денситометријска евалуација трака. Концентрација IGFBP-2 у солубилизатима је процењена упоређивањем са различитим разблажењима серума познате концентрације. Концентрација IGFBP-2 је изражена по граму мембранских протеина (**Табела 7**). На мембранама изолованим из туморског ткива било је више везаног IGFBP-2 него на мембранама здравог ткива.

**Табела 7.** Опсег концентрација IGFBP-2 везаног за ћелијске мембране у ткиву дебелог црева у односу на укупне протеине и релативне заступљености мономера и фрагмента IGFBP-2 у солубилизатима мембрана из здравог и туморског ткива

	Здраво ткиво n=15	Туморско ткиво n=15
<b>Концентрација IGFBP-2 (nmol/g протеина)</b>	0.03-0.08	0.14-0.28*
<b>IGFBP-2 мономер (ADU)</b>	9-15	15-354
<b>IGFBP-2 фрагмент (ADU)</b>	9-503	10-722

\* Статистички значајна разлика (Студентов *t*-тест,  $p < 0,05$ )



**Слика 32.** Расподела молекулских облика IGFBP-2 у солубилизатима мембрана добијених из здравог (31-34) и туморског ткива дебелог црева (Т1-Т4)

Уопштено гледајући, сви резултати за мембранске препарате показују велики опсег вредности, због изражене разлике између појединачних узорак. Када се упоређују узорци нетуморског и туморског ткива исте особе, има случајева са сличним концентрацијама IGFBP-2 у оба узорка, са већом концентрацијом у туморском узорку, или супротно, са већом концентрацијом у нетуморском узорку. Имуноблот који приказује ове варијације дат је на **слици 32** (четири узорка у пару). Због овако великих разлика, подаци добијени за мембранске протеине су приказани као опсег вредности, уместо као средња вредност са стандардном девијацијом. У IGFBP-2 имуноблоту ткивних узорак детектовани су само мономер и фрагменти.

Досадашњи резултати су показали да је концентрација IGFBP-2 у серуму већа код оболелих од тумора дебелог црева него код здравих особа, а и распоред молекулских облика није исти. Количина IGFBP-2 мономера (одређена дензитометријски) је, у просеку, 20-30 % већа код пацијената, количина фрагмената је двоструко већа у поређењу са здравим особама, док је количина IGFBP-2 у комплексу са  $\alpha 2\text{M}$  2,5 пута мања код пацијената. Према овој расподели, IGFBP-2 не само што се интензивније настаје код оболелих од тумора дебелог црева, већ је и количина укључена у изградњу комплекса са  $\alpha 2\text{M}$  значајно смањена, фаворизујући постојање бинарних IGFBP-2/IGF комплекса, из којих се IGF молекули лако ослобађају протеолизом IGFBP-2. Када се упореде релативне количине IGFBP-2 облика, код здравих особа IGFBP-2/ $\alpha 2\text{M}$  комплекси чине око 20 % укупних молекула IGFBP-2, док код пацијената са тумором дебелог црева чине око 6 %. Може се

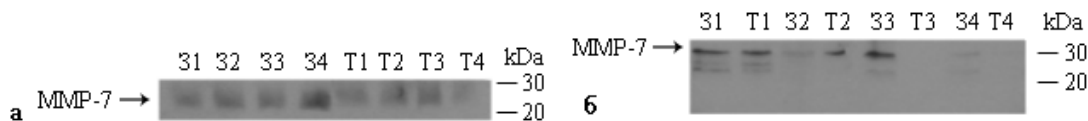
претпоставити да је формирање IGFBP-2/ $\alpha$ 2M комплекса део контролног механизма који је укључен у регулацију концентрације слободног IGFBP-2 и, самим тим, концентрације комплекса IGFBP-2/IGF, па посредно и IGF пептида. У овом тренутку није познато да ли IGFBP-2 комплекси са  $\alpha$ 2M везују своје IGF лиганде.

#### **4.4.3. Испитивање присуства IGFBP-2 протеазе MMP-7 у циркулацији и ткиву дебелог црева пацијената са колоректалним карциномом имуноблотом**

Један од начина на који туморске ћелије „отварају“ себи пут кроз ткива је излучивањем протеаза, које директно обезбеђују инвазију и метастазу, кроз протеолизу великог броја супстрата у ванћелијском матриксу. Према литературним подацима, MMP-7 излучују само туморске ћелије дебелог црева и она функционише као активатор разних фактора раста и цитокина, тако што разлаже њихове прекурсоре или инхибиторе (*Shiomi & Okada, 2003*). Показано је да MMP-7 директно делује и на неке IGFBP (*Miyamoto et al., 2004*). IGFBP-2 поседује карактеристичну аминокиселинску секвенцу, HBD домен, који омогућава интеракције са елементима ванћелијског матрикса. На тај начин се „укотви“ у близини ћелијске мембране, одакле може по потреби отпуштати везане IGF пептиде, након протеолизе ензимом MMP-7.

Пошто је показано да је удео фрагмената IGFBP-2 у серуму оболелих од тумора дебелог црева већи него код здравих особа, а за MMP-7 се зна да протеолизује IGFBP-2, урађен је имуноблот са анти-MMP-7 антителом у циљу утврђивања присуства овог ензима у серуму. Уједно је извршена и анализа ткивних солубилизата, да би се испитала експресија ове протеазе од стране самих ћелија дебелог црева. Добијени резултати су приказани на [слици 33](#) (појединачни узорци серума и спарени узорци ткива) и у [Табели 8](#). Може се видети да у серуму не постоји статистички значајна разлика у присуству MMP-7 између узорака здравих људи и пацијената са тумором дебелог црева. Исти закључак важи и за ткивне солубилизате, са тим што су код њих заступљене веће унутариндивидуалне варијације, независне од тога да ли је реч о здравом или туморском ткиву. Због велике разлике између узорака,

дензитометријске вредности за заступљеност MMP-7 у ткиву су дате као опсег, а не као средња вредност. У просеку је више MMP-7 у туморском ткиву, него у здравом.



**Слика 33.** Имуноблот MMP-7 у серуму а) и ткивним солубилизатима б) здравих особа (З) и пацијената са тумором дебелог црева (Т)

**Табела 8.** Релативна заступљеност MMP-7 у серуму и у ткивним солубилизатима здравих људи и пацијената са тумором дебелог црева, изражена као средња вредност са стандардном девијацијом

	Здраве особе n=42	Пацијенти са тумором дебелог црева n=29	Здраво ткиво n=15	Туморско ткиво n=15
<b>MMP-7 (ADU)</b>	136 ± 35	111 ± 12	32–136	73–292

Добијени резултати нису потврдили литературне податке према којима је количина (концентрација) MMP-7 у циркулацији пацијената са тумором дебелог црева значајно већа него код здравих особа (Xing *et al.*, 2014). Постојање ове разлике би се могло објаснити разликом у стадијуму болести пацијената. Литературни подаци се односе на пацијенте са метастазама, што није био случај са пацијентима чији су узорци анализирани у овој дисертацији.

У погледу присуства MMP-7 на површини мембране, постоје велике варијације унутар самих група (туморски и нетуморски узорци), што онемогућава упоређивање. Према објављеним радовима, количина MMP-7 везана за мембрану би требала бити већа код измењених ћелија слузокоже дебелог црева (Pryczynicz *et al.*, 2013), међутим то није потврђено у нашим експериментима. Поред релативно малог

броја узорака ткива (15 парова), појединачни дензитометријски резултати су били у широком опсегу вредности, а и пацијенти нису имали дијагностиковане метастазе.

#### **4.4.4 Испитивање оксидативног статуса IGFBP-2 у циркулацији и ткиву дебелог црева пацијената са колоректалним карциномом**

Познато је да повећани оксидативни стрес прати малигне промене у ткивима (*Fiaschi & Chiarugi, 2012*). Туморске ћелије могу производити већу количину реактивних (кисеоничних) врста од здравих ћелија. Ови молекули учествују у преносу сигнала, али истовремено су туморске ћелије отпорније на њихово дејство него здраве (*Pani et al., 2010*). Циљ наредног експеримента је био да се испита да ли је IGFBP-2 претрпео оксидативне промене услед појачаног дејства реактивних врста код пацијената са тумором дебелог црева. Најчешћа промена, и уједно најпоузданија за детекцију, је оксидација аминокиселинских остатака до карбонила. Карбонилне групе на протеинима (PCO) се појављују рано у процесу слободнорадикалске оксидације и релативно су стабилне (*Levine et al., 1990*). Да би се карбонили детектовали, узорци су прво дериватизовани са 2,4-динитрофенилхидразином (DNP), а формиран адукти су даље одређени. Мерење концентрације PCO у серуму и у ткивном солубилизату урађено је на два начина: спектрофотометријски на 370 nm и имуноблотом са анти-DNP антителима.

Осим укупних PCO, одређени су и карбониловани облици IGFBP-2 (CO-IGFBP-2). Након DNP дериватизације, узорци серума и солубилизата су подвргнути имунопреципитацији на матриксу са везаним анти-IGFBP-2 антителима. Концентрација, односно релативна заступљеност CO-IGFBP-2 је одређена дензитометријски после имуноблота са анти-DNP антителима.

У серуму пацијената са тумором дебелог црева измерене су веће концентрације PCO него у серуму здравих људи, међутим статистичка анализа је дала р вредност мало изнад 0,05 (**Табела 9** и **слика 34**). И код узорака ткивних солубилизата је, такође, била већа концентрација PCO у туморском него у здравом ткиву, али разлика није била статистички значајна (**Табела 10** и **слика 35**).

**Табела 9.** Концентрација, односно релативна заступљеност PCO и CO-IGFBP-2 у серуму здравих особа и пацијената са тумором дебелог црева, изражени као средња вредност са стандардном девијацијом

	Здраве особе n=37	Пацијенти са тумором дебелог црева n=32
Концентрација PCO <sup>a</sup> (nmol/mg протеина)	0,75 ± 0,15	0,93 ± 0,17
Релативна заступљеност укупних PCO (ADU) <sup>b</sup>	42,53 ± 5,17	60,47 ± 2,28
Релативна заступљеност CO-IGFBP-2 (ADU)	117 ± 17	202 ± 20*

<sup>a</sup>Спектрофотометрија, <sup>b</sup>дензитометрија након имуноблота

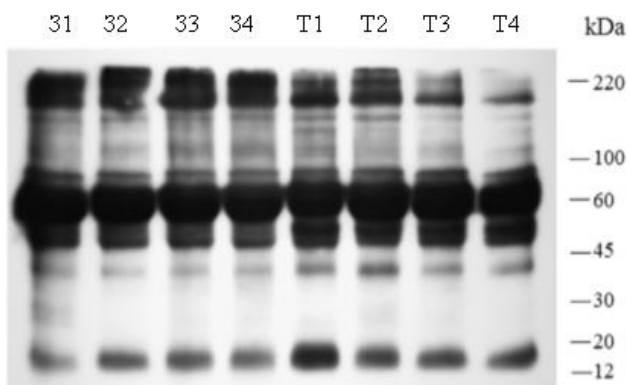
\*Статистички значајна разлика (Студентов *t*-тест,  $p < 0,05$ )

**Табела 10.** Концентрација и релативна заступљеност PCO у ткивним солубилизатима здравог и туморског ткива дебелог црева, изражени као средња вредност са стандардном девијацијом

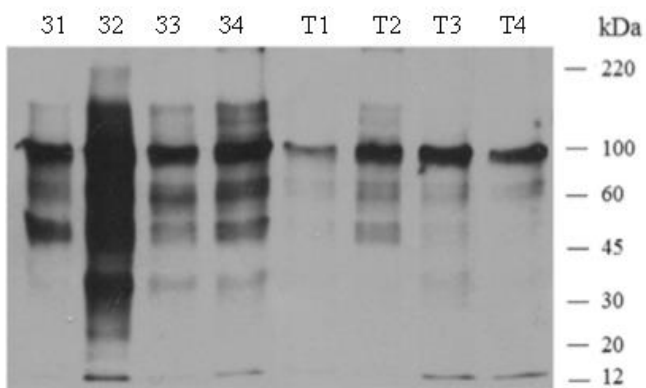
	Здраво ткиво n=15	Туморско ткиво n=15
Концентрација PCO (nmol/mg протеина) <sup>a</sup>	1,40 ± 0,56	2,22 ± 1,05
Релативна заступљеност укупних PCO (ADU) <sup>b</sup>	14,34 ± 4,31	38,22 ± 29,59

<sup>a</sup>Спектрофотометрија, <sup>b</sup>дензитометрија након имуноблота

Слични резултати су добијени и анализом степена карбониловања IGFBP-2. Концентрација, односно релативна заступљеност CO-IGFBP-2 је одређена само дензитометријски, након имуноблота са анти-DNP антителима (Табела 9 и слика 36).



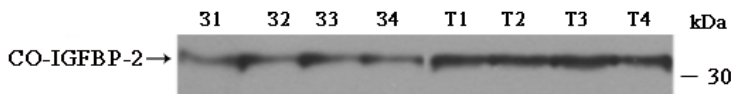
**Слика 34.** Имуноблот дериватизованих протеина серума здравих особа (31-34) и пацијената са тумором дебелог црева (Т1-Т4) са анти-DNP антителим



**Слика 35.** Имуноблот дериватизованих протеина ткивних солубилизата нетуморског (здравог) ткива црева (31-34) и туморског ткива (Т1-Т4) са анти-DNP антителим

У циркулацији пацијената са тумором дебелог црева нађена је већа концентрација СО-IGFBP-2 него код здравих људи и разлика је била статистички значајна ( $p = 3,16 \times 10^{-4}$ ). У ткивним солубилизатима нису детектовани оксидативно измењени облици IGFBP-2.





**Слика 36.** Имуноблот дериватизованог IGFBP-2 изолованог из серума здравих особа (31-34) и пацијената са тумором дебелог црева (T1-T4) са анти-DNP антителима

Немогућност детекције CO-IGFBP-2 у ткивним узорцима може бити последица његове мале концентрације, која је неколико стотина пута мања у ткиву него у серуму. Међутим, пошто се IGFBP-2 везује за мембранске интегрине и елементе ванћелијског матрикса, могуће је да је заштићенији од деловања слободних радикала.

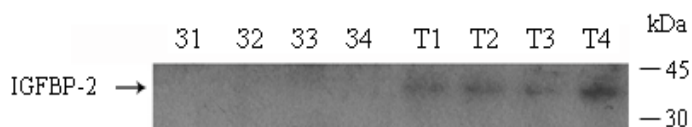
#### 4.4.5 Испитивање реактивности IGFBP-2 у циркулацији пацијената са колоректалним карциномом

Основна функција IGFBP-2 је да везује IGF молекуле, с тим да је афинитет нешто већи за IGF-II него за IGF-I (*Firth & Baxter, 2002*). Осим са IGF пептидима, овај молекул у циркулацији интерагује и са  $\alpha 2M$ . Из претходних експеримената се могло закључити да IGFBP-2 подлеже пост-транслационим изменама које обухватају протеолизу и оксидацију функционалних група, што би се могло одразити на његов афинитет за IGF лиганде. Протеолиза је изучен процес у коме се смањује афинитет IGFBP-2 ка IGF, чиме се контролише биодоступност IGF пептида. Такође је већ показано у овој дисертацији да процес старења, као и неопластичне измене у организму, утичу на смањено везивање IGFBP-2 за  $\alpha 2M$ .

Циљ наредног експеримента је био да испита да ли се мења афинитет мономера IGFBP-2 за IGF молекуле код туморских промена у организму, што би могла бити последица оксидације IGFBP-2. Коришћен је метод лиганд блота.

Узорци серума здравих особа и пацијената са тумором дебелог црева су подвргнути електрофорези у нередукујућим условима (неопходно за очување везивног места за лиганд) и лиганд блоту са радиоактивно обележеним IGF-I ( $^{125}I$ -

IGF-I), а потом је урађена ауторадиографија (слика 37). Резултати дензитометријске анализе добијених трака дати су у Табели 11.



**Слика 37.** Лиганд блот узорака серума здравих особа (31-34) и особа са тумором дебелог црева (Т1-Т4) са  $^{125}\text{I}$ -IGF-I

**Табела 11.** Везивање  $^{125}\text{I}$ -IGF-I лиганда за IGFBP-2 из серума здравих особа и особа са тумором дебелог црева, изражено као средња вредност са стандардном девијацијом

	Здраве особе n=15	Пацијенти са тумором дебелог црева n=15
$^{125}\text{I}$ -IGF-I везивање за IGFBP-2 из серума (срт)	$23 \pm 6$	$208 \pm 70^*$

\*Статистички значајна разлика (Студентов t-тест,  $p < 0,05$ )

На лиганд блоту са  $^{125}\text{I}$ -IGF-I се виде јаки сигнали код узорака пацијената са тумором дебелог црева и веома слаби код узорака здравих особа (дужом експозицијом би све траке постале јаче, али би позадински сигнал постао прејак). Дензитометријска анализа је показала да је везивање лиганда за IGFBP-2 скоро 10 пута веће код узорака пацијената него код здравих особа.

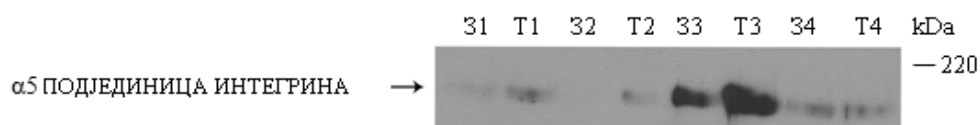
На основу добијених резултата се може закључити да је афинитет IGFBP-2 за IGF-I у серуму пацијената већи него у серуму здравих особа. Промена у везивању лиганда није последица само промене у концентрацији IGFBP-2, пошто је концентрација IGFBP-2 код пацијената већа око два пута у односу на здраве људе (видети Табелу 5), а везивање лиганда је веће десет пута. Ова разлика би се могла

објаснити структурном променом молекула IGFBP-2 која је условила промену афинитета. Као што је наведено, IGFBP-2 не подлеже гликозиловању и само је у једном раду објављено да је нађена фосфоформа IGFBP-2 (*Graham et al., 2007*). Протеолизом IGFBP-2 се смањује афинитет за лиганде, али фрагменти IGFBP-2 су маса 4-21 kDa (*Mark et al., 2005*) и они се електрофоретски крећу даље од мономера. Према томе, на положају мономера се могу наћи само форме IGFBP-2 које су измењене тако да се маса протеина незнатно мења. У ову групу промена би припадала оксидација бочних група, а раније је показано да је повећан садржај РСО и СО-IGFBP-2 у узорцима пацијената са тумором дебелог црева. Оксидација (карбониловање) би могла изазвати измену у конформацији везивних површина IGFBP-2, а последица тога би било ефикасније везивање IGF пептида. Повећањем афинитета СО-IGFBP-2 у односу на IGFBP-2, омогућава се прерасподела IGF пептида између различитих IGFBP у циркулацији. Улога IGFBP-3 као главног IGFBP у крви се препушта IGFBP-2. Ако се узме у обзир да бинарни комплекси IGFBP-2/IGF (око 45 kDa), за разлику од терцијарних IGFBP-3/IGF/ALS (око 150 kDa) (*Firth & Baxter, 2002*) лако пролазе кроз ендотелну баријеру крвних судова, транспорт IGF до туморског ткива је олакшан. Овим путем се, можда, додатно стимулише пролиферативна активност туморских ћелија.

#### **4.4.6 Испитивање експресије $\alpha 5$ подјединице интегрин у ткиву дебелог црева пацијената са колоректалним карциномом**

Пошто се IGFBP-2 везује за  $\alpha 5 \beta 1$  интегрин на површини ћелија (*Schütt et al., 2004*), у наредном експерименту је испитана повезаност експресије овог интегрин на мембранама и појаве малигног тумора. Туморски и нетуморски (здрави) ткивни солубилизати су анализирани имуноблотом са антителом на  $\alpha 5$  подјединицу интегрин. Уочене су значајне унутариндивидуалне разлике ([слика 38](#), узорци су уједначени у концентрацији укупних протеина). Било је случајева са већом експресијом  $\alpha 5$  интегрин код туморских него код нетуморских узорака и обрнуто, мада је први случај био чешћи. Дензитометријском анализом су добијене вредности у

врло широком опсегу (Табела 12), па су подаци приказани као опсег. У складу са тим, нису нађене ни статистички значајне разлике између две врсте ткива.



**Слика 38.** Присуство  $\alpha 5$  подјединице интегринa у солубилизатима ћелијских мембрана добијених из здравог (31-34) и туморског ткива дебелог црева (T1-T4)

**Табела 12.** Опсег релативне заступљености  $\alpha 5$  подјединице интегринa у ткивним солубилизатима здравог и туморског ткива дебелог црева

	Здраво ткиво n=15	Туморско ткиво n=15
Релативна заступљеност $\alpha 5$ подјединице интегринa (ADU)	16-109	28-880

Због велике варијације у присуству  $\alpha 5$  подјединице, као и  $\alpha 5\beta 1$  интегринa, између пацијената, нису се могли донети јасни закључци о евентуалној разлици на нивоу експресије услед појаве тумора. Могући извор варијације је стадијум болести, као и релативна заступљеност различитих ћелија у ткивним препаратима, од којих само неке експримирају овај интегрин. Међутим, пошто су оба узорка једне особе обично слично експримирали  $\alpha 5$  протеин, врло је вероватно да је његова синтеза индивидуално карактеристична.

#### 4.4.7 Испитивање обрасца гликозиловања $\alpha 2M$ у циркулацији пацијената са колоректалним карциномом

Гликозиловање има критичну улогу у различитим биолошким интеракцијама које се јављају у (пато)физиолошким променама у организму (*Kim & Varki, 1997*). Алфа-2-макроглобулин је гликопротеин са осам потенцијалних места за N-гликозиловање (*Lin et al., 2012*). Промене у обрасцима гликозиловања су уобичајене у неопластичним трансформацијама. Недавне студије су потврдиле да измењени образац гликозиловања подстиче онкогену трансформацију и стимулише инвазију и метастазу туморских ћелија (*Denis & Laferte, 1987; Gu et al., 2009*).

Пошто је у претходним експериментима установљено да су комплекси IGFBP-2/ $\alpha 2M$  део контролног механизма који регулише концентрацију слободне форме IGFBP-2 и да се код пацијената са тумором дебелог црева мења удео ових комплекса, у наредном експерименту је испитан образац гликозиловања  $\alpha 2M$ , који би, такође, могао бити важан за интеракцију са IGFBP-2. Анализа обрасца гликозиловања  $\alpha 2M$  из серума здравих особа и пацијената са тумором дебелог црева урађена је методом лектинског микроереја. Поред утврђивања евентуалне промене гликозиловања која би могла бити важна за везивање IGFBP-2, испитивање гликана  $\alpha 2M$  овом методом је послужило и као “screening test” у процени могу ли они бити гликобиомаркери за тумор дебелог црева. Метода микроереја је погодна у трагању за биомаркерима као брза, осетљива и у једном кораку се може обрадити неколико стотина узорака.

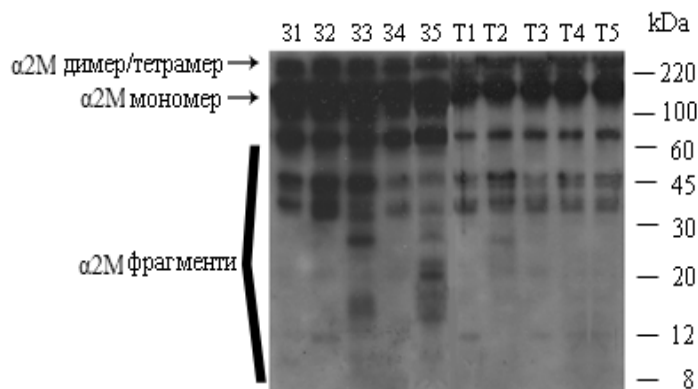
За ову студију је искоришћено 14 лектина, који су специфични за широк спектар сахаридних структура, првенствено оних које су до сада нађене на гликопротеинима у циркулацији. Као додатна метода за потврду резултата је коришћена техника лектинског блота (са неколико лектина). Пре анализе серије физиолошких узорака, метода је оптимизирана за сваки лектин. За рад су коришћене концентрације лектина које су давале најјаче могуће сигнале, уз најслабији позадински сигнал (**Табела 13**).

**Табела 13.** Оптималне концентрације лектина за лектински микоререј за анализу обрасца гликозиловања  $\alpha 2M$

Лектин	Оптимална концентрација ( $\mu\text{g/ml}$ )
<i>Phaseolus vulgaris</i> леукоаглутинин (PHA-L)	100
<i>Phaseolus vulgaris</i> еритроаглутинин (PHA-E)	50
<i>Sambucus nigra</i> аглутинин (SNA)	50
<i>Maackia amurensis</i> лектин-II (MAL-II)	50
<i>Aspergillus oryzae</i> лектин(AOL)	100
<i>Griffonia simplicifolia</i> лектин-II (GSL-II)	150
<i>Galanthus nivalis</i> лектин (GNL)	100
<i>Hipperastrum hybrid</i> лектин (HHL)	100
Аглутинин из кикирикија (PNA)	50
<i>Lens culinaris</i> аглутинин (LCA)	100
Конканавалин А (ConA)	50
Wheat germ agglutinin (WGA)	50
<i>Ricinus communis</i> agglutinin-I (RCA-I)	50
<i>Aleuria aurantia</i> lectin (AAL)	50

Алфа-2-макроглобулин је имунопреципитацијом изолован из серума здравих особа и пацијената са тумором дебелог црева. Сваки узорак  $\alpha 2M$  је нанет у 14 поља наменске стаклене плочице (епокси активирани чип) у пентапликату и омогућено му је да интерагује са биотинилованим лектинима. После везивања флуоресцентно обележеног стрептавидина, плочице су скениране и за сваку комбинацију узорак/лектин израчунат је средњи интензитет сигнала, као и интензитет позадинског сигнала. Резултати су приказани као однос интензитета специфичног сигнала (S) и позадинског сигнала (N, “noise“), а као граница прихватљивости резултата (вредност која је потребна да би подаци били поуздани) сматран је однос  $S/N > 5$ . Вредност сигнала S/N за одређену комбинацију узорак/лектин је даље нормализована спрам количине  $\alpha 2M$  у сваком узорку, која је одређена дензитометријски после имуноблота

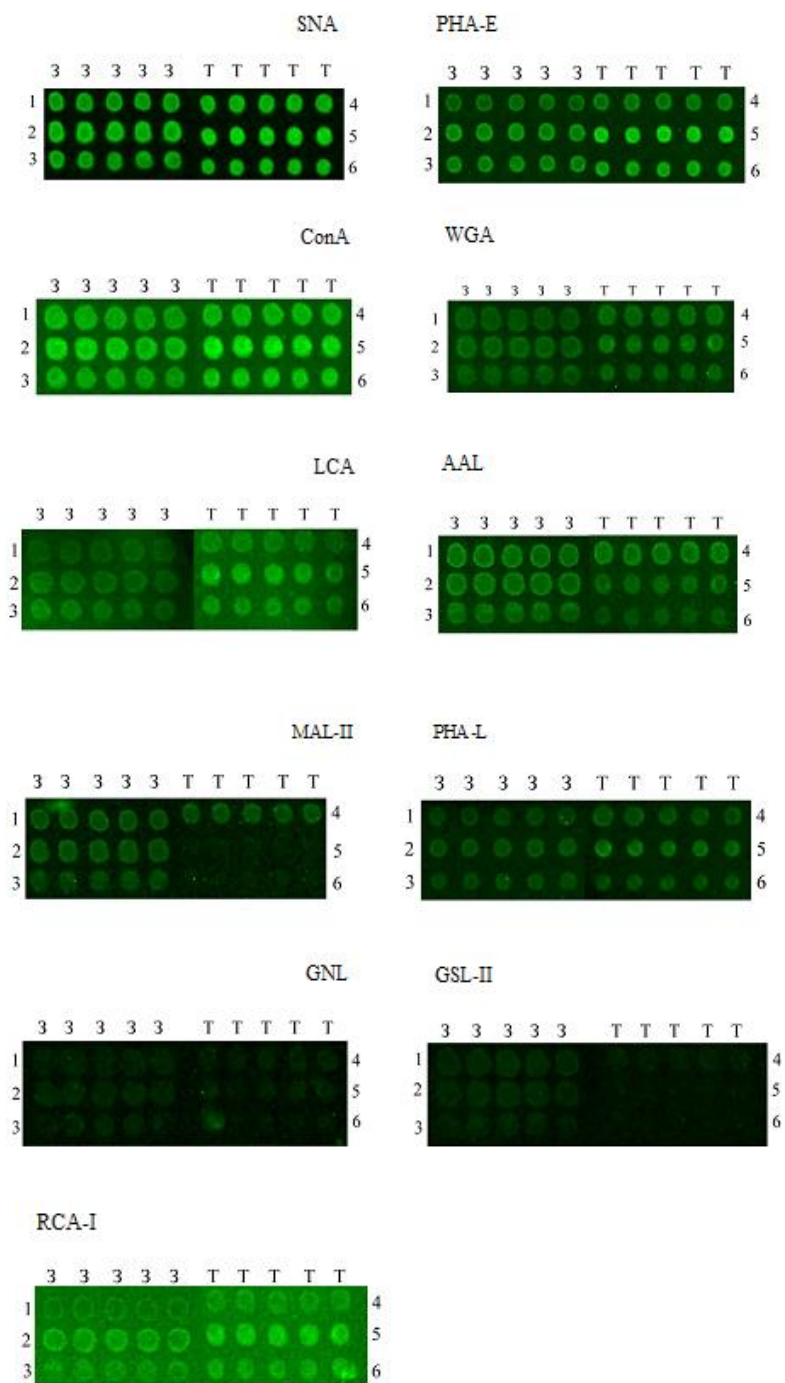
(слика 39). Нормализоване вредности сигнала су статистички обрађене и резултати приказани у Табели 14.



**Слика 39.** Имуноблот  $\alpha 2M$  у елуату са матрикса на коме је имобилизовано анти- $\alpha 2M$  антитело;  $\alpha 2M$  је изолован из серума здравих особа (31-35) и пацијената са тумором дебелог црева (T1-T5)

Од четрнаест коришћених лектина, једанаест је испунило услов  $S/N > 5$ , тј. специфично се везивало са  $\alpha 2M$ . То су били: SNA, PHA-E, ConA, WGA, LCA, AAL, MAL-II, PHA-L, GNL, GSL-II и RCA-I. На слици 40 приказани су репрезентативни резултати (по три узорка здравих људи и пацијената са тумором дебелог црева).

Интензитети сигнала су се значајно разликовали за различите лектине (Табела 14) и, на основу односа  $S/N$ , констатовано је да су лектини који најјаче интерагују са  $\alpha 2M$ : SNA, PHA-E и ConA. Статистички значајне разлике у интензитету сигнала између две групе узорака су пронађене за SNA, ConA, WGA, LCA и PHA-L, односно  $\alpha 2M$  пацијената са тумором дебелог црева је давао интензивније сигнале (слика 40).



**Слика 40.** Резултати лектинског микроереја изолованог  $\alpha$ 2М (у пентапликату) из серума здравих особа (31-33) и пацијената са тумором дебелог црева (Т4-Т6)



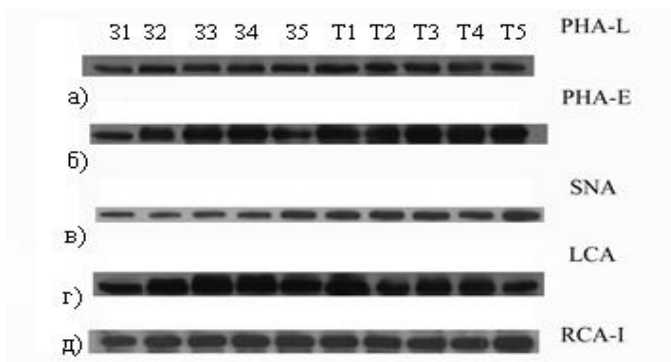
**Табела 14.** Резултати анализе протеина  $\alpha 2M$  изолованог из серума здравих особа и пацијената са тумором дебелог црева методом лектинског микроереју; сигнали су изражени у произвољним јединицама и нормализовани на количину  $\alpha 2M$

Лектин	S/N	Нормализован интензитет сигнала, здраве особе	Нормализован интензитет сигнала, пацијенти са тумором дебелог црева
<b>SNA</b>	189	772 $\pm$ 313	1431 $\pm$ 225*
<b>PHA-E</b>	79	527 $\pm$ 298	1004 $\pm$ 350
<b>Con A</b>	35	357 $\pm$ 159	621 $\pm$ 129*
<b>WGA</b>	14	741 $\pm$ 288	1336 $\pm$ 259*
<b>LCA</b>	13	98 $\pm$ 54	249 $\pm$ 82*
<b>AAL</b>	11	171 $\pm$ 91	374 $\pm$ 70
<b>MAL-II</b>	8	187 $\pm$ 23	338 $\pm$ 190
<b>PHA-L</b>	8	30 $\pm$ 6	45 $\pm$ 27*
<b>GNL</b>	7	28 $\pm$ 6	18 $\pm$ 9
<b>GSL-II</b>	6	95 $\pm$ 21	123 $\pm$ 79
<b>RCA-I</b>	5	312 $\pm$ 233	436 $\pm$ 239
<b>PNA</b>	<5	-	-
<b>HHL</b>	<5	-	-
<b>AOL</b>	<5	-	-

\* Статистички значајна разлика (Студентов *t*-тест,  $p < 0,05$ )

Као комплементарна метода лектинском микроереју коришћен је стандардни лектински блот, уз употребу изолованог  $\alpha 2M$  и пет биотинилованих лектина: PHA-L, PHA-E, SNA, LCA и RCA-I. Резултати лектинског блота су приказани на **слици 41**.

Дензитометријска анализа протеинских трака са лектинског блота и података након нормализације сигнала су указали на статистички значајне разлике између две групе узорака у случају PHA-L, PHA-E и SNA лектина (**Табела 15**). Резултати добијени у лектинском микроереју и лектинском блоту су били у сагласности, чиме је потврђено да се повећава степен и мења образац гликозиловања  $\alpha 2M$  код пацијената са тумором дебелог црева.



**Слика 41.** Лектински блот изолованог  $\alpha 2\text{M}$  из серума здравих особа (31-35) и пацијената са тумором дебелог црева (Т1-Т5) са лектинима: а) РНА-Л, б) РНА-Е, в) SNA, г) LCA и д) RCA-I

**Табела 15.** Резултати анализе протеина  $\alpha 2\text{M}$  изолованог из серума здравих особа и пацијената са тумором дебелог црева методом лектинског блота; сигнали су изражени у дензитометријским јединицама и нормализовани на количину  $\alpha 2\text{M}$

Лектин	Нормализован интензитет сигнала, здраве особе (ADU)	Нормализован интензитет сигнала, пацијенти са тумором дебелог црева (ADU)
<b>РНА-Л</b>	50 ± 10	83 ± 13*
<b>РНА-Е</b>	67 ± 17	100 ± 18*
<b>SNA</b>	33 ± 12	83 ± 17*
<b>LCA</b>	67 ± 17	83 ± 28
<b>RCA-I</b>	33 ± 8	50 ± 12

\* Статистички значајна разлика (Студентов *t*-тест,  $p < 0,05$ )

На основу јаких интензитета сигнала за интеракцију  $\alpha 2\text{M}$  са SNA, РНА-Е и ConA лектинима (слика 40) могло би се закључити да већина молекула  $\alpha 2\text{M}$  садржи високо-манозне типове N-гликана са остацима  $\alpha 2,6$  сијалинске киселине на крају и уметнутим GlcNAc. Појава високо-манозних N-гликана, који су фукозиловани у свом језгру, је већ уочена у измењеном ткиву дебелог црева (Balog *et al.*, 2012), а пораст

садржаја високо-манозних гликана је констатован и у серуму пацијенткиња са тумором дојке (*de Leoz et al., 2011*). Са друге стране, мањи интензитети сигнала добијених са осталим лектинима могу навести на претпоставку да је мањи садржај сахараида за које су они специфични, као што су терминална  $\alpha 2,3$  сијалинска киселина, три- и тетра-антенарни комплексни N-гликани. Међутим, треба имати у виду да интеракција лектина са лигандом није увек у односу 1:1. Резултати добијени у овом раду су у сагласности са подацима добијеним методом MS (*Lin et al., 2012*). За разлику од MS, у којој се врши фрагментација протеина, лектински микроереј се заснива на структурном препознавању гликана у природној конформацији. Узимајући у обзир специфичност лектина, може се претпоставити да у физиолошким условима рецептори који везују угљене хидрате могу интераговати са  $\alpha 2M$ . Даље, микроереј омогућава анализу великог броја узорака у кратком временском периоду, што није случај са методом MS.

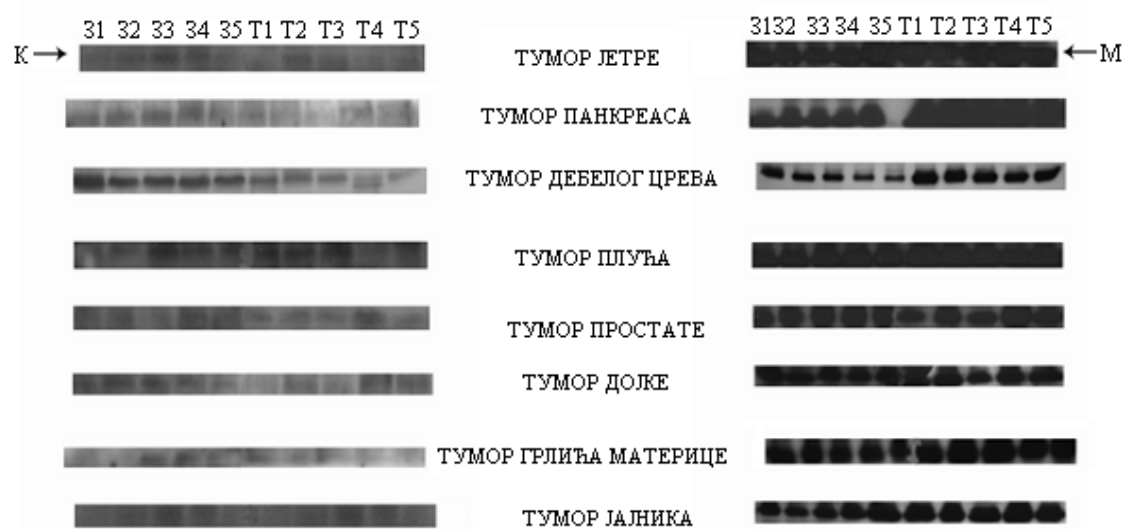
Промена у гликозиловању  $\alpha 2M$  може бити један од узрочника промењеног афинитета  $\alpha 2M$  за IGFBP-2, чиме се утиче на концентрацију IGFBP-2/ $\alpha 2M$  комплекса, као и на концентрацију слободног IGFBP-2. Измењено гликозиловање  $\alpha 2M$  би могло утицати на његову интеракцију и са другим лигандима и ћелијским рецептором, на ћелијски одговор и/или на брзину уклањања из организма.

Резултати који су добијени анализом гликана на  $\alpha 2M$  могу имати већу важност од утврђивања њиховог утицаја на интеракције. Познато је да се образац гликозиловања протеина мења при појави различитих врста тумора (*Kim & Varki, 1997*). Потрага за гликобиомаркерима који би се могли детектовати у серуму у раној фази болести је интензивирана у последњој деценији и све је већи број студија које указују на потенцијалне гликобиомаркере тумора (*Adamczyk et al., 2012*). Дијагноза тумора дебелог црева се још увек заснива на конвенционалним клиничким методама, пошто не постоји поуздан биомаркер у циркулацији, карактеристичан за ову патологију. Стога би  $\alpha 2M$  требало узети у разматрање као кандидата за (глико)биомаркер тумора дебелог црева. Експерименти су настављени у циљу диференцијалне анализе  $\alpha 2M$  код пацијената са различитим стадијумима тумора.

## 4.5 Молекулски облици IGFBP-2 код пацијената са различитим врстама тумора

На моделу тумора дебелог црева је констатовано да је измењена заступљеност одређених молекулских облика IGFBP-2 показатељ трансформисаног фенотипа ћелија епитела дебелог црева, и то пре свега повећана концентрација мономера IGFBP-2 и смањена концентрација комплекса са  $\alpha 2M$ . Бројна истраживања су показала да је код многих врста тумора повећана концентрација IGFBP-2 у крви, као и да степен повећања одговара степену малигнитета тумора (*Hoeflich et al., 2001*).

У следећој серији експеримената је испитано да ли појаве везане за тумор дебелог црева важе и за туморе који се могу јавити у осталим органима. Да би се то утврдило, анализирани су серуми пацијената оболелих од седам других врста тумора: јетре, панкреаса, плућа, простате, дојке, грлића материце и јајника. Урађен је имуноблот са анти-IGFBP-2 антителом, а протеинске траке за мономер IGFBP-2 и комплексе су дензитометријски процењене (урађена је електрофореза на 10 % гелу, на коме су сви комплекси груписани на истом положају). Резултати имуноблота су приказани на [слици 42](#), а дензитометријска анализа у [Табели 16](#).



**Слика 42.** Комплекси (К) и мономери (М) IGFBP-2 у серуму здравих људи (31-35) и пацијената оболелих од тумора (Т1-Т5)

**Табела 16.** Концентрација укупних протеина и релативна заступљеност комплекса и мономера IGFBP-2 у серуму здравих особа (З) и пацијената оболелих од тумора (Т), изражена као средња вредност са стандардном девијацијом

Врста тумора	Укупна концентрација протеина у серуму $X \pm SD$ (g/l)	Релативна заступљеност IGFBP-2 комплекса и мономера $X \pm SD$ (ADU)			
		Комплекси		Мономер	
		З	Т	З	Т
<b>Здраве особе</b>	$73 \pm 3,8$				
<b>Јетра</b>	$73 \pm 0,5$	$107 \pm 16$	$119 \pm 10$	$703 \pm 30$	$899 \pm 66^*$
<b>Панкреас</b>	$72 \pm 2,8$	$289 \pm 16$	$130 \pm 36^*$	$69 \pm 52$	$176 \pm 81^*$
<b>Дебело црево</b>	$75 \pm 0,6$	$238 \pm 55$	$149 \pm 98$	$458 \pm 15$	$943 \pm 58^*$
<b>Плућа</b>	$68 \pm 1,1$	$120 \pm 4$	$124 \pm 3$	$731 \pm 28$	$809 \pm 10$
<b>Простата</b>	$69 \pm 0,7$	$33 \pm 2$	$34 \pm 1$	$324 \pm 21$	$398 \pm 76^*$
<b>Дојка</b>	$70 \pm 0,5$	$145 \pm 3$	$132 \pm 4^*$	$254 \pm 6$	$257 \pm 3$
<b>Грлић материце</b>	$70 \pm 0,9$	$174 \pm 12$	$167 \pm 12$	$793 \pm 6$	$969 \pm 14^*$
<b>Јајник</b>	$75 \pm 0,6$	$126 \pm 6$	$106 \pm 11^*$	$697 \pm 12$	$925 \pm 5^*$

\* Статистички значајна разлика (Студентов *t*-тест,  $p < 0,05$ )

Као што се из **табеле 16** и са **слике 42** може видети, заступљеност мономерног облика IGFBP-2 у серуму је повећана код свих пацијената, независно од врсте тумора, с тим што се статистички значајна разлика појављује код тумора јетре,

панкреаса, дебелог црева, простате, грлића материце или јајника. Са друге стране, заступљеност IGFBP-2/ $\alpha$ 2M комплекса је најчешће била мања код пацијената него код здравих људи, с тим што је статистички значајна разлика констатована само код пацијената са тумором панкреаса, дебелог црева, дојке или јајника.

Као што је раније речено, смањена склоност грађењу комплекса није последица смањене концентрације  $\alpha$ 2M, пошто је она неколико стотина до хиљаду пута већа од концентрације IGFBP-2. Највероватније је да смањена концентрација IGFBP-2/ $\alpha$ 2M комплекса одражава структурне промене оба партнера, што их чини међусобно мање реактивним. У овом моменту се не може рећи да ли је промена структуре (оксидација IGFBP-2 и измењено гликозиловање  $\alpha$ 2M) примарни догађај, а смањено комплексирање последица тога или је повећана потреба за слободним (мономерним) IGFBP-2 (у циљу транспорта IGF пептида до ткива) примарни патофизиолошки захтев код пацијената са тумором, који се испуњава смањењем стварања комплекса, тако што се партнери структурно мењају. У сваком случају, равнотежа између молекулских облика IGFBP-2 у циркулацији се мења код тумора. Грађење комплекса IGFBP-2, који би могао регулисати степен слободе овог молекула, упућује на постојање новог нивоа његове регулације. Према досадашњим сазнањима, регулација IGFBP-2 је обезбеђена брзином његове синтезе (у јетри и локално) и разградње (протеолизом). Комплекс IGFBP-2/ $\alpha$ 2M је већ присутан у циркулацији и повећана потреба за IGFBP-2 (макар она била штетна по организам) се може брзо задовољити отпуштањем из комплекса, променом међусобне реактивности IGFBP-2 и  $\alpha$ 2M. Иако за сада нема доказа о циљаном транспорту IGFBP-2/ $\alpha$ 2M комплекса до ткива, могуће је да комплекс има способност везивања за ткивни  $\alpha$ 2M рецептор, чиме се IGFBP-2 приближава рецепторима који везују IGF пептиде или свом рецептору (интегрини).

## 5. Закључци

- Везујући протеин 2 за факторе раста сличне инсулину (IGFBP-2) у циркулацији се може јавити у три облика: као комплекс, мономер и фрагмент различитих молекулских маса
- Врста молекулских облика IGFBP-2 се не мења под утицајем различитих (пато)физиолошких фактора, као што су старење, активно бављење спортом, оксидативни стрес, повећана концентрација липида или глукозе, измењена протеолитичка активност, али се мења њихова количина и међусобни однос
- Од пост-транслационих модификација, IGFBP-2 подлеже протеолизи и оксидацији (карбониловању)
- IGFBP-2 ствара комплексе са алфа-2-макроглобулином ( $\alpha 2M$ ) у циркулацији
- Концентрације IGFBP-2 и  $\alpha 2M$  не утичу директно на концентрацију и релативну заступљеност IGFBP-2/ $\alpha 2M$  комплекса
- Јони цинка (II) подстичу олигомеризацију  $\alpha 2M$ , али не утичу на стварање комплекса IGFBP-2/ $\alpha 2M$
- Пептидна секвенца RGD, важна за интеракцију IGFBP-2 са интегрином, није контактна секвенца за интеракцију IGFBP-2 са  $\alpha 2M$
- Са старењем се повећава концентрација мономера и фрагмената IGFBP-2 у циркулацији, као и  $\alpha 2M$ , а смањује се концентрација IGFBP-2/ $\alpha 2M$  комплекса
- Код пацијената са тумором дебелог црева је повећана концентрација укупног IGFBP-2 у циркулацији и међусобни однос молекулских облика је измењен: повећана је концентрација мономера и фрагмената IGFBP-2, а смањена комплекса IGFBP-2/ $\alpha 2M$
- У ткиву дебелог црева су нађени само мономер и фрагменти IGFBP-2; упоређивањем спарених узорака исте особе (нетуморског и туморског ткива), констатовано је да има случајева са сличном концентрацијом IGFBP-2 у оба узорка, са већом концентрацијом у туморском узорку или обрнуто – могуће је да стадијум тумора и/или врста и број ћелија које укључује, утичу на експресију овог молекула

- Мономер IGFBP-2 у циркулацији пацијената са тумором дебелог црева је додатно оксидован (карбонилован) у односу на здраве особе
- Присуство матриксне металопротеазе-7 (MMP-7), која протеолизује IGFBP-2, али и разлаже ванћелијски матрикс у напредовању тумора, је слично у циркулацији здравих људи и пацијената са тумором дебелог црева, односно у нетуморском и туморском ткиву црева – додатну протеолизу IGFBP-2 код пацијената изазива неки други ензим или је активност MMP-7 повећана
- Присуство интегрина у чијем је саставу  $\alpha 5$  подјединица, за који се зна да везује IGFBP-2, је слично на мембранама ћелија нетуморског и туморског ткива дебелог црева – није повећана експресија рецептора за IGFBP-2 код тумора
- Реактивност IGFBP-2 према  $^{125I}$ -IGF-I је знатно већа у циркулацији пацијената са тумором дебелог црева; концентрација IGFBP-2 код пацијената је већа око два пута у односу на здраве људе, а везивање лиганда је веће десет пута – ова разлика би се могла објаснити структурном променом IGFBP-2 која условљава промену афинитета
- $\alpha 2M$  у циркулацији пацијената са тумором дебелог црева је више гликозилован, садржи више  $\alpha 2,6$  Sia, GlcNAc и Man остатака, и поседује више мулти-антенарних комплексних типова N-гликана у односу на протеин здравих људи
- Анализом узорака пацијената са осам различитих врста тумора, констатован је најчешћи образац молекулске промене IGFBP-2 у циркулацији у односу на здраве људе – концентрација укупног и мономерног IGFBP-2 се повећава, а концентрација IGFBP-2/ $\alpha 2M$  комплекса се смањује
- У овом моменту се не може рећи да ли је промена структуре (оксидација IGFBP-2 и измењено гликозиловање  $\alpha 2M$ ) примарни догађај код пацијената са тумором, а смањено комплексирање његова последица, или је повећана потреба за слободним (мономерним) IGFBP-2 (у циљу транспорта IGF пептида до ткива и/или интеракције са интегрином) примарни патофизиолошки захтев, кроз смањено стварања комплекса услед промена у структури партнера
- Грађење комплекса IGFBP-2 са  $\alpha 2M$ , који контролише доступност IGFBP-2, упућује на постојање новог нивоа његове регулације – према досадашњим сазнањима, регулацију IGFBP-2 контролише брзина синтезе (у јетри и локално) и разградње



(протеолизом), док је комплекс IGFBP-2/ $\alpha$ 2M већ присутан у циркулацији и повећана потреба за IGFBP-2 (макар штетна по организам) се може брзо задовољити отпуштањем из комплекса, променом међусобне реактивности IGFBP-2 и  $\alpha$ 2M

## 6. Литература

- Adamczyk B, Tharmalingam T, Rudd PM (2012) Glycans as cancer biomarkers. *Biochim Biophys Acta* 1820:1347-1353
- Adams TE, Epa VC, Garrett TP, Ward CW (2000) Structure and function of the type 1 insulin-like growth factor receptor. *Cell Mol Life Sci* 57:1050-1093
- Adham NF, Song MK, Rinderknecht H (1977) Binding of zinc to alpha-2-macroglobulin and its role in enzyme binding activity *Biochim Biophys Acta* 495:212-219
- Adiels M, Taskinen MR, Packard C, Caslake MJ, Soro-Paavonen A, Westerbacka J, Vehkavaara S, Hakkinen A, Olofsson SO, Yki-Jarvinen H, Boren J (2006) Overproduction of large VLDL particles is driven by increased liver fat content in man. *Diabetologia* 49:755-765
- Angelloz-Nicoud P, Binoux M (1995) Autocrine regulation of cell proliferation by the insulin-like growth factor (IGF) and IGF binding protein-3 protease system in a human prostate carcinoma cell line (PC-3). *Endocrinology* 136:5485-5492
- Annunziata M, Granata R, Ghigo E (2011) The IGF system. *Acta Diabetol* 48:1-9
- Arai T, Parker A, Busby W Jr., Clemmons DR (1994) Heparin, heparan sulfate, and dermatan sulfate regulate formation of the insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor-binding protein complexes. *J Biol Chem* 269:20388-20393
- Arai T, Busby W Jr., Clemmons DR (1996a) Binding of insulin-like growth factor (IGF)- I or- II to IGF-binding protein-2 enables it to bind to heparin and extracellular matrix. *Endocrinology* 137:4571-4575
- Armstrong PB (2010) Role of  $\alpha$ 2-macroglobulin in the immune responses of invertebrates. *Invertebr Surviv J* 7:165-180
- Azar WJ, Azar SH, Higgins S, Hu JF, Hoffman AR, Newgreen DF, Werther GA, Russo VC (2011) IGFBP-2 enhances VEGF gene promoter activity and consequent promotion of angiogenesis by neuroblastoma cells. *Endocrinology* 152:3332-3342

Azar WJ, Zivkovic S, Werther GA, Russo VC (2014) IGFBP-2 nuclear translocation is mediated by a functional NLS sequence and is essential for its pro-tumorigenic actions in cancer cells. *Oncogene* 33:578-588

Bach LA, Headey SJ, Norton RS (2005) IGF-binding proteins—the pieces are falling into place. *Trends Endocrinol Metab* 16:228-234

Bahhady R, Kim K-J, Borok Z, Crandall ED, Shen W-C (2008) Characterization of protein factor(s) in rat bronchoalveolar lavage fluid that enhance insulin transport via transcytosis across primary rat alveolar epithelial cell monolayers. *Eur J Pharm Biopharm* 69:808-816

Baker J, Liu JP (1993) Role of insulin-like growth factors in embryonic and postnatal growth. *Cell* 75:73-82

Balog CIA, Stavenhagen K, Fung WLJ, Koeleman CA, McDonnell LA, Verhoeven A, Mesker WE, Tollenaar RAEM, Deelder AM, Wuhrer M (2012) N-glycosylation of colorectal cancer tissues. *Mol Cell Proteomics* 11:571-585

Bang P, Brismar K, Rosenfeld RG (1994) Increased proteolysis of insulin-like growth factor-binding protein-3 (IGFBP-3) in noninsulin-dependent diabetes mellitus serum, with elevation of a 29-kilodalton (kDa) glycosylated IGFBP-3 fragment contained in the approximately 130- to 150-kDa ternary complex. *J Clin Endocrinol Metab* 78(5):1119-1127

Barrera DI, Matheus LM, Stigbrand T, Arbelaez LF (2007) Proteolytic hydrolysis and purification of the LRP/alfa-2-macroglobulin receptor domain from  $\alpha$ -macroglobulins. *Protein Expr Purif* 53:112-118

Barton-Hay S, Boyle F, Ferrier, Scott C (2004) Elevated serum insulin-like growth factor binding protein-2 as a prognostic marker in patients with ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 10:1796-1806

Baxter RC (2001) Changes in the IGF-IGFBP axis in critical illness. *Best Pract Res Clin Endocrinol* 15:421-434

Belfiore A, Frasca F, Pandini G, Sciacca L, Vigneri R (2009) Insulin receptor isoforms and insulin receptor/insulin-like growth factor receptor hybrids in physiology and disease. *Endocr Rev* 30:586-623

- Berg U, Enqvist JK, Mattsson CM, Carlsson-Skwirut C, Sundberg CJ, Ekblom B, Bang P (2008) Lack of sex differences in the IGF-IGFBP response to ultra endurance exercise. *Scand J Med Sci Sports* 18:706-714
- Bermann M, Jaffe CA, Tsai W, DeMott-Friberg R, Barkan AL (1994) Negative feedback regulation of pulsatile growth hormone secretion by insulin-like growth factor I. *J Clin Invest* 94:138-145
- Binoux M, Lalou C, Lassare C, Blat C, Hossenlopp P (1994) Limited proteolysis of insulin-like growth factor binding protein-3 (IGFBP-3): A physiological mechanism in the regulation of IGF bioavailability. Current directions in insulin-like growth factor research (Le Roith D, Raizada MK, eds) pp. 293-300. Plenum Press, New York, NY.
- Birkenmeier G, Kampf I, Kratzsch J, Schellenberger W (1998) Human leptin forms complexes with alpha 2-macroglobulin which are recognized by the alpha 2-macroglobulin receptor/low density lipoprotein receptor-related protein. *Eur J Endocrinol* 139:224-230
- Blum WF, Horn N, Kratzsch J, Jørgensen JO, Juul A, Teale D, Mohnike K, Ranke MB (1993) Clinical studies of IGFBP-2 by radioimmunoassay. *Growth Reg* 3:100-104
- Boisclair YR, Rhoads RP, Ueki I, Wang J, Ooi GT (2001) The acid-labile subunit (ALS) of the 150 kDa IGF-binding protein complex: an important but forgotten component of the circulating IGF system. *J Endocrinol* 170:63-70
- Bond JE, Cianciolo GJ, Pizzo SV (2007) Incorporation of low molecular weight molecules into  $\alpha$ 2-macroglobulin by nucleophilic exchange. *Biochem Biophys Res Commun* 357:433-438
- Bond JJ, Meka S, Baxter RC (2000) Binding characteristics of pro-insulin-like growth factor-II from cancer patients: binary and ternary complex formation with IGF binding proteins-1 to -6. *J Endocrinol* 165: 253-260
- Booth BA, Boes M, Andress DL, Dake BL, Kiefer MC, Maack C, Linhardt Rj, Bar K, Caldwell EE, Weiler J, Bar RS (1995) IGFBP-3 and IGFBP-5 association with endothelial cells: role of C-terminal heparin binding domain. *Growth Reg* 5:1-17
- Botfield C, Ross, RJM, Hinds, C.J (1997) The role of IGFs in catabolism. *Bailliere Clin Endocrinol* 11:679-697

Boulle N, Logié A, Gicquel C, Perin L, Le Bouc Y (1998) Increased levels of insulin-like growth factor II (IGF-II) and IGF binding protein-2 are associated with malignancy in sporadic adrenocortical tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 83:1713-1720

Bowers EV, Horvath JJ, Bond JE, Cianciolo GJ, Pizzo SV (2009) Antigen delivery by  $\alpha$ 2-macroglobulin enhances the cytotoxic T lymphocyte response. *J Leukocyte Biol* 86:1259-1268

Bowers EV, Bond JE, Cianciolo GJ, Pizzo SV (2012)  $\alpha$ 2-Macroglobulin co-administered in vivo promotes antigen delivery and presentation. *Open J Immunol* 2:72-77

Brandt J, Andersen AS, Kristensen C (2001) Dimeric fragment of the insulin receptor alpha-subunit binds insulin with full holoreceptor affinity. *J Biol Chem* 276:12378-12384

Brandt K, Lundell K, Brismar K (2011) Neutrophil-derived azurocidin cleaves insulin-like growth factor-binding protein-1,-2 and -4. *Growth Hormon IGF Res* 21:167-173

Buchanan CM, Phillips AR, Cooper GJ (2001) Preptin derived from proinsulin-like growth factor II (proIGF-II) is secreted from pancreatic beta cells and enhances insulin secretion. *Biochem J* 360:431-439

Buck C.A, Glick MC, Warren L (1971) Glycopeptides from the surface of control and virus-transformed cells. *Science* 172:169-171

Bunn RC, Fowlkes JL (2003) Insulin-like growth factor binding protein proteolysis. *Trends Encorinol Metab* 14:176-181

Burgess AW (1998) Growth control mechanisms in normal and transformed intestinal cells. *Philos Trans R Soc Lond Ser B Biol Sci* 353:903-909

Burke RD (1999) Invertebrate integrins: structure, function, and evolution. *Int Rev Cytol* 191:257-284

Busund LT, Richardsen E, Busund R, Ukkonen T, Bjørnsen T, Busch C, Stalsberg H (2005) Significant expression of IGFBP-2 in breast cancer compared with benign lesions. *J Clin Pathol* 58:361-366

Butler AA, Yakar S, Gewolb IH, Karas M, Okubo Y, Le Roith D (1998) Insulin-like growth factor-I receptor signal transduction: at the interface between physiology and cell biology. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 121:19-26

Campillo B, Paillaud E, Bories PN, Noel M, Porquet D, Le Parco JC (2000) Serum levels of insulin-like growth-I in the three months following surgery for a hip fracture in elderly: relationship with nutritional status and inflammatory reaction. *Clin Nutr* 19:349-354

Cara JF, Rosenfield RL, Furlanetto RW (1987) A longitudinal study of the relationship of plasma somatomedin-C concentration to the pubertal growth spurt. *Am J Dis Child* 141:562-564

Cara JF (1994) Insulin-like growth factors, insulin-like growth factor binding proteins and ovarian androgen production. *Horm Res* 42:49-54

Cardin AD, Weintraub HJ (1989) Molecular modeling of protein-glycosaminoglycan interactions. *Arteriosclerosis* 9:21-32

Carrick FE, Hinds MG, McNeil KA, Wallace JC, Forbes BE, Norton RS (2005) Interaction of insulin-like growth factor (IGF)-I and -II with IGF binding protein-2: mapping the binding surfaces by nuclear magnetic resonance. *J Mol Endocrinol* 34:685-698

Carter S, Li Z, Lemieux I, Almeras N, Tremblay A, Bergeron J, Poirier P, Deshaies Y, Despres J-P, Picard F (2014) Circulating IGFBP-2 levels are incrementally linked to correlates of the metabolic syndrome and independently associated with VLDL triglycerides. *Atherosclerosis* 237:645-651

Cazals V, Nabeyrat E, Corroyer S, de Keyzer Y, Clement A (1999) Role for NF- $\kappa$ B in mediating the effects of hyperoxia on IGF-binding protein 2 promoter activity in lung alveolar epithelial cells. *Biochim Biophys Acta* 1448:349-362

Chan JM, Stampfer MJ, Giovannucci E, Gann PH, Ma J, Wilkinson P, Hennekens CH, Pollak M (1998) Plasma insulin-like growth factor-I and prostate cancer risk: a prospective study. *Science* 279:563-566

Chelius D, Baldwin MA, Lu X, Spencer EM (2001) Expression, purification and characterization of the structure and disulfide linkages of insulin-like growth factor binding protein-4. *J Endocrinol* 168:283-296

Chiabrando GA, Vides MA, Sanchez MC (2002) Differential binding properties of human pregnancy zone protein—and  $\alpha$ 2-macroglobulin—proteinase complexes to low-density lipoprotein receptor-related protein. *Arch Biochem Biophys* 398:73-78

Clemmons DR, Klibanski A, Underwood LE (1981) Reduction of plasma immunoreactive somatomedin C during fasting in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 53:1247-1250

Clemmons DR, Snyder DK, Busby WH Jr. (1991) Variables controlling the secretion of insulin-like growth factor binding protein-2 in normal human subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 73:727-733

Clemmons DR (1994) Role of post-translational modifications in modifying the biologic activity of insulin-like growth factor binding proteins. Current directions in insulin-like growth factor binding proteins (Le Roith D, Raizada MK, eds), pp 245-253. Plenum Press, NY

Clemmons DR, Moses AC, McKay MJ, Sommer A, Rosen DM, Ruckle J (2000) The combination of insulin-like growth factor-binding protein-3 reduces insulin requirements in insulin-dependent type 1 diabetes:evidence for in vivo biological activity. *J Clin Endocrinol Metab* 85:1518-1524

Clemmons DR, Moses AC, Sommer A, Jacobson W, Rogol AD, Sleevi MR, Allan G (2005) Rh/IGF-I/rhIGFBP-3 administration to patients with type 2 diabetes mellitus reduces insulin requirements while also lowering fasting glucose. *Growth Horm IGF Res* 15:265-274

Clemmons DR (2006) Involvement of insulin-like growth factor-I in the control of glucose homeostasis. *Curr Opin Pharmacol* 6:620-625

Clemmons DR (2009) Role of IGF-I in skeletal muscle mass maintenance. *Trends Endocrinol Metab* 20:349-356

Cohen P, Graves HC, Peehl DM, Kamarei M, Giudice LC, Rosenfeld RG (1992) Prostate-specific antigen (PSA) is an insulin-like growth factor binding protein-3 protease found in seminal plasma. *J Clin Endocrinol Metab* 75:1046-1053

Cohen P, Peehl DM, Stamey TA, Wilson KF, Clemmons DR, Rosenfeld RG (1993) Elevated levels of insulin-like growth factor-binding protein-2 in the serum of prostate cancer patients. *J Clin Endocrinol Metab* 76:1031-1035

Colao A (2008) The GH/IGF-I axis and the cardiovascular system:clinical implications. *Clin Endocrinol* 69:347-358

Collett-Solberg PF, Cohen P (1996) The role of the insulin-like growth factor binding proteins and IGFBP proteases in modulating IGF action. *Endocrinol Metab Clin Exp* 25:591-609

Conover CA (1991) Glycosylation of insulin-like growth factor binding protein-3 (IGFBP-3) is not required for potentiation of IGF-I action: evidence for processing of cell-bound IGFBP-3. *Endocrinology* 129:3259-3268

Conover CA, De Leon DD (1994) Acid-activated insulin-like growth factor-binding protein-3 proteolysis in normal and transformed cells. Role of cathepsin D. *J Biol Chem* 269:7076-7080

Conover CA, Perry J, Tindall D (1995) Endogenous cathepsin D-mediated hydrolysis of insulin-like growth factor-binding proteins in cultured human prostatic carcinoma cells. *J Clin Endocrinol Metab* 80:987-993

Conover CA, Lee PD, Riggs BI, Powell DR (1996) Insulin-like growth factor binding protein-1 expression in cultured human bone cells: regulation by insulin and glucocorticoid. *Endocrinology* 137:3295-3301

Conover CA, Bale LK, Durham SK, Powell DR (2000) Insulin-like growth factor (IGF) binding protein-3 potentiation of IGF action is mediated through the phosphatidylinositol-3-kinase pathway and is associated with alteration in protein kinase B/AKT sensitivity. *Endocrinology* 141:3098-3103

Corkins MR, Vanderhoof JA, Slentz DH, Mac Donald RG, Park JH (1995) Growth stimulation by transfection of intestinal epithelial cells with an antisense insulin-like growth factor binding protein-2 construct. *Biochem Biophys Res Commun* 211:707-713

Counts DR, Gwirtsman H, Carlsson LM, Lesem M, Cutler GB Jr. (1992) The effect of anorexia nervosa and refeeding on growth hormone-binding protein, the insulin-like growth factors (IGFs), and the IGF-binding proteins. *J Clin Endocrinol Metab* 75:762-767

Coverley JA, Baxter RC (1997) Phosphorylation of insulin-like growth factor binding proteins. *Mol Cell Endocrinol* 128:1-5

Coverley JA, Martin JL (2000) The effect of phosphorylation by casein kinase 2 on the activity of insulin-like growth factor binding protein-3. *Endocrinology* 141:564-570



Craig-Barnes HA, Doumouras BS, Palaniyar N (2010) Surfactant protein D interacts with  $\alpha$ 2-macroglobulin and increases its innate immune potential. *J Biol Chem* 285:13461-13470

Crowe FL, Key TJ, Allen NE, Appleby PN, Roddam A, Overvad K, Grønbaek H, Tjønneland A, Halkjaer J, Dossus L, Boeing H, Kröger J, Trichopoulou A, Dilis V, Trichopoulos D, Boutron-Ruault MC, De Lauzon B, Clavel-Chapelon F, Palli D, Berrino F, Panico S, Tumino R, Sacerdote C, Bueno-de-Mesquita HB, Vrieling A, van Gils CH, Peeters PH, Gram IT, Skeie G, Lund E, Rodríguez L, Jakszyn P, Molina-Montes E, Tormo MJ, Barricarte A, Larrañaga N, Khaw KT, Bingham S, Rinaldi S, Slimani N, Norat T, Gallo V, Riboli E, Kaaks R (2009) The association between diet and serum concentrations of IGF-I, IGFBP-1, IGFBP-2, and IGFBP-3 in the European prospective investigation into cancer and nutrition. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 18:1333-1340

D'Ercole AJ, Applewhite GT, Underwood LE (1980) Evidence that somatomedin is synthesized by multiple tissues in fetus. *Dev Biol* 75:315-328

Daughaday WH, Emanuele MA, Brooks MH, Barbato AL, Kapadia M, Rotwein P (1988) Synthesis and secretion of insulin-like growth factor-II by a leiomyosarcoma with associated hypoglycaemia. *N Engl J Med* 319:1434-1440

Daughaday WH (1996) Free insulin-like growth factor (IGF) in disorders of IGF binding protein 3 complex formation. *J Clin Endocrinol Metab* 89:3-5

de Benedetti F, Meazza C, Oliveri M, Pignatti P, Vivarelli M, Alonzi T, Fattori E, Garrone S, Barreca A, Martini A (2001) Effect of IL-6 on IGF binding protein-3: a study in IL-6 transgenic mice and in patients with systemic juvenile idiopathic arthritis. *Endocrinology* 142:4818-4826

de Groot JWB, Rikhof B, van Doorn J, Bilo HJG, Alleman MA, Honkoop AH, van der Graaf WT (2007) Non-islet cell tumour induced hypoglycaemia: a review of the literature including two new cases. *Endocr Rel Cancer* 14:979-993

de Kort RAL, (2010) The Biological Role of Insulin-Like Growth Factor binding Protein-2 in Tumorigenesis and Metabolic Homeostasis. (Master thesis) Department of Metabolic & Endocrine Diseases, University Medical Center Utrecht

de Leoz MLA, Young LJT, An HJ, Kronewitter SR, Kim J, Miyamoto S, Borowsky AD, Chew HK, Lebrilla CB (2011) High-Mannose Glycans are Elevated during Breast Cancer Progression. *Mol Cell Proteomics* DOI 10.1074/mcp.M110.002717

de Graff DJ, Malik M, Chen Q, Miyako K, Rejto L, Aguiar AA, Bancroft DRE, Cohen P, Sikes RA (2007) Hormonal regulation of IGBP-2 proteolysis is attenuated with progression to androgen insensitivity in the LNCaP progression model. *J Cell Physiol* 213:261-268

Denley A, Bonython ER, Booker GW, Cosgrove LJ, Forbes BE, Ward CW, Wallace JC (2004) Structural determinants for high-affinity binding of insulinlike growth factor II to insulin receptor (IR)-A, the exon 11 minus isoform of the IR. *Mol Endocrinol* 18:2502-2512

Denley A, Cosgrove LJ, Booker GW, Wallace JC, Forbes BE (2005) Molecular interactions of the IGF system. *Cytokine Growth Factor Rev* 16:421-439

Dennis JW, Laferte S (1987) Tumor cell surface carbohydrate and the metastatic phenotype. *Cancer Metastasis Rev* 5:185-204

Devi GR, Byrd JC, Slentz DH, Mac Donald RG (1998) An insulin-like growth factor II (IGF-II) affinity-enhancing domain localized within extracytoplasmic repeat 13 of the IGF-II/mannose 6-phosphate receptor. *Mol Endocrinol* 12:1661-1672

Diehl D, Hessel E, Oesterle D, Renner-Muller I, Elmlinger M, Langhammer M, Gottlicher M, Wolf E, Lahm H, Hoeflich A (2009) IGFBP-2 overexpression reduces the appearance of dysplastic aberrant crypt foci and inhibits growth of adenomas in chemically induced colorectal carcinogenesis. *Int J Cancer* 124:2220-2225

Disis ML, Gad E, Herendeen DR, Lai VP, Park KH, Cecil DL, O'Meara M, Treuting PM, Lubet RA (2013) A multiantigen vaccine targeting Neu, IGFBP-2, and IGF-IR prevents tumor progression in mice with preinvasive breast disease. *Cancer Prev Res* 6:1273-1282

Dupont J, Karas M, Le Roith D (2000) The potentiation of estrogen on insulin-like growth factor- I action in MCF-7 human breast cancer cells includes cell cycle components. *J Biol Chem* 275:35893-35901

Dupont J, Pierre A, Froment P, Moreau C (2003) The insulin-like growth factor axis in cell cycle progression. *Horm Metab Res* 35:740-750

El Atiq F, Garrouste F, Remacle-Bonnet M, Sastre B, Pommier G (1994) Alterations in serum levels of insulin-like growth factors and insulin-like growth-factor-binding proteins in patients with colorectal cancer. *Int J Cancer* 57:491-497

Ewton DZ, Falen SL, Florini JR (1987) The type II insulin-like growth factor (IGF) receptor has low affinity for IGF-I analogs: pleiotypic actions of IGFs on myoblasts are apparently mediated by the type I receptor. *Endocrinology* 120:115-123

Feldman SR, Gonias SL, Pizzo SV (1985) Model of alpha 2-macroglobulin structure and function. *Proc Natl Acad Sci USA* 82:5700-5704

Feldser D, Agani F, Iyer NV, Pak B, Ferreira G, Semenza GL (1999) Reciprocal positive regulation of hypoxia-inducible factor-1 alpha and insulin-like growth factor 2. *Cancer Res* 59:3915-3918

Fiaschi T, Chiarugi P (2012) Oxidative Stress, Tumor Microenvironment, and Metabolic Reprogramming: A Diabolic Liaison. *Int J Biochem Cell Biol* doi:10.1155/2012/762825

Firth SM, Ganeshprasad U, Baxter RC (1998) Structural determinants of ligand and cell surface binding of insulin-like growth factor-binding protein-3. *J Biol Chem* 273:2631-2638

Firth SM, Baxter RC (1999) Characterisation of recombinant glycosylation variants of insulin-like growth factor binding protein-3. *J Endocrinol* 160:379-387

Firth SM, Baxter RC (2002) Cellular actions of the insulin-like growth factor binding proteins. *Endocr Rev* 23:824-854

Fisker S (2006) Physiology and pathophysiology of growth hormone-binding protein: methodological and clinical aspects. *Growth Horm IGF Res* 16:1-28

Foote JW, Delves HT (1984) Albumin bound and alpha 2-macroglobulin bound zinc concentrations in the sera of healthy adults. *J Clin Pathol* 37:1050-1054

Forbes BE, Turner D, Hodge SJ, McNeil KA, Forsberg G, Wallace JC (1998) Localization of an insulin-like growth factor (IGF) binding site of bovine IGF binding protein-2 using disulfide mapping and deletion mutation analysis of the C terminal domain. *J Biol Chem* 273:4647-4652

Forbes BE, McCarthy P, Norton RS (2012) Insulin-like growth factor binding proteins: a structural perspective. *Front Endocrinol* 3:1-13

Foulstone EJ, Zeng L, Perks CM, Holly JM (2013) Insulin-like growth factor binding protein 2 (IGFBP-2) promotes growth and survival of breast epithelial cells: novel regulation of the estrogen receptor. *Endocrinology* 154:1780-1793

Fowlkes JL (1994) Degradation of insulin-like growth factor (IGF)-binding protein-3 (IGFBP-3) by a metal-dependent protease produced by human fibroblasts: effects of IGFs on protease activity. *Endocr J* 2:63-68

Fowlkes JL, Suzuki K, Nagase H, Thraikill KM (1994) Proteolysis of insulin-like growth factor binding protein-3 during rat pregnancy: A role for matrix metalloproteinases. *Endocrinology* 135:2810-2813

Fowlkes JL, Serra DM (1996) Characterization of glycosaminoglycan-binding domains present in insulin-like growth factor-binding protein-3. *J Biol Chem* 271:14676-14679

Fowlkes JL, Thraikill KM, George-Nascimento C, Rosenberg CK, Serra DM (1997) Heparin-binding, highly basic regions within the thyroglobulin type-1 repeat of insulin-like growth factor (IGF)-binding proteins (IGFBPs) -3, -5, and -6 inhibit IGFBP-4 degradation. *Endocrinology* 138:2280-2285

Frommer KW, Reichenmiller K, Schütt BS, Hoeflich A, Ranke MB, Dodt G, Elmlinger MW (2006) IGF-independent effects of IGFBP-2 on the human breast cancer cell line Hs578T. *J Mol Endocrinol* 37:13-23

Frystyk J, Skjaerbaek C, Zapf J & Orskov H (1998) Increased levels of circulating free insulin-like growth factors in patients with non-islet cell tumour hypoglycaemia. *Diabetologia* 41: 589-594

Frystyk J, Skjaerbaek C, Vestbo E, Fisker S, Orskov H (1999) Circulating levels of free insulin-like growth factors in obese subjects: the impact of type 2 diabetes. *Diabetes Metab Res Rev* 15:314-322

Frystyk J (2004) Free insulin-like growth factors—measurements and relationships to growth hormone secretion and glucose homeostasis. *Growth Horm IGF Res* 14:337-375

Fu VX, Schwarze SR, Kenowski ML, Leblanc S, Svaren J, Jarrod DF (2004) A loss of insulin-like growth factor-2 imprinting is modulated by CCCTC-binding factor down-regulation at senescence in human epithelial cells. *J Biol Chem* 279:52218-52226

Fukushima T, Tezuka T, Shimomura T, Nakano S, Kataoka H (2007) Silencing of insulin-like growth factor-binding protein-2 in human glioblastoma cells reduces both invasiveness and expression of progression-associated gene CD24. *J Biol Chem* 282:18634-18644

Fuller GN, Rhee CH, Hess KR, Caskey LS, Wang R, Bruner JM, Yung WK, Zhang W (1999) Reactivation of insulin-like growth factor binding protein 2 expression in glioblastoma multiforme: a revelation by parallel gene expression profiling. *Cancer Res* 59:4228-4232

Galea CA, Mobli M, McNeil KA, Mulhern TD, Wallace JC, King GF, Forbes BE, Norton RS (2012) Insulin-like growth factor binding protein-2: NMR analysis and structural characterization of the N-terminal domain. *Biochimie* 94:608-616

Gallagher EJ, Le Roith D (2010) The proliferating role of insulin-like growth factors in cancer. *Trends Endocrinol Metab* 21:610-618

Gerritsen HE, Robles R, Lammle B, Furlan M (2001) Partial amino acid sequence of purified von Willebrand factor-cleaving protease. *Blood* 98:1654-1661

Giannoukakis N, Deal C, Paquette J, Goodyer CG, Polychronakos C (1993) Parental genomic imprinting of the human IGF2 gene. *Nat Genet* 4:98-101

Gibson JM, Aplin JD, White A, Westwood M (2001) Regulation of IGF bioavailability in pregnancy. *Mol Hum Reprod* 7:79-87

Ginsberg HN, Zhang YL, Hernandez-Ono A (2006) Metabolic syndrome: focus on dyslipidemia. *Obesity* 14:41S-49S

Giudice LC, Farrell EM, Pham H, Rosenfeld RG (1990) Identification of insulin-like growth factor-binding protein-3 (IGFBP-3) and IGFBP-2 in human follicular fluid. *J Clin Endocrinol Metab* 71:1330-1338

Graham ME, Kilby DM, Firth SM, Robinson PJ, Baxter RC (2007) The in vivo phosphorylation and glycosylation of human insulin-like growth factor binding protein-5. *Mol Cell Proteomics* 6:1392-1405

Grant DB, Hambley J, Becker D, Pimstone BL (1973) Reduced sulphation factor in undernourished children. *Arch Dis Child* 48:596-600

Grey A, Chen Q, Xu X, Callon K, Cornish J (2003) Parallel phosphatidylinositol-3 kinase and p42/44 mitogen-activated protein kinase signaling pathways subserve the mitogenic

and antiapoptotic actions of insulin-like growth factor I in osteoblastic cells. *Endocrinology* 144:4886-4893

Griffiths R D, Hinds C J, Little R A (1999) Manipulating the metabolic response to injury. *Br Med Bull* 55:181-195

Grimberg A, Coleman CM, Shi Z, Burns TF, MacLachlan TK, Wang W, El-Deiry WS (2006) Insulin-like growth factor binding protein-2 is a novel mediator of p53 inhibition of insulin-like growth factor signaling. *Cancer Biol Ther* 5:1408-1414

Gu J, Sato Y, Kariya Y, Isaji T, Taniguchi N, Fukuda T (2009) A mutual regulation between cell-cell adhesion and N-glycosylation: implication of the bisecting GlcNAc for biological functions. *J Proteome Res* 8:431-435

Guler HP, Zapf J, Schmid C, Froesch ER (1989) Insulin-like growth factors- I and -II in a healthy man. Estimations of half-lives and production rates. *Acta Endocrinol* 121:753-758

Hanahan D, Weinberg RA (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144:646-674

Harley CB, Kim NW, Prowse KR, Weinrich SL, Hirsch KS, West MD, Bacchetti S, Hirte HW, Counter CM, Greider CW, Piatyszek MA, Wright WE, Shay JW (1994) Telomerase, cell immortality, and cancer. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 59:307-315

Harris AL (2002) Hypoxia—a key regulatory factor in tumour growth. *Nat Rev Cancer* 2:38-47

Hartmann LC, Sellers TA, Frost MH, Lingle WL, Degenim AC, Ghosh K, Vierkant RA, Maloney SD, Pankratz VS, Hillman DW, Suman VJ, Johnson J, Blake C, Tlsty T, Vachon CM, Melton LJ III, Visscher DW (2005) Benign breast disease and the risk of breast cancer. *N Engl J Med* 353:229-237

Heald AH, Kaushal K, Siddals KW, Rudenski AS, Anderson SG, Gibson JM (2006) Insulin-like growth factor binding protein-2 (IGFBP-2) is a marker for the metabolic syndrome. *Exp Clin Endocrinol Diab* 114:371-376

Helle SI, Geisler S, Aas T, Paulsen T, Holly JMP, Lønning PE (2001) Plasma insulin-like growth factor binding protein-3 proteolysis is increased in primary breast cancer. *Br J Cancer* 85:74-77

Hermanto U, Zong CS, Wang LH (2000) Inhibition of mitogen activated protein kinase kinase selectively inhibits cell proliferation in human breast cancer cells displaying enhanced insulin-like growth factor I-mediated mitogen-activated protein kinase activation. *Cell Growth Differ* 11:655-664

Heumann D, Vischer TL (1988) Immunomodulation by alpha 2-macroglobulin and alpha 2-macroglobulin-proteinase complexes: the effect on the human T lymphocyte response. *Eur J Immunol* 18:755-760

Hill KK, Hill DB, McClain MP, Humphries LL, McClain J (1993) Serum insulin-like growth factor-I concentrations in the recovery of patients with anorexia nervosa. *J Am Coll Nutr* 12:475-478

Hintz RL, Suskind R, Amatayakul K (1978) Plasma somatomedin and growth hormone values in children with protein calorie malnutrition. *J Pediatr* 92:153-156

Hizuka N, Fukuda I, Takano K, Okubo Y, Asakawa-Yasumoto K & Demura H (1998) Serum insulin-like growth factor II in 44 patients with non-islet cell tumor hypoglycemia. *Endocr J* 45:61-65

Ho PJ, Baxter RC (1997) Characterization of truncated insulin-like growth factor-binding protein-2 in human milk. *Endocrinology* 138:3811-3818

Ho P-Y, Cheng C-H, Cheng W (2009) Identification and cloning of the  $\alpha$ 2-macroglobulin of giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* and its expression in relation with the molt stage and bacteria injection. *Fish Shellfish Immunol* 26:459-466

Hobba GD, Forbes BE, Parkinson EJ, Francis GL, Wallace JC (1996) The insulin-like growth factor (IGF) binding site of bovine insulin-like growth factor binding protein-2 (bIGFBP-2) probed by iodination. *J Biol Chem* 271:30529-30536

Hoeflich A, Lahm H, Blum W, Kolb H, Wolf E (1998) Insulin-like growth factor-binding protein-2 inhibits proliferation of human embryonic kidney fibroblasts and of IGF-responsive colon carcinoma cell lines. *FEBS Lett* 434:329-334

Hoeflich A, Reisinger R, Lahm H, Kiess W, Blum WF, Kolb HJ, Weber MM, Wolf E (2001) Insulin-like growth factor-binding protein 2 in tumorigenesis: protector or promoter? *Cancer Res* 61:8601-8610

Hoeflich A, Fettscher O, Preta G, Lahm H, Kolb HJ, Wolf E, Weber MM (2003) Increased activity of catalase in tumor cells overexpressing IGFBP-2. *Horm Metab Res* 35:816-821

Hoeflich A, Wirthgen E, David R, Classen CF, Spitschak M, Brenmoehl J (2014) Control of IGFBP-2 expression by steroids and peptide hormones in vertebrates. *Front Endocrinol* 5:1-9

Holtet TL, Nielsen KL, Etzerodt M, Moestrup SK, Gliemann J, Sottrup-Jensen L, Thügersen HC (1994) Recombinant  $\alpha$ 2M receptor binding domain binds to the  $\alpha$ 2M receptor with high affinity. *Ann NY Acad Sci* 737:480-482

<http://www.cancer.gov/about-cancer/what-is-cancer>

Hu D, Pawlikowska L, Kanaya A, Hsueh W-C, Colbert L, Newman AB, Satterfield S, Rosen C, Cummings SR, Harris TB, Ziv E (2009) Serum Insulin-Like Growth Factor-I Binding Proteins 1 and 2 and Mortality in Older Adults: The Health, Aging, and Body Composition Study. *J Am Geriatr Soc* 57:1213-1218

Hu Z, Lee IH, Wang X, Sheng H, Zhang L, Du J, Mitch WE (2007) PTEN expression contributes to the regulation of muscle protein degradation in diabetes. *Diabetes* 56:2449-2456

Humbel RE (1990) Insulin-like growth factors I and II. *Eur J Biochem* 196:445-462

Huq A, Singh B, Meeker T, Mascarenhas D (2009) The metal-binding domain of IGFBP-3 selectively delivers therapeutic molecules into cancer cells. *Anticancer Drugs* 20:21-31

Hynes RO (2002) Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* 110:673-687

Irwin JC, De las Fuentes L, Dsupin BA, Giudice LC (1993) Insulin-like growth factor (IGF) regulation of human endometrial stromal cell function: coordinate effects on IGFBP-1, cellular proliferation and prolactin secretion. *Reg Pept* 48:165-177

Isley WL, Underwood LE, Clemmons DB (1983) Dietary components that regulate serum somatomedin-C concentrations in humans. *J Clin Invest* 71:175-182

Jacobs S, Kull FC Jr, Cuatrecasas P (1983) Monensin blocks the maturation of receptors for insulin and somatomedin c: identification of receptor precursors. *Proc Natl Acad Sci USA* 80:1228-1231

Jones JJ, Clemmons DR (1995) Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. *Endocr Rev* 16:3-34



Jones JL, Busby WH Jr., Wright G, Smith CE, Kimack NM, Clemmons DR (1993a) Identification of the sites of phosphorylation in insulin-like growth factor binding protein-1. Regulation of its affinity by phosphorylation of serine 101. *Biol Chem* 268:1125-1131

Jones JJ, Gockerman A, Busby WH Jr., Camacho-Hubner C, Clemmons, DR (1993b) Extracellular matrix contains insulin-like growth factor binding protein-5: potentiation of the effects of IGF-I. *J Cell Biol* 121:679-687

Jones JL, Gockerman A, Busby WH Jr., Wright G, Clemmons DR (1993c) Insulin-like growth factor binding protein 1 stimulates cell migration and binds to the alpha 5 beta 1 integrin by means of its Arg-Gly-Asp sequence. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:10553-10557

Jørgensen JOL, Christensen, JJ, Krag M, Fisker S, Ovesen P, Christiansen JS (2004) Serum insulin-like growth factor I levels in growth hormone-deficient adults: influence of sex steroids. *Horm Res* 62:73-76

Kaneda A, Wang CJ, Cheong R, Timp W, Onyango P, Wen B, Iacobucio-Donahue CA, Ohlsson R, Andraos R, Pearson MA (2007) Enhanced sensitivity to IGF-II signaling links loss of imprinting of IGF2 to increase cell proliferation and tumour risk. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:20926-20931

Karasik A, Menczer J, Pariente C, Kanety H (1994) Insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF-binding protein-2 are increased in cyst fluids of epithelial ovarian cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 78(2):271-276

Kasuga M, Karlsson FA, Kahn CR (1982) Insulin stimulates the phosphorylation of the 95,000-dalton subunit of its own receptor. *Science* 215:185-187

Kasuga M, Fujita-Yamaguchi Y, Blithe DL, White MF, Kahn CR (1983) Characterization of the insulin receptor kinase purified from human placental membranes. *J Biol Chem* 258:10973-10980

Kawai M, Breggia AC, DeMambro VE, Shen X, Canalis E, Bouxsein ML, Beamer WG, Clemmons DR, Rosen CJ (2011) The heparin-binding domain of IGFBP-2 has insulin-like growth factor binding-independent biologic activity in the growing skeleton. *J Biol Chem* 286:14670-14680

Khan SA, Khan FH (2004) Oxidized caprine alpha-2-macroglobulin: damaged but not completely dysfunctional. *Biochim Biophys Acta* 1674:139-148

- Kim YJ, Varki A (1997) Perspectives on the significance of altered glycosylation of glycoproteins in cancer. *Glycoconj J* 14:569-576
- Koblinski JE, Ahram M, Sloane BF (2000) Unraveling the role of proteases in cancer. *Clin Chim Acta* 291:113-135
- Kornfeld S (1987) Trafficking of lysosomal enzymes. *FASEB J* 1:462-468
- Kornfeld S (1992) Structure and function of the mannose 6-phosphate/insulin like growth factor II receptors. *Ann Rev Biochem* 61:307-330
- Kuang Z, Yao S, Keizer DW, Wang CC, Bach LA, Forbes BE, Wallace JC, Norton RS (2006) Structure, dynamics and heparin binding of C-terminal domain of insulin-like growth factor-binding protein-2. *J Mol Biol* 364:690-704
- Kuang Z, Yao S, McNeil KA, Thompson JA, Bach LA, Forbes BE, Wallace JC, Norton RS (2007) Cooperativity of the N- and C-terminal domains of insulin-like growth factor (IGF) binding protein 2 in IGF binding. *Biochemistry* 46:13720-13732
- Kumar V, Abbas AK, Fausto N (2005) Robbins and Cotran: Pathologic Basis of Disease; 7<sup>th</sup> Edition. SAUNDERS ELSEVIER, Philadelphia, PA.
- Lalou C, Lassare C, Binoux M (1996) Isolation and characterization of proteolytic fragments of insulin-like growth factor-binding protein-3. *Horm Res* 45:156-159
- Lang CH, Pollard V, Fan J, Traber LD, Traber DL, Frost RA, Gelato MC, Prough DS (1997) Acute alterations in growth hormone-insulin-like growth factor axis in humans injected with endotoxin. *Am J Physiol* 273: R371-R378
- Lawrence JB, Oxvig C, Overgaard MT, Sottrup-Jensen L, Gleich GJ, Hays LG, Yates JR, III, Conover CA (1999) The insulin-like growth factor (IGF)-dependent IGF binding protein-4 protease secreted by human fibroblasts is pregnancy-associated plasma protein-A. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:3149-3153
- Le Roith D, Butler AA (1999) Insulin-like growth factors in paediatric health and disease. *J Clin Endocrinol Metab* 84:4355-4361
- Le Roith D, Bondy C, Yakar S, Liu JL, Butler A (2001) The somatomedin hypothesis. *Endocr Rev* 22:53-74
- Le Roith D (2003) The insulin-like growth factor system. *Exp Diabes Res* 4:205-212

Le Roith D, Yakar S (2007) Mechanisms of disease: metabolic effects of growth hormone and insulin-like growth factor I. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* 3:302-310

Lee H, Arnold IT, McFann KK, Blackman MR (2006) DHT and testosterone, but not DHEA or E2, differentially modulate IGF-I, IGFBP-2, and IGFBP-3 in human prostatic stromal cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 290:E952-E960

Lee PD, Hodges D, Hintz RL, Wyche JH, Rosenfeld RG (1986) Identification of receptors for insulin-like growth factor II in two insulin-like growth factor II producing cell lines. *Biochem Biophys Res Commun* 134:595-600

Lee YC, Jogie-Brahim S, Lee DY, Han J, Harada A, Murphy LJ, Oh Y (2011) Insulin-like growth factor-binding protein-3 (IGFBP-3) blocks the effects of asthma by negatively regulating NF-kappaB signaling through IGFBP-3R mediated activation of caspases. *J Biol Chem* 286:17898-17909

Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz AG, Ahn BW, Shaltiel S, Stadtman ER (1990) Determination of carbonyl content of oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol* 186:464-478

Levitt RJ, Georgescu M-M, Pollak M (2005) PTEN-induction in U251 glioma cells decreases the expression of insulin-like growth factor binding protein-2. *Biochem Biophys Res Commun* 336:1056-1061

Li Y, Jiang T, Zhang J, Zhang B, Yang W, You G, Xu K, Wu J, Luo C, Song SW (2012) Elevated serum antibodies against insulin-like growth factor-binding protein-2 allow detecting early stage cancers: evidences from glioma and colorectal carcinoma studies. *Ann Oncol* 23:2415-2422

Lin YC, Vaseeharan B, Chen JC (2008) Molecular cloning and phylogenetic analysis on a2-macroglobulin (a2-M) of white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Dev Comp Immunol* 32:317-329

Lin Z, Lo A, Simeone DM, Ruffin MT, Lubman DM (2012) An N-glycosylation analysis of human alpha-2-macroglobulin using an integrated approach. *J Proteomics Bioinform* 5:127-134

Livingstone C (2012) The insulin-like growth factor system and nutritional assesement. *Scientifica* doi:10.6064/2012/768731

- Livingstone C, Borai A (2014) Insulin-like growth factor-II: its role in metabolic and endocrine disease. *Clin Endocrin* 80:773-781
- Ludvigsen M, Jacobsen C, Maunsbach AB, Honoré B (2009) Identification and characterization of novel ERC-55 interacting proteins: Evidence for the existence of several ERC-55 splicing variants; including the cytosolic ERC-55-C. *Proteomics* 9:5267-5287
- Mac Donald RG, Pfeffer SR, Coussens L, Tepper MA, Brocklebank CM, Mole JE, Anderson JK, Chen E, Czech MP, Ullrich A (1988) A single receptor binds both insulin-like growth factor II and mannose-6-phosphate. *Science* 239:1134-1137
- Mann K (2007) The chicken egg white proteome. *Proteomics* 7:3558-3568
- Manousos O, Souglakos J, Bosetti C, Tzonou A, Chatzidakis V, Trichopoulos D, Adami H-O, Mantzoros C (1999) IGF-I and IGF-II in relation to colorectal cancer. *Int J Cancer* 83:15-17
- Mark S, Kübler B, Höning S, Oesterreicher S, John H, Bräulke T, Forssmann W-G, Ständker L (2005) Diversity of human insulin-like growth factor (IGF) binding protein-2 fragments in plasma: primary structure, IGF-binding properties, and disulfide bonding pattern. *Biochemistry* 44:3644-3652
- Marks V, Teale JD (1998) Tumours producing hypoglycaemia. *Endocr Rel Cancer* 5:111-129
- Marrero A, Duquerroy S, Trapani S, Goulas T, Guevara T, Andersen GR, Navaza J, Sottrup-Jensen L, Gomis-Ruth FX (2012) The crystal structure of human  $\alpha$ 2-macroglobulin reveals a unique molecular cage. *Angew Chem Int Ed* 51:3340-3344
- Mattsson A, Svensson D, Schuett B, Osterziel KJ, Ranke MB (2008) Multidimensional reference regions for IGF-I, IGFBP-2 and IGFBP-3 concentrations in serum of healthy adults. *Growth Horm IGF Res* 18:506-516
- Mauras N, Haymond MW (2005) Are metabolic effects of GH and IGF-I separable? *Growth Horm IGF Res* 15:19-27
- Mauras N, Rogol AD, Haymond MW, Veldhuis JD (1996) Sex steroids, growth hormone, insulin-like growth factor-I: neuroendocrine and metabolic regulation in puberty. *Horm Res* 45:74-80

McCusker RH, Cohick WS, Busby WH, Clemmons DR (1991) Evaluation of the developmental and nutritional changes in porcine insulin-like growth factor-binding protein-1 and -2 serum levels by immunoassay. *Endocrinology* 129:2631-2638

Mehrian-Shai R, Chen CD, Shi T, Horvath S, Nelson SF, Reichardt JK, Sawyers CL (2007) Insulin growth factor-binding protein 2 is a candidate biomarker for PTEN status and PI3K/Akt pathway activation in glioblastoma and prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:5563-5568

Meyer C, Hinrichs W, Hahn U (2012) Human  $\alpha$ 2-macroglobulin - another variation on the venus flytrap. *Angew Chem* 51:5045-5047

Michell NP, Langman MJ, Eggo MC (1997) Insulin-like growth factors and their binding proteins in human colonocytes: preferential degradation of insulin-like growth factor binding protein 2 in colonic cancers. *Br J Cancer* 76:60-66

Mishra L, Bass B, Ooi BS, Sidawy A, Korman L (1998) Role of insulin-like growth factor-I (IGF-I) receptor, IGF-I, and IGF binding protein-2 in human colorectal cancers. *Growth Horm IGF Res* 8:473-479

Miyako K, Cobb LJ, Francis M, Huang A, Peng B, Pintar JE, Ariga H, Cohen P (2009) PAPA-1 is a nuclear binding partner of IGFBP-2 and modulates its growth-promoting actions. *Mol Endocrinol* 23:169-175

Miyamoto S, Yano K, Sugimoto S, Ishii G, Hasebe T, Endoh Y, Kodama K, Goya M, Chiba T, Ochiai A (2004) Matrix metalloproteinase-7 facilitates insulin-like growth factor bioavailability through its proteinase activity on insulin-like growth factor binding protein-3. *Cancer Res* 64:665-671

Miyamoto S, Nakamura M, Yano K, Ishii G, Hasebe T, Endoh Y, Sangai T, Maeda H, Shichuang Z, Chiba T, Ochiai A (2007) Matrix metalloproteinase-7 triggers the matricine action of insulin-like growth factor-II via proteinase activity on insulin-like growth factor binding protein 2 in the extracellular matrix. *Cancer Sci* 98:685-691

Miyoshi E, Nakano M (2008) Fucosylated haptoglobin is a novel marker for pancreatic cancer: detailed analyses of oligosaccharide structures. *Proteomics* 8:3257-3262

Mohanraj L, Oh Y (2011) Targeting IGF-I, IGF-BPs and IGF-I receptor system in cancer: the current and future in breast cancer therapy. *Recent Pat Anticancer Drug Disc* 6:166-177

Mohnike KL, Kluba U, Mittler U, Aumann V, Vorwerk P, Blum WF (1996) Serum levels of insulin-like growth factor-I, -II and insulin-like growth factor binding proteins -2 and -3 in children with acutelymphoblastic leukaemia. *Eur J Pediatr* 155:81-86

Moralli OG, Jouncau A, McLaughlin KJ, Thiery JP, Larue L (2000) IGF-II promotes mesoderm formation. *Dev Biol* 227:133-145

Morgan DO, Edman JC, Standring DN, Fried VA, Smith MC, Roth RA, Rutter WJ (1987) Insulin-like growth factor II receptor as a multifunctional binding protein. *Nature* 329:301-307

Moser AR, Dove WF, Roth KA, Gordon JI (1992) The Min (multiple intestinal neoplasia) mutation: its effect on gut epithelial cell differentiation and interaction with a modifier system. *J Cell Biol* 116:1517-1526

Münzer T, Rosen CJ, Harman SM, Pabst KM, St Clair C, Sorkin JD, Blackman MR (2006) Effects of GH and/or sex steroids on circulating IGF-I and IGFBPs in healthy, aged women and men. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 290:E1006-E1013

Murphy LJ (2003) The role of insulin-like growth factors and their binding proteins in glucose homeostasis. *Exp Diabes Res* 4:213-224

Murphy SK, Hung Z, Wen Y, Spillman MA, Whitaker RS, Simel LR, Nichols TD, Marks JR, Berchuk A (2006) Frequent IGF2/H19 domain epigenetic alterations and elevated IGF2 expression in epithelial ovarian cancer. *Mol Cancer Res* 4:283-292

Naishiro Y, Yamada T, Idogawa M, Honda K, Takada M, Kondo T, Imai K, Hirohashi S (2005) Morphological and transcriptional responses of untransformed intestinal epithelial cells to an oncogenic [beta]-catenin protein. *Oncogene* 24:3141-3153

Nakae J, Kido Y, Accili D (2001) Distinct and overlapping functions of insulin and IGF-I receptors. *Endocr Rev* 22:818-835

Nam SY, Lee EJ, Kim KR, Cha BS, Song YD, Lim SK, Lee HC, Huh KB (1997) Effect of obesity on total and free insulin-like growth factor (IGF)-I, and their relationship to IGF binding protein (BP)-1, IGFBP-2, IGFBP-3, insulin, and growth hormone. *Int J Obes Relat Metab Disor* 21:355-359

Narayanan RP, Fu B, Oliver RL, Siddals KW, Donn R, Hudson JE, White A, Laing I, Ollier WE, Heald AH, Gibson J (2013) Insulin-like growth factor-II and insulin-like growth

factor binding protein-2 prospectively predict longitudinal elevation of HDL-cholesterol in type 2 diabetes. *Ann Clin Biochem* 51:468-475

Neumann GM, Marinaro JA, Bach LA (1998) Identification of O-glycosylation sites and partial characterization of carbohydrate structure and disulfide linkages of human insulin-like growth factor binding protein 6. *Biochemistry* 37:6572-6585

Neumann GM, Bach LA (1999) The N-terminal disulfide linkages of human insulin-like growth factor binding protein-6 (hIGFBP-6) and hIGFBP-1 are different as determined by mass spectrometry. *J Biol Chem* 274:14587-14594

Niedernhofer LJ, Garinis GA, Raams A, Lalai AS, Robinson AR, Appeldoorn E, Odijk H, Oostendorp R, Ahmad A, van Leeuwen W, Theil AF, Vermeulen W, van der Horst GT, Meinecke P, Kleijer WJ, Vijg J, Jaspers NG, Hoeijmakers JH (2006) A new progeroid syndrome reveals that genotoxic stress suppresses the somatotroph axis. *Nature* 444:1038-1043

Nishida Y, Matsubara T, Tobina T, Shindo M, Tokuyama K, Tanaka K, Tanaka H (2010) Effect of low-intensity aerobic exercise on insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor-binding proteins in healthy men. *Int J Endocrinol* doi: 10.1155/2010/452820

Nunn S, Peehl DM, Cohen P (1997) Acid-activated insulin-like growth factor binding protein protease activity of cathepsin D in normal and malignant prostatic epithelial cells and seminal plasma. *J Cell Physiol* 171:196-204

O'Dell SD, Day INM (1998) Molecules in focus: insulin-like growth factor II (IGF- II). *Int J Biochem Cell B* 30:767-771

Oh Y, Muller HL, Lee DY, Fielder PJ, Rosenfeld RG (1993): Characterization of the affinities of insulin-like growth factor (IGF)-binding proteins 1-4 for IGF-I, IGF-II, IGF-I/insulin hybrid, and IGF-I analogs. *Endocrinology* 132:1337-1344

Oh Y, Muller HL, Ng L, Rosenfeld RG (1995) Transforming growth factor-beta-induced cell growth inhibition in human breast cancer cells is mediated through insulin-like growth factor binding protein-3 action. *J Biol Chem* 270:13589-13592

Oh Y, Nagalla SR, Yamanaka Y, Kim H-S, Wilson E, Rosenfeld RG (1996) Synthesis and characterization of insulin-like growth factor-binding protein (IGFBP)-7. *J Biol Chem* 271:30322-30325

Ohlsson C, Mohan S, Sjorgen K, Tivesten A, Isgaard J, Isaksson O, Jansson JO, Svensson J (2009) The role of liver-derived insulin-like growth factor-I. *Endocr Rev* 30:494-535

Okuyama N, Ide Y, Nakano M, Nakagawa T, Yamanaka K, Moriwaki K, Murata K, Ohigashi H, Yokoyama S, Eguchi H, Ishikawa O, Ito T, Kato M, Kasahara A, Kawano S, Gu J, Taniguchi N, Miyoshi E (2006) Fucosylated haptoglobin is a novel marker for pancreatic cancer: a detailed analysis of the oligosaccharide structure and a possible mechanism for fucosylation. *Int J Cancer* 118 2803-2808

Pani G, Galeotti T, Chiarugi P (2010) Metastasis: cancer cell's escape from oxidative stress. *Cancer Metastasis Rev* 29:351-378

Pao CI, Farmer PK, Begovic S, Goldstein S, Wu GJ, Phillips LS (1992) Expression of hepatic insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor-binding protein-1 genes is transcriptionally regulated streptozotocin-diabetic rats. *Mol Endocrinol* 6:969-977

Payet LD, Wang XH, Baxter RC, Firth SM (2003) Amino- and carboxyl-terminal fragments of insulin-like growth factor (IGF) binding protein-3 cooperate to bind IGFs with high affinity and inhibit IGF receptor interactions. *Endocrinology* 144:2797-2806

Pereira JJ, Meyer T, Docherty SE, Reid HH, Marshall J, Thompson EW, Rossjohn J, Price JT (2004) Bimolecular interaction of insulin-like growth factor (IGF) binding protein-2 with alphavbeta3 negatively modulates IGF-I-mediated migration and tumor growth. *Cancer Res* 64:977-984

Perks CM, Vernon EG, Rosendahl AH, Tonge D, Holly JM (2007) IGF-II and IGFBP-2 differentially regulate PTEN in human breast cancer cells. *Oncogene* 26:5966-5972

Peslova G, Petrak J, Kuzelova K, Hrdy I, Halada P, Kuchel PW, Soe-Lin S, Ponka P, Sutak R, Becker E, Huang MLH, Rahmanto YS, Richardson DR, Vyoral D (2009) Hepcidin, the hormone of iron metabolism, is bound specifically to  $\alpha$ -2-macroglobulin in blood. *Blood* 113:6225-6236

Petersen SV, Thogersen IB, Valnickova Z, Nielsen MS, Petersen JS, Poulsen ET, Jacobsen C, Oury TD, Moestrup SK, Crapo JD, Nielsen NC, Kristensen T, Enghild JJ (2010) The concentration of extracellular superoxide dismutase in plasma is maintained by LRP mediated endocytosis. *Free Radic Biol Med* 49:894-899



- Peyrat JP, Louchez MM, Lefebvre J, Bonneterre J, Vennin P, Demaille A, Helquet B, Fournier C (1993) Plasma insulin-like growth factor-I (IGF-I) concentrations in human breast cancer. *Eur J Cancer* 29:492-497
- Piecewicz SM, Pandey A, Roy B, Xiang SH, Zetter BR, Sengupta S (2012) Insulin-like growth factors promote vasculogenesis in embryonic stem cells. *PLoS ONE* 7:e32191
- Piura E, Piura B (2010) Autoantibodies to tumor-associated antigens in breast carcinoma. *J Oncol* 2010:1-14
- Plopper G (2007) The extracellular matrix and Cell Adhesion, in *Cells* (Lewin B, Lingappa VR, Plopper G, eds) pp.645-702, Jones and Bartlet, Ontario
- Plow EF, Haas TA, Zhang L, Loftus J, Smith JW (2000) Ligand binding to integrins. *J Biol Chem* 275:21785-21788
- Pochon F, Favaudon V, Tourbez-Perrin M, Beith J (1981) Localization of the two protease binding sites in human alpha 2-macroglobulin. *J Biol Chem* 256:547-550
- Pollak MN, Schernhammer ES, Hankinson SE (2004) Insulin-like growth factors and neoplasia. *Nat Rev Cancer* 4:505-518
- Powers SK, Jackson MJ (2008) Exercise-Induced Oxidative Stress: Cellular Mechanisms and Impact on Muscle Force Production. *Physiol Rev* 88:1243-1276
- Pryczynicz A, Gryko M, Niewiarowska K, Dymicka-Piekarska V, Ustymowicz M, Hawryluk M, Cepowicz D, Borsuk A, Kemonia A, Famulski W, Guzinska-Ustymowicz K (2013) Immunohistochemical expression of MMP-7 protein and its serum level in colorectal cancer. *Folia Histochem Cytobiol* 51:206-212
- Puche JE, Castilla-Cortázar I (2012) Human conditions of insulin-like growth factor-I (IGF-I) deficiency. *J Translat Med* 10:1-29
- Pucilowska JB, Davenport ML, Kabir I, Clemmons DR, Thissen JP, Butler T, Underwood LE (1993) The effect of dietary protein supplementation on insulin-like growth factors (IGFs) and IGF-binding proteins in children with shigellosis. *J Clin Endocrinol Metab* 77:1516-1521
- Qin C, Chen L, Qin JG, Zhao D, Zhang H, Wu P, Li E, Yu N (2010) Molecular cloning and characterization of alpha2-macroglobulin ( $\alpha$ 2-M) from the haemocytes of Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis*. *Fish Shellfish Immunol* 29:195-203

- Rajah R, Katz L, Nunn S, Solberg P, Beers T, Cohen P (1995) Insulin-like growth factor binding protein (IGFBP) proteases: functional regulators of cell growth. *Prog Growth Factor Res* 6:273-284
- Rajah R, Valentinis B, Cohen P (2000) Insulin-like growth factor (IGF) binding protein-3 induces apoptosis and mediates the effects of transforming growth factor-beta on programmed cell death through a p53- and IGF- independent mechanism. *J Biol Chem* 275:33607-33613
- Rajaram S, Baylink DJ, Mohan S (1997) Insulin-like growth factor-binding proteins in serum and other biological fluids: regulation and functions. *Endocr Rev* 18:801-831
- Ranke MB, Schweizer R, Elmlinger MW, Weber K, Binder G, Schwarze CP, Wollmann HA (2000) Significance of basal IGF-I, IGFBP-3 and IGFBP-2 measurements in the diagnostics of short stature in children. *Horm Res* 54:60-68
- Rechler MM (1993) Insulin-like growth factor binding proteins *Vitam Horm* 47:1-114
- Reeve JG, Kirby LB, Brinkman A, Hughes SA, Schwander J, Bleehen NM (1992) Insulin-like growth-factor-binding protein gene expression and protein production by human tumour cell lines. *Int J Cancer* 51:818-821
- Rehman AA, Ahsan H, Khan FH (2012) Alpha-2-macroglobulin: a physiological guardian. *J Cell Physiol* DOI: 10.1002/jcp.24226
- Reiter EO (2008) Endocrine regulation of growth. Williams Textbook of Endocrinology (Kronenberg HM, Melmed S, Polonsky KS, Larsen PR, eds) pp. 1957-2011. SAUNDERS ELSEVIER, Philadelphia, PA
- Rinderknecht E, Humbel RE (1978) The amino acid sequence of human insulin-like growth factor I and its structural homology with proinsulin. *J Biol Chem* 253:2769-2776
- Roghani M, Hossenlopp P, Lepage P, Balland A, Binoux M (1989) Isolation from human cerebrospinal fluid of a new insulin-like growth factor-binding protein with a selective affinity for IGF-II. *FEBS Lett* 255:253-258
- Rosenfeld RG, Conover CA, Hodges D, Lee PDK, Misra P, Hintz RL, Li CH (1987) Heterogeneity of insulin-like growth factor-I affinity for the insulin-like growth factor-II receptor: comparison of natural, synthetic and recombinant DNA-derived insulin-like growth factor-I. *Biochem Biophys Res Commun* 143:195-205

Rosenfeld RG, Pham H, Cohen P (1994) Insulin-like growth factor binding proteins and their regulation. *Acta Paediatr Suppl* 339:154-158

Rosenthal SM, Cheng ZQ (1995) Opposing early and late effects of insulin-like growth factor-I on differentiation and the cell cycle regulatory retinoblastoma protein in skeletal myoblasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:10307-10311

Rowan AJ, Lamlum H, Ilyas M, Wheeler J, Straub J, Papadopoulou A, Bicknell D, Bodmer WF, Tomlinson IPM (2000) APC mutations in sporadic colorectal tumors: a mutational “hotspot” and interdependence of the “two hits”. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:3352-3357

Rubin JB, Shia MA, Pilch PF (1983) Stimulation of tyrosine-specific phosphorylation in vitro by insulin-like growth factor I. *Nature* 305:438–440

Rudman D, Feller AG, Nagraj HS, Gergans GA, Lalitha PY, Goldberg AF, Schlenker RA, Cohn L, Rudman IW, Mattson DE (1990) Effects of human growth hormone in men over 60 years old. *N Engl J Med* 323:1-6

Russo VC, Bach LA, Werther GA (1995) Cell membrane association of insulin-like growth factor binding protein-2 (IGFBP-2) in the rat brain olfactory bulb. *Prog Growth Factor Res* 6:329-336

Russo VC, Bach LA, Fosang AJ, Baker NL, Werther GA (1997) Insulin-like growth factor binding protein-2 binds to cell surface proteoglycans in the rat brain olfactory bulb. *Endocrinology* 138:4858-4867

Russo VC, Rekaris G, Baker NL, Bach LA, Werther GA (1999) Basic fibroblast growth factor induces proteolysis of secreted and cell membrane-associated insulin like growth factor binding protein-2 in human neuroblastoma cells. *Endocrinology* 140:3082-3090

Russo VC, Schütt BS, Andaloro E, Yimer SI, Hoeflich A, Ranke MB, Bach LA, Werther GA (2005) Insulin-like growth factor binding protein-2 binding to extracellular matrix plays a critical role in neuroblastoma cell proliferation, migration and invasion. *Endocrinology* 146:4445-4455

Russo VC, Azar WJ, Yau SW, Sabin MA, Werther GA (2014) IGFBP-2: The dark horse in metabolism and cancer. *Cytokine Growth Factor Rev* 26:329-346

Sackett L, McKusker RH (1998) Multivalent cations depress ligand affinity of insulin-like growth factor-binding proteins-3 and -5 on human GM-10 fibroblast cell surfaces. *J Cell Biochem* 69:364-375

Saldova R, Royle L, Radcliffe CM, Abd Hamid UM, Evans R, Arnold JN, Banks R, Hutson R, Harvey DJ, Antrobus R (2007) Ovarian cancer is associated with changes in glycosylation in both acute-phase proteins and IgG. *Glycobiology* 17:1344-1356

Saldova R, Reuben J, Abd Hamid U, Rudd P, Cristofanilli M (2011) Levels of specific serum N-glycans identify breast cancer patients with higher circulating tumor cell counts. *Ann Oncol* 22:1113-1119

Samani AA, Brodt P (2001) The receptor for the type I insulin-like growth factor and its ligands regulate multiple cellular functions that impact on metastasis. *Surg Oncol Clin North Am* 10:289-312

Sarrats A, Saldova R, Comet J, O'Donoghue N, de Llorens R, Rudd PM, Peracaula R (2010) Glycan characterization of PSA 2-DE subforms from serum and seminal plasma, *OMICS:J Integr Biol* 14:465-474

Scavo LM (2004) Insulin-like growth factor-I stimulates both cell growth and lipogenesis during differentiation of human mesenchymal stem cells into adipocytes. *J Clin Endocrinol Metab* 89:3543-3553

Schaefer EM, Siddle K, Ellis L (1990) Deletion analysis of the human insulin receptor ectodomain reveals independently folded soluble subdomains and insulin binding by a monomeric alpha-subunit. *J Biol Chem* 265:13248-13253

Schütt BS, Langkamp M, Ranke MB, Elmlinger, MW (2000) Intracellular signalling of insulin-like growth factor binding protein-2. *Growth Horm IGF Res* 10:A30

Schütt BS, Langkamp M, Rauschnabel U, Ranke MB, Elmlinger MW (2004) Integrin-mediated action of insulin-like growth factor binding protein-2 in tumor cells. *J Mol Endocrinol* 32:859-868

Schwartz GN, Hudgins WR, Perdue JF (1993) Glycosylated insulin-like growth factor-II promoted expansion of granulocytes-macrophage colony forming cells in serum deprived liquid cultures of human peripheral blood cells. *Exp Hematol* 21:1447-1454

Schwartz MA, Schaller MD, Ginsberg MH (1995) Integrins: emerging paradigms of signal transduction. *Ann Rev Cell Dev Biol* 11:549-599

Selman C, Lingard S, Choudhury A, Batterham RL, Claret M, Clements M, Ramadani F, Okkenhaug K, Schuster E, Blanc E, Piper MD, Al-Qassab H, Speakman JR, Carmignac D, Robinson IC, Thornton JM, Gems D, Partridge L, Withers DJ (2008) Evidence for lifespan extension and delayed age-related biomarkers in insulin receptor substrate 1 null mice. *FASEB J* 22:807-818

Semenza GL (1999) Regulation of mammalian O<sub>2</sub> homeostasis by hypoxia-inducible factor-1. *Ann Rev Cell Dev Biol* 15:551-578

Semenza GL (2003) Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 3:721-32

Sheikh AM, Chauhan V, Tsiouris JA, Mehta PD, Burgess K, Fenko MD, Spivack W, Vaughan M, Malik M (2003) Elevated levels of serum alpha<sub>2</sub> macroglobulin in wild black bears during hibernation. *Biochimie* 85:1027-1032

Shen X, Xi G, Maile LA, Wai C, Rosen CJ, Clemmons DR (2012) Insulin-like growth factor binding protein-2 functions coordinately with receptor protein tyrosine phosphatase beta and the IGF-I receptor to regulate IGF-I-stimulated signaling. *Mol Cell Biol* 32:4116-4130

Shi Y, Yamauchi T, Gaultier A, Takimoto S, Campana WM, Gonias SL (2011) Regulation of cytokine expression by Schwann cells in response to alpha<sub>2</sub>-macroglobulin binding to LRP1. *J Neurosci Res* 89:544-551

Shimasaki S, Ling N (1991) Identification and molecular characterization of insulin-like growth factor binding proteins (IGFBP-1,-2,-3,-4,-5, and -6) *Prog Growth Factor Res* 3:243-266

Shiomi T, Okada Y (2003) MT1-MMP and MMP-7 in invasion and metastasis of human cancers. *Cancer Metastasis Rev* 22:145-152

Singh B, Charkowicz D, Macarenhas D (2004) Insulin-like growth factor-independent effects mediated by a C-terminal metal-binding domain of insulin-like growth factor binding protein-3. *J Biol Chem* 279:477-487

So AI, Levitt RJ, Eigl B, Fazli L, Muramaki M, Leung S, Cheang MC, Nielsen TO, Gleave M, Pollak M (2008) Insulin-like growth factor binding protein-2 is a novel therapeutic target associated with breast cancer. *Clin Cancer Res* 14:6944-6954

Soh CL, McNeil K, Owczarek CM, Hardy MP, Fabri LJ, Pearse M, Delaine CA, Forbes BE (2014) Exogenous administration of protease-resistant, non-matrix-binding IGFBP-2 inhibits tumour growth in a murine model of breast cancer. *Br J Cancer* 110:2855-2864

Song H, Beattie J, Campbell IW, Allan GJ (2000) Overlap of IGF- and heparin-binding sites in rat IGF-binding protein-5. *J Mol Endocrinol* 24:43-51

Song SW, Fuller GN, Khan A, Kong S, Shen W, Taylor E, Taylor E, Ramdas L, Lang FF, Zhang W (2003) Iip45, an insulin-like growth factor binding protein 2 (IGFBP-2) binding protein, antagonizes IGFBP-2 stimulation of glioma cell invasion. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:13970-13975

Soos MA, Field CE, Siddle K (1993) Purified hybrid insulin/insulin-like growth factor-I receptors bind insulin-like growth factor-I, but not insulin, with high affinity. *Biochem J* 290:419-426

Stambolić V, Suzuki A, de la Pompa JL, Brothers GM, Mirtsos C, Sasaki T, Ruland J, Penninger JM, Siderovski DP, Mak TW (1998) Negative regulation of PKB/Akt-dependent cell survival by the tumor suppressor PTEN. *Cell* 95:29-39

Stewart CE, Rotwein P (1996) Growth, differentiation, and survival: multiple physiological functions for insulin-like growth factors. *Physiol Rev* 76:1005-1026

Stewart LV, Weigel NL (2005) Role of insulin-like growth factor binding proteins in 1 alpha,25-dihydroxy vitaminD(3)-induced growth inhibition of human prostate cancer cells. *Prostate* 64:9-19

Swisshelm K, Ryan K, Tsuchiya K, Sager R (1995) Enhanced expression of an insulin growth factor-like binding protein (mac25) in senescent human mammary epithelial cells and induced expression with retinoic acid. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:4472-4476

Taaffe DR, Thompson JL, Butterfield GE, Hoffman AR, Marcus R (2001) Recombinant human growth hormone, but not insulin-like growth factor-I, enhances central fat loss in postmenopausal women undergoing a diet and exercise program. *Horm Metab Res* 33:156-162

- Taguchi A, Wartschow L, White M (2007) Brain IRS2 signaling coordinates life span and nutrient homeostasis. *Science* 317:369-372
- Tang X, Powelka AM, Soriano NA, Czech MP, Guilherme A (2005) PTEN, but not SHIP2, suppresses insulin signaling through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway in 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem* 280:22523-22529
- Tatar M, Bartke A, Antebi A (2003) The endocrine regulation of aging by insulin-like signals. *Science* 299:1346-1351
- Tong PY, Tollefsen SE, Kornfeld S (1988) The cation-independent mannose 6-phosphate receptor binds insulin-like growth factor II. *J Biol Chem* 263:2585-2588
- Tong PY, Gregory W, Kornfeld S (1989) Ligand interactions of the cation dependent mannose 6-phosphate receptor. The stoichiometry of mannose 6-phosphate binding. *J Biol Chem* 264:7962-7969
- Torres-Aleman I (2010) Toward a comprehensive neurobiology of IGF-I. *Dev Neurobiol* 70:384-396
- Travis J, Salvesen GS (1983) Human plasma proteinase inhibitors. *Annu Rev Biochem* 5:655-709
- Tunstal A, Merriman JM, Milne I, James K (1975) Normal and pathological serum levels of  $\alpha$ 2-macroglobulins in men and mice. *J Clin Pathol* 28:133-139
- Twigg SM, Baxter RC (1998) Insulin-like growth factor (IGF)-binding protein 5 forms an alternative ternary complex with IGFs and the acid-labile subunit. *J Biol Chem* 273:6074-6079
- Unterman TG, Vazquez RM, Slas AJ (1985) Nutrition and somatomedin XIII. Usefulness of somatomedin-C nutritional assessment. *Am J Med* 78:228-234
- Valenta T, Hausmann G, Basler K (2012) The many faces and functions of beta-catenin. *EMBO J* 31:2714-2736
- Valnickova Z, Thogersen IB, Christensen S, Chu CT, Pizzo SV, Enghild JJ (1996) Activated human plasma carboxypeptidase B is retained in the blood by binding to  $\alpha$ 2-macroglobulin and pregnancy zone protein. *J Biol Chem* 271:12937-12943

van den Beld AW, Blum WF, Pols HA, Grobbee DE, Lamberts SW (2003) Serum insulin-like growth factor binding protein-2 levels as an indicator of functional ability in elderly men. *Eur J Endocrinol* 148:627-634

van den Berghe G (2000) Novel insights into the neuroendocrinology of critical illness. *Eur J Endocrinol* 143:1-13

Vrieling A, Voksuil DW, Bueno de Mesquita HB, Kaaks R, van Noord PA, Keinan-Boker L, van Gils CH, Peeters PH (2004) Dietary determinants of circulating insulin-like growth factor (IGF)-I and IGF binding proteins 1,-2 and-3 in women in the Netherlands. *Cancer Causes Control* 15:787-796

Vrieling A, Voskuil DW, Bonfrer JM, Korse CM, van Doorn J, Cats A (2007) Lycopene supplementation elevates circulating insulin-like growth factor binding protein-1 and -2 concentrations in persons at greater risk of colorectal cancer. *Am J Clin Nutr* 86:1456-1462

Wang GK, Hu L, Fuller GN, Zhang W (2006) An interaction between insulin-like growth factor-binding factor 2 (IGFBP-2) and integrin alpha 5 is essential for IGFBP2-induced cell mobility. *J Biol Chem* 281:14085-14091

Wang H, Wang H, Shen W, Huang H, Hu L, Ramdas L, Zhou YH, Liao WS, Fuller GN, Zhang W (2003) Insulin-like growth factor binding protein 2 enhances glioblastoma invasion by activating invasion-enhancing genes. *Cancer Res* 63:4315-4321

Warburg O (1923) Tests on surviving carcinoma cultures. *Biochem Z* 142:317-333

Weinzimer SA, Gibson TB, Collett-Solberg PF, Khare A, Liu B, Cohen P (2001) Transferrin is an insulin-like growth factor-binding protein-3 binding protein. *J Clin Endocrinol Metab* 86:1806-1813

Weng LP, Brown JL, Baker KM, Ostrowski MC, Eng C (2002) PTEN blocks insulin-mediated ETS-2 phosphorylation through MAP kinase, independently of the phosphoinositide 3-kinase pathway. *Hum Mol Genet* 11:1687-1696

Werner S, Grose R (2003) Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Am J Physiol* 83:835-870

Westlund B, Dahms NM, Kornfeld S (1991) The bovine mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor. Localization of mannose 6-phosphate binding sites to domains 1-3 and 7-11 of the extracytoplasmic region. *J Biol Chem* 266:23233-23239



Westwood M, Aplin JD, Ilse AC, Gill A, White A, Gibson JM (2001)  $\alpha$ 2-Macroglobulin: a new component in the insulin-like growth factor/insulin-like growth factor binding protein-1 axis. *J Biol Chem* 276:41668-41674

Wheatcroft SB, Kearney MT, Shah AM, Ezzat VA, Miell JR, MODO M, Williams SC, Cawthorn WP, Medina-Gomez G, Vidal-Puig A, Sethi JK, Crossey PA (2007) IGF binding protein-2 protects against the development of obesity and insulin resistance. *Diabetes* 56:285-294

Wheatcroft SB, Kearney MT (2009) IGF-dependent and IGF-independent actions of IGF-binding protein-1 and -2 implications for metabolic homeostasis. *Trends Endocrinol Metab* 20:153-162

Wilson EM, Rotwein P (2006) Control of MyoD function during initiation of muscle differentiation by an autocrine signaling pathway activated by insulin-like growth factor-II. *J Biol Chem* 281:29962-29971

Wolf E, Kramer R, Blum WF, Föll J, Brem G (1994) Consequences of post-natally elevated insulin-like growth factor-II in transgenic mice: endocrine changes and effects on body and organ growth. *Endocrinology* 135:1877-1886

Wu SM, Patel DD, Pizzo SV (1998) Oxidized alpha 2-macroglobulin (alpha2M) differentially regulates receptor binding by cytokines/growth factors: implications for tissue injury and repair mechanisms in inflammation. *J Immunol* 161:4356-4365

Wyatt AR, Yerbury JJ, Dabbs RA, Wilson MR (2012) Roles of extracellular chaperones in amyloidosis. *J Mol Biol* 421:499-516

Xing XJ, Gu XH, Ma TF (2014) Relationship of serum MMP-7 levels for colorectal cancer: a meta-analysis. *Tumour Biol* 35:10515-10522

Xu Q, Yan B, Li S, Duan C (2004) Fibronectin binds insulin-like growth factor-binding protein 5 and abolishes its ligand-dependent action on cell migration. *J Biol Chem* 279:4269-4277

Yuen KC, Dunger DB (2007) Therapeutic aspects of growth hormone and insulin-like growth factor –I treatment on visceral fat and insulin sensitivity in adults. *Diabetes Obes Metab* 9:11-22

Zachrisson I, Brismar K, Carlsson-Skwirut C, Dahlquist G, Wallensteen M, Bang P (2000) Increased 24 h mean insulin-like growth factor binding protein-3 proteolytic activity in pubertal type 1 diabetic boys. *Growth Horm IGF Res* 10:324-331

Zaidel-Bar R, Itzkovitz S, Ma'ayan A, Iyengar R, Geiger B (2007) Functional atlas of the integrin adhesome. *Nat Cell Biol* 9:858-867

Zhao R, DeCoteau JF, Geyer CR, Gao M, Cui H, Casson AG (2009) Loss of imprinting of the insulin-like growth factor-II (IGF2) gene in esophageal normal and adenocarcinoma tissues. *Carcinogenesis* 30:2117-2122

## Биографија аутора

Милош Б. Шундерић рођен је 7. децембра 1984. године у Београду. Основну школу и гимназију, природно-математичког смера, завршио је у Београду. Хемијски факултет у Београду, смер дипломирани биохемичар, уписао је 2003. године. Дипломирао је 2010. године са просечном оценом 8,79 и оценом 10 на дипломском раду. Године 2011. уписао је докторске студије на Хемијском факултету Универзитета у Београду, смер Биохемија.

У Институту за примену нуклеарне енергије (ИНЕП) ради од 01.10.2011. године, на пројекту под називом: „Структурне карактеристике везујућих протеина и рецептора за инсулину сличне факторе раста (IGF), њихове интеракције са другим физиолошким молекулима и промене код поремећаја метаболизма“ (МПНТР РС, број пројекта 173042).

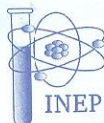
Учествовао је у COST пројекту „Chemistry of non-enzymatic protein modifications-modulation of protein structure and function“ (број пројекта CM 1001, 2011-2014), у оквиру кога је похађао летњу школу под називом: „Biochemical basis of healthy ageing“ (2014. године, Спецес, Грчка).

Учествовао је у билатераланој сарадњи са колегама из Словачке академије наука на пројекту: „Lectin biochips for characterization of glycan structure of the IGF system proteins as a tool for research, diagnostics and therapy of colorectal carcinoma“ (број пројекта 680-00-140/2012-09/01, 2012-2013).

У току 2012. године провео је недељу дана у лабораторији др Јарослава Катрлика у циљу обучавања за рад са лектинским микроерејем. Сарадња је настављена кроз пројекат: „Determination of glycosylation changes of proteins related to colorectal carcinoma using modern sensitive lectin biochips with impact to cancer research, diagnostics and therapy“ (број пројекта 451-03-545/2015-09/01, 2015-2016).

Члан је Српског хемијског друштва од 2011. године и Биохемијског друштва Србије од исте године.

## Прилог 1



Banatska 31 b  
11030 Beograd  
Srbija, POB 46

82. 02-211/2  
31.03.2015.

### UNIVERZITET U BEOGRADU INSTITUT ZA PRIMENU NUKLEARNE ENERGIJE

Tekući račun: 340-13505-58, ERSTE BANK – AD Novi Sad  
PIB: 103011991 Matični broj: 07030088  
www.inep.co.rs



Tel: 011 2618-666, 2618-696  
Fax: 011 2618-724  
E-mail: mall@inep.co.rs

#### ЕТИЧКА КОМИСИЈА ИНЕП-а

#### ОДОБРЕЊЕ ЗА КОРИШЋЕЊЕ МАТЕРИЈАЛА ХУМАНОГ ПОРЕКЛА

Број одобрења: 02-211/2

Датум: 31. март 2015.

Назив активности: Молекулски облици везујућег протена 2 за факторе раста сличне инсулину и њихова заступљеност у различитим (пато)физиолошким стањима

Облик активности:

- 1) Научноистраживачки пројекат
- 2) Докторска дисертација
- 3) Мастер/специјалистички рад
- 4) Остало

Име истраживача: Милош Шундерић

Пројекат: МПН РС 173042

Врста узорка: Хумани серуми и ткиво

Основ за давање одобрења: Захтев 02-211/1

Рок трајања одобрења: 2015 – 2016.

  
Др Мирослава Јанковић  
Председник Етичке комисије ИНЕП-а



## Прилог 2

### Списак радова проистеклих из тезе:

1. Šunderić M., Miljuš G., Nedić O., Interaction of insulin-like growth factor-binding protein 2 with  $\alpha$ 2-macroglobulin in the circulation. *The Protein Journal*, 2013, 32, 138-142. (M23)

2. Nedić O., Robajac D., Šunderić M., Miljuš G., Đukanović B., Malenković V., Detection and identification of oxidized insulin-like growth factor-binding proteins and receptors in patients with colorectal carcinoma. *Free Radical Biology and Medicine*, 2013, 65, 1195-1200. (M21)

3. Šunderić M., Đukanović B., Malenković V., Nedić O., Molecular forms of the insulin-like growth factor-binding protein-2 in patients with colorectal cancer. *Experimental and Molecular Pathology*, 2014, 96, 48-53. (M21)

4. Šunderić M., Mihailović N., Nedić O., Protein molecular forms of insulin-like growth factor binding protein-2 change with aging. *Experimental Gerontology*, 2014, 58, 154-158. (M21)

5. Šunderić M., Malenković V., Nedić O., Complexes between insulin-like growth factor binding proteins and alpha-2-macroglobulin in patients with tumor. *Experimental and Molecular Pathology*, 2015, 98, 173-177. (M21)

6. M. Šunderić, A. Šedivá, D. Robajac, G. Miljuš, P. Gemeiner, O. Nedić, J. Katrik: Lectin-based protein microarray analysis of differences in serum alpha-2-macroglobulin glycosylation between patients with colorectal cancer and persons without cancer, *Biotechnol Appl Biochem* DOI:10.1002/bab.1407 (M23)

### Прилог 3

## Изјава о ауторству

Потписани Милош Б. Шундерић

број индекса дб 14/2011

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Молекулски облици везујућег протеина 2 за факторе раста сличне инсулину и њихова заступљеност у различитим патофизиолошким стањима

- 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 ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

**Потпис докторанда**

У Београду, 01.02.2016.

Милош Шундерић

## Прилог 4

### Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Милош Б. Шундерић

Број индекса дб 14/2011

Студијски програм Доктор биохемијских наука

Наслов рада Молекулски облици везујућег протеина 2 за факторе раста сличне инсулину и њихова заступљеност у различитим патофизиолошким стањима

Ментор др Марија Гавровић-Јанкуловић, др Олгица Недић

Потписани Милош Шундерић

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

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

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

**Потпис докторанда**

Милош Шундерић

У Београду, 01.02.2016.

## Прилог 5

### Изјава о коришћењу

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

**Молекулски облици везујућег протеина 2 за факторе раста сличне инсулину и њихова заступљеност у различитим патофизиолошким стањима**

која је моје ауторско дело.

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

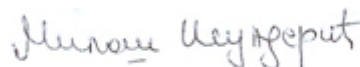
Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио.

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

У Београду, 01.02.2016.

Потпис докторанда





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.