

UNIVERZITET U BEOGRADU

HEMIJSKI FAKULTET

Goran M. Miljuš

**IZOLOVANJE, KARAKTERIZACIJA I
ULOGA KOMPLEKSA TRANSFERINA SA
VEZUJUĆIM PROTEINOM 3 ZA
FAKTORE RASTA SLIČNE INSULINU**

doktorska disertacija

Beograd, 2015

UNIVERZITET U BEOGRADU

HEMIJSKI FAKULTET

Goran M. Miljuš

**Izolovanje, karakterizacija i uloga
kompleksa transferina sa vezujućim
proteinom 3 za faktore rasta slične insulinu**

doktorska disertacija

Beograd, 2015

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF CHEMISTRY

Goran M. Miljuš

**Isolation, characterisation and the role of
complexes formed between transferrin and
insulin-like growth factor-binding protein 3**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2015.

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

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

Članovi komisije:

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

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

dr Milan Nikolić, docent
Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu

Datum odbrane doktorske teze: _____

„Obrazovanje je majmoćnije oružije koje možete upotrebiti da menjate svet“

Nelson Mandela

Eksperimentalni deo ove doktorske disertacije urađen je u Odeljenju za metabolizam instituta INEP, Univerziteta u Beogradu, u okviru projekata pod rukovodstvom dr Olgice Nedić, naučnog savetnika INEP-a.

Svom mentoru, dr Olgici Nedić, dugujem najveću zahvalnost prvenstveno zbog znanja i iskustva koje mi je nesebično prenosila tokom mog naučnog usavršavanja. Posebno joj se zahvaljujem na svesrdnoj pomoći koju mi je pružala tokom izrade svakog dela ove disertacije. Izuzetna mi je čast i privilegija što sam deo njenog naučno-istraživačkog tima, koji pod (roditeljskim) nadzorom dr Olgice Nedić podseća na pravu porodicu.

Posebno se zahvaljujem dr Mariji Gavrović-Jankulović, redovnom profesoru Hemijskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu, na interesovanju za moj rad od samog početka. Veliko hvala za korisne savete i sugestije, kao i za pomoć prilikom konačne izrade ove doktorske disertacije.

Veliku zahvalnost dugujem i dr Milanu Nikoliću, docentu Hemijskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu, na svim predlozima koji su omogućili da ova disertacija bude finalno prikazana u najboljem mogućem obliku.

Iskreno i od srca se zahvaljujem mojim kolegama iz Laboratorije, sa kojima delim i više od prostora u kome radimo. Hvala na podršci, savetima, raspravama i lepom druženju Dragana R., Dragana L., Miloše, Ana i Nikola. Hvala svim kolegama iz INEP-a sa kojima posao nije bio samo posao, nego i lepši deo dana.

Mojoj majci Milki, ocu Miloradu i bratu Slobodanu reći hvala za podršku i ljubav koju su mi pružili i omogućili da izrastem u osobu kakva sam danas, nije dovoljno. Hvala Vam!

I naravno, mojoj Jeleni dugujem najviše. Za sve što smo zajedno prošli, i što ćemo zajedno proći, za svaki trenutak kada mi je pružala podršku i uputila kritiku, i što je pokazala razumevanje za sve moje poteze u životu. HVALA TI!

Goran Miljuš

Izolovanje, karakterizacija i uloga kompleksa transferina sa vezujućim proteinom 3 za faktore rasta slične insulinu

IZVOD

Sistem faktora rasta, po strukturi i funkciji, sličnih insulinu („insulin-like growth factor“-IGF) obuhvata elemente sa primarnom ulogom u regulaciji rasta, razvoja, diferencijacije ćelija kako u fiziološkim, tako i u patofiziološkim uslovima. Pored dva funkcionalna peptidna hormona, IGF-I i IGF-II, ovaj sistem sadrži molekule koji regulišu ispoljavanje njihove fiziološke funkcije. Regulatorni elementi IGF sistema su: vezujući proteini (IGFBP-1 do -6), receptori za IGF molekule: IGF-1R, IGF-2R, insulinski receptor (IR), hibridni receptor IGF-R/IR, kao i specifične proteaze. Nakon proteolize IGFBP, funkcija IGF-I/II se ispoljava interakcijom sa IGF specifičnim receptorima na površini ćelija.

U kompleksu sa IGFBP-3 se nalazi 70-75% IGF peptida. Pored primarne uloge nosača IGF molekula, IGFBP-3 učestvuje i u brojnim interakcijama nezavisno od IGF. IGFBP-3 poseduje više strukturnih domena što ga čini sposobnim za vezivanje za druge molekule i pokretanje signalnih puteva i mehanizama nezavisnih, a nekad i suprotnih, dejstvu IGF peptida poput stimulacije rasta ćelija ili pokretanja apoptotskih procesa. Jedan od partnera koji interaguje sa IGFBP-3 je transferin (Tf), glavni transporter jona gvožđa u krvi.

Iako se za postojanje kompleksa IGFBP-3/Tf znalo i ranije, rezultati ove disertacije predstavljaju prvi prikaz strukturnih i funkcionalnih osobina ovih kompleksa, kao i sagledavanje njihove moguće uloge. U ovoj disertaciji je opisan optimizovan postupak za izolovanje kompleksa iz fizioloških uzoraka (seruma i tkiva), navedene su strukturne karakteristike kompleksa IGFBP-3/Tf, faktori koji utiču na njihovo formiranje, određena je koncentracija kompleksa u serumu zdravih odraslih osoba i osoba sa poremećajem u metabolizmu gvožđa, dokazana je neophodnost jona gvožđa za formiranje kompleksa i analizirana je subćelijska raspodela kompleksa u tkivu debelog creva (zdravog i tumorskog). U radu je ispitan uticaj: anemije, visoke koncentracije gvožđa i tumora debelog creva, na koncentraciju i strukturu kompleksa. Za tumor debelog creva je karakteristična sistemska anemija, praćena akumulacijom gvožđa u samom tumorskom tkivu. Na model sistemu tumora debelog creva ispitana je važnost puta internalizacije IGFBP-3 preko kompleksa sa Tf, odnosno posredstvom transferinskog receptora (TfR).

Nađeno je da je koncentracija kompleksa IGFBP-3/Tf kod zdravih ljudi $241 \pm 62 \mu\text{g/L}$ i da se u ovoj formi nalazi 5-7% ukupnog IGFBP-3. Kod različitih patofizioloških stanja sa poremećajem u metabolizmu gvožđa utvrđeno je da formiranje kompleksa primarno zavisi od koncentracije gvožđa, potom koncentracije IGFBP-3, ali i proteina uključenih u metabolizam gvožđa, poput feritina. Kod IGFBP-3/Tf kompleksa analiziranih u uzorcima seruma dobijenih od pacijenata sa tumorom debelog creva primećen je izmenjen način

glikozilovanja i povećan stepen oksidacije molekula, kao i jača interakcija sa metalnim jonima. Eksperimenti na uzorcima tkiva su pokazali da je stepen kolokalizacije IGFBP-3/Tf/TfR izrazito visok na membranama tumorskih ćelija, što ukazuje da se internalizacija IGFBP-3 kod ovog tkiva pretežno vrši putem Tf-TfR interakcije. Pojačana ekspresija TfR na površini ćelija tumora predstavlja kompenzaciju za umanjeno prisustvo IGFBP-3 u cirkulaciji, te internalizacija ovim putem obezbeđuje ispoljavanje pro-apoptotske funkcije IGFBP-3 molekula.

Ključne reči: IGFBP-3, transferin, kompleksi, jon gvožđa, transferinski receptor, metabolizam gvožđa, tumor debelog creva

Naučna oblast: Biohemija

Uža naučna oblast: Biohemija proteina

UDK broj: 577.112

Isolation, characterisation and the role of complexes formed between transferrin and insulin-like growth factor-binding protein 3

ABSTRACT

The insulin-like growth factor (IGF) system plays an important role in the regulation of cell growth, development and differentiation, in both physiological and pathophysiological condition. Beside two peptide hormones IGF-I and IGF-II, this system includes the following regulatory elements: six IGF-binding proteins (IGFBP-1 to -6), specific receptors for IGF (IGF-1R and IGF-2R), insulin receptor (IR), hybrid receptor (IGF-R/IR) as well as IGFBP specific proteases. When IGFBPs are proteolytically cleaved, IGF-I/II are able to exert their physiological function by interacting with specific receptors on the cell surface.

Approximately 70-75% of the total IGFs, are transported in circulation in the form of ternary complexes with IGFBP-3. Besides being the principal carrier of IGF molecules, IGFBP-3 was reported to exert a number of activities which are IGF-independent. Due to its structural sub-domain organisation, this molecule is able to interact with binding partners other than IGFs, and consequently activate mechanisms and signaling cascades with independent or even opposite effects to those of IGF-I/II, such as apoptosis. One of these binding partners is transferrin (Tf), the principal iron transporter in the blood.

Although the existence of IGFBP-3/Tf complexes has already been reported, the results presented in this thesis offer the first complete structural and functional characterisation of the complexes, together with the analysis of their potential role. The fully optimised method for the isolation of intact IGFBP-3/Tf complexes from serum and tissue samples has been described, some structural characteristics have been defined, the effect of iron and other factors on the formation of complexes was studied, their concentration in sera from healthy persons and patients with impaired iron metabolism disorders was measured, as well as their subcellular distribution in colon tissue (healthy and tumor tissue). The formation and concentration of IGFBP-3/Tf complexes in persons with anemia, persons with very high iron concentration or patients with colorectal carcinoma (CRC) have also been investigated. The emphasis was made on samples from patients with CRC, a disease accompanied by systemic anemia and increased iron accumulation in cancer cells. CRC was a model system for the analysis of IGFBP-3 internalisation via Tf-TfR pathway.

The concentration of IGFBP-3/Tf complexes in healthy adults was measured to be 241 ± 62 $\mu\text{g/L}$, which makes up to 5-7% of the total IGFBP-3. The results have shown that in impaired iron metabolism, the formation of complexes is highly dependent on the iron concentration, then IGFBP-3 concentration, as well as the concentration of other proteins involved in iron metabolism, such as ferritin. IGFBP-3/Tf complexes isolated from serum

obtained from CRC patients, demonstrated altered glycosylation pattern, increased protein oxidation and a higher affinity for metal ions. Experiments with tissue samples revealed high co-localisation of IGFBP-3/Tf/TfR, especially on the membranes of cancer cells, confirming that the internalisation of IGFBP-3 in CRC pathology is predominately mediated by the Tf-TfR interaction. The increased presence of TfR on the surface of cancer cells compensates for the reduced IGFBP-3 in the circulation, thus enabling IGFBP-3 internalisation and the expression of its pro-apoptotic role.

Key words: IGFBP-3, transferrin, iron ion, complexes, transferrin receptor, iron metabolism, colorectal carcinoma

Scientific field: Biochemistry

Special topic: Biochemistry of proteins

UDC number: 577.112

SKRAĆENICE

ADAM - dizintegrin i metalo-proteazni enzim

α 2M - alfa-2-makroglobulin

ALS - podjedinica nestabilna u kiseline

ASA - američka asocijacija anesteziologa

Asn- asparagin

Bad - Bcl-povezani „smrtonosni“ protein

Bax - Bcl-povezani X protein

Bcl - regulatorni protein apoptoze B-ćelijskog limfoma

BMI - „Body Mass Index“

BP - pufer za blokiranje

BSA - albumin goveđeg seruma

CK - kazein kinaza

CNBr - cijanogen bromid

CRC - „colorectal cancer“ - kolorektalni kancer

DAPI - 4',6-diamidino-2-fenilindol

DEAE - dietilaminoetil

DJ - denzitometrijska jedinica

DNAPK - DNK proteinska kinaza

DNK - dezoksiribonukelinska kiselina

DNP - dinitrofenil hidrazin

DSL - „Diagnostics System Laboratory“

EC₅₀ - efektivna koncentracija koja dovodi do inaktivacije 50% ukupnog broja ćelija/molekula

ECL - lektin iz *Erythrina cristagalli*

ECL - pojačana hemiluminiscencija

ECM - vanćelijski matriks

EDTA - dinatrijum-etilendiamin-tetrasirćetna kiselina

EE - EDTA elucija
ELISA - imunoenzimski test
Fuc - fukoza
GAG - glikozamino glikani
GH - hormon rasta
GlcNAc - N-acetil-glukozamin
Hb - hemoglobin
HBD - heparin-vezujući domen
HFE - hefestin
HRP - peroksidaza iz rena
HyR - hibridni receptor
IAC - imunoafinitetna hromatografija
IDA - iminodisirćetna kiselina
IEP - imunoelektroforeza
IGF - faktor rasta sličan insulinu
IGFBP - vezujući protein za faktor rasta sličan insulinu
IGF-R - receptor za faktor rasta sličan insulinu
IgY - imunoglobulini žumanceta
IHC - imunohistohemija
Ileu - izoleucin
IMAC - imobilizovana metal-afinitetna hromatografija
INEP - institut za primenu nuklearne energije
IP - imunoprecipitacija
IR - insulinski receptor
kb - kilobaza
KBC - kliničko-bolnički centar
kDa - kilodalton
Lac - laktoza
LAC - lektin-afinitetna hromatografija

LCA - lektin iz *Lens culinaris*
Leu - leucin
LRP - protein povezan sa lipoproteinom
LTBP - latentni TGF vezujući protein
MAL - lektin iz *Maackia amurensis*
Man - manozna
MBD - metal-vezujući domen
MCF - Michigan Cancer Foundation
MES - 2-(N-morfolino)etansulfonska kiselina
MMP - matriksna metalo-proteinaza
MS - masena spektrometrija
NaA - natrijum acetat
NaF - natrijum fluorid
NF-B - jedarni faktor kapa B
NLS - sekvenca za usmeravanje ka jedru
NP - neutralizacioni pufer
NSILA - nepotisnuta aktivnost slična insulinu
NTA - nitrilotrisirčetna kiselina
PAGE - poliakrilamidna gel elektroforeza
PBS - rastvor fosfatnog pufera
PHA-E - lektin iz *Phaseolus vulgaris*
PHA-L - lektin iz *Phaseolus vulgaris*
PSA - prostata specifični antigen
PZU - pufer za uzorke
RAR - receptor retinolne kiseline
RCA-I - lektin iz *Ricinus communis*
RGD - tripeptid Arg-Gly-Asp
RIA - radio-imuno esej
ROS - reaktivne kiseonične vrste

RxR - retinolnii X receptor
SDS - natrijum-dodecil-sulfat
SELDI - surface-enhanced laser desorption ionization
Ser - serin
SF - faktor sulfacije
SNA - lektin iz *Sambucus nigra*
SPA - sinapinska kiselina
s-WGA - lektin iz *Triticum vulgare*
TBST - *Tween* rastvor tris pufera
TCA - trihlorsirćetna kiselina
TEMED - N,N,N',N' – tetrametilen-diamin
Tf - transferin
TfR - transferinski receptor
TGF - transformišući faktor rasta
TIBC - vezujući kapacitet ukupnog gvožđa
TNF - faktor nekroze tumora
TOF - vreme preleta
TRIS - Tris(hidroksimetil)-aminometan
UEA - lektin iz *Ulex europaeus*
WGA - lektin iz *Triticum vulgare*

Sadržaj

1. Uvod	1
2. Pregled literature.....	5
2.1 IGF sistem	6
2.1.1 IGF peptidi.....	6
2.1.2 IGF receptori	8
2.1.3 IGF vezujući proteini.....	9
2.2 IGFBP-3	13
2.2.1 Struktura IGFBP-3.....	13
2.2.2 Post-translacione modifikacije IGFBP-3.....	14
2.2.3 Uloga IGFBP-3.....	16
2.3 Transferin.....	21
2.3.1 Struktura Tf	22
2.3.2 Uloga Tf.....	23
2.4 Povezanost metaboličkih puteva u kojima učestvuju IGFBP-3 i Tf	25
2.4.1 Metabolizam gvožđa i njegove promene.....	26
2.4.2 Tumor i metabolizam gvožđa	28
3. Materijal i metode.....	29
3.1 Osnovne hemikalije	30
3.2 Pufferi i rastvori	34
3.2.1 Afinitetna hromatografija sa imobilizovanim metalnim jonima (IMAC) .	34
3.2.2 Lektinska afinitetna hromatografija (LAC).....	34
3.2.3 Imunoafinitetna hromatografija (IAC) na IgY koloni	34
3.2.4 Preparativna imunoafinitetna hromatografija.....	34
3.2.5 SDS-PAGE i imunoblot	35
3.2.7 SELDI-TOF/MS	35
3.2.8 Solubilizacija ćelijskih membrane.....	35
3.2.9 Lektin blot	35
3.2.10 Derivatizacija proteina sa dinitrofenil hidrazinom (DNP)	36
3.2.11 Imunohistohemija	36
3.3 Smole.....	36

3.4	Antitela	36
3.5	Imunodijagnostički kompleti	37
3.6	Biohemijski reagensi	37
3.7	Uređaji i aparati	38
3.8	Uzorci seruma.....	38
3.8.1	Serumi zdravih osoba	39
3.8.2	Serumi osoba sa povećanom koncentracijom gvožđa	39
3.8.3	Serumi osoba sa smanjenom koncentracijom gvožđa	39
3.8.4	Serumi pacijenata sa dijagnostikovanim kolorektalnim karcinomom.....	39
3.8.5	Serumi profesionalnih sportista.....	40
3.9	Uzorci tkiva	40
3.10	Hromatografske metode	41
3.10.2	Lektinska afinitetna hromatografija (LAC).....	41
3.10.3	Imunoafinitetna hromatografija (IAC) na smoli sa imobilizovanim IgY antitelima	42
3.10.4	Preparativna imunoafinitetna hromatografija za izolovanje IGFBP-3/Tf kompleksa.....	43
3.11	Elektroforetske metode.....	43
3.11.1	Imunoelektroforeza (IEP)	43
3.11.2	SDS poliakrilamidna gel-elektroforeza i Western imunoblot	44
3.11.3	Lektinski blot.....	44
3.12	Testovi vezivanja liganda	45
3.13	Denzitometrijska obrada rezultata	45
3.14	Imunoprecipitacija proteinskih kompleksa.....	45
3.15	Masena spektrometrija SELDI-TOF (Surface-enhanced laser desorption ionization - time of flight)	46
3.16	Ultrafiltracija	47
3.17	Izolovanje ćelijskih membrane i citosola iz tkiva debelog creva	47
3.18	Derivatizacija karbonilnih grupa proteina dinitrofenil hidrazinom (DNP)	48
3.19	Imunohistohemijska (IHC) detekcija proteina	48
3.20	Statistička obrada podataka	49
4.	Cilj istraživanja.....	50
5.	Rezultati i diskusija	53

5.1 Izolovanje IGFBP-3/Tf kompleksa iz seruma zdravih osoba.....	54
5.1.1 Ispitivanje specifičnosti antitela	54
5.1.2 Afinitetna hromatografija sa imobilizovanim metalnim jonima (IMAC) za izolovanje kompleksa IGFBP-3/Tf iz seruma	55
5.1.3 Lektinska afinitetna hromatografija (LAC) za izolovanje IGFBP-3/Tf kompleksa iz seruma	56
5.1.4 Imunoafinitetna hromatografija za izolovanje kompleksa IGFBP-3/Tf iz seruma.....	57
5.1.5 Preparativna imunoafinitetna hromatografija za izolovanje IGFBP-3/Tf kompleksa iz seruma	59
5.1.6 Imunoelektroforeza za izolovanje IGFBP-3/Tf kompleksa iz seruma	60
5.2 Karakterizacija izolovanog IGFBP-3/Tf kompleksa iz seruma zdravih osoba	63
5.2.1 Značaj metalnog jona za stvaranje i interakcije IGFBP-3/Tf kompleksa..	63
5.2.2 Ispitivanje glikana na izolovanim IGFBP-3/Tf kompleksima.....	68
5.2.3 Ispitivanje nekih fizičko-hemijskih karakteristika izolovanog IGFBP-3/Tf kompleksa metodom SELDI-TOF MS.....	69
5.2.4 Ispitivanje prisustva karbonilnih grupa na izolovanim IGFBP-3/Tf kompleksima.....	69
5.3 Određivanje koncentracije IGFBP-3/Tf kompleksa u serumu zdravih odraslih osoba.....	70
5.4 Uticaj intenzivne fizičke aktivnosti na koncentraciju kompleksa IGFBP-3/Tf u serumu zdravih osoba	72
5.5 Ispitivanje fiziološke uloge kompleksa IGFBP-3/Tf.....	74
5.5.1 Ispitivanje interakcije IGFBP-3/Tf kompleksa sa receptorima na zdravom tkivu debelog creva.....	76
5.6 Ispitivanje promene strukture i distribucije IGFBP-3/Tf kompleksa kod osoba u određenim patofiziološkim stanjima	78
5.6.1 Ispitivanje promene koncentracije IGFBP-3/Tf kompleksa u cirkulaciji osoba sa izmenjenim metabolizmom gvožđa	79
5.6.2 Ispitivanje promene strukture IGFBP-3/Tf kompleksa i reaktivnosti IGFBP-3 u cirkulaciji osoba sa tumorom debelog creva	82
5.6.3 Ispitivanje promene strukture i distribucije IGFBP-3/Tf kompleksa u tkivu debelog creva pacijenata sa tumorom.....	86
6. Zaključci	91
7. Literatura	95

1. Uvod

Kontrola procesa rasta, mitoze, razvoja i diferencijacije ćelija, kao i oporavka tkiva, se odvija pod uticajem sistema faktora rasta sličnih insulinu („insulin-like growth factors“, IGF). IGF sistem predstavlja evolutivno staru funkcionalnu celinu koju čine dva peptidna hormona (IGF-I i IGF-II), šest vezujućih proteina (IGFBP-1 do IGFBP-6), receptori (IGF-1R, IGF-2R, insulinski, IR i hibridni receptor, IR/IGF-1R) i specifične proteaze. Uloga IGF molekula ostvaruje se vezivanjem za receptore na površini ćelija, koji zatim pokreću ćelijske signalne procese. Mnoga tkiva sintetišu IGF molekule, a njihov transport, čuvanje i usmeravanje obavljaju IGFBP. U cirkulaciji se nalaze IGF peptidi pretežno poreklom iz jetre, u binarnim i tercijarnim kompleksima sa IGFBP, a u slobodnoj formi je jako mali deo (oko 1%). IGF-I i IGF-II u slobodnoj formi su fiziološki aktivni. Dostupnost receptorima, preko kojih ispoljavaju svoje efekte, regulisana je na tri nivoa: koncentracijom određenog IGFBP, mogućnošću prelaska IGFBP kroz određene fiziološke barijere i afinitetom IGFBP.

Koncentracija IGFBP najviše zavisi od stepena sinteze u specifičnim ćelijama, a u manjoj meri od brzine uklanjanja. Slobodu kretanja IGFBP reguliše oblik u kome se nalaze (binarni ili tercijarni kompleksi) i, u izvesnoj meri, posedovanje domena koji omogućavaju specifične interakcije sa drugim molekulima. Afinitet prema IGF zavisi od primarne strukture IGFBP i post-translacionih modifikacija. Oslobođanje IGF iz kompleksa sa IGFBP događa se kad afinitet IGFBP postane manji od afiniteta receptora za IGF. U fiziološkim uslovima, proteoliza i druge post-translacione modifikacije IGFBP obezbeđuju ove promene.

Glavni vezujući protein IGF sistema i glavni nosilac IGF-I/-II molekula u cirkulaciji je IGFBP-3. Zajedno sa IGF ligandom i podjedinicom nestabilnom u kiselini („acid-labile subunit“, ALS) stvara tercijarne komplekse mase oko 150 kDa. U ovoj vrsti kompleksa se nalazi 70-75 % ukupnih IGF-I/-II, što IGFBP-3 čini glavnim regulatorom dejstva IGF. Tercijarni kompleksi su depoi IGF, pošto ne mogu izaći van krvnih sudova, produžavaju poluzivot liganda, štiteći ih od proteaza, i transporteri su IGF po organizmu. IGFBP-3 može da interaguje sa pojedinim sastojcima vanćelijskog matriksa („extracellular matrix“, ECM), omogućavajući usmeravanje i koncentrovanje faktora rasta na mestima povrede ili remodelovanja tkiva. Pošto je afinitet IGFBP-3 prema IGF oko sto puta veći od afiniteta receptora, njegova sposobnost „hvatanja“ slobodnih IGF sprečava spontano vezivanje IGF za receptore, što je posebno važno u situacijama kada treba ograničiti aktivnost IGF. IGFBP-3 je, prema tome, glavni inhibitor dejstva IGF kod različitih tumora.

Pored funkcija koje su direktno vezane za IGF, IGFBP-3 ispoljava veći broj uloga nezavisnih od IGF. On može direktno podsticati rast, diferencijaciju i preživljavanje ćelija nakon interakcije sa određenim membranskim proteinima. Ipak, osnovna samostalna uloga IGFBP-3, suprotna ulozi IGF, jeste pro-apoptotska. Dvojaka uloga IGFBP-3 se ne može objasniti samo funkcionalnim karakteristikama IGFBP-3 molekula, koje su neposredna posledica njegove strukture; dodatno objašnjenje treba tražiti u karakteristici molekula da, pored sposobnosti vezivanja IGF, stupa u specifične interakcije sa drugim molekulima, kao posredni rezultat strukture ovog molekula, kako u cirkulaciji, tako i u vanćelijskim i unutarćelijskim prostorima. Ove interakcije su odgovorne za različite obrasce ponašanja IGFBP-3, dovode do promene u strukturi i orijentaciji, i mogu predstavljati „raskršća“ koja usmeravaju specifičnu aktivnost IGFBP-3.

Jedan od partnera u stvaranju kompleksa sa IGFBP-3 u cirkulaciji je molekul transferina (Tf). Tf je ključni faktor u regulaciji metabolizma gvožđa, pošto je njegov glavni transportni protein. Koncentracija gvožđa u cirkulaciji i tkivima se menja u skladu sa fiziološkim potrebama (povećana fizička aktivnost, trudnoća), ili u skladu sa patološkim promenama u metabolizmu gvožđa (anemija, hipoksija, bolest jetre, tumor). Transport gvožđa se do ćelije korisnice odvija posredstvom Tf, koji se na samoj ćelijskoj membrani vezuje za Tf receptor (TfR) i internalizuje u ćeliju.

Iako je poznato da IGFBP-3 formira komplekse sa Tf, oni su malo izučavani i njihova uloga nije poznata. Rezultati ove doktorske disertacije ukazali su na faktore koji definišu uslove stvaranja kompleksa IGFBP-3/Tf, izmerena je koncentracija kompleksa u cirkulaciji, ispitan je i standardizovan postupak njihovog izolovanja (iz seruma i tkiva), analizirane su strukturne karakteristike kompleksa i utvrđena je važnost metalnog jona (posebno jona gvožđa) za njihovo formiranje. Dalje je ispitan efekat izmenjene potrebe organizma za gvoždem (kod profesionalnih sportista), kao i efekat izmenjenog metabolizma gvožđa (kod anemija i velike koncentracije gvožđa) na stvaranje kompleksa. Posebno su analizirani kompleksi IGFBP-3/Tf kod pacijenata sa tumorom debelog creva („colorectal carcinoma“, CRC), za koje je karakteristična sistemska anemija i ćelijska akumulacija gvožđa u tumoru.

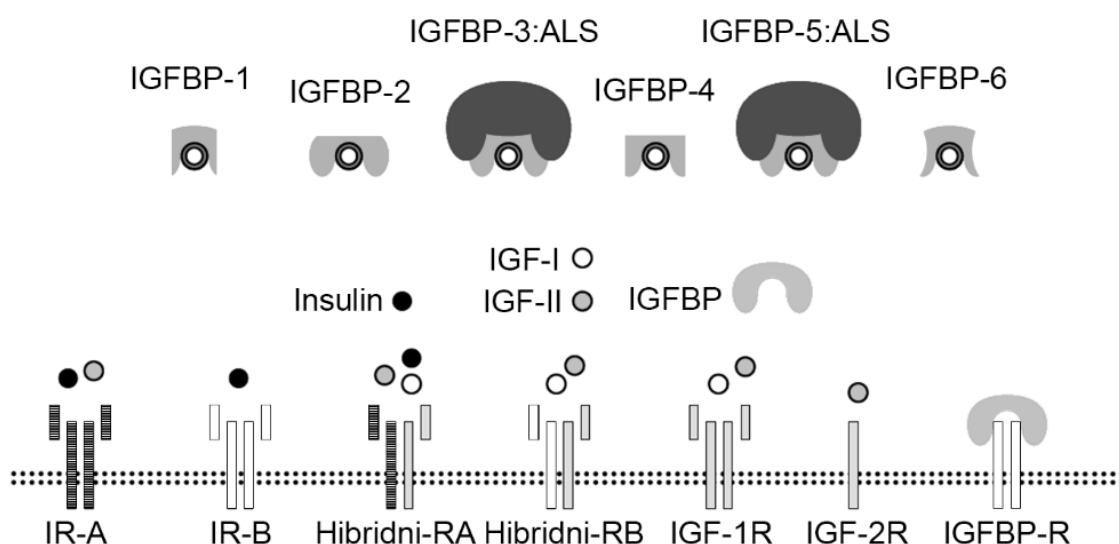
Pored karakterizacije kompleksa formiranih u cirkulaciji, ispitan je njihova lokalizacija u tkivu debelog creva kod pacijenata sa CRC, u cilju izučavanja mogućeg značaja putanje internalizacije IGFBP-3/Tf preko TfR. Pošto je otkriveno više membranskih proteina koji mogu interagovati sa IGFBP-3, cilj je bio da se utvrdi koliki je značaj TfR za unutarćelijski transport IGFBP-3. Rezultati koji su dobijeni doprineli su

boljem razumevanju mesta IGFBP-3/Tf u biohemijskim procesima u organizmu, posebno onim vezanim za metabolizam gvožđa. Za konačnu potvrdu uloge ovog kompleksa, neophodni su dodatni eksperimenti sa različitim tipovima ćelija i/ili tkiva.

2. Pregled literature

2.1 IGF sistem

Sistem faktora rasta sličnih insulinu (IGF) podrazumeva multifunkcionalni sistem u čijem su sastavu dva peptidna hormona (IGF-I i IGF-II), receptori (IGF-1R i IGF-2R), šest vezujućih proteina (IGFBP-1 do IGFBP-6) i proteaze specifične za IGFBP [1, 2]. Zbog strukturne i funkcionalne homologije IGF sa insulinom, IGF sistem je usko povezan sa insulinom, insulinskim receptorima (forme IR-A i IR-B) i hibridnim receptorima (HyR, IR/IGF-1R). Svi navedeni molekuli (**Slika 1**) zajednički regulišu ćelijski rast, diferencijaciju i proliferaciju, proces apoptoze i ćelijsku migraciju. Zbog homologije sa insulinom, IGF molekuli se vezuju za IR i utiču na metaboličke procese i energetski balans u organizmu, ali sa daleko manjom potentnošću. Svoju aktivnost IGF sistem ispoljava od embrionalne faze do kraja života, s tim da svaki životni period karakteriše veća, odnosno manja, aktivnost pojedinih elemenata sistema.

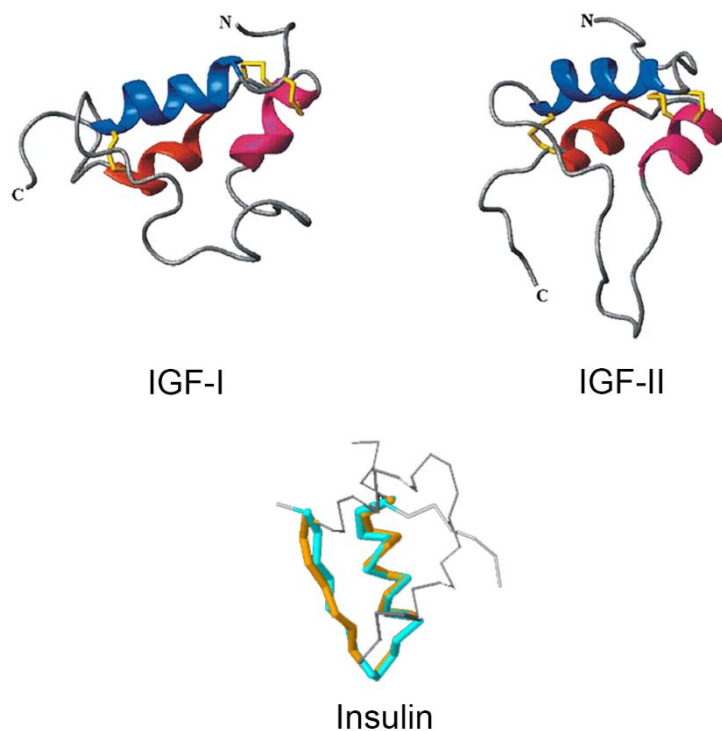


Slika 1. Šematski prikaz elemenata IGF sistema u širem smislu. Slika je prilagođena iz [16].

2.1.1 IGF peptidi

Kada su otkriveni sredinom prošlog veka [3], peptidi su označavani kao faktori sulfatacije („sulphatation factors“, SF) ili faktori slični insulinu čija se aktivnost ne može potisnuti („non-supresible insulin-like activity“, NSILA) [4-6], ali i kao posrednici dejstva hormona rasta („growth hormone“, GH), odnosno somatomedini [7, 8]. Dugo godina nije uočeno da je reč o istim molekulima, kao i da postoje dva tipa, IGF-I i IGF-II. Stepen homologije ova dva peptidna hormona je oko 70% (**Slika 2**), a između njih i

insulina je oko 50% [9]. IGF-I i IGF-II se sastoje od jednolančanih peptida od 70, odnosno 67 aminokiselinskih ostataka [10], molekulskih masa 7649 Da [11], odnosno 7469 Da [12, 13]. Peptidni lanci su organizovani u pet domena: B, C, A, D i E (redom od N kraja). Homologija sa molekulom insulina je u domenima B, C i A, dok se domen E proteolitički odvaja tokom sazrevanja IGF-II.



Slika 2. Struktura molekula IGF-I, IGF-II i insulina. Homologi domeni IGF-I i IGF-II su obojeni plavo, crveno i roze, IGF-I i insulina tirkizno, a IGF-II i insulina narandžasto. (Izvor 3D prikaza molekulskih struktura i strukturnog preklapanja: www.rcsb.org/pdb)

Glavno mesto sinteze ovih faktora je jetra, ali ih sintetisu i mnoga druga tkiva [14, 15]. Sinteza IGF poreklom iz jetre je pod uticajem GH [1, 16] i dejstvo je pretežno endokrino, dok oni nastali u drugim tkivima deluju uglavnom autokrino i parakrino [12].

IGF-I je primarni faktor rasta u post-natalnom i odraslom periodu života, dok je IGF-II glavni faktor rasta tokom unutarmateričnog razvoja embriona [17]. O ulozi IGF-II se malo zna u kasnijem periodu života. Pretpostavlja se da ima značaja u određivanju dugovečnosti organizma, ali ne i na koji način [18]. IGF molekuli su potentni mitogeni i ispoljavaju anaboličko dejstvo stimulišući sintezu DNK [10, 19, 20]. Oni su ujedno i inhibitori/blokatori apoptotskih procesa [21-23]. IGF peptidi podstiču pokretljivost ćelija aktivacijom aktina [13] ili signalnih puteva odgovornih za kretanje [24, 25]. Koliko je

ova karakteristika poželjna kod zdravog rasta ćelija i tkiva, toliko je negativna kod metastatskog širenja tumora. Radi povećanja metastatskog potencijala, neke ćelije tumora same luče IGF, koji autokrino stimuliše pokretljivost i dalje razmnožavanje [26]. Sve navedene funkcije IGF se ostvaruju posredstvom interakcija sa membranskim receptorima.

2.1.2 IGF receptori

Receptori IGF sistema su transmembranski i ima ih četiri: IGF-1R, IGF-2R, IR i HyR [27]. Afinitet receptora za IGF-I, IGF-II i insulin je različit. IGF-1R vezuje IGF-I sa najvećim afinitetom, šest puta manji afinitet ima prema IGF-II, a sto puta manji prema insulinu [16]. IGF-2R gotovo isključivo vezuje IGF-II [28]. IR vezuje insulin sa velikim afinitetom, u zavisnosti od izoforme može vezati i IGF-II sa velikim afinitetom, a IGF-I vezuje daleko slabije [29]. Na kraju, HyR vezuje IGF peptide sa većim afinitetom nego insulin [30].

IGF-1R i IR su homologni receptori i pripadaju porodici proteina tirozin kinazne aktivnosti [31-34]. Sastoje se iz dve α i dve β subjedinice, koje grade heterotetramerni protein [35-37]. IR postoji u dve izoforme: izoforma A (IR-A), koja je pretežno zastupljena u fetalnom i tumorskom tkivu, i izoforma B (IR-B), koja je šire zastupljena [38]. Afinitet IR-A prema IGF-II je vrlo veliki i približan afinitetu prema insulinu [39]. IGF molekuli vezani za IR aktiviraju metaboličke procese kao insulin [40].

Vezivanjem IGF za IGF-1R aktiviraju se procesi sinteze i popravke oštećene DNK [41, 42], ćelijska proliferacija i diferencijacija [43, 44], kao i metabolizam glukoze [45]. Inaktivacijom ovog receptora dolazi do zastoja u rastu [46]. U tkivima koja zahtevaju veći unos energije, veća je koncentracija IR i IGF-1R i veći je udeo HyR [47]. HyR(A) ima afinitet prema IGF-I i IGF-II sličan kao IGF-1R, a efekti aktivacije su sličniji efektu aktivacije IR. Sa druge strane, afinitet HyR(B) je veliki za IGF-I (EC_{50} 1,5 nM), višestruko manji za IGF-II (EC_{50} 10 nM) i skoro zanemarljiv za insulin (EC_{50} > 100 nM) [30].

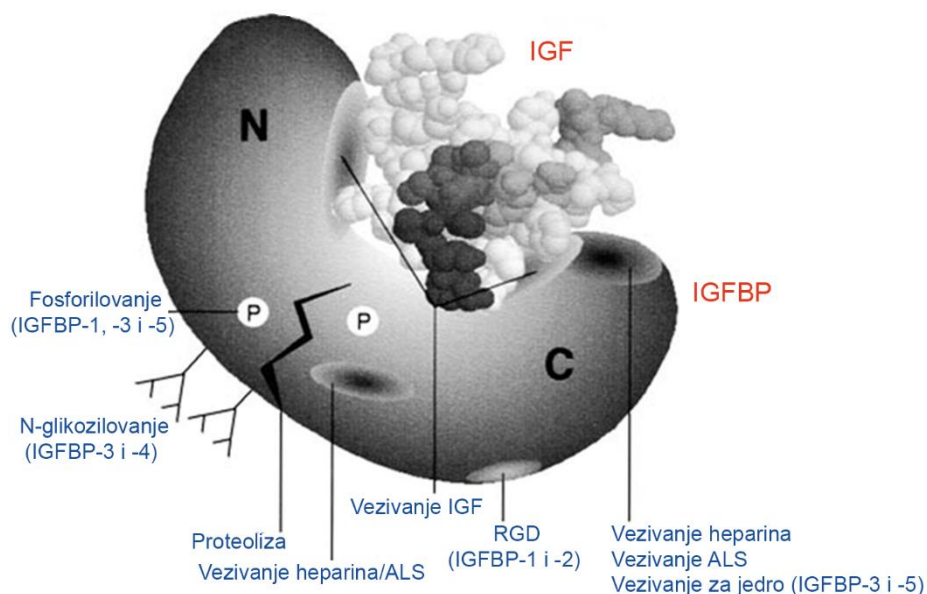
IGF-2R je jednostruki polipeptidni lanac koji gradi transmembranski receptor [48] i ne ispoljava tirozin kinaznu aktivnost. Vanćelijski domen poseduje vezujuća mesta za IGF-II i ligande koji sadrže manozu-6-fosfatne (M6P) ostatke [49-51]. Vezivanje IGF-II i M6P liganda se uglavnom ne odigrava istovremeno, zbog konformacionih promena receptora nakon vezivanja jednog liganda i sternih smetnji. Nakon internalizacije, IGF-

2R usmerava IGF-II i molekule koji poseduju M6P ka lizozomima u cilju degradacije [51, 52]. Osnovna uloga IGF-2R je regulisanje (uklanjanje) koncentracije IGF-II u cirkulaciji, bez dodatne ćelijske signalizacije. Vrlo je važna ravnoteža u ekspresiji IGF-1R i IGF-2R, a posebno na ćelijama tumora [53, 54]. Smanjeno prisustvo IGF-2R omogućava pojačanu stimulaciju IGF-1R i rast tumora [52], što je dalo povoda da se IGF-2R proglasi tumorskim supresorom.

2.1.3 IGF vezujući proteini

Za razliku od insulina, čije se lučenje i sinteza regulišu koncentracijom glukoze u cirkulaciji, sinteza IGF se odvija neprekidno i njihova koncentracija u cirkulaciji je relativno velika (100-400 ng/mL), 100-1000 veća nego insulina (0,5-5 ng/mL) [55]. Sintaza IGF je regulisana fiziološkim potrebama rasta, razvoja ili oporavka, a pod uticajem je drugih hormona, citokina i ishrane [56-58]. Kao što je već rečeno, samo slobodni IGF peptidi su fiziološki aktivni, a stepen slobode kontrolišu IGFBP. Svih šest vezujućih proteina gradi binarne komplekse sa IGF, dok IGFBP-3 i IGFBP-5, u prisustvu ALS, grade i tercijarne komplekse. IGFBP se sastoje od 216-289 aminokiselinskih ostataka, vezuju IGF peptide sa većim afinitetom nego receptori [59-62] i ispoljavaju veliki stepen strukturne homologije, do 60% u pojedinim domenima [14, 63, 64].

U strukturi svakog IGFBP mogu se prepoznati tri domena: N terminalni, C terminalni i centralni („linker“, L) domen (**Slika 3**). U svakom IGFBP postoji signalna sekvenca za izlučivanje čija je dužina, u zavisnosti od IGFBP, 20-39 aminokiselinskih ostataka [61]. Dok su N i C domeni očuvani u svim IGFBP i sadrže većinu cisteinskih ostataka (10-12 u N domenu i 6-8 u C domenu), u centralnom domenu su ključne razlike između IGFBP (samo 15% homologije među molekulima) [65]. Za vezivanje IGF odgovorni su N i C domeni, koji formiraju „džep“ visokog afiniteta [66-72].



Slika 3. Strukturni domeni i karakteristike IGFBP. Preuzeto i prilagođeno iz [61].

Najveća razlika između IGFBP je u L domenu, u kome se događaju post-translacione promene, od kojih su najčešće proteoliza, glikozilovanje i fosforilovanje [2, 73]. Proteoliza IGFBP je opšta pojava, događa se u trenutku kada je potrebno osloboditi IGF i smanjiti afinitet IGFBP prema njemu [14]. Poluživot slobodnih IGF molekula je oko 14 minuta, a u kompleksima sa IGFBP 12-15 časova [74]. Kao što je već navedeno, najveći deo IGF se nalazi u tercijskim kompleksima sa IGFBP-3 i ALS, te se ovi kompleksi smatraju glavnim „čuvarima“ i „depoom“ liganda [75]. Za razliku od tercijskih kompleksa (masa oko 150 kDa), binarni kompleksi IGF/IGFBP (masa oko 30-50 kDa) mogu proći endotelnu barijeru krvnih sudova i transportovati IGF do mesta delovanja, gde ih otpuštaju [76]. Pošto je tema ove doktorske teze IGFBP-3 i njegove interakcije, podaci o karakteristikama i promenama drugih IGFBP biće dati samo u osnovnim crtama (**Tabele 1-3**).

U **Tabeli 1** je navedeno da pojedini IGFBP imaju isti afinitet za oba liganda, dok drugi sa većim afinitetom vezuju IGF-II [59, 77]. IGFBP-1 i IGFBP-2, odnosno IGFBP-3 i IGFBP-5, imaju veću međusobnu sličnost nego drugi IGFBP.

Tabela 1. Pregled osnovnih karakteristika IGFBP molekula. Prilagođeno iz [59].

	Br. AK	Masa molekula (kDa)	Strukturna karakteristika	NLS *	Afinitet prema IGF molekula	Potenciranje /inhibiranje IGF aktivnosti
IGFBP-1	234	25,3	RGD*	-	I = II	-/+
IGFBP-2	289	31,4	RGD, HBD*	-	I < II	-
IGFBP-3	264	28,7	HBD, N-glikozilovanje	+	I = II	-/+
IGFBP-4	237	25,9	2 cisteina više, N-glikozilovanje	-	I = II	-
IGFBP-5	252	28,5	HBD	+	I < II	+
IGFBP-6	216	22,8	HBD, 2 cisteina manje, O-glikozilovanje	-	I < II	-

*RGD: tripeptid Arg-Gly-Asp, odgovoran za vezivanje za integrine, HBD: „heparin-binding domain“, MBD: „metal-binding domain“, NLS: „nuclear-localisation sequence“, +/-: dejstvo zavisi od post-translacione modifikacije

Što se post-translacionih modifikacija tiče, najveći broj različitih promena se sreće kod IGFBP-3, dok su kod ostalih IGFBP prisutne samo pojedine modifikacije. Zbirni pregled ovih modifikacija dat u **Tabeli 2**. Takođe, posledice ovih promena nisu jednake. Svi IGFBP su podložni proteolizi, a neki od fragmenata nastali ovim putem mogu ispoljiti samostalna dejstva mimo signalizacije posredstvom IGF receptora [78-83]. O post-translacionim modifikacijama IGFBP-3 biće više reči kasnije.

Tabela 2. Post-translacione modifikacije IGFBP molekula

Post-translaciona modifikacija	IGFBP
Proteoliza	Svi [78-83]
Fosforilovanje	IGFBP-1, IGFBP-2, IGFBP-3, IGFBP-5 [2, 61, 73]
N-glikozilovanje	IGFBP-3, IGFBP-4 [2, 61, 73]
O-glikozilovanje	IGFBP-5, IGFBP-6 [2, 61, 73]
Glikovanje	IGFBP-3 [159-161]
Metilovanje	IGFBP-3? [162]
Oksidacija	IGFBP-2, IGFBP-3, IGFBP-5 [162, 164]

Transglutaminovanje	IGFBP-1 [368]
Ubikvitinovanje	IGFBP-3 [165]

Sekvence odgovorne za interakcije IGFBP sa drugim molekulima se nalaze uglavnom u C domenu. Fiziološke uloge IGFBP koje ne zavise od prethodnog vezivanja IGF i koje ne obuhvataju aktivaciju IGF receptora, potiču od interakcija C domena sa drugim vezujućim partnerima [61, 84-86]. Na ovaj način pojedini IGFBP mogu direktno podstaći ili inhibirati rast ćelija, kao i stimulisati apoptozu, ćelijsku adheziju ili migraciju [61, 62, 65, 87]. Kao što se vidi iz **Tabele 3**, većina IGFBP ima mali broj vezujućih partnera, osim IGFBP-3. O interakcijama IGFBP-3 će biti više detalja naknadno u tekstu.

Tabela 3. Interakcije IGFBP molekula sa drugim proteinima

Interagujući protein	IGFBP
Heparin	IGFBP-2, IGFBP-3, IGFBP-5, IGFBP-6 [61]
Kolagen	IGFBP-3 [362]
Fibrinogen, fibrin	IGFBP-3 [364]
Fibronektin	IGFBP-3 [365]
Plazminogen	IGFBP-3 [366]
Transferin	IGFBP-3 [120, 200]
Laktoferin	IGFBP-3 [240]
Kaveolin	IGFBP-3 [117-119]
Glikozaminoglikani	IGFBP-3 [111, 162]
Importin β	IGFBP-3, IGFBP-5 [63, 203]
Alfa-2-makroglobulin	IGFBP-1, IGFBP-2 [369]
Inhibitor aktivatora plazminogena 1	IGFBP-5 [370]
Trombospondin	IGFBP-5 [371]
Vitronektin	IGFBP-5 [372]
Humanin	IGFBP-3 [179]
Integrini	IGFBP-1, IGFBP-2 [87]

2.2 IGFBP-3

IGFBP-3 je najzastupljeniji IGFBP u cirkulaciji, sa većim brojem ispitanih i dokazanih funkcija, kako onih vezanih za IGF molekule, tako i samostalnih. Koncentracija IGFBP-3 zavisi od pola, starosti, rase, ishrane, energetskog unosa, unosa alkohola, od telesne mase i fizičke aktivnosti. Koncentracija IGFBP-3 je najveća u periodu rasta (kod dece je 0,9-4,3 mg/L, u pubertetu 2,4-10,0 mg/L), opada u odraslom dobu (3,3-7,8 mg/L) i dalje se smanjuje sa starenjem [88, 89]. Kod žena je koncentracija IGFBP-3 veća nego kod muškaraca, a razlika potiče od uticaja polnih hormona [89, 90, 91]. Ishrana bogata proteinima i sa većim energetskim sadržajem povećava koncentraciju IGFBP-3 [92], dok je unos alkohola smanjuje [88, 90].

IGFBP-3 je učesnik u reakcijama i mehanizmima kontrole koji, kao krajnji rezultat, mogu imati suprotne efekte. Sa jedne strane, IGFBP-3 kao čuvar i kontrolor aktivnosti IGF podstiče ćelijski rast, diferencijaciju i preživljavanje [93], dok, sa druge strane, pokreće signalne puteve ćelijske apoptoze. U cirkulaciji, IGFBP-3 je transportni molekul, a na nivou tkiva ispoljava svoju aktivnost direktno (uglavnom pro-apoptotsku), vezivanjem za ćeliju. Samostalni uticaj IGFBP-3 je ređe indirektan, na način koji reguliše druge faktore koji indukuju apoptozu [94-97]. Do pre dvadesetak godina o IGFBP-3 se govorilo samo kao o nosaču IGF, a zatim se otvorilo novo polje koje je otkrivalo sve više samostalnih uloga IGFBP-3 i sve veći broj interakcija sa drugim proteinima. O ulozi IGFBP-3 kompleksa se relativno malo zna, a još manje o mehanizmima koji regulišu njihovo stvaranje. Prema tome, IGFBP-3 može imati mitogenu i anaboličku funkciju, kao i pro-apoptotsku, a velika je nepoznanica šta je „prekidač“ koji usmerava njegovu aktivnost ka proliferaciji, odnosno ka apoptozi ćelija.

2.2.1 Struktura IGFBP-3

Kod ljudi, neglikozilovana zrela forma IGFBP-3 je protein mase 28,7 kDa i sastoji se od 264 aminokiselinska ostatka [98]. Gen za IGFBP-3 nalazi se na hromozomu 7p i dužine je 8,9 kb. Ovaj gen je eksprimiran u velikom broju tkiva, ali je transkripcija najintenzivnija u Kupferovim i sinusoidnim ćelijama endotela jetre [60, 99-102]. Domeni odgovaraju sledećim aminokiselinskim nizovima: N domen 1-87, L domen 88-183 i C domen 184-264. N i C domeni sadrže 12 i 6 cisteinskih ostataka, koji su ključni za nastanak tercijarne strukture, odnosno za prostorno formiranje domena [103-106].

N i C domeni IGFBP-3 stvaraju „džep“ u koji se smešta IGF [107-110], a pojedinačno nemaju veliki afinitet za IGF. L domen ne sadrži cisteinske ostatke, modifikuje se post-translaciono i, u izvesnoj meri, može učestvovati u interakcijama sa drugim molekulima, kao što je heparin („heparin-binding domain“, HBD, aminokiselinski ostaci 149-153). Afinitet ovog vezujućeg mesta za heparin je znatno manji (oko tri puta) od afiniteta vezujućeg mesta u C domenu [111]. Iako manjeg afiniteta, interakcija L domen/heparin može inhibirati formiranje tercijarnog kompleksa IGF/IGFBP-3/ALS [112, 113], što se pokazalo važnim u ECM ili na površini ćelija kad je potrebno osloboditi IGF [114, 115]. Osim HBD, u C domenu se nalazi i sekvenca za usmeravanje IGFBP-3 ka jedru („nuclear-localisation sequence“, NLS) [63, 116], domen koji može vezati metalne jone („metal-binding domain“, MBD) [117], kao i sekvence odgovorne za interakcije sa kaveolinom [117-119] i transferinom [120].

2.2.2 Post-translacione modifikacije IGFBP-3

U **Tabeli 2** su navedene do sada otkrivene post-translacione modifikacije IGFBP-3. Neke od njih su ključne za funkcionisanje IGFBP-3, dok su druge od manjeg značaja. O najvažnijim modifikacijama će biti više reči, dok će druge biti samo spomenute.

Nakon sinteze proteinskog lanca IGFBP-3 (28,7 kDa), najveći broj kopija ovog molekula podleže glikozilovanju i napušta ćeliju kao glikoprotein u dve izoforme masa oko 40 i 45 kDa. IGFBP-3 poseduje tri moguća mesta N-glikozilovanja locirana u L domenu: Asn⁸⁹, Asn¹⁰⁹ i Asn¹⁷² [121, 122]. Na svako od ovih mesta se može dodati oko 4-4,5 kDa ugljenohidratnih ostataka. Pod fiziološkim uslovima, dva mesta su uvek glikozilovana, a treće u manjem broju molekula [122]. Kada je potpuno glikozilovana polovina molekula, imunoblotom se IGFBP-3 detektuje kao dublet od 40-45 kDa, sa sličnom zastupljenošću obe izoforme. Ovakva situacija se najčešće sreće kod zdravih odraslih osoba. Glikozilovanje povećava stabilnost IGFBP-3 [114, 123], ali ne utiče na vezivanje IGF ili na njegovo lučenje van ćelije [122, 124, 125]. Prilikom ispitivanja uticaja glikoformi IGFBP-3 na apoptozu, dobijeni su kontradiktorni rezultati. Prema jednoj grupi istraživača, glikozilovane forme su potentnije [126-127], dok prema drugima između glikoformi nema razlike [128]. U eksperimentima sa ćelijama tumora dojke, pokazano je da manje glikozilovana forma IGFBP-3 podstiče autofagiju i preživljavanje ćelija tumora [129].

Molekul IGFBP-3 poseduje veliki broj serinskih i tirozinskih ostataka, koji su moguća mesta fosforilovanja [61]. U fiziološkim uslovima, fosforilovanje se događa samo na Ser¹¹¹ i Ser¹¹³ [98, 130], pod dejstvom dve kinaze. Kazein kinaza 2 (CK-2) se nalazi u jedru i citosolnim ćelijskim odeljcima [131]. Fosforilovanje IGFBP-3 posredstvom CK-2 ne utiče na njegov afinitet za IGF, niti za molekule na ćelijskoj površini, već podstiče sintezu DNK zajedno sa IGF [132, 133]. Prema tome, fosforilovanje IGFBP-3 enzimom CK-2 inhibira njegovu pro-apoptotsku ulogu i stimuliše mitogeni efekat.

Sa druge strane, fosforilovanje IGFBP-3 pod dejstvom proteinske kinaze koja zavisi od DNK (DNAPK) aktivira njegovu pro-apoptotsku ulogu [134]. Na ćelijama tumora prostate je pokazano da, inhibicijom DNAPK, IGFBP-3 gubi sposobnost vezivanja za partnere u jedru, koji su ključni za pokretanje apoptotskih procesa [135].

Proteolizom IGFBP-3 nastaje nekoliko fragmenata, od koji je glavni onaj od oko 30 kDa (ostali su manji i nastaju iz njega). On je redovno prisutan u cirkulaciji zdravih osoba. U pojedinim fiziološkim stanjima, kao što je trudnoća, on može biti dominantna forma IGFBP-3 [136]. Ovaj fragment nije potpuno izgubio sposobnost vezivanja IGF, ali mu je afinitet znatno smanjen i ne može interagovati sa ALS [125]. Proteolizom IGFBP-3 u samom terciarnom kompleksu se smanjuje afinitet za IGF, ali to ne dovodi nužno do oslobađanja IGF [137-139]. U blizini IGF receptora najčešće dolazi do preuzimanja liganda od strane receptora, pošto je njegov afinitet za IGF veći od afiniteta delimično proteolizovanog IGFBP-3, odnosno kompleksa.

Proteoliza IGFBP-3 se odigrava u brojnim kataboličkim stanjima: postoperativno [140, 141], kod teških oboljenja [142, 143], kod dijabetesa tip 1 [144-146] i tip 2 [138] i u najvećem broju stanja koja karakteriše inflamacija, infekcija, neuhranjenost. Proteaze IGFBP-3 se svrstavaju u dva tipa: matriksne metaloproteaze (MMP) i serinske proteaze [147, 148]. Dobro je izučeno dejstvo MMP-7, koja se eksprimira u ćelijama tumora debelog creva, ali ne i u normalnoj stromi. Enzim proteolizuje IGFBP-3, smanjuje mu afinitet za IGF, kome olakšava interakciju sa IGF-1R i time podstiče ćelijsku proliferaciju [149]. Interesantno je da se neki fragmenti IGFBP-3 samostalno vezuju za membranske proteine i time pokreću apoptotske procese [128, 150]. Kod osoba sa velikom telesnom masom uočena je korelacija između povećane količine IGFBP-3 fragmenata u cirkulaciji i povećane insulinske rezistencije [151].

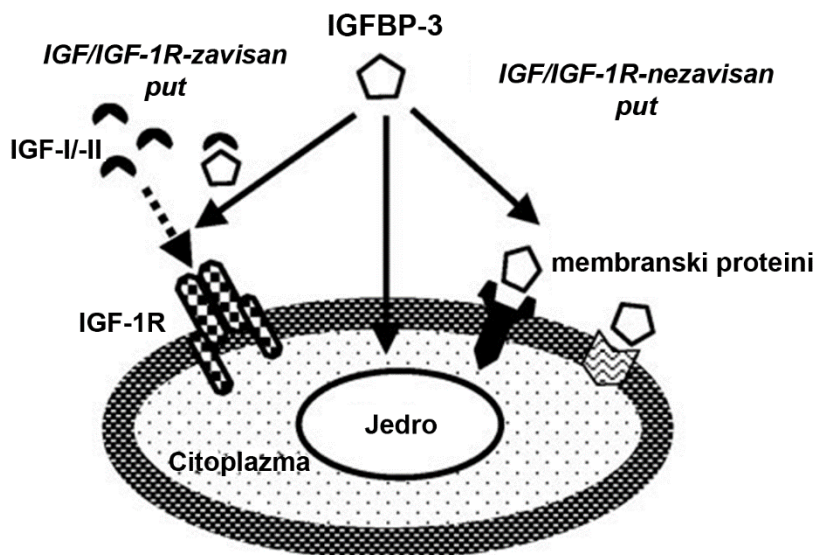
Osim MMP-7, kao IGFBP-3 proteaze su potvrđeni plazmin i trombin [152, 153], katepsini L, D i G [154, 155], kalikrein 2, specifični antigen za prostatu (PSA) [156, 157]

i ADAM 12-S [158]. Poznato je da do proteolize može doći dejstvom i drugih enzima čiji identitet još nije utvrđen (tzv. serumske proteaze).

IGFBP-3 podleže i drugim post-translacionim modifikacijama. Glikovanje ili neenzimsko glikozilovanje IGFBP-3 uočeno je kod pacijenata sa dijabetesom tip 2 [159-161]. Ova promena menja afinitet IGFBP-3 prema ligandima, ali ne u meri koja bi značajno ugrozila funkcionisanje IGF sistema. Metilovanje IGFBP-3 je spomenuto samo u jednom radu, bez tumačenja mogućih fizioloških posledica [162]. Oksidacijom IGFBP-3 nastaju oligomeri povezani disulfidnim vezama [163]. Kod pacijenata sa tumorom debelog creva, uočen je povećan stepen oksidacije IGFBP-3, preko povećanog prisustva karbonilnih grupa [164]. Ubikvitinovanjem se u jedru IGFBP-3 usmerava ka proteazomu u cilju degradacije [165]. Ovom modifikacijom se reguliše poluživot IGFBP-3 u jedru, koji je znatno kraći nego u cirkulaciji. Pretpostavka je da se ovim mehanizmom kontroliše i pro-apoptotska uloga IGFBP-3.

2.2.3 Uloga IGFBP-3

Ulogu IGFBP-3 treba sagledati u dva potpuno nezavisna pravca (**Slika 4**).



Slika 4. Uloga IGFBP-3. Preuzeto i prilagođeno iz [98].

Dugo godina se IGFBP-3 smatrao isključivo regulatorom dejstva IGF [166-169]. Pošto je njegova koncentracija u cirkulaciji 10-100 puta veća od koncentracije ostalih IGFBP [59], zauzima mesto „glavnog“ IGFBP [61]. Već je rečeno da je uloga IGFBP-3

pretežno inhibitorna u pogledu aktivnosti IGF peptida, jer ih vezuje afinitetom većim od afiniteta receptora [162]. Sa druge strane, post-translacione modifikacije slabe vezu IGFBP-3 i IGF, dok interakcije sa drugim molekulima (npr. iz ECM) usmeravaju njihovo kretanje i nakupljanje na mestima povećane potrebe za rastom i popravkom tkiva, što sve zajedno dovodi do „predaje“ IGF receptorima [123, 170, 171]. U slučaju vezivanja kompleksa IGFBP-3/IGF za površinu ćelije, on ne dostavlja IGF direktno IGF receptorima [172], već se smanjuje afiniteta za IGF i olakšava prelaz na receptore [130]. Stav da su sve funkcije IGFBP-3 usmerene isključivo ka kontroli aktivnosti IGF, promenjen je zahvaljujući istraživanjima Valentinisa i saradnika pre dve decenije [173]. Oni su pokazali da povećana ekspresija IGFBP-3 inhibira rast fibroblasta sa poremećajem u sintezi IGF-1R, nezavisno od dejstva IGF. Od tog trenutka, istraživačko polje na temu IGFBP-3 se znatno proširilo i usmerilo ka ulogama nezavisnim od IGF/IGF-R. Pošto se tema ove doktorske teze odnosi na jednu od tih uloga, u narednom poglavlju će one biti detaljnije opisane.

2.2.4 Interakcije i dejstva IGFBP-3 nezavisna od IGF sistema

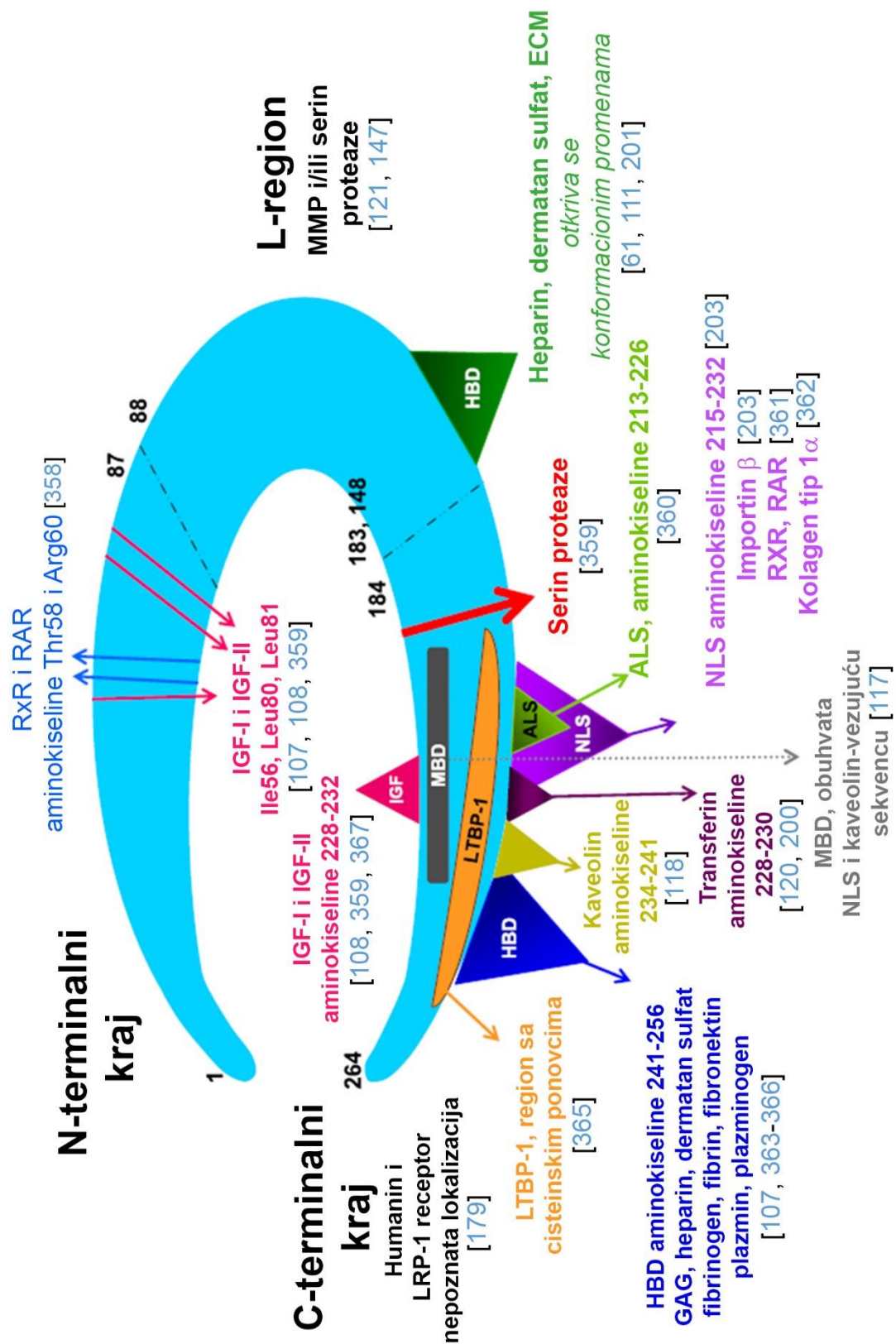
Vrlo intenzivno se istražuju interakcije i uloge IGFBP-3 nezavisne od ostalih članova IGF sistema [61, 98, 162, 174]. Na **Slici 5** prikazani su interagujući segmenti i ključne aminokiseline u strukturi IGFBP-3, a u **Tabeli 3** su nabrojani proteini koji grade komplekse sa IGFBP-3.

Pokazalo se da IGFBP-3, nezavisno od IGF sistema, a nakon vezivanja za druge molekule, može podstaći ćelijsku proliferaciju i preživljavanje u izmenjenom (nepovoljnom) okruženju [107]. Takođe, u kombinaciji sa drugim molekulima i kao odgovor na spoljašnje ili unutrašnje signale stresa, može pokrenuti pro-apoptotske procese i inhibirati ćelijski rast [107]. Pored ovih, otkrivene su i druge interakcije čiji je fiziološki značaj još uvek nepoznat: sa proteinima plazme i ćelijskih membrana, sa unutarćelijskim transporterima i receptorima u jedru (**Tabela 3**). Iz svega navedenog se može zaključiti da je IGFBP-3, u fiziološkom smislu, jedan od najvažnijih molekula raskršća na kome se ukrštaju putevi rasta i preživljavanja sa jedne strane i ćelijske smrti sa druge. Od daljih istraživanja se očekuje da otkriju koji su faktori presudni za održavanje ravnoteže ili usmeravanje ka jednom od ova dva pravca.

Smatra se da je osnovna samostalna uloga IGFBP-3, ipak, pro-apoptotska [95, 98, 162, 165, 175]. Vezivanjem za površinu ćelija, IGFBP-3 najčešće inhibira dalji rast [176,

177]. Na velikom broju ćelijskih linija je pokazano da transfekcija IGFBP-3 pokreće apoptozu, ispoljavajući autokrini/parakrini efekat [178-181]. Jedan od načina ispoljavanja ovog efekta jeste povećana ekspresija pro-apoptotskih proteina (Bax i Bad) u odnosu na anti-apoptotske proteine (Bcl-X i Bcl-2) [182]. Drugi način dejstva IGFBP-3 je uočen kod ćelija tumora dojke, gde aktivira kaspazu 3, takođe pokretača apoptoze [183]. Pošto se apoptotski procesi mogu pokrenuti unutrašnjim (mitohodrijalnim) ili spoljašnjim (receptorskim) putem [184, 185], istraživalo se kojim putem deluje IGFBP-3. Otkrićem specifičnog IGFBP-3 receptora [175, 186] i daljeg puta aktivacije kaspaza 7 i 8, pretpostavilo se da je put dejstva IGFBP-3 u stimulaciji apoptoze spoljašnji. Međutim, postoje izvesne kontradiktornosti u rezultatima, a u drugim eksperimentima su konstatovani i unutrašnji putevi aktivacije. Za sada nema jasnog tumačenja mehanizma dejstva IGFBP-3. Treći put pro-apoptotskog dejstva IGFBP-3 jeste inhibicija NF- κ B transkripcionog faktora [187, 188]. Ovaj faktor podstiče anti-apoptotsku zaštitu i ćelijsku proliferaciju, a povećano je eksprimiran kod određenih vrsta tumora [189, 190]. Na ćelijama tumora debelog creva je konstatovano da IGFBP-3 inhibira aktivnost NF- κ B posredstvom TNF receptora [187, 191].

Iako je pro-apoptotska uloga IGFBP-3 označena kao u osnovi nezavisna od IGF, pojedina istraživanja su ukazala na njegovo suprotno dejstvo. U eksperimentima sa glatkomišićnim ćelijama i ćelijama tumora debelog creva, pokazano je da se stimulacijom TGF β može povećati ekspresija IGFBP-3, što dalje dovodi do rasta ćelija [192, 193]. Takaoka i saradnici su, na ćelijama tumora jednjaka, otkrili da IGFBP-3 samostalno pokreće sintezu iRNK i podstiče rast ćelija [194], dok su Martin i saradnici uočili isti efekat radeći sa MCF-10A epitelnim ćelijama i ćelijama tumora dojke [174]. Dodatno je pokazano da IGFBP-3 ima i pro-angiogeni efekat na prekursore endotelnih ćelija, stimulišući njihovu migraciju i diferencijaciju u endotelne ćelije, kao i rast i oporavak tkiva posle ishemične povrede [195, 196]. Mehanizam dejstva IGFBP-3 kao faktora proliferacije nije poznat, kao i uticaji koji ga opredeljuju za tu ulogu, ali se pretpostavlja da su uključene komponente ECM i stanje stresa.



Slika 5. Interagujući domeni IGFBP-3. Preuzeto i prilagođeno iz [162].

Većina dosadašnjih saznanja o IGFBP-3 aktivnosti upućuje na postojanje interagujućih partnera na samoj ćelijskoj površini. Postojanje signalne sekvence na IGFBP-3 podupire stav da se najveći deo, ako ne i celokupna količina sintetisanih molekula, izlučuje van ćelije, a potom internalizuje da bi ispoljila neko od svojih dejstava [120]. Osim specifičnog receptora za IGFBP-3 (IGFBP-3-R) [175, 186], otkriveni su i drugi molekuli na ćelijama koji vezuju IGFBP-3 (**Slika 5**) [61, 98, 162]. Osim IGFBP-3 oni prepoznaju i druge ligande. U toj grupi se nalazi receptor za protein srodan lipoproteinima, koji je ujedno i receptor za alfa-2-makroglobulin („lipoprotein-related protein“, LRP-1/ α 2M), zatim receptor za TGF β V [197, 198], kaveolin [118, 119, 199], TfR [120, 200], površinski glukozaminoglikani (GAG) [111, 162], kao i za sada neidentifikovan receptor na ćelijskim linijama tumora dojke MCF-7 i Hs578T [201].

Otkriće sekvence koja omogućava prolaz IGFBP-3 u samo jedro (NLS) [202], označilo je otvaranje još jednog pravca u istraživanju IGF nezavisne uloge IGFBP-3, da bi ubrzo njegovo prisustvo u jedru bilo potvrđeno [63, 116]. Schedlisch i saradnici [63, 203] su identifikovali importin- β i heterodimer importin α - β kao partnere koji, nakon internalizacije IGFBP-3, obezbeđuju njegovu translokaciju do jedra. Taj mehanizam je potvrđen i u drugim eksperimentima [127]. Kao vezujući partneri u jedru su označeni: retinoidni X receptor (RXR) [204], receptor retinolne kiseline (RAR) [205] i transkripcioni faktor Nur77 [206]. Pokazano je da interakcija IGFBP-3 sa RXR pokreće proces apoptoze [165, 207]. Iako je u izvesnoj meri poznat mehanizam dejstva IGFBP-3 na nivou jedra, ostalo je nepoznato šta ga kontroliše u fiziološkim i patofiziološkim uslovima.

Ispoljavanje bilo koje od navedenih uloga, pored sistemskih i lokalnih okolnosti i potreba, zavisi i od koncentracije IGFBP-3. Na njegovu sintezu utiču hormoni, citokini, farmaceutici, genetički i faktori okoline. Osnovni regulator sinteze IGFBP-3 je GH, koji je podstiče [208, 209]. Koncentracija IGFBP-3 je manja kod osoba sa smanjenim lučenjem GH [210, 211] i povećana kod osoba sa akromegalijom ili preteranim lučenjem GH [212]. Stvaranje IGFBP-3 podstiču insulin [208], pro-apoptotski molekuli TGF β [213-215], retinolna kiselina [215-217], TNF α [216-218] i vitamin D [219-221], kao i farmaceutici u kategoriji anti-estrogena i anti-androgena [219, 222, 223]. Još jedan pozitivan regulator sinteze IGFBP-3 je tumor supresorski gen p53 [224, 225], koji se aktivira kod ćelija koje su pretrpele oštećenja, sa ciljem zaustavljanja daljeg razvoja tumorskih ćelija.

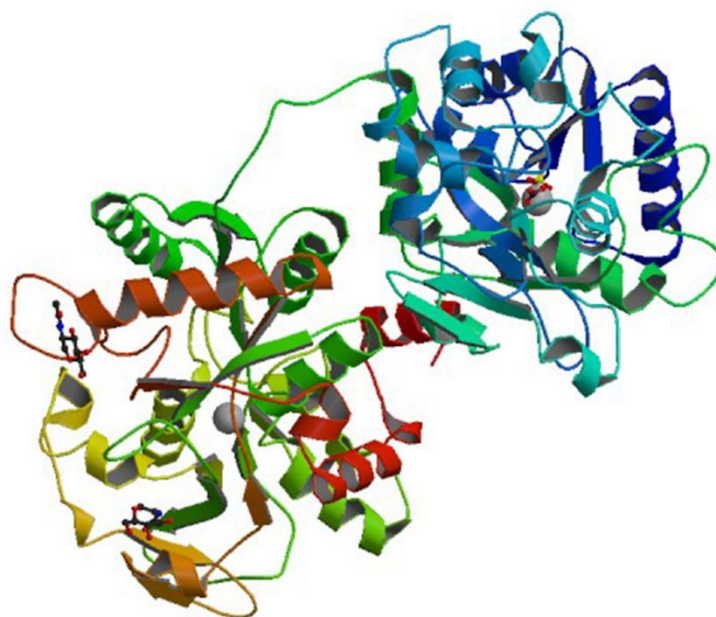
Na smanjenje koncentracije IGFBP-3 se može uticati na više nivoa: transkripcionom, translacionom i post-translacionom. Na prvom nivou se utiče metilovanjem i histonskom modifikacijom DNK [226]. Ovo se događa u različitim patofiziološkim stanjima (uključujući tumorska) u cilju utišavanja gena važnih za odbranu organizma, kao što je p53 [227-230], pa i IGFBP-3. Utišavanje gena za IGFBP-3 konstatovano je kod tumora želuca, debelog creva, dojke, jajnika, bubrega i hepatocelularnog karcinoma [231-234]. Nedavno istraživanje je pokazalo da se mesto metilovanja DNK nalazi u neposrednoj blizini sekvence čiju transkripciju reguliše insulin [235], čime su povezani metilovanje DNK, sinteza IGFBP-3 i uticaj insulina. Postoje i drugi negativni transkripcioni regulatori [236, 237], a na post-translacionom nivou smanjenje koncentracije IGFBP-3 se događa uglavnom kao posledica poptune proteolize.

2.3 Transferin

Osnovna uloga Tf je transport jona gvožđa (u obliku Fe^{3+}), od koga zavisi ćelijsko preživljavanje, transport kiseonika i procesi zasnovani na prenosu elektrona [238]. U organizmu se nalazi 3-4 g gvožđa, a oko 0,1% je u cirkulaciji [239]. Tf pripada transferinskoj porodici proteina zaduženih za transport gvožđa u koju se, osim njega, ubrajaju laktoferin, ovotransferin, melanotrasferin i drugi analozi [240]. Sintaza Tf se primarno odvija u hepatocitima [241], ali ga ekspimiraju i Sertolijeve [242, 243] i ćelije epididimusa [244], oligodendrogialne [245] i ćelije nekih tumora [246, 247]. Osim u plazmi, Tf je prisutan u žuči, cerebrospinalnoj i amnionskoj tečnosti, mleku i limfi [248]. Koncentracija Tf u plazmi je relativno konstantna tokom života (3-4 g/L) [249].

2.3.1 Struktura Tf

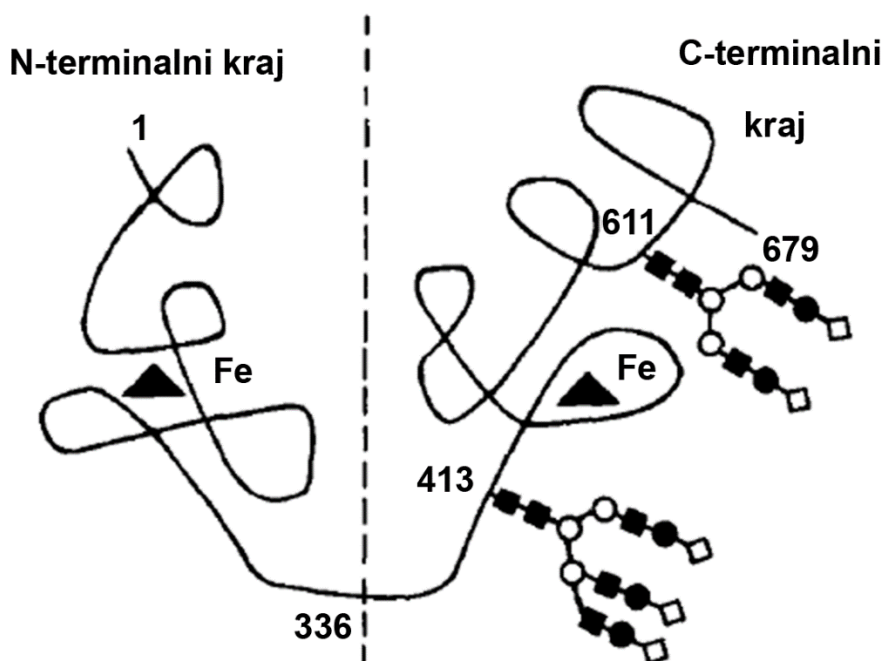
Tf je glikoprotein mase 70-80 kDa, u zavisnosti od stepena glikozilovanja [250, 251]. On je treći najzastupljeniji protein u cirkulaciji, posle albumina i imunoglobulina, a njegova fiziološka koncentracija je 2-4 g/L [252]. Tf čini jedan proteinski lanac od 679 aminokiselinskih ostataka podeljen na dva domena slične veličine: aminokiseline 1-336 čine N domen, a 337-679 C domen. U svakom od ovih domena može se vezati po jedan jon gvožđa [253] (**Slika 6**).



Slika 6. Struktura transferina sa mestima vezivanja jona gvožđa. Izvor 3D strukture molekula: www.rcsb.org/pdb.

Mehanizam vezivanja i otpuštanja jona gvožđa je složen i uključuje seriju reakcija protonovanja, prisustvo pomoćnih jona, helatora, interakciju između domena Tf i strukturnu promenu molekula [254]. U molekulu Tf postoje četiri mogućavezujuća mesta za jone gvožđa, ali zbog konformacionih ograničenja, moguće je istovremeno vezivanje najviše dva jona. Prema tome, u cirkulaciji postoji Tf zasićen sa dva jona gvožđa, poluzasićen sa jednim jonom u C ili N domenu i nezasićen (apo-Tf) [255]. Kod zdravih ljudi, u proseku jedna trećina Tf molekula nosi po jedan jon gvožđa [256]. Takođe, kod zdravih ljudi udeo drugih proteina nosača gvožđa u plazmi je zanemarljiv, te se koncentracija Tf može smatrati pokazateljem ukupnog kapaciteta vezivanja gvožđa („total iron-binding capacity“, TIBC).

Tf je N-glikozilovan, isključivo u C domenu, na aminokiselinskim ostacima Asn⁴¹³ i Asn⁶¹¹ [257-259]. Na **Slici 7** su prikazana mesta vezivanja glikana i jona gvožđa.



Slika 7. Mesta vezivanja glikana i jona gvožđa u molekulu Tf. (Preuzeto i prilagođeno iz [257].)

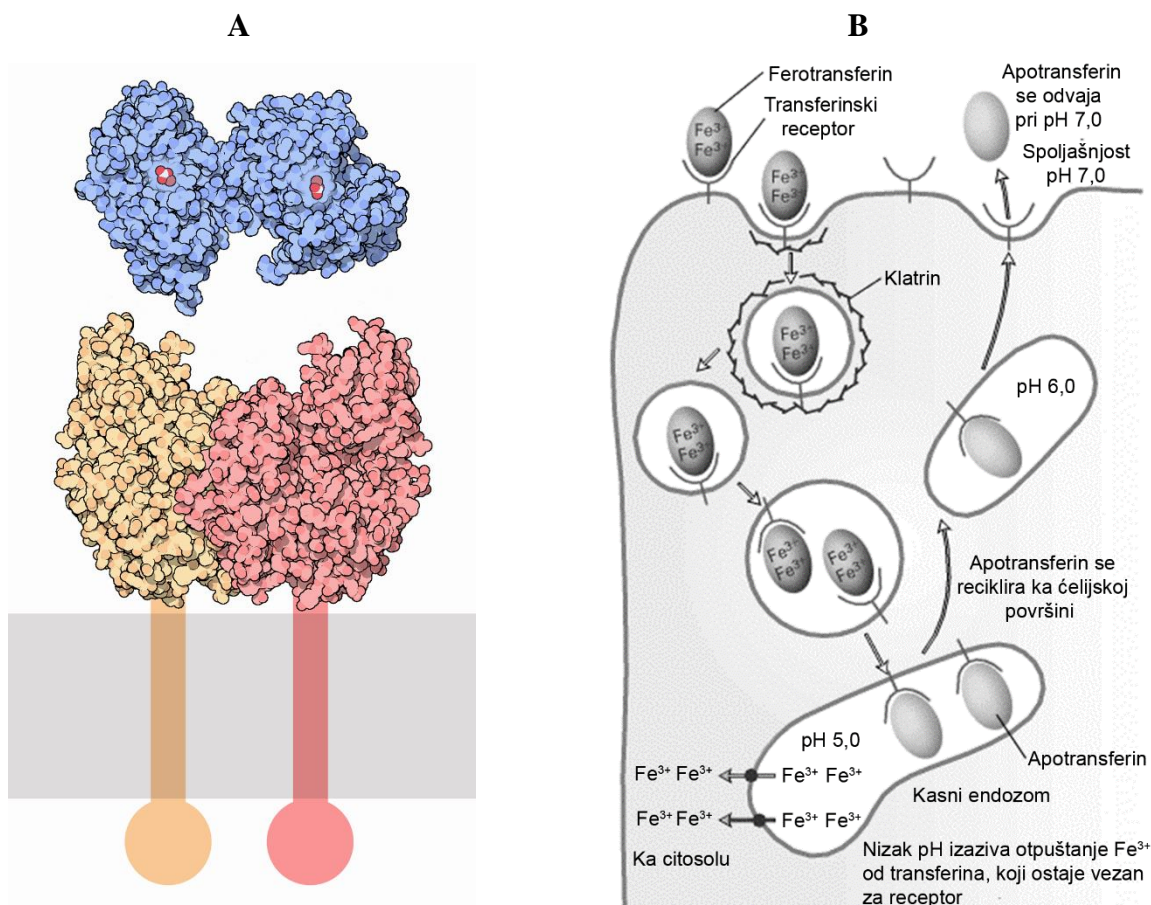
2.3.2 Uloga Tf

Tf transportuje jone gvožđa do mesta njihovog korišćenja. Slobodni jon gvožđa je izuzetno toksičan s obzirom da podstiče stvaranje slobodnih radikala i reaktivnih kiseoničnih vrsta („reactive oxygen species“, ROS) u Fentonovoj reakciji [260, 261]. Kroz stvaranje i transformaciju većeg broja ROS (hidroperoksidi, peroksil i alkoksil radikali), slobodno gvožđe posredno izaziva oksidaciju proteina, lipida i DNK [262]. Iz ovih razloga je važno jone gvožđa prenositi kroz cirkulaciju u redoks neaktivnoj formi. Tf, prema tome, nema samo transportnu, već i zaštitnu ulogu, sprečavajući štetno dejstvo gvožđa. Tf predaje gvožđe ćelijama u cilju podsticanja rasta, a to čini nakon vezivanja za TfR na njihovim površinama. Tf može vezati i druge metalne jone u organizmu, što se pokazalo vrlo važnim za fiziološki transport tih jona, ali i za saniranje posledica trovanja metalnim mikroelementima [263-266].

Višak slobodnog gvožđa podstiče rast patogenih mikroorganizama i razvoj bakterijske infekcije, pa se molekulu Tf pripisuje i anti-mikrobna uloga [250, 267]. Patološka stanja koja karakteriše povećana koncentracija (slobodnog) gvožđa (hemohromatoza, otkazivanje rada jetre, kardiovaskularna oboljenja ili hematološki maligniteti) su često praćena bakterijskim infekcijama [250, 267]. Bilo je pokušaja da se davanjem apo-Tf pacijentima podstakne vezivanje slobodnih jona gvožđa i time utiče na suzbijanje infekcije [250, 267-269]. Značaj Tf u transportu i dostavi gvožđa ćelijama u fazi rasta je dokazan na velikom broju različitih linija [270-275].

2.3.3 Interakcija Tf sa TfR

TfR je dimerni transmembranski glikoprotein, eksprimiran na gotovo svim ćelijama [276-280]. Tf se vezuje za TfR na površini ćelija u fazi aktivne deobe [281]. Kompleks Tf/TfR se internalizuje i transportuje do endozoma, gde se, uz aktivno učešće protonske pumpe, snižava pH na 5,5 i oslobađa gvožđe iz kompleksa [282]. Pod kiselim uslovima, konformacija TfR je takva da Tf molekul ostaje vezan za njega, a kompleks se vraća do ćelijske membrane, gde se Tf izbacuje i vraća u cirkulaciju. Ciklus se ponavlja kada Tf veže nove jone gvožđa (Slika 8).



Slika 8. Interakcija Tf i TfR (A), internalizacija kompleksa Tf/TfR i recirkulacija Tf (B). Izvor 3D strukture: www.rcsb.org/pdb; slika preuzeta i prilagođena iz [431].

Postoje dva tipa receptora, TfR1 i TfR2 [279, 280]. TfR1 je eksprimiran skoro na svim ćelijama, a TfR2 je pretežno prisutan na ćelijama jetre [280]. Stepenn ekspresije TfR zavisi od tipa ćelije. Ćelije koje se sporo dele imaju izuzetno malu ekspresiju TfR, dok kod ćelija koje se brzo dele (kakve su i tumorske) njihov broj može dostići i 100000 kopija po ćeliji [247].

Zahvaljujući specifičnosti i dinamici interakcije Tf-TfR, ovaj mehanizam je privukao pažnju mnogih istraživača, koji su ispitivali mogućnost korišćenja interakcije za ciljanu dostavu terapijskih metalnih jona, lekova, proteina i gena [277]. Kao što je ranije rečeno, u normalnim fiziološkim uslovima samo trećina Tf molekula u cirkulaciji je „zasićena“ jonima gvožđa, dok se za ostatak Tf mogu vezati drugi metalni joni (čak tridesetak različitih) [263]. Koristeći ovu karakteristiku, ciljano je vezivan i dostavljan izotop jon galijuma ($^{67}\text{Ga}^{3+}$) ćelijama, što se pokazalo korisnim u terapiji tumora kod kojih je povećana ekspresija TfR [263, 283]. Vezivanjem toksina difterije za Tf stvoren je kompleks koji je korišćen u terapiji malignog tumora mozga, kod pacijenata koji su bili otporni na konvencionalne metode lečenja [284]. Kompleksi Tf sa lekovima paklitaksel, doksorubicin ili hlorambucil su, takođe, primenjivani u terapiji [285-287]. U slučaju većih molekula, terapijskih peptida ili gena, kompleks se formirao ugradnjom terapeutika u sam molekul Tf ili pravljenjem vektorskih nosača gena [288, 289].

2.4 Povezanost metaboličkih puteva u kojima učestvuju IGFBP-3 i Tf

Zajedničko za IGF sistem i Tf je da podstiču rast i anabolizam. IGFBP-3 učestvuje u tim procesima, kada obavlja ulogu IGF nosača. Kada obavlja samostalnu funkciju, IGFBP-3 se može naći u ulozi stimulatora ćelijskog rasta, ali i u ulozi pro-apoptotskog faktora. Sa druge strane, iako se Tf uglavnom sagledava kao „pozitivan“ molekul koji transportuje jone gvožđa i štiti organizam od neželjenih oksidativnih reakcija, kod određenog broja tumora je zapaženo nagomilavanje gvožđa u ćelijama [290]. Otkriće kompleksa IGFBP-3/Tf [200] otvorilo je nova pitanja [61, 162], te je njegovo detaljnije izučavanje u toku.

Prilikom izrade ove doktorske disertacije, postavljeno je nekoliko pitanja, na koja su odgovori traženi kroz izvedene eksperimente:

- (a) u kojim procesima bi kompleks IGFBP-3/Tf mogao učestvovati?,
- (b) na koji način bi on mogao doprineti metabolizmu, a da to već ne čine IGFBP-3 i Tf pojedinačno?,
- (c) da li je neka specifičnost u metabolizmu gvožđa razlog za ovo udruživanje?,
- (d) ima li razlike u zastupljenosti i karakteristikama kompleksa u stanjima izmenjenog metabolizma gvožđa? i
- (e) gde je mesto TfR u odnosu na druge vezujuće strukture za IGFBP-3 na površini ćelija?

2.4.1 Metabolizam gvožđa i njegove promene

Gvožđe se u organizam unosi putem hrane (uglavnom u obliku Fe^{3+}), a dnevna potreba je oko 1-2 mg [291]. U dvanaestopalačnom crevu se apsorbuje posredstvom transportera dvovalentnih metalnih jona, koji su prisutni na enterocitima (uz prethodnu enzimsku redukciju Fe^{3+} do Fe^{2+} u lumenu creva) [292, 293]. Nakon apsorpcije, na bazolateralnoj membrani gvožđe se ponovo oksiduje (dejstvom hefestina, HFE) i vezuje za Tf [294, 295]. U poglavlju 2.3.3. je opisano na koji način se transportuju joni gvožđa i kako dospevaju u ćelije (**Slika 8**). Oni se dalje ugrađuju u proteinske komplekse, u skladu sa vrstom ćelije, njenom potrebom i ulogom. Najveći deo jona gvožđa u organizmu ulazi u sastav enzima i hemoglobina [296, 297]. Višak gvožđa preuzima feritin u jetri, koji može vezati do 4500 jona [298]. Iz ovog depoa se gvožđe preuzima (i ponovo vezuje za Tf) u slučaju smanjene apsorpcije, povećane potrebe ili neočekivanog gubitka.

Povećana potreba za gvoždem, u fiziološkim uslovima, sreće se kod profesionalnih sportista. Kod ove populacije se menjaju koncentracije i lučenja mnogih hormona i citokina, uključujući GH, insulin, IGF peptide i njihove vezujuće proteine, u cilju intenziviranja anaboličkih procesa [299]. Veliki broj studija je urađen na sportistima, međutim, dobijeni su kontradiktorni rezultati po pitanju promena koncentracije pojedinih elemenata IGF sistema [300-304]. Opšti zaključak bi bio da vrsta treninga (pretežno aeroban ili aneroban), vrsta opterećenja (vežbe snage ili izdržljivosti), dužina profesionalnog bavljenja sportom, sama sportska disciplina (tok izvođenja, dinamika igre...), kao i telesna masa utiču na krajnji ishod promena i prilagođavanja IGF sistema. Ovaj zaključak važi i za promene samog IGFBP-3 [91, 305, 306]. Kod sportista je, do sada, ispitivana isključivo uloga IGFBP-3 u okviru aktivnosti IGF sistema, ne i njegova samostalna funkcija.

Povećana potreba za gvoždem kod sportista nastaje, pre svega, zbog povećane potrebe za kiseonikom, a bolje snabdevanje kiseonikom povećava aerobnu izdržljivost [307, 308]. Kod njih je izmerena veća koncentracija hemoglobina (Hb), usled dodatno stimulisane eritropoeze [309]. Kod ekstremnih fizičkih napora, može se sresti nedostatak Hb, ukoliko unos i metabolizam gvožđa ne mogu pratiti potrebe organizma [310]. Radi sticanja celokupne slike o metabolizmu gvožđa, potrebno je pratiti koncentracije Hb, Tf, feritina, gvožđa, TIBC, eventualno rastvorne forme TfR u cirkulaciji [311-314] i određivati hematološke parametre, kao što su broj eritrocita i sadržaj Hb po eritrocitu.

Patološko povećanje koncentracije gvožđa u cirkulaciji (hemohromatoza) može nastati kao posledica poremećaja u bilo kom delu metaboličkog puta, a poremećaji mogu biti nasledni i stečeni [315]. Nasledna hemohromatoza podrazumeva izmenu gena za neki od faktora uključenih u apsorpciju ili transport gvožđa, a najčešći oblik je posledica mutacije na genu za protein HFE [316-319]. Povećana koncentracija gvožđa usled prekomerne apsorpcije se prvo reguliše dodatnim vezivanjem gvožđa za feritin, a u nemogućnosti da se ukloni, gvožđe se taloži u nekim organima gde izaziva oksidativna i druga oštećenja. Stečena ili sekundarna hemohromatoza se može javiti kod učestalih transfuzija i kao posledica hroničnog oboljenja jetre (ciroza, alkoholno oboljenje, hronični hepatitis, steatoza) [320]. Oboljenje jetre, a posebno cirozu, prati i smanjena sinteza Tf, što može dodatno doprineti povećanju slobodnog gvožđa [321]. Povećana koncentracija gvožđa u cirkulaciji, bez patoloških posledica, primećena je kod osoba koje unose previše vitamina C, pošto on podstiče njegovu apsorpciju [322].

Anemija, usled nedostatka gvožđa, pogađa najviše decu, stare osobe i mlađu žensku populaciju [323]. Nedostatak gvožđa se odražava na koncentraciju Hb, a smanjenje Hb je, zapravo, najpouzdaniji dokaz anemije. Mnogi faktori mogu narušiti homeostazu gvožđa izazivajući anemiju [324-326]: (a) loša ishrana (osim gvožđa, nedovoljni unos vitamina B12 i C), (b) problemi u apsorpciji gvožđa (na nivou transportera i usled intestinalne infekcije u kojoj mikroorganizmi koriste vitamin B12 ili oštećuju crevnu mukozu), (c) oboljenje jetre (nedostatak Tf, višak feritina), (d) unutrašnje ili nekontrolisano menstrualno krvarenje i neki drugi faktori. Na genetski izazvane anemije, koncentracija gvožđa uglavnom ne utiče. Česti su slučajevi anemije sa povećanom koncentracijom gvožđa u cirkulaciji pošto organizam, u nemogućnosti da zadovolji potrebu za kiseonikom (nemogućnost sinteze Hb ili Tf, mutirani Hb), nekontrolisano šalje signal za povećanu apsorpciju gvožđa [327-331].

2.4.2 Tumor i metabolizam gvožđa

Kao što je na početku poglavlja rečeno, IGF sistem i Tf su važni ne samo za rast zdravih, već i tumorskih ćelija [332]. IGF-I i IGF-II su izuzetno potentni mitogeni tumorskih ćelija [333], a dokazana je pozitivna korelacija između koncentracije IGF-I u cirkulaciji i rasta različitih vrsta tumora [334-344]. Studije o povezanosti IGFBP i njihove IGF nezavisne uloge u rastu ili inhibiciji rasta tumora su donele kontradiktorne zaključke [345]. Do sada, najčvršći dokazi idu u prilog pro-apoptotskom dejstvu IGFBP-3 na tumorske ćelije.

Karakteristično za neke tumore je unutarćelijsko nakupljanje gvožđa. Pojava je primećena kod tumora debelog creva, jetre, dojke, pankreasa [346, 347]. Nije razjašnjeno da li nakupljanje prethodi tumorskoj transformaciji ili je njena posledica. U slučaju da prethodi, moglo bi se pretpostaviti da gvožđe, izazivajući stvaranje ROS koji oštećuju DNK, učestvuje u etiologiji tumora [348-350]. Takođe je konstatovano da gvožđe inhibira odbrambene mehanizme ćelija [348], kao i da ga ćelije tumora intenzivno koriste kao nutritivni element u cilju rasta i razmnožavanja [348].

Povećana potreba tumorskih ćelija za gvoždem praćena je povećanom ekspresijom TfR na površini ćelija [351, 352]. Ujedno, intenzivan metabolizam i deoba ćelija dovode do stanja lokalne hipoksije, što je signal za povećanu angiogenezu u tumorskom tkivu [353] i povećan dotok hranljivih sastojaka. Krajnji rezultat ovih promena može biti velika koncentracija gvožđa u ćelijama tumora i nedostatak u cirkulaciji. Ovakvo stanje može dovesti do sistemske anemije iako se ukupna telesna količina gvožđa ne mora značajno izmeniti. U zavisnosti od tipa tumora, anemija može biti pojačana krvarenjem, lošom apsorpcijom, lošom ishranom usled tegoba pri jelu ili gubitka apetita. Iako je anemija najčešći pratilac tumora, posebnu situaciju predstavlja dugotrajna povećana koncentracija gvožđa koja može dovesti do stradanja jetre i pojave hepatocelularnog karcinoma [354-357].

Kombinacijom svih navedenih podataka može se zaključiti da je za rast tumora važan jon gvožđa, da tumor povećano eksprimira TfR i da internalizuje IGFBP-3. Svakako je interesantno utvrditi šta se događa sa kompleksom IGFBP-3/Tf kod tumora, što je bio predmet izučavanja u ovoj doktorskoj disertaciji

3. Materijal i metode

3.1 Osnovne hemikalije

Za potrebe ove doktorske disertacije, korišćene su hemikalije nabavljene od sledećih proizvođača:

Beolab, Beograd

Etanol

Tween-20

Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA

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

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

Sinapinska kiselina (SPA)

Trifluorosirćetna kiselina (TFA)

Diagnostic System Laboratories, Webster, USA

Rekombinantni IGFBP-3

ICN Biomedicals, Costa Mesa, USA

Akrlamid

Natrijum-azid (NaN_3)

Tris(hidroksimetil)-aminometan (Tris)

INEP, Beograd

^{125}I -IGF-I

^{125}I -IGF-II

KODAK, Paris, France

Hemikalije za razvijanje i fiksiranje rentgen filmova

Rentgen film MXB (100 NIF – 13×18)

Merck, Darmstadt, Germany

Brom-fenol plavo

Glacijalna sirćetna kiselina

Natrijum-dihidrogenfosfat

Natrijum-hidrogenfosfat

Perkin Elmer Life and Analytical Sciences, Boston, USA

Nitrocelulozna membrana (0,45 µm), Whatman® Protran®

Pierce, Minneapolis, USA

ECL reagens

Pierce Biotechnology, Rockford, USA

Komplet za imunoprecipitaciju (IP) - Pierce Coimmunoprecipitation kit

Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany

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

Amonijum-persulfat

Cijanogen-bromid, CNBr

Coomassie Brilliant Blue R-250 boja

Dinitro-fenilhidrazin

Etanolamin

Fukoza (Fuc)

Glicin

Goveđi serumski albumin (BSA)

Kazein

Koktel inhibitora proteaza

Laktoza (Lac)

Manoza (Man)

Metil- α -glukopiranozid

Metil- α -manopiranozid

N,N' – metilen-bisakrilamid

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

N-acetil-glukozamin (GlcNAc)

Natrijum-dodecil-sulfat (SDS)

Ponso S boja

Saharoza

Trihlorsirćetna kiselina (TCA)

Triton X-100

Vodonik peroksid (H₂O₂), 30% rastvor

Zorka Pharma, Šabac

Bakar(II)-hlorid

Cink(II)-hlorid

Dinatrijum-etilendiamin-tetrasirćetna kiselina (EDTA)

Glicerol

Gvožđe(III)-hlorid

Hlorovodonična kiselina

Kalcijum-hlorid (CaCl₂)

Ksilen

Magnezijum-hlorid (MgCl₂)

Mangan-hlorid (MnCl₂)

Metanol

Natrijum-acetat (NaA)

Natrijum-amonijum fosfat (NaAF)

Natrijum-bikarbonat

Natrijum-borat

Natrijum-hidroksid

Natrijum-hlorid (NaCl)

Natrijum-karbonat

Nikl(II)-hlorid

Vector Laboratories, Burlingame, UK

HRP-Avidin konjugat

VectaShield[®] Antifade Mounting medijum sa DAPI bojom za ćelijska jedra

U **Tabeli 4** su navedeni korišćeni imobilizovani lektini i njihova specifičnost.

Tabela 4. Lektini i njihova specifičnost.

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

Pored imobilizovanih lektina korišćeni su i lektini konjugovani sa biotinom: SNA, ECL, RCA, MAL i PHA-E.

3.2 Pufferi i rastvori

(grupisani prema primenjenim metodama)

3.2.1 Afinitetna hromatografija sa imobilizovanim metalnim jonima (IMAC)

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

Fosfatni puffer (FP) - 0,2 M, pH 8,0

Boratni puffer (BP) - 0,1 M, pH 10,0

Rastvor 0,1 M EDTA

3.2.2 Lektinska afinitetna hromatografija (LAC)

HBS pufferi (osnovni) za:

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

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

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

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

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

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

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

3.2.3 Imunoafinitetna hromatografija (IAC) na IgY koloni

TBS puffer - 10 mM Tris-HCl/1 M NaCl, pH 7,4

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

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

3.2.4 Preparativna imunoafinitetna hromatografija

Boratni puffer - 0,1 M /75 mM NaCl, pH 8,5

Biakarbonatni puffer - 0,1 M /0,5 M NaCl

Puffer za ispiranje - 50 mM FP/0,15 M NaCl, pH 7,2

Elucioni puffer (EP) - 0,1 M Tris-HCl, pH 3,7

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

3.2.5 SDS-PAGE i imunoblot

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

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

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

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

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

3.2.6 Imunoprecipitacija

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

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

3.2.7 SELDI-TOF/MS

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

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

Pufer za vezivanje proteina za IMAC30 čip (PVIM) - 0,1 M FP/0,5 M NaCl, pH 7,0

Pufer za vezivanje proteina za Q10 čip (PVQ) - 50 mM NaAF, pH 7,0

Pufer za vezivanje proteina za CM10 čip (PVCM) - 50 mM NaA, pH 5,0

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

3.2.8 Solubilizacija ćelijskih membrane

0,25 M rastvor saharoze u destilovanoj vodi

Koktel inhibitora proteaza

HBS - 50 mM HEPES/0,9% NaCl/0,1% NaN₃, pH 7,5

1% Triton X-100 u HBS

3.2.9 Lektin blot

TBS pufer - 0,15 M NaCl/10mM Tris-HCl, pH 7,4

3% rastvor BSA u TBS puferu

Rastvor biotiničanog lektina - 1/5000 u TBST puferu

Rastvor HRP-avidina - razblaženje 1:100000

3.2.10 Derivatizacija proteina sa dinitrofenil hidrazinom (DNP)

10% rastvor TCA

0,01 M rastvor DNP u 2M HCl

Rastvor za ispiranje etanol/etil-acetat (1/1)

2% rastvor SDS u 0,1 M FP, pH 8,0

3.2.11 Imunohistohemija

PBS pufer - 50 mM FP/0,15 M NaCl, pH 7,5

90% rastvor etanola

70% rastvor etanola

5% rastvor kazeina

1% rastvor H₂O₂ u etanolu

4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) u okviru VectaShield[®] Antifade Mounting medijuma

3.3 Smole

AminoLink Plus Coupling Resin[®], u okviru kompleta Co-Immunoprecipitation kit, Pierce Biotechnology, Rockford, USA

DEAE-sefaroza, Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany

IDA agarozna, Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany

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

Lektin-agarozna smole navedene u **Tabeli 4**, Vector Laboratories, Burlingame, UK

Sefaroza 4B, Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany

3.4 Antitela

Primarna:

Poliklonska anti-IGFBP-3 antitela (kozija), Diagnostic Systems Laboratory, Webster, USA

Poliklonska anti-IGFBP-3 antitela (kozija), Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, USA

Poliklonska anti-Tf antitela (ovčija), INEP, Beograd

Poliklonska anti-TfR antitela (zečija), Abcam, Cambridge, UK

Poliklonska anti-TfR antitela (zečija), Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, USA

Poliklonska anti-DNP antitela (zečija), Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany

Sekundarna:

AlexaFluor® 488 IgG antitela (magareća) spram koze, Molecular probes, Invitrogen™, Eugene, USA

AlexaFluor® 555 IgG antitela (kozija) spram kunića, Molecular probes, Invitrogen™, Eugene, USA

Biotinilovana IgG antitela (konjska) spram koze, Vector Laboratories, Burlingame, UK

HRP-konjugovana IgG antitela (svinjska) spram koze, Biosource, Camarillo, USA

HRP-konjugovana IgG antitela (magareća) spram kunića, Pierce Biotechnology Inc., Rockford, USA

HRP-konjugovana IgG antitela (kozija) spram kunića, AbD Serotec, Oxford, UK

3.5. Imunodijagnostički kompleti

ELISA komplet za određivanje IGFBP-3, Abcam, Cambridge, UK

ELISA komplet za određivanje feritina, Abcam, Cambridge, UK

Imunoturbidimetrijski test za određivanje transferina, Human GmbH, Wiesbaden, Germany

RIA komplet za određivanje IGF-I, INEP, Beograd

3.6. Biohemijski reagensi

Komercijalni reagensi za određivanje koncentracije gvožđa, ukupnog kapaciteta vezivanja gvožđa (TIBC), proteina i albumina, Human GmbH, Wiesbaden, Germany

3.7 Uređaji i aparati

U radu su korišćeni sledeći uređaji i aparati:

Centrifuga MiniSpin plus, Eppendorf

Centrifuga LC-321, Tehtnica

Filtri za ultrafiltraciju od 10 kDa, 30 kDa i 100 kDa, Microcon, Millipore

Frakcioni kolektor HeliFrac, Pharmacia

Gama brojač Wallac Wizard, PerkinElmer

Kinetor MR-1, LKB

Konelab 20 biohemijski analizator, Thermo Scientific

Kombinovani pH/konduktometar InoLab 720, WTW

Kriotom Leica CM1850, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar

Magnetna mešalica ARE, Velp

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

Mikroskop za imunofluorescentnu detekciju (Carl Zeiss Axio Imager 1.0) sa AxioCam

HR kamerom (Carl Zeiss) ili sa Canon A640 digitalnom kamerom (Canon Inc.)

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

Spektrofotometar Ultrospec 2000, Pharmacia

Ultracentrifuga, Beckman Coulter

Vaga analitička B6, Mettler

Vaga tehnička, Chyo

Victor ELISA čitač ³V, PerkinElmer

Vortex ZX3, Velp

3.8 Uzorci seruma

U eksperimentima su korišćeni uzorci seruma odraslih ljudi. Pošto je cilj istraživanja bila analiza kompleksa za čije je formiranje važno prisustvo jona gvožđa, IGFBP-3 i transferina, korišćeni su uzorci seruma zdravih ljudi i pacijenata sa poremećajem u metabolizmu gvožđa ili izmenjenim potrebama za njim, kao i osoba koje su pored promena u metabolizmu gvožđa imale i promene u koncentraciji i metabolizmu IGFBP-3. Dozvole za prikupljanje i korišćenje uzoraka u sprovedenim istraživanjima su dobijene od etičkih komiteta INEP-a i KBC-a „Bežanijska Kosa“.

3.8.1 Serumi zdravih osoba

Sakupljeni su serumi dobrovoljnih davaoca, n=112 (56 muškaraca i 56 žena), starosti 26-72 godina, BMI 20-34 kg/m². Na osnovu usmenog anketiranja i naknadne analize osnovnih biohemijskih i hematoloških parametara, utvrđeno je da se ova grupa uzoraka može smatrati kontrolnom. Venska krv je izvađena ujutru, posle 12 h gladovanja. Nakon 40 min stajanja na sobnoj temperaturi, serum je izdvojen centrifugiranjem na 1000 x g 10 minuta, alikvotiran i čuvan na -40°C. Serumi su korišćeni u periodu od 2 meseca.

Kontrolna grupa osoba i seruma za pojedine eksperimente je formirana tako da parametri poput starosti i BMI osoba budu slični onima iz eksperimentalne grupe.

3.8.2 Serumi osoba sa povećanom koncentracijom gvožđa

Sakupljeni su serumi ljudi (n=39, starosti 32-58 godina, BMI 25-36 kg/m²) čija je koncentracija gvožđa bila znatno iznad referentne granice (muškarci: 11-27 µmol/L, žene: 7-27 µmol/L). Izabrani su uzorci u kojima je izmerena koncentracija gvožđa bila veća od 35 µmol/L, ali pored ove karakteristike, ostali standardni biohemijski parametri su bili u referentnim opsezima i same osobe nisu imale dijagnozu nekog oboljenja (npr. hemohromatozu) kao posledice povećanog sadržaja gvožđa u serumu.

3.8.3 Serumi osoba sa smanjenom koncentracijom gvožđa

Korišćeni su serumi osoba (n=55, starosti 21-70 godina, BMI 20-31 kg/m²) sa anemijom, koja je potvrđena preko većeg broja biohemijskih (koncentracija gvožđa, transferina, feritina, TIBC) i hematoloških parametara (koncentracija hemoglobina, sadržaj hemoglobina po eritrocitu). U radu su analizirani uzorci u kojima je koncentracija gvožđa bila manja od 4,5 µmol/L.

3.8.4 Serumi pacijenata sa dijagnostikovanim kolorektalnim karcinomom

Pacijenti (n=97: 54 muškarca i 43 žene, starosti 36-74 godina, BMI 15-29 kg/m²) sa kolorektalnim karcinomom (CRC) su dijagnostikovani i praćeni u Kliničko-bolničkom centru (KBC) Bežanijska kosa. Kod ovih pacijenata, pored osnovnog patološkog stanja, bila je izražena anemija izazvana teškoćama u ishrani, poremećenom crevnom apsorpcijom, rektalnim krvarenjem i/ili radioterapijom. Prema ASA (American Society of Anesthesiologists) ocenjivanju fiziološkog stanja organizma (preoperativno) [432], ovi

pacijenti su svrstani u III (62 pacijenta), odnosno IV kategoriju (35 pacijenata). Kategorija III ukazuje na ozbiljno sistemsko oboljenje, a kategorija IV je najteža i ukazuje na ozbiljno sistemsko oboljenje koje je konstantna opasnost po život. Svi pacijenti su bili predviđeni za hiruršku intervenciju (resekciju debelog creva), a njihovi uzorci seruma su uzeti ujutru, na dan zakazane operacije.

3.8.5 Serumi profesionalnih sportista

Poznato je da profesionalni sportisti imaju povećanu metaboličku potrebu za gvožđem, u skladu sa povećanom potrebom za kiseonikom i izloženošću kataboličkim stanjima tokom treninga i takmičenja, kao i da se IGF sistem menja usled intenzivnog vežbanja. Sakupljeni su uzorci profesionalnih igračica rukometa ženskog rukometnog kluba iz Kragujevca (1. rukometna liga Srbije, u režimu profesionalnog treninga 3-5 godina), n=17, starosti 16-18 godina, BMI 19-24 kg/m². Uzorci seruma su sakupljeni po završenoj redovnoj sezoni takmičenja i nakon jednomesečne intenzivne pripreme u kampu. Svaka sportiskinja je radila test opterećenja trčanjem na traci, tokom koga je mereno VO₂. Ujutru je vađena krv, nakon 12 h gladovanja i u venu su im postavljene braunile. Drugi uzorak krvi je izvađen tokom testa opterećenja, kad je dostignuto individualno maksimalno iskorišćenje kiseonika, VO₂max. Treći uzorak je uzet nakon završetka testa opterećenja i oporavka (10 minuta nakon drugog uzorkovanja). Rukometašice su test opterećenja izvodile pod kontrolom trenera i lekara, nezavisno od ispitivanja urađenih u ovom radu. Ideja je bila da se utvrdi da li stepen fizičke utreniranosti (pre i posle priprema) kod profesionalnih sportista utiče na parametre IGF sistema tokom testa opterećenja.

3.9 Uzorci tkiva

Tkivo debelog creva je korišćeno na dva načina: za direktno izolovanje proteina i za pravljenje parafinskih isečaka. Uzorci su dobijeni iz KBC Bežanijska kosa, od pacijenata od kojih su dobijeni i uzorci seruma, n=37 (22 muškarca i 15 žena), starosti 36-72 godina, BMI 15-29 kg/m². Prema ASA klasifikaciji, 26 slučajeva je klasifikovano kao kategorija III, a 11 kao kategorija IV. Iako je početni broj pacijenata sa dijagnostikovanim oboljenjem bio znatno veći (poglavlje 3.8.4), uzorci tkiva su uzeti samo od pacijenata kod kojih je izvedena intervencija uklanjanja većeg dela creva (dužina reza 3-40 cm), pošto je za izolovanje proteina bio potreban barem gram tkiva. Od svakog

pacijenta su uzeta dva uzorka tkiva, u roku od 1 h postoperativno, neposredno nakon histopatološke diferencijacije na tumorsko i netumorsko tkivo (diferencijaciju je radio patolog u KBC Bežanijska kosa, za potrebe klinike). Tkiva su istog dana podvrgnuta daljoj obradi i izolovanju proteina. U tkivnim preparatima je utvrđivano prisustvo IGFBP-3, Tf i Tf receptora.

3.10 Hromatografske metode

3.10.1 Afinitetna hromatografija sa imobilizovanim metalnim jonima (IMAC)

U kolonu za hromatografiju nanet je 1 mL agaroze sa imobilizovanom iminodisirćetnom kiselinom (IDA). Ispiranje matriksa je izvršeno destilovanom vodom. U skladu sa potrebama eksperimenta, kolona je sukcesivno zasićena rastvorima jona metala (0,1 M, 1,0 mL) u formi hlorida i to: Cu^{2+} , Ni^{2+} , Fe^{3+} , Mg^{2+} i Zn^{2+} . Nevezani joni metala su isprani sa 10 mL destilovane vode i 10 mL 0,1% rastvora sirćetne kiseline. Matriks je uravnotežen u MES puferu (poglavlje 3.2.1) pre nanošenja uzorka (100 μL seruma u 900 μL MES pufera), koji je na koloni recirkulisan 1 h, na sobnoj temperaturi. Nevezani materijal je ispran sa 10 mL MES pufera, dok je frakcija vezanih proteina eluirana sa 10 mL FP, a zatim sa 10 mL EDTA rastvora. Nakon eluiranja, kolona je regenerisana sa 10 mL BP (poglavlje 3.2.1), pre nanošenja drugog metalnog jona. Ovaj postupak je ponavljan za 30 uzoraka seruma zdravih osoba i sve navedene metalne jone.

3.10.2 Lektinska afinitetna hromatografija (LAC)

Za lektinsku afinitetnu hromatografiju su korišćene agarozne smole sa imobilizovanim lektinima (**Tabela 4**). Kolone sa smolom (2 mL) su uravnotežene u odgovarajućim HBS puferima (poglavlje 3.2.2). Inkubacija uzoraka (100 μL seruma u 900 μL odgovarajućeg HBS pufera) je rađena recirkulacijom na kolonama u trajanju od 1 h, na sobnoj temperaturi. Nakon završene inkubacije, nevezani proteini su isprani sa 20 mL odgovarajućeg HBS pufera. Specifično vezani proteini su eluirani u dve faze, i to:

1. rastvorom haptenskog ugljenog hidrata u 15 mL odgovarajućeg HBS pufera, pH 7,5 i
2. rastvorom haptenskog ugljenog hidrata u 7 mL sirćetne kiseline, pH 3,0.

Specifične su bile kolone sa PHA-E- i PHA-L-agarozom, sa kojih je eluiranje bilo jednofazno, uz 10 mL 1,0 M sirćetne kiseline. Haptenski ugljeni hidrati korišćeni za eluiranje sa kolona su bili:

1. 0,5 M Lac za SNA-agarozu,
2. smeša 0,2 M metil- α -glukopiranozida i 0,2 M metil- α -manopiranozida za ConA- i LCA-agarozu,
3. 0,2 M Lac za RCA-I- i ECL-agarozu,
4. 0,5 M GlcNAc za WGA- i s-WGA-agarozu i
5. 0,1 M Fuc za UEA-agarozu.

Eluirane frakcije proteina su neutralisane sa NP, pH 8,9, dijalizovane naspram 0,15 M NaCl preko noći na 4°C i skoncentrovane do 1 mL ultrafiltracijom. Ovom metodom je ispitana mogućnost izolovanja kompleksa IGFBP-3/Tf iz seruma zdravih osoba posredstvom interakcije njihovih glikana sa lektinima.

3.10.3 Imunoafinitetna hromatografija (IAC) na smoli sa imobilizovanim IgY antitelima

Za hromatografiju na mikrospin kolonama je korišćena smola sa imobilizovanim IgY antitelima, koja su bila specifična za 12 najzastupljenijih proteina plazme: albumin, IgG, transferin, fibrinogen, IgA, α 2-makroglobulin, IgM, α 1-antitripsin, haptoglobin, orozomukoid, apolipoprotein A-I i apolipoprotein A-II. Na 500 μ L smole u koloni nanošeno je 20 μ L uzorka seruma razblaženog u 480 μ L osnovnog TBS pufera (poglavlje 3.2.3). Uzorci su inkubirani na rotacionoj mešalici, u trajanju od 15 minuta, na sobnoj temperaturi. Nevezani proteini su uklonjeni sa kolone centrifugiranjem na 2000 \times g u trajanju od 30 s, nakon čega je kolona ispirana 2 puta sa po 500 μ L TBS pufera istom procedurom. Eluiranje vezanih proteina sa smole je urađeno elucionim puferom (2 \times 100 μ L) uz centrifugiranje (2000 \times g u trajanju od 30 s). Nakon eluiranja, uzorak i sama kolona su neutralisani puferom za neutralizaciju pH 8,0, a kolona je dalje isprana osnovnim puferom (3 \times 200 μ L) pre nanošenja sledećeg uzorka.

Ovom metodom su analizirani uzorci seruma zdravih osoba i osoba sa promenama u metabolizmu gvožđa.

3.10.4 Preparativna imunoafinitetna hromatografija za izolovanje IGFBP-3/Tf kompleksa

U cilju izolovanja veće količine IGFBP-3/Tf kompleksa iz uzoraka seruma, imunoafinitetna hromatografija je urađena koristeći veću zapreminu smole sefaroze 4B (50 mL) koja je aktivirana primenom CNBr, prema proceduri koju su razvili Korpela i Ryan [373, 374]. Sefaroza 4B je inkubirana u rastvoru CNBr (koncentracije 40 mg/mL) u bikarbonatnom puferu, pH 11 tokom 10 min. Nakon inkubacije, matriks je intenzivno ispran boratnim i bikarbonatnim puferima (poglavlje 3.2.4), a zatim je dodat rastvor anti-Tf antitela, frakcija IgG (50 mg). Vezivanje antitela je izvedeno na 4°C, preko noći. Matriks je intenzivno ispran sa PBS, preostale slobodne reaktivne grupe su blokirane rastvorom etanolamina i ponovljeno je intenzivno ispiranje sa PBS. Na ovako pripremljeni matriks sa imobilizovanim anti-Tf antitelima, nanet je uzorak seruma (100 µL), recirkulisan tokom 1 h na sobnoj temperaturi, a zatim ostavljen na koloni preko noći na 4°C. Nevezani proteini su isprani sa PBS, a specifično vezani su eluirani sa EP (poglavlje 3.2.4) i rastvori neutralisani. Prisustvo proteina u frakcijama utvrđeno je merenjem apsorbance na 280 nm.

Varijacija ove imunoafinitetne hromatografije je bio postupak koji je uključivao preinkubaciju uzorka seruma (na 4°C preko noći) sa radioaktivno obeleženim ligandom (poglavlje 3.12). Dalji tok ispiranja i eluiranja je izveden po prethodno opisanom postupku. Prisustvo radioaktivne komponente u frakcijama utvrđeno je merenjem radioaktivnosti na gama brojaču.

3.11 Elektroforetske metode

3.11.1 Imunoelektroforeza (IEP)

Metodom IEP je ispitana mogućnost međusobnog razdvajanja IGFBP-3, Tf i IGFBP-3/Tf kompleksa, odnosno mogu li se kompleksi izolovati kao imunoprecipitati u 1% agaroznom gelu. U kružne otvore za uzorke naneto je 5 µL seruma i proteini su razdvojeni elektroforetski pod standardnim uslovima (jačina struje 20 mA, napon 100 V, na 4 °C, 105 minuta). Po završenoj elektroforezi, u kanale je naneto 100 µL odgovarajućih primarnih antitela razblaženih u PBS. Ploča sa gelom je ostavljena u vlažnoj komori, na sobnoj temperaturi, 24 h. Antitela su difundovala kroz gel i izazivala imunoprecipitaciju imunoaktivnih proteina iz seruma. Na ovaj način su analizirani serum i zdravih osoba,

osoba sa poremećajem u metabolizmu gvožđa i pacijenata sa kolorektalnim karcinomom (po 10 uzoraka iz svake grupe).

3.11.2 SDS poliakrilamidna gel-elektroforeza i Western imunoblot

U zavisnosti od eksperimenta, uzorci seruma, solubilizati membrana i citosoli ćelija, frakcije specifično vezanih proteina sa kolona posle imunoprecipitacije, eluati sa IMAC kolona, ultrafiltrati i uzorci sa lektinskih kolona su ispitani metodom SDS-PAGE. Prema standardnoj proceduri [375] elektroforetsko razdvajanje proteina iz uzoraka je vršeno na 8% ili 10% gelu u neredukujućim ili redukujućim (10% 2-merkaptetanol) uslovima. Uzorci seruma su razblaživani u PBS (poglavlje 3.2.5) u odnosu 1:40 i dodatno u PZU puferu u odnosu 1:1. Ostali uzorci su razblaživani samo u PZU puferu u odnosu 1:1. Elektroforeza je rađena pod naponom od 200 V, pri jačini struje od 120 mA, na sobnoj temperaturi tokom 45 minuta. Elektroforetski razdvojeni proteini su elektrotransferom preneti na nitroceluloznu membranu. Da bi se sprečilo nespecifično vezivanje antitela za membranu, ona je inkubirana u 5% rastvoru odmašćenog mleka u 10 mM TBST na sobnoj temperaturi u trajanju od 45 minuta. Membrana je isprana sa TBST, inkubirana sa primarnim antitelima u 1% odmašćenom mleku u TBST na 4 °C preko noći, ponovo isprana i inkubirana sa sekundarnim antitelima. Za detekciju imunoreaktivnih proteina je korišćen hemiluminescentni HRP supstrat luminol (kao deo ECL reagensa) i autoradiografija.

3.11.3 Lektinski blot

Metoda lektinskog blot-a je korišćena za detekciju glikoproteina razdvojenih postupkom SDS-PAGE. Nakon elektrotransfera proteina na nitroceluloznu membranu, slobodna mesta na membrani su blokirana primenom 3% BSA rastvora u TBST, preko noći, a zatim su dodavani rastvori biotinilovanih lektina u istom puferu. Usledila je inkubacija u rastvoru HRP-avidina (poglavlje 3.2.9) i rastvoru ECL. Metodom lektin blot-a su analizirani glikani izolovanih IGFBP-3/Tf kompleksa iz seruma zdravih ljudi i pacijenata sa kolorektalnim karcinomom.

3.12 Testovi vezivanja liganda

Korišćene su dve vrste vezujućih testova za ligande, uz primenu radioaktivno obeleženog liganda IGF-I ili IGF-II: afinitetna hromatografija i ligand blot. Za potrebe ligand afinitetne hromatografije, na CNBr-aktiviranu agarozu imobilizovana su anti-Tf antitela, a uzorak seruma (100 μ L) je inkubiran sa 125 I-IGF-I/II (300000 cpm). Uzorak seruma je nanet na kolonu i inkubiran na 4 °C preko noći. Nevezani proteini su isprani sa 50 mM PBS, pH 7,2, a vezani sa EP, pH 3,7. Cilj ovog eksperimenta je bio da utvrdi mogu li imobilizovana anti-Tf antitela vezati merljive količine IGFBP-3/Tf kompleksa, a praćenje vezivanja je bilo preko interakcije IGFBP-3 sa radioaktivno obeleženim ligandom. U eluatima je merena radioaktivnost na gama brojaču.

Za potrebe ligand blot-a, proteini su razdvojeni elektroforetski, preneti na nitroceluloznu membranu i inkubirani u rastvoru 125 I-IGF-I/II (300000 cpm). Nakon inkubacije i ispiranja, membrana je analizirana autoradiografski.

3.13 Denzitometrijska obrada rezultata

Svi rezultati dobijeni metodom blot-a analizirani su denzitometrijski, koristeći program Image Master Total Laboratory v2.01 (Amersham BioSciences, Buckinghamshire, USA). Izmerene brojčane vrednosti su izražene u denzitometrijskim jedinicama (DJ).

3.14 Imunoprecipitacija proteinskih kompleksa

Korišćen je komercijalni komplet za imunoprecipitaciju, koji se zasniva na primeni epoksi aktivirane agaroze za imobilizaciju antitela. Za potrebe ove doktorske disertacije, kompleksi IGFBP-3/Tf su izolovani dvostepenom imunoprecipitacijom. Prema priloženom uputstvu proizvođača, na 20 μ L suspenzije smole u mikrospin kolonama imobilizovano je 5 μ g primarnih antitela (anti-IGFBP-3 ili anti-Tf). Na kolone su nanošene tri vrste uzoraka: 10 μ L seruma razblaženog u 190 μ L TBS, 50 μ L membranske frakcije tkiva (solubilizat) ili citosola u 150 μ L TBS. Uzorci su inkubirani na 4 °C preko noći. Nevezani proteini su isprani TBS puferom (3 x 500 μ L) uz centrifugiranje na 2000 \times g u trajanju od 30 s. Eluiranje vezanih proteina je urađeno sa ukupno 110 μ L (10 + 2 x 50 μ L) EP, pH 2,8 uz centrifugiranje, a eluati su neutralisani sa NP, pH 8,9. U cilju izolovanja kompleksa, neutralisana eluirana frakcija sa jedne kolone

je propuššana kroz drugu. Isprobane su obe varijante u smislu redosleda kolona. Imunoprecipitacijom su izolovani kompleksi iz svih grupa seruma i tkiva.

3.15 Masena spektrometrija SELDI-TOF (Surface-enhanced laser desorption ionization - time of flight)

Masena spektrometrija je korišćena za analizu strukturnih karakteristika i fizičko-hemijskih svojstava IGFBP-3/Tf kompleksa. SELDI-TOF metod, za razliku od osnovne masene spektrometrije koja podrazumeva fragmentaciju molekula i dalju analizu, uključuje još jedan korak, a to je interakcija (vezivanje) molekula sa matriksom koji ima specifične karakteristike. Za ispitivanje IGFBP-3/Tf kompleksa izolovanih imunoprecipitacijom iz seruma i tkiva, korišćeni su čipovi IMAC 30, Q10, H50, CM10 i PS20, u skladu sa propisanom procedurom proizvođača čipova.

IMAC30 je čip kod koga u prvoj fazi dolazi do interakcije proteina sa metalnim jonima imobilizovanim na površini čipa (heliranim grupama nitrilo-triacetate kiseline, NTA). Pri analizi proteinskih kompleksa, za površinu čipa su vezani joni Cu^{2+} , Ni^{2+} , Fe^{3+} , Mg^{2+} i Zn^{2+} u formi hlorida.

Q10 čip se koristi za vezivanje i ispitivanje negativno naelektrisanih molekula, pošto na površini sadrži kvaternerne amonijum grupe koje interaguju sa ostacima Asp, Glu, terminalnim karboksilnim grupama i fosfatnim grupama. Koristeći ovaj čip, ispitane su razlike u naelektrisanju IGFBP-3/Tf kompleksa koji su poticali iz različitih grupa uzoraka.

CM10 je čip koji se koristi za ispitivanje pozitivno naelektrisanih molekula. Karboksilne grupe na površini čipa prepoznaju Lys, His i Arg ostatke, kao i terminalnu amino grupu.

H50 je čip za koji se vezuju proteini preko svojih hidrofobnih delova, jer su metilenski nizovi na površini čipa.

PS20 je čip čija je površina derivatizovana dajući epoksi grupe za koje se kovalentno mogu vezati proteini. Za potrebe ove disertacije, imobilizovana su anti-IGFBP-3, odnosno anti-Tf antitela i izolovanim kompleksima IGFBP-3/Tf je omogućeno da interaguju gradeći imune komplekse na čipu pre jonizacije i fragmentacije. Ideja je bila da se ispita uticaj promena fizičko-hemijskih karakteristika kompleksa, usled promene u metabolizmu gvožđa i/ili prisustva tumora, na njegovu imunoreaktivnost.

Svaka vrsta čipa je aktivirana i isprana na način koji je propisao proizvođač pre nanošenja uzorka. Nakon propisane inkubacije, čipovi su ispirani, sušeni, nanet je sloj sinapinske kiseline (poglavlje 3.2.7) i uzorci su dalje podvrgnuti jonizaciji i fragmentaciji. Spektri su čitani u opsegu 1-300000 m/z, primenjeno je 8815 laserskih snopova po reaktivnoj površini čipa, uz energiju lasera od 6000 nJ. Spektri su čitani i analizirani koristeći program Ciphergen Express 3.0 (Bio-Rad Laboratories, Hercules).

3.16 Ultrafiltracija

Za potrebe pojedinih eksperimenata, proteini su koncentrovani ultrafiltracijom ili su razdvajani primenom filtera u cilju izolovanja proteina određenih molekulskih masa. Korišćena su molekulska sita (poglavlje 3.7) čije su pore zadržavale molekule masa većih od 10 kDa, odnosno 30 ili 100 kDa. Proces ultrafiltracije (brzina i vreme centrifugiranja) je izveden u skladu sa procedurom propisanom od strane proizvođača.

3.17 Izolovanje ćelijskih membrane i citosola iz tkiva debelog creva

Uzorci tumorskog i netumorskog tkiva debelog creva su u roku od 1 h dopremljeni na ledu iz KBC Bežanijska Kosa do INEP-a (poglavlje 3.9). Tkivo je intenzivno isprano ledenim PBS (u cilju uklanjanja tragova krvi), isečen je epitelni sloj kod netumorskog tkiva (analizirani tumori su epitelnog porekla) i svaki uzorak je pojedinačno homogenizovan i dalje obrađen. Homogenizacija je urađena u vodenom rastvoru 0,25 M saharoze, u koju su dodati proteazni inhibitori (poglavlje 3.2.8), teflonskim homogenizerom, u ledenom kupatilu. Centrifugiranjem na $600 \times g$ na $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 10 minuta su odbačeni delovi nehomogenizovanog tkiva. Supernatant je dalje izcentrifugiran na $42000 \times g$ (na $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, 1 h) u ultracentrifugi. Dobijeni supernatant je sadržao citosolnu frakciju, a talog, u kome su zaostale ćelijske membrane, je ispran ledenim HEPES puferom, pH 7,4 (poglavlje 3.2.8) i resuspendovan u istom puferu kome je dodat Triton X-100 (1%). Solubilizacija membrana je izvedena na sobnoj temperaturi, stalnim mešanjem suspenzije u toku 1 h. Centrifugiranjem na $100000 \times g$ ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$, 90 min) odvojen je supernatant u kome su se nalazile solubilizovane ćelijske membrane.

3.18 Derivatizacija karbonilnih grupa proteina dinitrofenil hidrazinom (DNP)

Prisustvo karbonilnih grupa na proteinima, nastalih kao posledica oksidativnih procesa kod zdravih, a posebno kod pacijenata izloženih oksidativnom stresu (što je slučaj kod tumora), određivano je spektrofotometrijski i metodom imunoblota nakon derivatizacije sa DNP.

Iz uzorka seruma zapremine 0,5 mL (radne koncentracije 10 mg/mL, dobijene razblaživanjem u dejonizovanoj vodi) staloženi su proteini sa 0,25 mL 10% TCA (poglavlje 3.2.10). Nakon centrifugiranja na 1500 x g 5 minuta, supernatant je odbačen, a na talog je odpipetirano 0,25 mL 0.01 M rastvora DNP u 2 M HCl. Suspenzija je intenzivno mešana na magnetnoj mešalici do potpune homogenizacije, na sobnoj temperaturi u trajanju od 30 minuta. Proteini su ponovo istaloženi dodatkom 0,5 mL rastvora TCA, suspenzija je centrifugirana, a talog ispran dva puta rastvorom etanol/etil-acetat (1/1, 1 mL), uz intenzivno mešanje i dodatno centrifugiranje, radi uklanjanja slobodnog DNP reagensa. Talog je, na kraju, rastvoren u 1,5 mL 2% rastvora SDS, na 37 °C tokom 10 minuta, uz povremeno mućkanje u cilju potpune homogenizacije. Apsorbanca rastvora je merena spektrofotometrijski, na 370 nm, koristeći 2 M HCl kao slepu probu. Identičan eksperiment je izveden bez DNP reagensa i nespecifični signal je oduzet od specifičnog. Za tkivne uzorke, početna koncentracija proteina je bila 1 mg/mL.

Derivatizovani proteini su ispitivani i metodom imunoblot-a (poglavlje 3.11.2) koristeći anti-DNP antitela.

3.19 Imunohistohemijska (IHC) detekcija proteina

Za imunohistohemijsku detekciju IGFBP-3/Tf kompleksa u uzorcima tkiva korišćeni su parafinski preparati koji su pripremljeni u KBC Bežanijska Kosa. Isečci parafinskih preparata debljine 5 µm su napravljeni i fiksirani na mikroskopske pločice u INEP-u.

Postupak IHC detekcije je bio standardan (poglavlje 3.2.11). Parafinski isečci su deparafinirani u ksilolu (10 minuta) i rehidratirani u etanolu. Aktivnost endogenih peroksidaza je blokirana 1% rastvorom H₂O₂ u etanolu, na sobnoj temperaturi tokom 30 minuta. Isečci su ispirani u 70% etanolu i destilovanoj vodi. Nespecifično vezivanje je blokirano inkubacijom u 5% kazeinu, 20 minuta.

Za eksperimentalno dokazivanje kolokalizacije proteina, isečci tkiva su prvo inkubirani u rastvoru kozjih anti-IGFBP-3 antitela, na sobnoj temperaturi, u trajanju od 1 h u vlažnoj komori. Nakon ispiranja sa PBS, isečci su inkubirani sa anti-kozjim sekundarnim antitelima konjugovanim sa fluorescentnom bojom AlexaFluor[®] 488, na sobnoj temperaturi u vlažnoj komori, 30 minuta. Po završenoj inkubaciji, isečak je ispran PBS puferom, ponovljeno je blokiranje 5% kazeinom i izvedena je inkubacija u rastvoru kunićevih anti-TfR antitela. Kao sekundarna su ovaj put korišćena anti-kunićeva antitela konjugovana sa bojom AlexaFluor[®] 555. Nakon još jednog intenzivnog ispiranja sa PBS, preparati su fiksirani ProLong[®] Gold Antifade reagensom. Osim ispitivanih kompleksa, u kontrolne svrhe su detektovana i jedra, bojenjem sa DAPI reagensom (poglavlje 3.2.11). Preparati su analizirani fluorescentnim mikroskopom, uz upotrebu specifičnih filtera (poglavlje 3.7).

3.20 Statistička obrada podataka

Statistička obrada podataka urađena je u programu SPSS 16.0 (IBM, New York, USA). Kao statistički značajne razlike između grupa uzimani su podaci čija je statistička značajnost bila izražena kao $p < 0.05$.

4. Cilj istraživanja

Dosadašnja saznanja u pogledu funkcije IGFBP-3 pretežno se odnose na ulogu IGFBP-3 kao posrednika u dejstvu IGF peptida [166-169]. Utvrđeno je da IGFBP-3 ispoljava i dejstva koja ne zavise od prethodnog vezivanja IGF liganada, ali to polje istraživanja je nedovoljno ispitano. Nekoliko studija je pokazalo da IGFBP-3 može direktno interagovati sa biomolekulima iz cirkulacije i membranskim proteinima, međutim, značaj tih interakcija je ostao nepoznat [98, 162]. O fiziološkoj kontroli interakcija gotovo da nema podataka. Iako za formiranje određenih asocijacija nije neophodno prisustvo IGF u kompleksu sa IGFBP-3, još uvek nije utvrđeno da li vezan IGF ligand utiče na procese i signalne puteve koji se dalje aktiviraju [84]. Cilj ove disertacije je bio da ispita jednu od međumolekulskih interakcija IGFBP-3 i to sa transferinom. Zadaci rada bi se mogli sažeti na sledeći način:

- da se ispita prisustvo kompleksa koji se formiraju između IGFBP-3 i transferina (IGFBP-3/Tf) u cirkulaciji,
- da se utvrdi na koji način koncentracija kompleksa zavisi od koncentracije polaznih komponenti,
- da se ispita značaj prisustva metalnog jona za formiranje kompleksa (i vrste jona),
- da se analizira uticaj promene u metabolizmu gvožđa na stepen stvaranja kompleksa,
- da se utvrdi reaktivnost kompleksa sa transferinskim receptorom (TfR) na membrani ćelija debelog creva, zdravog tkiva i tumora (kao model sistemu),
- da se analizira stepen kolokalizacije IGFBP-3 i Tf u/na ćelijama debelog creva,
- da se ispitaju strukturne karakteristike kompleksa IGFBP-3/Tf i njihove promene sa (pato)fiziološkim promenama u metabolizmu gvožđa, odnosno pojavom tumora i
- da se, na kraju, predloži moguća uloga kompleksa u organizmu.

Relativno je mali broj istraživanja na temu samostalne fiziološke uloge IGFBP-3 (mimo IGF regulacije), koja su urađena na uzorcima ljudi. Najviše je rađeno sa ćelijskim kulturama i uzorcima glodara [95, 98, 162, 177, 180]. Pokazalo se, međutim, da IGF sistem nije isti u različitim životinjskim vrstama (pre svega na nivou ćelijske i tkivne ekspresije i lokalizacije). Deo rezultata (i zaključaka) do kojih se došlo radeći sa

glodarima se nije potvrdio na ljudima. U ovoj disertaciji su korišćeni uzorci tkiva ljudi, te je potencijalni značaj i primenljivost rezultata za medicinsku praksu veći.

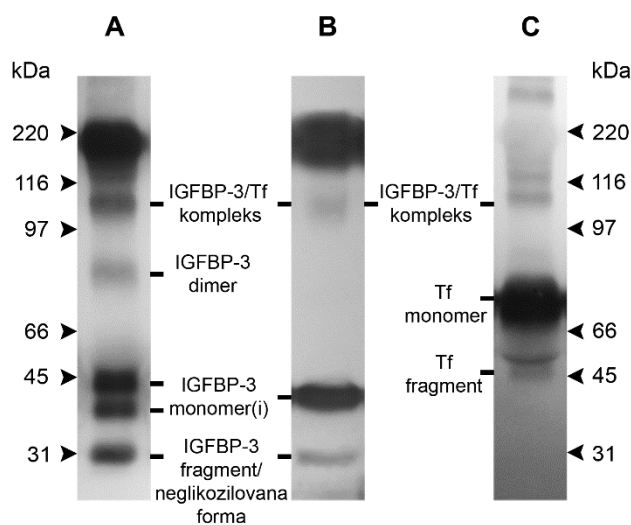
5. Rezultati i diskusija

5.1 Izolovanje IGFBP-3/Tf kompleksa iz seruma zdravih osoba

Ispitan je veći broj pristupa za izolovanje kompleksa IGFBP-3/Tf, koristeći različite fizičko-hemijske metode, zasnovane pretežno na afinitetnim interakcijama [373-375]. U narednih nekoliko poglavlja su prikazani dobijeni rezultati.

5.1.1 Ispitivanje specifičnosti antitela

Pre nego što se pristupilo izolovanju i karakterizaciji IGFBP-3/Tf kompleksa ispitana je imunoreaktivnost anti-IGFBP-3 i anti-Tf antitela. Stvarajući kompleks, ova dva proteina imaju ograničene površine i epitope kojima se mogu vezati za antitela, te je bilo potrebno potvrditi da antitela dovoljno dobro prepoznaju komponente u kompleksu. Fiziološka koncentracija Tf je znatno veća nego IGFBP-3, a Tf je i veći molekul od IGFBP-3, te su mogući problemi u detekciji pre bili očekivani na nivou IGFBP-3 nego Tf. Iz tog razloga se krenulo u ispitivanje sa jednim anti-Tf antitelom i dva anti-IGFBP-3 antitela. Pošto kompleksi imaju masu oko 110 kDa, praćeno je prisustvo proteinske trake na toj masi. Rezultati imunoblota su prikazani na **Slici 9**.



Slika 9. Testiranje specifičnosti antitela proizvođača (A) DSL i (B) Santa Cruz prema IGFBP-3 molekulu i antitela prema Tf molekulu (C) proizvedenih u INEP-u. Elektroforeza serumskog uzorka je rađena u neredukujućim uslovima, na 8% gelu.

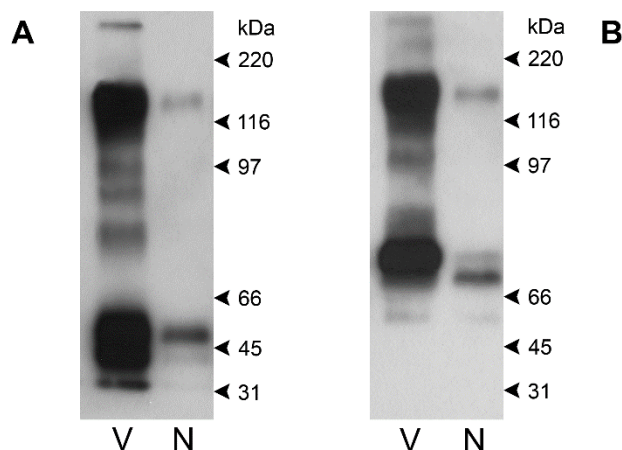
Pokazano je da sva tri antitela prepoznaju IGFBP-3/Tf komplekse. Na IGFBP-3 imunoblotu, protein sa najmanjom molekulskom masom (oko 30 kDa) odgovara

fragmentu i/ili neglikozilovanom obliku IGFBP-3 (oba su prisutna u cirkulaciji), dva proteina masa oko 40-45 kDa odgovaraju monomeru IGFBP-3, koji se javlja kao dublet dve glikoforme ravnopravno zastupljene kod zdravih osoba (**Slika 9A**), traka koja se javlja na masi iznad markera za 66 kDa odgovara dimeru IGFBP-3 (**Slika 9A**), a kompleks IGFBP-3/Tf se nalazi u zoni između markera od 97 i 116 kDa. Signal blizu starta potiče od većih agregata IGFBP-3 ili asocijacija sa drugim proteinima iz seruma. Što se Tf imunoblota tiče, detektovani su fragment na 45 kDa, monomer na oko 70 kDa, IGFBP-3/Tf kompleks na oko 110 kDa i molekuli na većim masama, slično kao na IGFBP-3 imunoblotu.

Anti-IGFBP-3 antitelo proizvođača DSL je bolje razlikovalo dve izoforme IGFBP-3, pa je ono dalje korišćeno za imunoblot. Kao što će biti prikazano u idućim poglavljima, anti-IGFBP-3 antitelo proizvođača Santa Cruz Biotechnology je pokazalo bolje rezultate u eksperimentima imunoprecipitacije, a uspešnost imunoprecipitacije je potvrđivana imunoblotom sa DSL antitelom.

5.1.2 Afinitetna hromatografija sa imobilizovanim metalnim jonima (IMAC) za izolovanje kompleksa IGFBP-3/Tf iz seruma

Kao što je već rečeno, IMAC se koristi za izolovanje molekula koji imaju negativno naelektrisane grupe, što je slučaj sa proteinima [376, 377]. Imajući u vidu dodatne karakteristike IGFBP-3 i Tf, odnosno da mogu direktno vezati metalne jone, testiranje IMAC kao prve metode za izolovanje kompleksa IGFBP-3/Tf je bio logičan izbor. Pošto oba proteina mogu vezati gvožđe [117, 238], metoda je testirana sa imobilizovanim Fe³⁺ jonima. Prisustvo kompleksa na približno 110 kDa u nevezanim i specifično eluiranim frakcijama je praćeno preko IGFBP-3 i Tf imunoblota (na **Slici 10** prikazani su tipični profili imunoreaktivnih proteina).



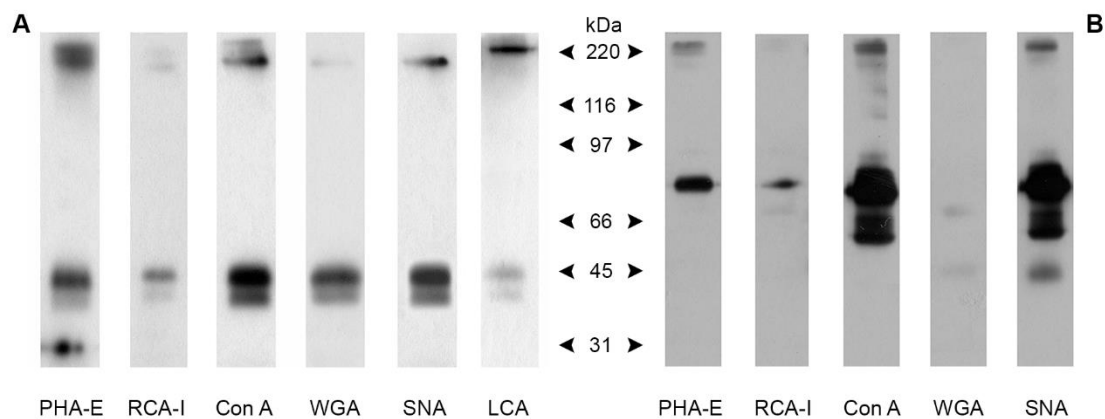
Slika 10. Imunoblot vezane (V) i nevezane (N) frakcije posle IMAC koristeći matriks sa imobilizovanim Fe^{3+} jonima. Imunoreaktivni proteini su prepoznati u interakciji sa anti-IGFBP-3 (**A**), odnosno anti-Tf antitelima (**B**).

Prema rezultatima imunoblota, može se zaključiti da imobilizovani metalni jon prepoznaje sve imunoreaktivne proteinske vrste IGFBP-3 i Tf. Prema tome, IMAC metoda se ne može koristiti za odvajanje IGFBP-3/Tf kompleksa od monomernih komponenti i njihovih fragmenata iz seruma.

5.1.3 Lektinska afinitetna hromatografija (LAC) za izolovanje IGFBP-3/Tf kompleksa iz seruma

Metoda LAC se zasniva na vezivanju glikomolekula, pre svega glikoproteina, koji u svojoj strukturi imaju šećernu komponentu prepoznatljivu od strane imobilizovanog lektina [378, 379]. Pošto su IGFBP-3 i Tf glikoproteini, sa relativno velikim sadržajem ugljenohidratnog dela [122, 258], ideja je bila da se ispita mogućnost selektivnog vezivanja kompleksa za određeni broj lektina. Naime, stvaranjem kompleksa se moglo očekivati da pojedini glikani budu nedostupni za interakciju sa lektinima, što bi poslužilo za diferencijalno izolovanje. Na osnovu literaturnih podataka, odabrano je 11 lektina koji su najčešće korišćeni za analizu ugljenohidratnih komponenti serumskih proteina [380, 381]. Korišćeni lektini su navedeni u poglavlju 3.1 (**Tabela 4**). Prisustvo imunoreaktivnih proteina u nevezanim i eluiranim frakcijama je praćeno imunoblotom.

Rezultati IGFBP-3 i Tf imunoblota su pokazali da je, od 11 lektina, 6 prepoznalo IGFBP-3, a 5 Tf iz seruma (**Slika 11**, reprezentativni profili imunoreaktivnih proteina).



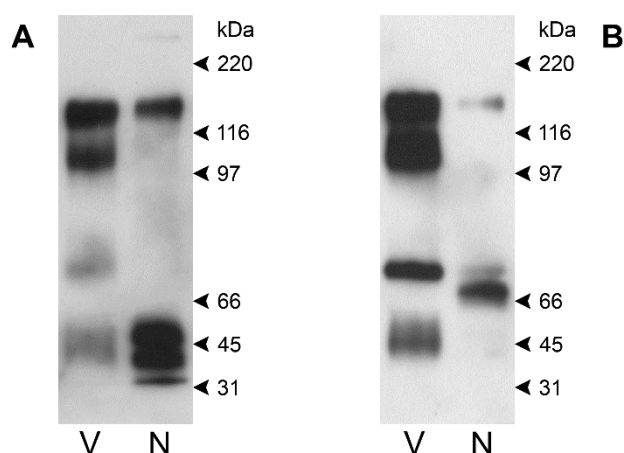
Slika 11. Imunoblot vezanih frakcija posle LAC koristeći lektine čiji je identitet naveden na samoj slici. Imunoreaktivni proteini su prepoznati u interakciji sa anti-IGFBP-3 (**A**), odnosno anti-Tf antitelima (**B**).

Ni jedan od lektina, koji su uspešno vezali monomere IGFBP-3 i Tf, nije prepoznao i vezao (barem ne u merljivim količinama) kompleks IGFBP-3/Tf. Takođe, u nevezanim frakcijama (koje ovde nisu prikazane) detektovano je prisustvo svih imunoreaktivnih vrsta. Pored toga što je kompleksa relativno malo, pretpostavka je da su glikani u kompleksu možda manje dostupni lektinima u LAC ili je (što je verovatnije) afinitet lektina prema monomerima IGFBP-3 i Tf znatno veći od afiniteta prema glikanima u IGFBP-3/Tf kompleksu. Zaključeno je da se metoda LAC ne može koristiti za razdvajanje kompleksa od ostalih srodnih molekulskih vrsta.

5.1.4 Imunoafinitetna hromatografija za izolovanje kompleksa IGFBP-3/Tf iz seruma

Pošto se pokazalo da su afinitetne tehnike koje se zasnivaju na vezivanju za metalni jon ili za lektin neupotrebljive za izolovanje kompleksa IGFBP-3/Tf, sledeća metoda koja je testirana se zasnivala na imunoafinitetnom prepoznavanju [382], odnosno imunoafinitetna hromatografija (IAC). Korišćen je komercijalni komplet IgY-ProteomeLab[®], koji je sadržao smolu na kojoj su imobilizovana, pored ostalih, anti-Tf antitela. Ideja je bila da se utvrdi da li se kompleks IGFBP-3/Tf može vezati za anti-Tf antitela, pa naknadno odvojiti od slobodnog Tf ili, alternativno, da li kompleks ostaje u nevezanoj frakciji, pa se može naknadno odvojiti od IGFBP-3. Kao i u prethodnim

eksperimentima, prisustvo IGFBP-3 i Tf u nevezanim i vezanim frakcijama je utvrđivano imunoblotom (**Slika 12**, reprezentativni profili imunoreaktivnih proteina).



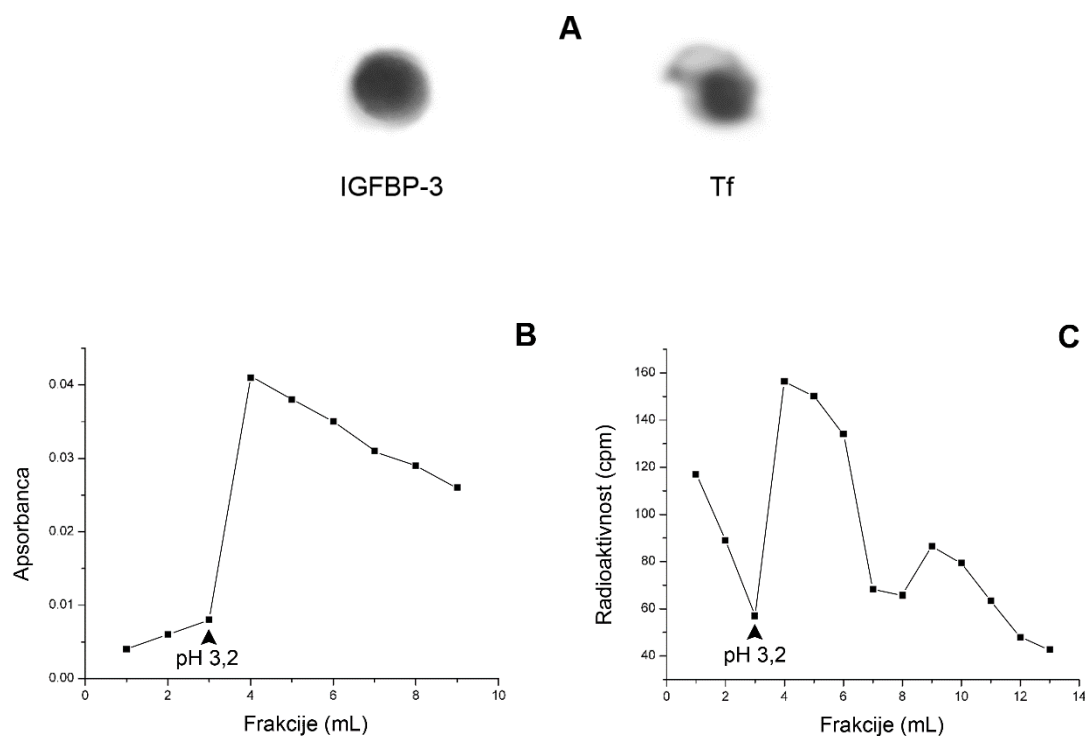
Slika 12. Imunoblot vezane (V) i nevezane (N) frakcije posle IAC koristeći matriks IgY-ProteomeLab[®], sa imobilizovanim anti-Tf antitelima. Imunoreaktivni proteini su prepoznati u interakciji sa anti-IGFBP-3 (**A**), odnosno anti-Tf antitelima (**B**).

Rezultati su pokazali da je monomer IGFBP-3 bio, uglavnom, prisutan u nevezanoj frakciji, dok su se u vezanoj frakciji nalazili monomer i fragment Tf, kompleksi IGFBP-3/Tf, kao i imunoreaktivni molekul (sa oba antitela) mase veće od mase kompleksa. Interesantno je bilo konstatovati da je ova smola vezala samo izoformu Tf koja je bila više glikozilovana, dok je forma manje mase ostala nevezana [258, 259]. IGFBP-3 imunoblot vezane frakcije je prepoznao u tragu IGFBP-3. Pošto afinitetna kolona, prema specifikaciji proizvođača, nije imala antitela specifična za IGFBP-3, može se pretpostaviti da je IGFBP-3 u vezanoj frakciji poticao iz kompleksa sa proteinima koji su se specifično vezali za kolonu (a do otpuštanja je došlo tokom postupka eluiranja u kiseljoj sredini ili tokom pripreme uzorka za elektroforezu).

Iako testirana IAC metoda nije razdvojila komplekse IGFBP-3/Tf od ostalih imunoreaktivnih vrsta, ukazala je na prednost imunoafinitetnog pristupa u odnosu na druge tehnike. Odlučeno je da se dalje u radu ispituju mogućnosti izolovanja kompleksa primenom nekoliko imunoafinitetnih metoda.

5.1.5 Preparativna imunoafinitetna hromatografija za izolovanje IGFBP-3/Tf kompleksa iz seruma

Prethodno iskustvo sa IAC, uz upotrebu komercijalne smole sa imobilizovanim različitim antitelima, uključujući i anti-Tf, podstaklo je dalji pokušaj izolovanja kompleksa (zajedno sa Tf) ovom metodom. Frakcija IgG izolovana iz anti-Tf seruma je imobilizovana na sefarozu 4B koja je aktivirana reagensom CNBr, a zatim je propušten serum. Sa specifično eluiranim frakcijama je urađena standardna SDS-PAGE i IGFBP-3 imunoblot, ali nije bilo jasno vidljivih traka. Urađen je, zatim, dot blot sa anti-IGFBP-3 i Tf antitelima, koji je dao signale, čime je potvrđeno prisustvo ova dva molekula u eluatima (**Slika 13A**). Pošto bi jedan od razloga za slab signal u imunoblotu bila mala količina eluiranih proteina, izmerena je apsorbancija na 280 nm u eluiranim frakcijama (**Slika 13B**), što je potvrdilo izuzetno malu količinu proteina. Iako ovaj pristup nije bio obećavajući za izolovanje IGFBP-3/Tf kompleksa, dodatno je urađena IAC posle inkubacije uzorka seruma sa radioaktivno obeleženim ligandom ^{125}I -IGF-I/II, da se proveriti da li se kompleks IGFBP-3/Tf uopšte vezao za smolu. Merenjem radioaktivnosti u eluiranim frakcijama potvrđeno je prisustvo ^{125}I -IGF/IGFBP-3/Tf kompleksa, ali u tragu (**Slika 13C**).

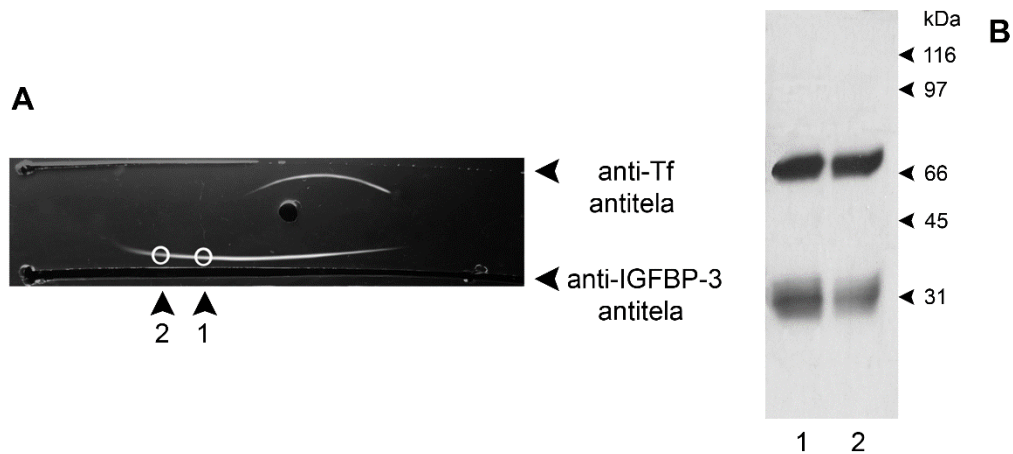


Slika 13. Dot blot vezane frakcije posle preparativne IAC koristeći matriks sa imobilizovanim anti-Tf antitelima. Imunoreaktivni proteini su prepoznati u interakciji sa anti-IGFBP-3, odnosno anti-Tf antitelima (**A**). Prisustvo proteina u vezanoj frakciji je praćeno merenjem A_{280} (**B**), a kompleksa ^{125}I -IGF/IGFBP-3/Tf merenjem gama radioaktivnosti (**C**).

Prinos eluiranih proteina u ovoj IAC je bio jako mali, a mogući razlog za ovakav rezultat je nepovoljna orijentacija anti-Tf antitela prilikom imobilizacije za smolu. Smola aktivirana reagensom CNBr vezuje amino grupe proteina što su, u slučaju antitela, to i N-terminalni krajevi na kojima su antigen vezujuća mesta [383, 384]. Na osnovu ovog eksperimenta je zaključeno da anti-Tf antitela koja su korišćena mogu vezati IGFBP-3/Tf komplekse i poslužiti za imunoafinitetno izolovanje, ali da je za dobar prinos neophodno koristiti smolu koja je aktivirana na način kojim se ne imobilizuju antitela prevashodno preko N-terminalnih amino grupa.

5.1.6 Imunoelektroforeza za izolovanje IGFBP-3/Tf kompleksa iz seruma

Metodom imunoelektroforeze (IEP) su proteini prvo elektroforetski razdvojeni, a zatim detektovani imunoprecipitacijom u samom gelu specifičnim antitelima [385]. Cilj je bio da se ispita mogućnost detekcije i izolovanja IGFBP-3/Tf kompleksa iz imunoprecipitiranih traka. Imunoprecipitati nastali upotrebom anti-IGFBP-3 i anti-Tf antitela su bili različiti, po položaju, obliku i količini. Sa **Slike 14A** (reprezentativni uzorci) se može videti da postoji segment IGFBP-3 precipitacione linije koji je u oblasti gela gde nema precipitata sa anti-Tf antitelima, pa je odlučeno da se potencijalno prisustvo IGFBP-3/Tf kompleksa traži u tom segmentu. Delovi gela označeni na **Slici 14A** kao uzorci 1 i 2 su isečeni i analizirani metodom IGFBP-3 imunoblota. Na **Slici 14B** se vidi da su u ovim uzorcima prisutni neki IGFBP-3 molekularni oblici, ali da ni jedan nije kompleks IGFBP-3/Tf (pretežno dimeri i fragmenti i/ili neglikozilovani IGFBP-3).



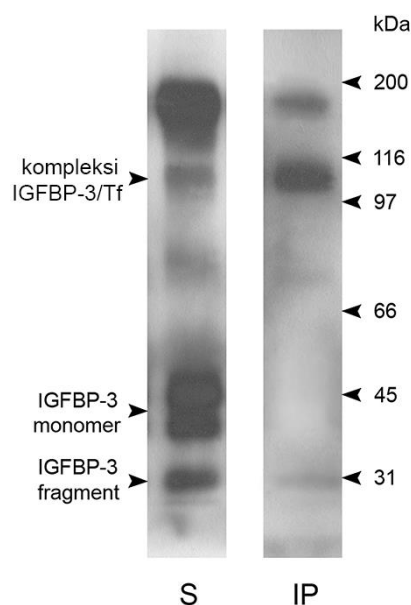
Slika 14. Imunoelektroforegram proteina seruma koji su prepoznati u interakciji sa anti-IGFBP-3, odnosno anti-Tf antitelima (A). Segmenti imunoprecipitacione linije sa anti-IGFBP-3 antitelom, 1 i 2, su analizirani metodom imunoblota sa anti-IGFBP-3 antitelom (B).

Iako su se mogli dalje analizirati još neki segmenti imunoprecipitata, na osnovu ovih prvih rezultata je zaključeno da je verovatnoća izolovanja samo kompleksa IGFBP-3/Tf na ovaj način mala i prešlo se na sledeći imunoafinitetni pristup.

5.1.7 Imunoprecipitacija IGFBP-3/Tf kompleksa iz seruma

Koristeći sva dosadašnja eksperimentalna iskustva, a posebno sa IAC, pristupilo se izolovanju kompleksa IGFBP-3/Tf koristeći imunoafinitetni princip, ali uz upotrebu komercijalne smole u okviru Co-Immunoprecipitation® kompleta reagenasa, koja je deklarirana za namensku imobilizaciju antitela. Za ovu smolu je navedeno da je raspored aktivnih grupa takav da imobilizacija antitela daje mogućnost prepoznavanja epitopa kako na pojedinačnim proteinima, tako i na proteinima u okviru kompleksa [386]. Ovaj postupak izolovanja izveden je uz centrifugiranje smole (a ne na koloni), te je nazvan imunoprecipitacija.

Prema uputstvu proizvođača su imobilizovana anti-Tf i obe vrste anti-IGFBP-3 antitela. Serumi su ostavljeni da interaguju sa imunoafinitetnim smolama, a specifično vezani proteini su eluirani i analizirani metodom SDS-PAGE i imunoblota. Pokazalo se da sva imobilizovana antitela prepoznaju svoje specifične epitope i to na svim molekulskim formama, uključujući i IGFBP-3/Tf komplekse. Dalje je urađena dvostruka imunoprecipitacija, tako što su eluati posle prvog koraka ostavljeni da interaguju sa smolom na kojoj je bila druga vrsta antitela. Isprobane su sve kombinacije i konstatovano je da se kombinacijom u kojoj se prvo izoluju Tf imunoreaktivni proteini, a zatim IGFBP-3 primenom Santa Cruz antitela, dobijaju najčistiji preparati IGFBP-3/Tf kompleksa. IGFBP-3 imunoblot sa anti-IGFBP-3 antitelima (proizvođača DSL) izolovanog kompleksa IGFBP-3/Tf je prikazan na **Slici 15** (zajedno sa uzorkom polaznog seruma).



Slika 15. Imunoblot kompleksa IGFBP-3/Tf izolovanog imunoprecipitacijom (IP) i proteina seruma (S) sa anti-IGFBP-3 antitelom.

Pored kompleksa IGFBP-3/Tf, koji se prema očekivanju nalazi na masi oko 110 kDa, na imunoblotu su detektovani i molekuli većih masa, kao i tragovi proteina na masi oko 30 kDa (verovatno fragmenti nastali tokom izolovanja kompleksa). Densitometrijska analiza je pokazala da je zastupljenost kompleksa IGFBP-3/Tf na oko 110 kDa u odnosu na celokupan signal oko 80%, što je najveći do sada postignut stepen čistoće izolovanih IGFBP-3/Tf kompleksa. Identitet imunoreaktivne trake na većoj masi je ostao

nepoznanica. Činjenica je da je ta proteinska forma interagovala sa anti-IGFBP-3 i anti-Tf antitelima (nije posledica nespecifičnih interakcija sekundarnih antitela, što je testirano). Moglo bi se pretpostaviti da je reč o dimeru kompleksa ili asocijaciji sa neravnopravnim brojem IGFBP-3 i Tf podjedinica, ali za to trenutno nema dokaza. U svakom slučaju, preparat dobijen dvostrukom imunoprecipitacijom je u daljem radu smatran izolatom kompleksa IGFBP-3/Tf i korišćen je za kvantitativnu i kvalitativnu analizu kompleksa.

5.2 Karakterizacija izolovanog IGFBP-3/Tf kompleksa iz seruma zdravih osoba

5.2.1 Značaj metalnog jona za stvaranje i interakcije IGFBP-3/Tf kompleksa

Poznato je da je Tf glavni transportni protein za jone gvožđa u cirkulaciji [251], a pored gvožđa je sposoban da veže i druge metalne jone [263, 264]. Tf, prema tome, učestvuje u homeostazi fizioloških metalnih jona, obezbeđuje njihov transport i rezervoar, a može imati i ulogu u detoksifikaciji, uklanjajući ih iz cirkulacije [250, 267]. Kinetičke studije su pokazale da različiti joni mogu ispoljiti alosterni efekat prilikom vezivanja za Tf. Naime, prisustvo vezanog jona Cr^{3+} ili Ni^{2+} za Tf podstiče vezivanje jona gvožđa [387]. Takođe je eksperimentalno pokazano da se ćelijska internalizacija Tf odvija drugačijom brzinom u prisustvu različitih jona [263], što je važno za unutarćelijski transport i koncentrovanje određenih vrsta jona. Kod zdravih ljudi je oko 30% Tf u cirkulaciji zasićeno jonima gvožđa [256], što ostavlja mogućnost drugim metalnim jonima da se vežu i transportuju u organizmu.

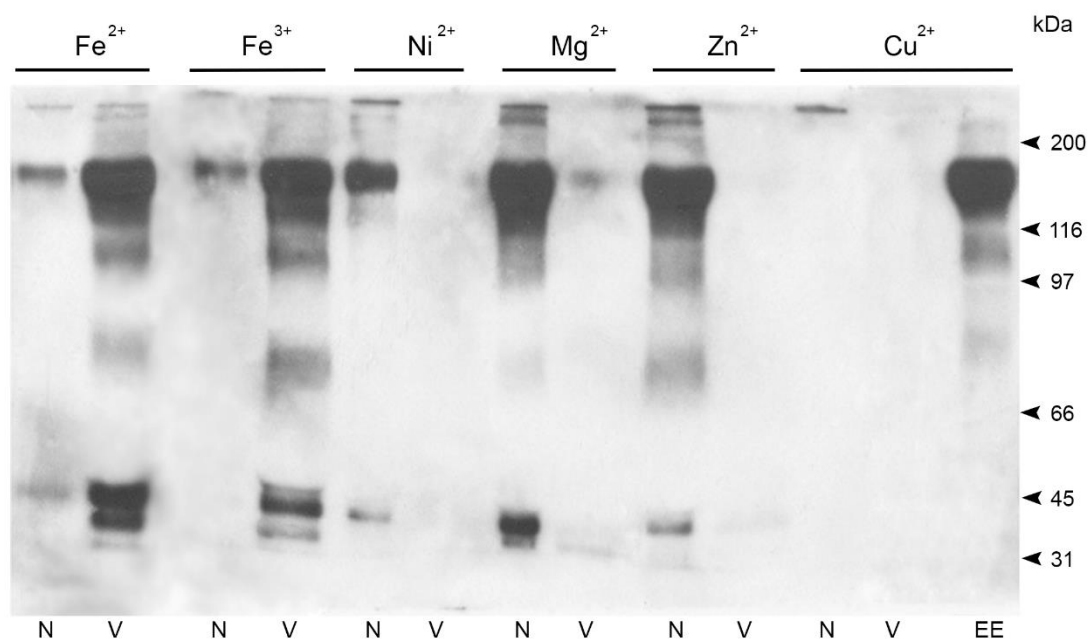
Molekul IGFBP-3 ima domen sposoban da veže jone metala, MBD [117]. Fiziološki značaj ove interakcije je još uvek nepoznat. Nezavisno od interakcije sa metalnim jonima, pokazano je da povećano prisustvo jona Cd^{2+} u cirkulaciji utiče na smanjenje koncentracije IGFBP-3 i IGF-I [388]. Sa druge strane, višak jona Zn^{2+} , koji je neophodan za sintezu elemenata IGF sistema, ne povećava njihovu sintezu [388]. Singh i saradnici [117] su utvrdili da IGFBP-3 može vezati jone Fe^{3+} , Fe^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Mg^{2+} i Mn^{2+} , ali ne i Ca^{2+} . U slučaju vezivanja Ni^{2+} jona, pokazali su da prisustvo IGF-I u kompleksu sa IGFBP-3 blokira vezivanje ovog jona, a pojavu su objasnili kao posledicu

konformacione nepristupačnosti MBD regiona u molekulu IGFBP-3. Upravo je ova strukturna karakteristika IGFBP-3 predložena da se iskoristiti u terapiji tumora metalnim jonima. Vezivanjem različitih metalnih jona za MBD u IGFBP-3, oni bi se učinili dostupni ćeliji nakon interakcije IGFBP-3 sa svojim vezujućim partnerima na površini ćelije [118, 389, 390]. IGFBP-3 vezan za ćelije ovim putem pokreće mehanizme apoptoze na način koji ne zavisi od IGF peptida. Ustanovljeno je da je za internalizaciju IGFBP-3 posredstvom (ne)specifičnih receptora važan C region IGFBP-3, u kome se nalazi i MBD [120, 391].

U skladu sa svim navedenim, razmišljano je o metalnom jonu kao važnom faktoru za stvaranje kompleksa IGFBP-3/Tf, kao i o mogućem uticaju kompleksa na metabolizam metalnih jona, odnosno na mitogene/metaboličke procese u koje je uključen IGFBP-3. Da bi se stekao uvid u značaj metalnog jona, kako za samu interakciju IGFBP-3 i Tf, tako i za interakciju već formiranog kompleksa i metalnog jona, urađena je serija eksperimenata koristeći različite metalne jone. Ispitivan je uticaj jona Fe^{3+}/Fe^{2+} kao osnovnog fiziološkog liganda molekula Tf, Cu^{2+} i Ni^{2+} , za koje je utvrđeno da se u značajnoj meri vezuju za Tf [263], kao i Mg^{2+} i Zn^{2+} , koji su uobičajeni kofaktori proteina [392, 393] i samim tim prisutni u organizmu u velikim koncentracijama.

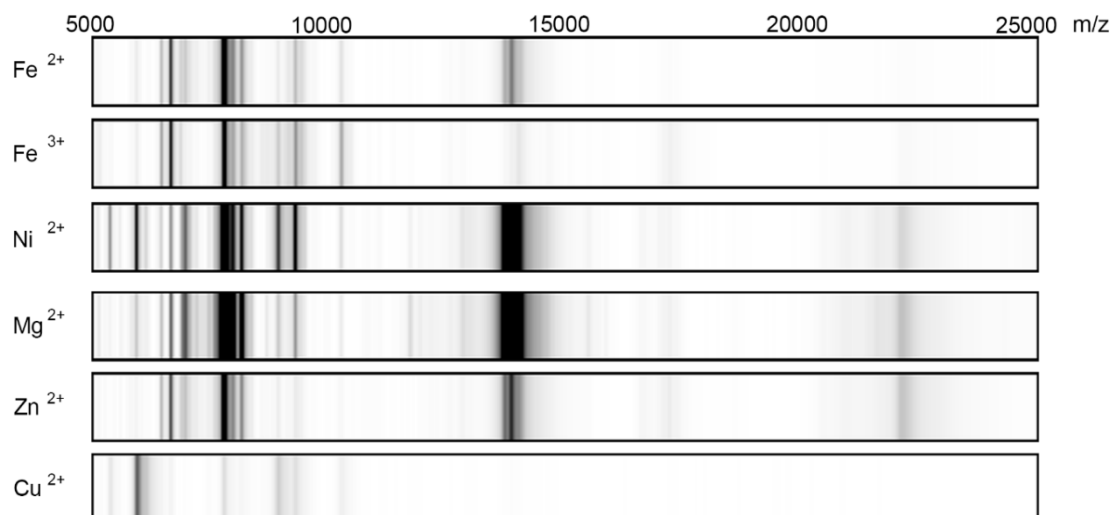
U prvoj grupi eksperimenata je testiran uticaj navedenih metalnih jona imobilizovanih na matriksu (IMAC) na vezivanje kompleksa IGFBP-3/Tf. Specifično eluirani proteini su analizirani imunoblotom sa anti-IGFBP-3 antitelom (Slika 16, reprezentativni profili imunoreaktivnih proteina). Kada su na matriksu bili imobilizovani joni gvožđa, afinitetno je vezana i eluirana najveća količina kompleksa IGFBP-3/Tf. Identičan profil je dobijen sa Fe^{2+} i Fe^{3+} jonima. Pošto su eksperimenti urađeni pod atmosferskim uslovima, vrlo je verovatno da se Fe^{2+} oksidovao do Fe^{3+} u toku rada. U slučaju imobilizovanih jona Ni^{2+} , Mg^{2+} i Zn^{2+} , IGFBP-3 imunoreaktivni proteini se nisu, ili su se u malom procentu, vezali za smolu. Za razliku od Mg^{2+} i Zn^{2+} IMAC eksperimenata, kod Ni^{2+} eksperimenta denzitometrijski zbir imunoreaktivnih traka u nevezanim i vezanim frakcijama je bio manji nego u polaznom uzorku, što je navelo na sumnju da je deo proteina ostao i dalje vezan posle standardnog eluiranja. Na isti način, ali u daleko većoj meri, je primećen „gubitak“ proteina nakon ispiranja i eluiranja proteina sa smole sa imobilizovanim jonima Cu^{2+} . Sa ove poslednje smole su eluirani proteini tek rastvorom EDTA, koji je jak helator jona. Drugim rečima, proteini su eluirani zajedno sa vezanim jonima Cu^{2+} , za koje je poznato da čvrsto interaguju sa polipeptidima [376]. Dobijeni rezultati su pokazali da se kompleksi IGFBP-3/Tf (a i sam IGFBP-3) afinitetno

vezuju samo za neke jone metala i da se potpuno eluiraju pod relativno blagim uslovima (FP) samo sa smole na kojoj su imobilizovani joni gvožđa.



Slika 16. Imunoblot vezanih (V), nevezanih (N) i EDTA eluiranih (EE) frakcija posle IMAC koristeći matrikse sa imobilizovanim metalnim jonima (identitet jona je naveden na slici). Imunoreaktivni proteini su prepoznati u interakciji sa anti-IGFBP-3 antitelom.

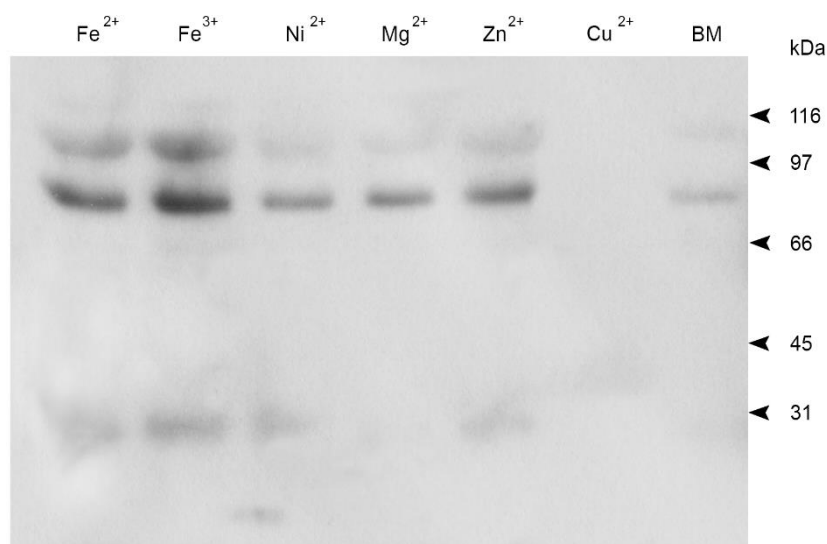
U drugoj grupi eksperimenata su rezultati dobijeni metodom IMAC potvrđeni analizom izolovanih IGFBP-3/Tf kompleksa (dvostrukom imunoprecipitacijom iz seruma zdravih ljudi) metodom masene spektrometrije SELDI-TOF. Korišćen je čip IMAC30, koji na svojoj površini ima helator metala NTA. Imobilizovani su isti metalni joni koji su testirani u IMAC. Kompleksi IGFBP-3/Tf su, nakon interakcije sa čipom IMAC30, jonizovani i fragmentisani. Dobijeni maseni spektri su prikazani na **Slici 17** (reprezentativni profili proteinskih fragmenata).



Slika 17. SELDI-TOF MS analiza IGFBP-3/Tf kompleksa izolovanih imunoprecipitacijom iz uzoraka seruma, koristeći IMAC30 čip sa imobilizovanim metalnim jonima (identitet jona je naveden na samoj slici).

Fragmenti koji potiču od kompleksa IGFBP-3/Tf su se javili u oblasti spektra 5000-25000 m/z, a pošto su svi joni bili jednostruko naelektrisani, to su ujedno bile i mase fragmenata izražene u Da. I u ovom eksperimentu su se, na sličan način kao ranije, grupisali rezultati dobijeni sa pojedinim jonima. Postojala je izvesna sličnost između svih ostalih spektara osim onog dobijenog sa imobilizovanim jonom Cu^{2+} . Sa ovog čipa je jako malo proteinskih fragmenata „letelo“, što potvrđuje jaku interakciju. Ukupni intenzitet svih traka na masenim spektrima dobijenim sa imobilizovanim jonima Ni^{2+} , Mg^{2+} i Zn^{2+} bio je znatno veći od intenziteta traka dobijenih sa čipovima na kojima su vezani joni $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$, što opet ukazuje na jaču interakciju kompleksa sa jonima gvožđa nego sa ovim drugim.

U trećoj seriji eksperimenata je ispitan značaj navedenih metalnih jona za formiranje samih kompleksa IGFBP-3/Tf. U tom cilju su uzorci seruma filtrirani na molekulskim sitima (ultrafiltracija na Millipore filterima). U retenatu na molekulskom situ od 100 kDa pretežno su zaostali kompleksi IGFBP-3/Tf. Filtrat je dalje filtriran na situ od 30 kDa, propuštajući fragmente, a zadržavajući monomere IGFBP-3 i Tf. Retenati na 30 kDa su pojedinačno inkubirani sa jonima Fe^{3+} , Ni^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} i Cu^{2+} preko noći, a zatim je rađena SDS-PAGE praćena imunoblotom. Rezultati IGFBP-3 imunoblota su prikazani na **Slici 18** (reprezentativni profili imunoreaktivnih proteina).



Slika 18. Imunoblot IGFBP-3 reaktivnih vrsta nakon ultrafiltracije i inkubacije retenata na filterima od 30 kDa sa metalnim jonima (identitet jona je naveden na slici). Kontrolni uzorak je retenat bez dodatih metalnih jona (BM).

Imunoblotom je pokazano da su se formirale značajne količine novih kompleksa IGFBP-3/Tf od monomera u prisustvu jona Fe^{3+} , dok je u prisustvu drugih jona taj efekat bio znatno slabiji. Istovremeno sa formiranjem kompleksa, verovatno su dodatno nastali i dimeri IGFBP-3 (traka na molekulskoj masi između markera od 66 i 97 kDa). U slučaju inkubacije uzoraka sa Cu^{2+} jonima nije detektovana ni jedna proteinska traka (provereno bojenjem membrane sa Ponso S bojom), niti jedan imunoreaktivni molekul. Naknadnom proverom gela, utvrđeno je da je došlo do taloženja proteina u gelu za koncentrovanje.

Dalje je testiran efekat različitih koncentracija jona, od sub- do suprafizioloških, za svaki jon pojedinačno. Rezultati su pokazali da nema dozne zavisnosti kada se pređe fiziološka granica koncentracije jona. U slučaju Fe^{3+} jona analiziran je uticaj koncentracija 1-1000 μM , a dobijeni su isti kvantitativni rezultati od koncentracije 10 μM . Ovakav rezultat navodi na pitanje da li svi molekuli IGFBP-3 i Tf mogu graditi kompleks ili samo neki sa karakterističnom mikrostrukturom.

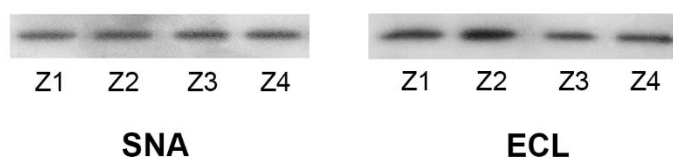
Eksperimentima koji su opisani u ovom poglavlju je potvrđena specifična uloga jona gvožđa u formiranju kompleksa IGFBP-3/Tf, kao i reaktivnost već formiranog kompleksa sa njima. Na osnovu ovih rezultata se može pretpostaviti da kompleksi IGFBP-3/Tf imaju određenu ulogu u metabolizmu gvožđa i da je kompleks deo fiziološke mreže proteina koji vezuju gvožđe u cirkulaciji, zajedno sa Tf, hemoglobinom i feritinom

[297]. U prilog ovde prikazanim rezultatima ide rad Weinzimer-a i saradnika, koji su pokazali da je Tf zasićen gvoždem imao veći afinitet prema IGFBP-3 nego holo Tf [200].

5.2.2 Ispitivanje glikana na izolovanim IGFBP-3/Tf kompleksima

Oba gradivna proteina kompleksa IGFBP-3/Tf su glikoproteini [122, 258]. Poznato je da su glikani odgovorni za tercijarnu strukturu glikoproteina, da su posrednici u interakcijama sa drugim fiziološkim molekulima na površini ćelija (receptorima) koji prepoznaju specifične ugljene hidrate, neki glikani produžavaju poluživot glikoproteina u cirkulaciji (npr. oni sa terminalnom sijalinskom kiselinom), što može imati i pozitivan i negativan opšti efekat (npr. u slučaju tumorskih molekula koji dužim ostankom u telesnim tečnostima podstiču metastazu tumora), a u nekim slučajevima glikani su antigeni [394-398]. Uzevši u obzir sve nabrojano, kao i prethodne rezultate dobijene metodom LAC, prema kojima ni jedan od 11 primenjenih lektina nije bio sposoban da veže i izoluje IGFBP-3/Tf komplekse direktno iz seruma, urađena je analiza šećerne komponente izolovanih kompleksa metodom lektinskog blota, koristeći HRP-konjugovane lektine koji su u LAC eksperimentima prepoznali IGFBP-3 i/ili Tf [399].

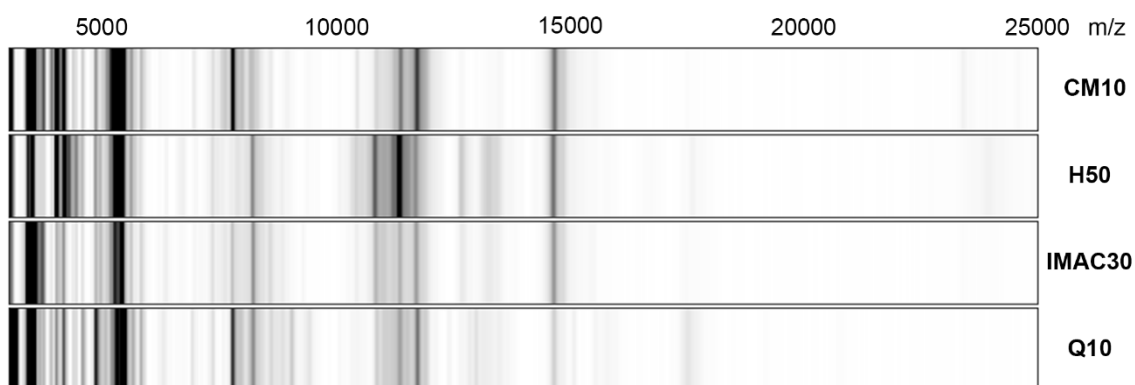
Rezultati su dobijeni samo u lektinskom blotu sa SNA i ECL, čime je utvrđeno da glikani na kompleksima IGFBP-3/Tf sadrže terminalnu sijalinsku kiselinu i Gal β 4GlcNAc (**Slika 19**, lektinski blot za četiri nezavisna uzorka izolovanih kompleksa). Prisustvo drugih ugljenohidratnih struktura, koje su nađene na monomerima IGFBP-3 i Tf, kao što su biantenarni visokomanozni glikani [400, 401], nije potvrđeno na kompleksima.



Slika 19. Lektinski blot IGFBP-3/Tf kompleksa izolovanih imunoprecipitacijom iz uzoraka seruma (Z1-Z4), koristeći SNA, odnosno ECL lektin.

5.2.3 Ispitivanje nekih fizičko-hemijskih karakteristika izolovanog IGFBP-3/Tf kompleksa metodom SELDI-TOF MS

Metoda SELDI-TOF MS se, kao što je već rečeno, zasniva na interakciji ispitivanog proteina sa čipovima različitih reaktivih površina pre jonizacije i fragmentacije [402-407]. U ovom radu su analizirani izolovani IGFBP-3/Tf kompleksi koristeći čipove sa pozitivnim (CM10) i negativnim naelektrisanjem (Q10), sa hidrofobnom površinom (H50), kao i čipovi sa imobilizovanim metalnim jonima (IMAC30). Na **Slici 20** su prikazani dobijeni maseni spektri za jedan isti uzorak, na četiri vrste čipa. Fragmenti su detektovani u opsegu m/z 3000-25000. Kompleksi IGFBP-3/Tf su se vezivali za sve čipove i analizom spektara se moglo zaključiti da je veliki broj fragmenata bio zajednički na svim čipovima. Drugim rečima, pojedinačni molekuli kompleksa imaju svoje pozitivno i negativno naelektrisane domene, kao i hidrofobni domen. Već ranije je ustanovljeno da se kompleksi IGFBP-3/Tf vezuju za metalne jone.



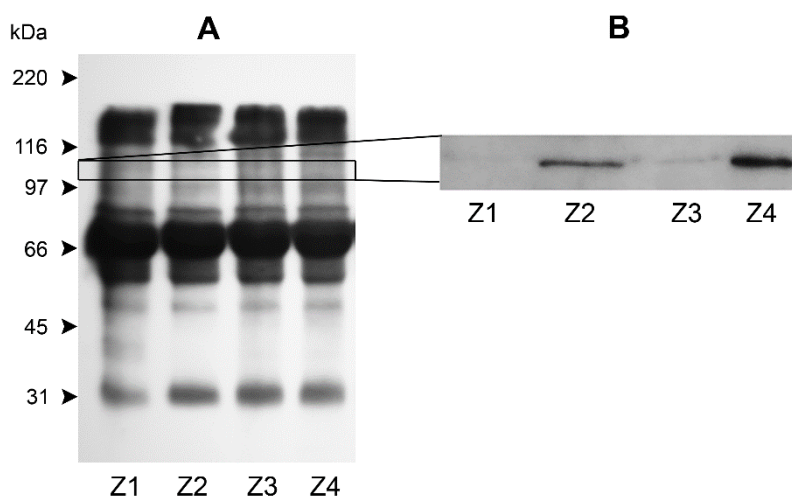
Slika 20. SELDI-TOF MS analiza IGFBP-3/Tf kompleksa izolovanih imunoprecipitacijom iz uzoraka seruma, koristeći čipove sa različitim reaktivnim površinama (identitet čipova je naveden na samoj slici).

5.2.4 Ispitivanje prisustva karbonilnih grupa na izolovanim IGFBP-3/Tf kompleksima

Karbonilne grupe na proteinima mogu biti prisutne kao sastavni deo osnovne strukture polipeptidnog lanca (ostaci Asp, Glu, deo peptidne veze), a mogu nastati i oksidacijom aminokiselinskih ostataka već formiranog polipeptida ili oksidativnim

cepanjem peptidnog lanca [408]. Pošto će u nastavku ovog rada biti ispitivan uticaj oksidativnog stresa kod pacijenata sa tumorom debelog creva na strukturu kompleksa IGFBP-3/Tf, bilo je neophodno utvrditi prisustvo karbonila u kompleksima izolovanim iz seruma zdravih ljudi.

Prisustvo karbonila je određivano nakon DNP derivatizacije proteina seruma, a zatim imunoprecipitacije kompleksa IGFBP-3/Tf. Ovaj redosled je bio neophodan (umesto najpre izolovanja, te derivatizacije kompleksa), pošto se derivatizacijom stabilizuju karbonilne grupe, pa se dalje ne menjaju u postupku izolovanja. Istovremeno se izbegava da se oksidativne promene, do kojih može doći u postupku izolovanja, registruju kao primarne u strukturi [164]. DNP derivatizovane grupe su detektovane u imunoblotu sa anti-DNP antitelom (Slika 21, reprezentativni profili derivatizovanih proteina u četiri nezavisna uzorka seruma i u IGFBP-3/Tf kompleksima izolovanih iz ovih seruma).



Slika 21. Imunoblot DNP derivatizovanih proteina seruma (A) i izolovanih kompleksa IGFBP-3/Tf (B). Imunoreaktivni proteini su prepoznati u interakciji sa anti-DNP antitelom. Uzorci zdravih osoba su izabrani tako da pokazuju opseg dobijenih rezultata.

5.3 Određivanje koncentracije IGFBP-3/Tf kompleksa u serumu zdravih odraslih osoba

Koncentracija kompleksa IGFBP-3/Tf određena je merenjem koncentracije IGFBP-3 komercijalnim ELISA testom preparata IGFBP-3/Tf koji je izolovan

dvostrukom imunoprecipitacijom iz uzoraka seruma zdravih odraslih osoba (n=112). Metoda za izolovanje kompleksa je prethodno optimizovana, tako da je izolovana celokupna količina kompleksa iz date zapremine seruma. Istovremeno su u uzorcima seruma određene koncentracije i odnosi ostalih parametara važnih za metabolizam gvožđa: slobodnih jona gvožđa, Tf, TIBC (ukupni kapacitet vezivanja gvožđa), hemoglobina, feritina, IGFBP-3, ukupnih proteina, odnosa IGFBP-3/Tf. Rezultati su prikazani u **Tabeli 5**.

Tabela 5. Određivanje biohemijskih parametara važnih za metabolizam gvožđa (n=112).

Mereni parametar (jedinice)	Zdrave osobe (X ± SD)	Referentni opseg
Gvožđe (µM)	18,9 ± 2,82	Muškarci: 11 – 27 Žene: 7 – 26
Transferin (g/L; mM)	2,8 ± 0,37; 34 ± 4,0	2,0 – 3,6; 24 – 44
TIBC (µM)	61,5 ± 6,22	46 – 75
Gvožđe/TIBC (% zasićenosti)	31,7 ± 3,1	Muškarci: 20 – 50 Žene: 17 – 45
Hemoglobin (g/L)	133 ± 8,2	Muškarci: 130 – 180 Žene: 110 – 160
Feritin (mg/L)	74 ± 30,2	Muškarci: 28 – 280 Žene: 4 – 82
IGFBP-3 (mg/L; nM)	3,7 ± 0,76; 77 ± 18,6	2,0 – 7,6; 45 – 169
Ukupni proteini (g/L)	77,1 ± 5,91	62 – 81
IGFBP-3/Tf odnos (mmol/mol)	2,3 ± 0,56	Nije određen
IGFBP-3 u kompleksu sa Tf (µg/L; nM)	241 ± 62; 5,4 ± 1,02	Nije određen

Određivanjem međusobnog odnosa IGFBP-3 i Tf pokazano je da je koncentracija IGFBP-3 u serumu oko 1000 puta manja od koncentracije Tf, tako da se može zaključiti

da je IGFBP-3 determinanta koja presuđuje koja će količina kompleksa IGFBP-3/Tf biti formirana. Drugim rečima, koncentraciju kompleksa u serumu treba određivati preko koncentracije IGFBP-3, što je i učinjeno. Takođe, zbog opsega koncentracija koje se mere, test za IGFBP-3 je osetljiviji od testa za Tf. Na osnovu izmerene koncentracije IGFBP-3 u izolovanim kompleksima sa Tf mogao se dalje izračunati udeo IGFBP-3 u kompleksima u odnosu na ukupni IGFBP-3 u cirkulaciji i on je iznosio 5-7%. Ovaj udeo nije zanemarljiv kad govorimo o fiziološkim uslovima.

5.4 Uticaj intenzivne fizičke aktivnosti na koncentraciju kompleksa IGFBP-3/Tf u serumu zdravih osoba

Kod sportista koji redovno treniraju povećava se potreba organizma za kiseonikom, što se u dugotrajnom smislu odražava na zasićenje hemoglobina kiseonikom i koncentraciju hemoglobina, a posredno i na sve ostale proteine koji učestvuju u metabolizmu gvožđa [307-313, 409, 410]. Podaci koji se odnose na koncentraciju IGF-I i IGFBP-3 su kontradiktorni. Naime, u studijama na sportistima koji su trenirali različite sportove nađena su i povećanja i smanjenja koncentracija IGF-I i IGFBP-3, a po nekim rezultatima uopšte nije bilo promena [300-306]. Pokazalo se da su dužina i tip vežbanja (aerobni/anaerobni, vežbe snage/izdržljivosti), vrsta sporta koji se trenira, kao i trenutak uzorkovanja (pre/u toku/posle treninga, posle pauze od par dana u vežbanju, tokom redovne igračke sezone i tokom intenzivnih priprema) od velikog uticaja na rezultate merenja, te da se saznanja o promenama (ili njihovom izostanku) ne smeju uopštavati. Trebalo bi imati u vidu da se tokom vežbanja intenziviraju katabolički procesi praćeni povećanom proteolitičkom, citokinskom i hormonskom aktivnošću, pa je krajnji efekat svakako zbir dugoročnih i trenutnih uticaja.

Pošto je fiziološka uloga kompleksa IGFBP-3/Tf nepoznata, a dosadašnji rezultati ovog rada su ukazali na njihovu ulogu u metabolizmu gvožđa, ideja je bila da se ispita da li se koncentracija kompleksa IGFBP-3/Tf u cirkulaciji menja kod sportista u toku velikog fizičkog napora. Kao model grupa analizirane su rukometašice prvoligaškog tima iz Srbije, koje su radile test opterećenja trčanjem na traci. Tokom testa je mereno VO_2 , a uzorci krvi su vađeni pre testa, kod dostizanja VO_{2max} i 10 minuta nakon testa. Testovi opterećenja i uzorkovanja su urađeni u dve prilike, posle redovne igračke sezone i posle

mesec dana intenzivnih priprema u kampu, pod nadzorom trenera i lekara. Pri tome, od svake osobe je uzeto šest uzoraka krvi.

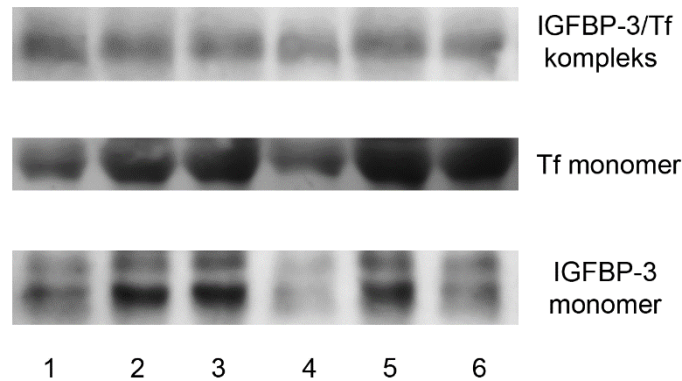
Antropometrijski parametri rukometašica se nisu značajno promenili posle priprema, kao ni koncentracija gvožđa u serumu, što se vidi iz **Tabele 6** (uzorci uzeti pre izvođenja testa opterećenja). Sa druge strane, došlo je do povećanja koncentracije hemoglobina. Pošto su izmerene koncentracije gvožđa pre i posle priprema bile slične, a koncentracija hemoglobina se povećala, može se pretpostaviti da je došlo do povećanja koncentracije gvožđa tokom priprema, ali je ono upotrebljeno za sintezu hemoglobina.

Tabela 6. Antropometrijski i biohemijski parametri rukometašica pre i posle priprema na planini.

Karakteristika	Pre priprema	Posle priprema
Godine	17 ± 1,1	17 ± 1,2
Visina (cm)	171 ± 7,7	172 ± 7,5
Težina (kg)	65 ± 8,1	66 ± 9,1
BMI (kg/m²)	22 ± 1,2	23 ± 2,2
Procenat masti (%)	23 ± 4,4	22 ± 5,3
Telesna voda (kg)	36 ± 5,2	37 ± 5,2
Koncentracija hemoglobina (g/L)	116 ± 8,2	125 ± 7,9*
Koncentracija gvožđa (µM)	13,8 ± 5,53	14,1 ± 6,31

*Statistički značajna razlika između dva termina uzorkovanja (p<0.05).

Prisustvo IGFBP-3, Tf i kompleksa IGFBP-3/Tf je praćeno u uzorcima seruma metodom imunoblota. Na **Slici 22** su prikazani reprezentativni profili imunoreaktivnih proteina za jednu osobu (uzorci 1-3 su uzeti pre priprema, a 4-6 posle).



Slika 22. Imunoblot proteina seruma iste osobe pre (1-3) i posle priprema (4-6). Uzorci 1 i 4 su uzeti pre testa opterećenja, 2 i 5 za vreme testa pri dostizanju VO_{2max} , a 3 i 6 10 minuta posle završetka testa. Imunoreaktivni proteini su prepoznati u interakciji sa anti-IGFBP-3, odnosno anti-Tf antitelom.

Denzitometrijska analiza je pokazala da se koncentracije IGFBP-3 i Tf u uzorcima uzetim pre i posle priprema (upareni uzorci prema periodu uzorkovanja) ne razlikuju značajno. Na **Slici 22** se vidi da se koncentracije IGFBP-3 i Tf povećavaju kod maksimalnog opterećenja (uzorci 2 i 5), dok je koncentracija IGFBP-3/Tf kompleksa ostala gotovo nepromenjena tokom testa. Takođe, nije bilo razlike između testa izvedenog pre i posle priprema. Na osnovu ovih rezultata bi se moglo zaključiti da IGFBP-3/Tf kompleks nema ključnu ulogu u metabolizmu gvožđa kod ove grupe sportista.

5.5 Ispitivanje fiziološke uloge kompleksa IGFBP-3/Tf

Svi dosadašnji rezultati upućuju na povezanost IGFBP-3/Tf kompleksa i metabolizma gvožđa. Da bi gvožđe moglo da ispuni svoju fiziološku ulogu, pre svega da postane sastavni deo proteinskih kompleksa koji imaju specifične funkcije u organizmu, neophodno ga je transportovati do ćelija u kojima se koristi. Kao što je već rečeno, Tf je glavni nosilac jona gvožđa, a internalizuje se u ćelije posredstvom transferinskog receptora [281]. Ovaj receptor postoji u rastvornom obliku u cirkulaciji i vezan za membrane velikog broja ćelija [276-280]. Postoje dva tipa receptora TfR1 i TfR2, koji se ne razlikuju značajno u strukturi. TfR1 je glavni receptor za Tf i njegova uloga u

internalizaciji Tf je potvrđena. Tfr2 je nađen na ćelijama jetre [280], u malom broju u poređenju sa Tfr1, i njegova uloga u regulaciji metabolizma gvožđa deluje zanemarljivo.

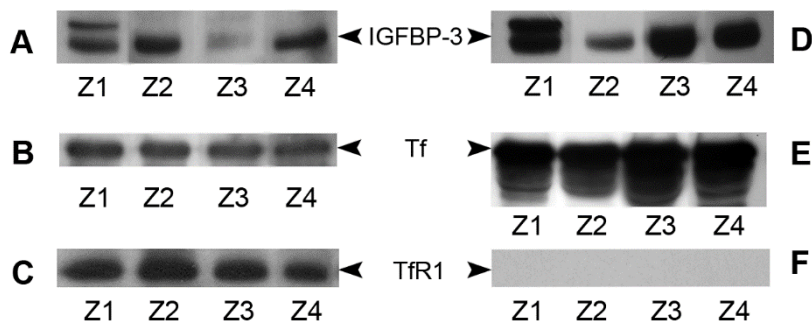
Različite ćelije su sposobne da sintetišu IGFBP-3 i izlučuju ga u okolinu, što je već navedeno u Uvodu [60, 99-102]. Jedna od uloga IGFBP-3, koja nije povezana sa IGF prisustvom, je kontrola i podsticanje apoptoze ćelija kada dođe vreme za njihovo uklanjanje [95, 98, 162, 165, 175]. Pretpostavka je da se IGFBP-3 koji obavlja ovu funkciju doprema u ćeliju iz okoline, mada on ispoljava i autokrino i parakrino dejstvo [178-181]. U ćeliji se dalje transportuje do jedra gde utiče na ekspresiju pro-apoptotskih signalnih molekula. Signalni putevi internalizovanog IGFBP-3 vode do aktiviranja retinoidnog X receptora [204, 358], receptora retinolne kiseline [205, 361] ili mehanizama koji se zasnivaju na aktivaciji NF κ B i p53 [187, 188, 224, 225]. Ako se podsetimo da je uloga IGFBP-3 kao transportera IGF peptida mitogena i anabolička, a IGF nezavisna uloga pro-apoptotska, molekul IGFBP-3 se može videti kao „saobraćajac“ na raskrsnici biohemijjskih puteva koje vode do umnožavanja i rasta ćelija, sa jedne strane, odnosno do ćelijske smrti, sa druge. Koji sve faktori opredeljuju ulogu IGFBP-3 i šta ih kontroliše, ostaje u velikoj meri nepoznanica.

U Uvodu je rečeno da više različitih molekula na ćelijskim membranama mogu vezati IGFBP-3 i učestvovati u njegovoj internalizaciji, međutim mehanizmi i značaj interakcija su uglavnom nepoznati (**Slika 5**) [61, 98, 111, 118, 120, 175, 197]. Nedavno je objavljeno postojanje specifičnog IGFBP-3 receptora, ali iza tog nalaza stoji samo jedna istraživačka grupa i treba sačekati potvrdu rezultata [186]. Jedan od receptora za koji je nađeno da vezuje IGFBP-3 je Tfr posredstvom Tf. Direktno interakcije IGFBP-3 i Tfr nema [120]. Pošto je pretpostavka da su IGFBP-3/Tf kompleksi povezani sa metabolizmom gvožđa, ideja je bila da se utvrdi u kojoj meri se ovi kompleksi vezuju za Tfr na ćelijama, u odnosu na interakcije sa drugim strukturama koje prepoznaju IGFBP-3. Iako postoje radovi u kojima je dokumentovana interakcija IGFBP-3 i Tfr, u svima njima je model sistem ćelijska kultura [120, 200]. Cilj naših istraživanja je bio ispitivanje interakcija na fiziološkom model sistemu, odnosno tkivu čoveka. Izabrano je tkivo debelog creva kao model sistem, s obzirom da epitelne ćelije sintetišu i internalizuju IGFBP-3 i poseduju Tfr na membrani [411, 412]. Kao što je opisano u poglavlju Materijal i metode (3.9), zdravo tkivo debelog creva je dobijeno u postupku odstranjivanja tumora debelog creva pacijentima sa kolorektalnim karcinomom (CRC). Odsustvo tumorskih ćelija u tkivu je potvrđeno histopatološkom analizom u KBC Bežanijska kosa.

5.5.1 Ispitivanje interakcije IGFBP-3/Tf kompleksa sa receptorima na zdravom tkivu debelog creva

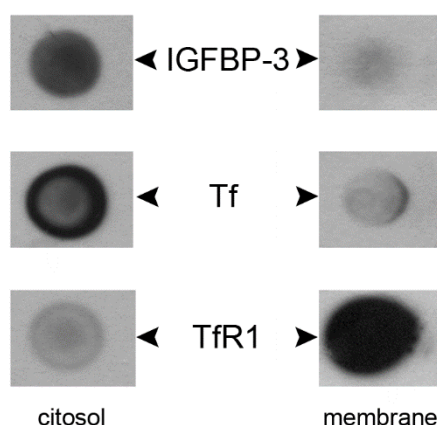
Da bi se ispitala interakcija IGFBP-3/Tf sa TfR, primenjena su dva pristupa: imunoprecipitacija sa imobilizovanim anti-TfR1 antitelom i dvostepeno imunohistohemijsko bojenje tkivnih isečaka koristeći primarna anti-IGFBP-3 i anti-TfR1 antitela i dva sekundarna antitela konjugovana sa dve različite fluorofore. Imunoprecipitacijom su odvojeno analizirane solubilizovane ćelijske membrane i citosolna frakcija, koji su dobijeni nakon homogenizacije tkiva debelog creva i diferencijalnog centrifugiranja. Imunohistohemijsko bojenje je urađeno na parafinskim isečcima tkiva istih osoba.

Pre ovih eksperimenata urađen je imunoblot membranske i citosolne frakcije, da se potvrdi prisustvo IGFBP-3, Tf i TfR1 (**Slika 23**, reprezentativni imunoblotovi za četiri nezavisna uzorka). Imunoblot je dokazao prisustvo monomera IGFBP-3 i Tf, kao i TfR1, dok kompleksi IGFBP-3/Tf nisu bili vidljivi. Iz ovih rezultata se moglo pretpostaviti da kompleksa nema, ili je njihova koncentracija jako mala i ispod detekcionog limita metode imunoblota.



Slika 23. Imunoblot membranske (A-C) i citosolne (D-F) frakcije ćelija izolovanih iz netumorskog (zdravog) tkiva debelog creva. Imunoreaktivni proteini su prepoznati u interakciji sa anti-IGFBP-3 (A, D), anti-Tf (B, E), odnosno anti-TfR antitelima (C, F).

Za potrebe eksperimenta imunoprecipitacije, anti-TfR1 antitela su imobilizovana na smoli iz kompleta Pierce Co-Immunoprecipitation® i omogućeno je proteinima iz membranske i citosolne frakcije da interaguju (iste polazne koncentracije). U eluatu sa smole je imunoblotom detektovano prisustvo IGFBP-3, Tf i TfR1 (**Slika 24**, zbirni uzorak za sva tkiva).

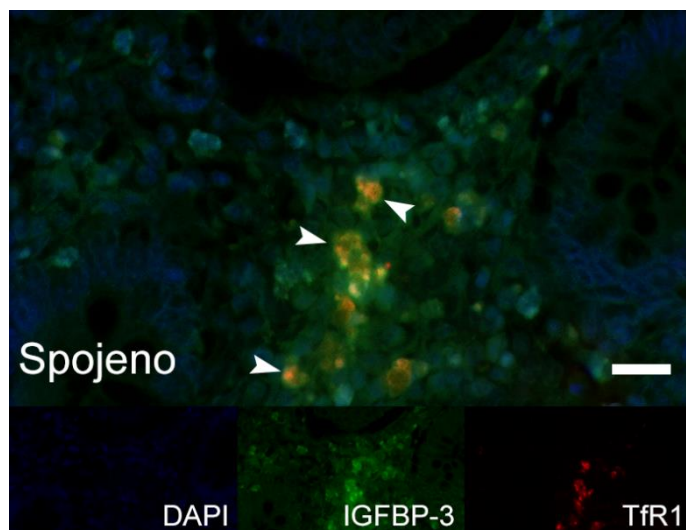


Slika 24. Dot blot citosolne i membranske frakcije ćelija izolovanih iz netumorskog (zdravog) tkiva debelog creva. Imunoreaktivni proteini su prepoznati u interakciji sa anti-IGFBP-3, anti-Tf, odnosno anti-TfR antitelima.

Sa slike se vidi da je (očekivano) neuporedivo više TfR1 na membrani nego u citosolu (frakcija internalizovanih TfR1), da je zasićenje membranskih receptora sa Tf neuporedivo manje nego u slučaju citosolnih TfR1 (internalizuju se receptori tek po vezivanju Tf) i da je u oba slučaja prisutan IGFBP-3 (znatno više u citosolu, u kompleksu sa Tf).

U eksperimentima imunohistohemijske detekcije, na tkivnim preparatima je dvostepeno testirano prisustvo IGFBP-3, uz primarna kozija antitela i sekundarna anti-koziji IgG antitela konjugovana sa fluorescentnom bojom AlexaFluor® 488 (emisija zelene svetlosti), a zatim prisustvo TfR1, uz primarna kunićeva antitela i sekundarna anti-kunić IgG antitela konjugovana sa fluorescentnom bojom AlexaFluor® 555 (emisija crvene svetlosti). Koristeći imunofluorescentni mikroskop, nezavisno je detektovan položaj IGFBP-3 i TfR1 molekula, a zatim su polja preklapljena dajući žuto-narandžasti signal na mestima ko-lokalizacije IGFBP-3 i TfR1 (**Slika 25**, reprezentativni prikaz za isti tkivni preparat). Uočen je veliki stepen ko-lokalizacije ova dva molekula na ćelijskom nivou (na membranama i unutar ćelija), što upućuje na pretpostavku da je put

internalizacije kompleksa IGFBP-3/Tf pretežno preko TfR1, ali i da je vezivanje egzogenog IGFBP-3 za ćeliju u najvećoj meri preko ovog kompleksa, a ne preko drugih struktura koje prepoznaju IGFBP-3 (slab fluorescentni signal IGFBP-3 nezavisan od TfR1). Prisustvo Tf nije dokazano, pošto se IGFBP-3 može vezati za TfR samo posredstvom Tf, te se ono u ovom slučaju podrazumevalo. Radi provere nespecifičnih interakcija, kontrolni isečci su inkubirani sa odgovarajućim ne-imunim serumom, umesto primarnih antitela, a rezultat je bio potpuno odsustvo fluorescentnog signala.



Slika 25. Imunohistochemijska detekcija prisustva IGFBP-3 i TfR1 u netumorskom (zdravom) tkivu debelog creva i potvrda njihove ko-lokalizacije (označeno strelicama). Razmerna crta predstavlja dužinu od 20 μ m.

Poslednja serija eksperimenata potvrdila je da IGFBP-3/Tf kompleksi obavljaju svoju funkciju posredstvom TfR1 i da je ispoljavaju u sinhronizaciji sa Tf. Da bi se ovi nalazi potvrdili, dalje su rađeni eksperimenti koristeći uzorke osoba sa poremećajem u metabolizmu gvožđa. Pošto je imunohistochemijski ustanovljeno da se ulazak IGFBP-3 u ćeliju odvija prvenstveno preko TfR1 kao medijatora, dalje je ispitana raspodela receptora i kompleksa u tkivu koje potiče od tumora debelog creva.

5.6 Ispitivanje promene strukture i distribucije IGFBP-3/Tf kompleksa kod osoba u određenim patofiziološkim stanjima

U daljem radu su ispitane promene u strukturi i distribuciji IGFBP-3/Tf kompleksa kod osoba sa izrazito malom ili velikom koncentracijom gvožđa u serumu.

Izabrane su grupe ljudi koje nisu imale druge promene u organizmu, a kod osoba sa velikom koncentracijom gvožđa (znatno iznad referentne vrednosti) izabrane su osobe kod kojih još uvek nije došlo do patofizioloških promena tipa hemohromatoze. Na ovaj način je izbegnut mogući uticaj promena na drugim organima (npr. na jetri), što bi se moglo odraziti na IGFBP-3/Tf komplekse kao posledica kombinovanog efekta.

Pored uzoraka osoba sa izraženom anemijom, analizirani su i uzorci osoba sa tumorom debelog creva, serum i tkivo. Pacijenti sa tumorom debelog creva često imaju krvarenja, smanjena im je apsorpcija hranljivih materija u gastrointestinalnom traktu, mogu imati fizičke teškoće pri gutanju, bolove, povraćanje, gubitak apetita [413-418]. Česta posledica je anemija. U odnosu na „običnu“ anemiju, kod ovih pacijenata se aktivira veliki broj biohemijskih puteva kao deo stresnog kataboličkog stanja. Tumorske ćelije debelog creva se dele drugačijom brzinom od zdravih, ekspimiraju drugačiji odnos membranskih i unutarćelijskih molekula [419-423], te je cilj dela eksperimenata bio da ispita prisustvo IGFBP-3/Tf kompleksa i interakciju sa TfR1 u uzorcima tumora.

5.6.1 Isptivanje promene koncentracije IGFBP-3/Tf kompleksa u cirkulaciji osoba sa izmenjenim metabolizmom gvožđa

Kao što je gore navedeno, analizirani su serumi osoba sa anemijom, sa velikom koncentracijom gvožđa i serumi pacijenata sa anemijom izazvanom postojanjem tumora debelog creva. U **Tabeli 7** su prikazani izmereni parametri važni za metabolizam gvožđa. Ovi rezultati su upoređivani sa rezultatima dobijenim kod zdrave populacije (**Tabela 5**), kao i međusobno. Podaci za koncentraciju IGFBP-3/Tf su dobijeni iz imunoprecipitata, na isti način kao i kod zdravih osoba. Statistički značajne razlike su označene.

Tabela 7. Koncentracije i relativni odnosi biohemijskih parametara u cirkulaciji osoba sa povišenom koncentracijom gvožđa (**n=39**), osoba sa anemijom (**n=55**) i osoba sa dijagnostikovanim CRC (**n=97**). Rezultati su dati kao srednja vrednost \pm SD.

Parametar (jedinice)	Osobe sa velikom koncentracijom gvožđa	Osobe sa anemijom	Osobe sa dijagnozom CRC
Gvožđe (μM)	40,8 \pm 3,46*	3,1 \pm 0,87***	5,0 \pm 1,55*
TIBC (μM)	51,9 \pm 6,85	69,6 \pm 13,34***	30,6 \pm 5,36****

Gvožđe/TIBC (% zasićenosti)	83 ± 8,0*	4,0 ± 1,7***	15 ± 4,3****
Hemoglobin (g/L)	141,0 ± 11,7*	94,0 ± 16,8***	85 ± 13,4****
Feritin (mg/L, nM)	108 ± 58,4; 240 ± 128,8*	7 ± 5,4; 16 ± 11,0***	246 ± 103,4; 547 ± 228, 9****
Ukupni proteini (g/L)	73,4 ± 7,95	70,8 ± 6,88	52,9 ± 5,4 ****
Transferin (g/L, mM)	2,3 ± 0,43; 28,6 ± 6,39	3,8 ± 0,38; 48,7 ± 5,99***	1,3 ± 0,29; 14,3 ± 4,95****
IGFBP-3 (mg/L, µM)	4,2 ± 0,66; 96 ± 14,0	3,8 ± 0,55; 85 ± 13,2	1,9 ± 0,36; 40 ± 7,6****
IGFBP-3/Tf odnos (mmol/mol)	3,2 ± 0,69*	1,7 ± 0,30***	3,0 ± 0,71***
IGFBP-3 u kompleksu sa Tf (mg/L, nM)	279 ± 34; 6,2 ± 0,76	215 ± 25; 4,6 ± 0,56**	80 ± 22; 1,8 ± 0,48****

*Statistički značajna razlika između zdrave populacije i posmatrane grupe (p<0.05).

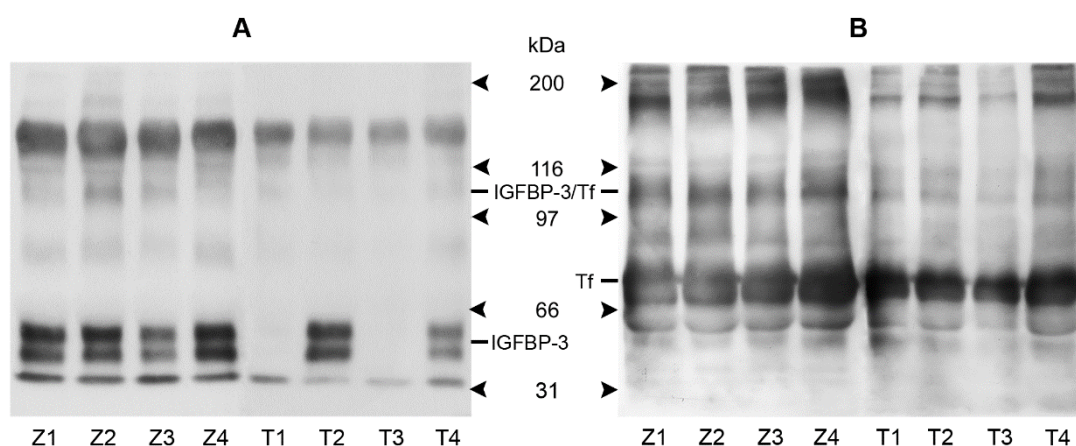
**Statistički značajna razlika između osoba sa velikom koncentracijom gvožđa i anemijom (p<0.05).

***Statistički značajne razlika između pacijenata sa CRC i osoba sa anemijom (p<0.05).

Kao što se iz **Tabele 7** može videti, kod osoba sa velikom koncentracijom gvožđa povećana je bila koncentracija hemoglobina i feritina, a smanjen je ukupni kapacitet vezivanja gvožđa (TIBC) i Tf. Shodno tome, zasićenje Tf gvožđem (izraženo preko odnosa Fe/TIBC) je bilo povećano. Ovakvi rezultati ukazuju na očekivan odgovor organizma na veliku koncentraciju gvožđa [315]. Koncentracija ukupnih proteina nije značajno promenjena, a koncentracija IGFBP-3 je bila nešto veća nego kod kontrolne grupe. Krajnji rezultat kombinacije svih navedenih parametara je bio povećan odnos IGFBP-3:Tf i nešto veća koncentracija IGFBP-3/Tf kompleksa (mada ne statistički značajno).

Kod osoba sa anemijom, očekivano je bila smanjena koncentracija hemoglobina i feritina, a povećana Tf i, shodno tome, TIBC [324-326]. Koncentracija ukupnih proteina i IGFBP-3 je bila nepromenjena u poređenju sa kontrolnom grupom. Stepem zasićenja Tf gvožđem je bio višestruko smanjen, kao i odnos IGFBP-3:Tf i koncentracija kompleksa IGFBP-3/Tf. Upoređivanjem prethodne grupe i ove, ustanovljena je značajna razlika u koncentraciji IGFBP-3/Tf kompleksa, uz nepromenjenu koncentraciju IGFBP-3 i desetostruko manju koncentraciju gvožđa. S obzirom da Tf molekula ima oko 1000 puta više nego IGFBP-3 u cirkulaciji, ovi rezultati potvrđuju na fiziološkom nivou da je koncentracija kompleksa IGFBP-3/Tf direktno zavisna od koncentracije gvožđa.

Kod treće grupe ispitanika, očigledno je došlo do smanjene sinteze proteina u jetri i/ili njihovog gubitka (krvarenje, povraćanje), pošto je osim pada ukupnih proteina smanjena koncentracija IGFBP-3 i Tf (koji je, inače, i negativni pokazatelj akutne faze) [424]. Ovi pacijenti, za razliku od osoba sa anemijom, imaju znatno povećanu koncentraciju feritina, koji je i akutno fazni reaktant i marker funkcije jetre [425, 426]. Rezultat disproporcije proteina daje odnos IGFBP-3:Tf veći nego kod osoba sa anemijom, ali je koncentracija IGFBP-3/Tf kompleksa trostruko manja. Iz ovih rezultata se može zaključiti da osim gvožđa, na koncentraciju IGFBP-3/Tf kompleksa značajno utiče i koncentracija IGFBP-3. Iako kompleksi količinski čine samo nekoliko procenata ukupnog IGFBP-3, pa teorijski koncentracija kompleksa ne bi morala biti u tolikoj meri smanjena, pretpostavka je da se porastom koncentracije feritina menja ravnoteža u distribuciji gvožđa. Feritin je protein koji može vezati čak 4500 jona gvožđa [298], te i mala promena u njegovoj koncentraciji (a kod ovih pacijenata je velika) značajno utiče na raspoloživost gvožđa. Da bi se potvrdila ovako velika razlika u koncentraciji IGFBP-3 i Tf kod pacijenata sa CRC, urađen je imunoblot seruma (**Slika 26**, četiri nezavisna uzorka seruma iz grupe zdravih ljudi i pacijenata sa CRC).

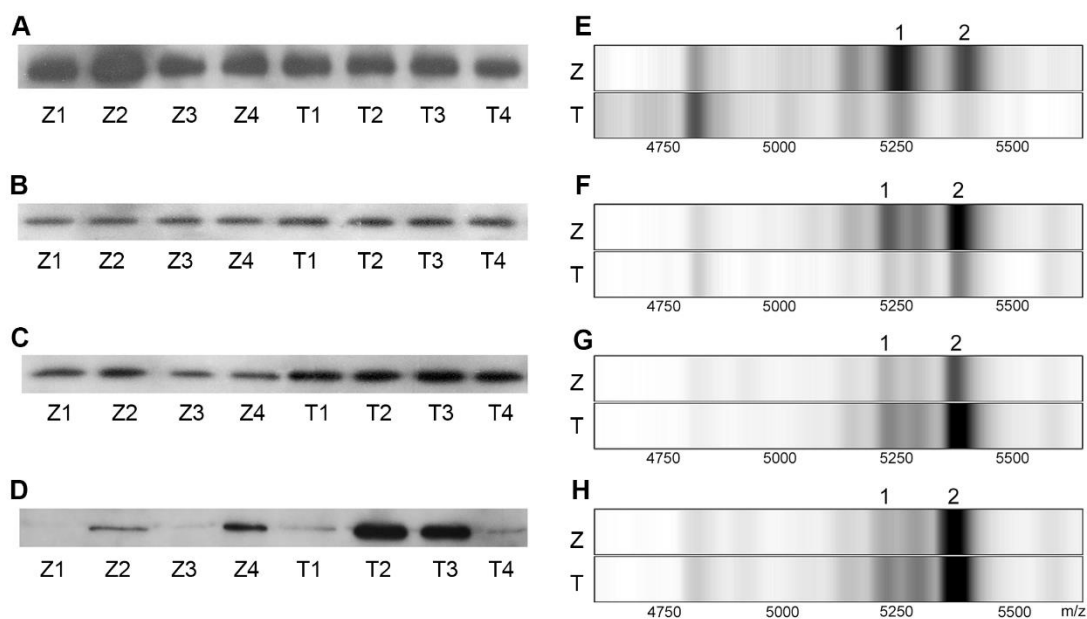


Slika 26. Imunoblot seruma zdravih osoba (Z) i pacijenata sa tumorom debelog creva (T). Imunoreaktivni proteini su prepoznati u interakciji sa anti-IGFBP-3 (A), odnosno anti-Tf antitelom (B). Profil reprezentativnih uzoraka ukazuje na opseg dobijenih rezultata.

5.6.2 Isptivanje promene strukture IGFBP-3/Tf kompleksa i reaktivnosti IGFBP-3 u cirkulaciji osoba sa tumorom debelog creva

Pacijenti sa tumorom debelog creva su pod povećanim oksidativnim stersom [427, 428], zbog izraženog katabolizma izmenjena je sinteza proteina u jetri (količina, a moguće i post-translaciona dorada peptida) [429], a zbog povećanog otpuštanja proteaza i drugih enzima iz ćelija [423, 430] dolazi do naknadnih modifikacija proteina u samoj cirkulaciji. Svi ovi uticaji se mogu odraziti na strukturu IGFBP-3/Tf kompleksa.

Kompleksi IGFBP-3/Tf, koji su izolovani imunoprecipitacijom iz seruma pacijenata sa tumorom debelog creva, su analizirani imunoblotom, lektinskim blotom i metodom SELDI-TOF MS. Na **Slici 27** su prikazani rezultati IGFBP-3 imunoblota, SNA i ECL lektinskog blota, DNP imunoblota (po četiri nezavisna uzorka iz grupe zdravih ljudi i pacijenata sa CRC) i SELDI-TOF MS spektri (po jedan reprezentativni uzorak iz svake grupe).

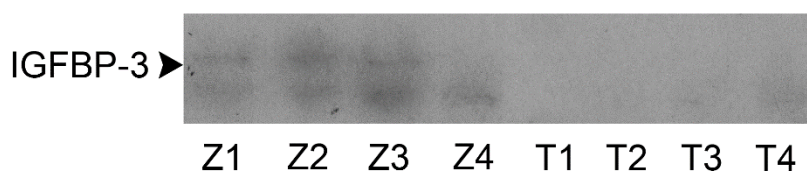


Slika 27. IGFBP-3 imunoblot (A), SNA (B) i ECL lektin blot (C), DNP imunoblot (D) i SELDI-TOF MS spektri na čipovima Q10 (E), CM10 (F), IMAC30 (G) i H50 (H) IGFBP-3/Tf kompleksa izolovanih iz seruma zdravih osoba (Z) i pacijenata sa tumorom debelog creva (T).

Kompleksi IGFBP-3/Tf izolovani iz seruma pacijenata, kojih je bilo manje nego u izolatima zdravih ljudi (Slika 27A), su u većoj meri interagovali sa lektinima SNA i ECL (ka 27B i C), ukazujući na povećano prisustvo terminalne sijalinske kiseline i disaharida Gal β 4GlcNAc. Ovi kompleksi su, takođe, u proseku bili „jače“ prepoznati anti-DNP antitelima nakon derivatizacije (Slika 27D). Prilikom SELDI-TOF MS analize, uočena je razlika u reaktivnosti kompleksa iz dve grupe ispitanika. Prisustvo fragmenata iz kompleksa pacijenata bilo je značajno manje u slučaju anjonskog (Slika 27E) i katjonskog čipa (Slika 27F), što ukazuje na smanjen sadržaj naelektrisanih grupa. Sa druge strane, na metal-afinitetnom čipu (Slika 27G) rezultat je bio obrnut, ukazujući na veću reaktivnost kompleksa iz uzoraka pacijenata sa metalnim jonom. Razlike između dve grupe uzoraka nije bilo na hidrofobnom čipu (Slika 27H), što bi moglo značiti da je hidrofobni region očuvan i/ili da je manje podložan strukturnim promenama. Sve uočene razlike su kvantitativno prikazane u Tabeli 8 (izražene preko denzitometrijskih jedinica, DJ).

Pošto uloga kompleksa IGFBP-3/Tf još nije dokazana, jedini način da se ispita uticaj svih navedenih strukturnih promena na proteine je na nivou poznate funkcije

pojedinačnih komponenti kompleksa. U ovom radu izabran je metod ligand blota koristeći serume dve grupe ispitanika i ^{125}I -IGF-I. Praćena je reaktivnost monomera IGFBP-3 (40-45 kDa) sa obeleženim ligandom (**Slika 28**, po četiri reprezentativna uzorka). Denzitometrijska analiza traka je pokazala da je vezivanje ^{125}I -IGF-I oko 9 puta manje za IGFBP-3 iz seruma pacijenata nego iz seruma zdravih ljudi. Pošto je pad ukupne koncentracije IGFBP-3 u serumu pacijenata sa tumorom debelog creva manji (**Tabela 7**, **Slika 26**) od pada reaktivnosti (u relativnim odnosima), može se zaključiti da post-translacione modifikacije drastično menjaju funkciju IGFBP-3, te vrlo verovatno i kompleksa u čijem je sastavu.



Slika 28. Ligand blot seruma zdravih osoba (Z) i pacijenata sa tumorom debelog creva (T). Reaktivni proteini su prepoznati u interakciji sa ^{125}I -IGF-I.

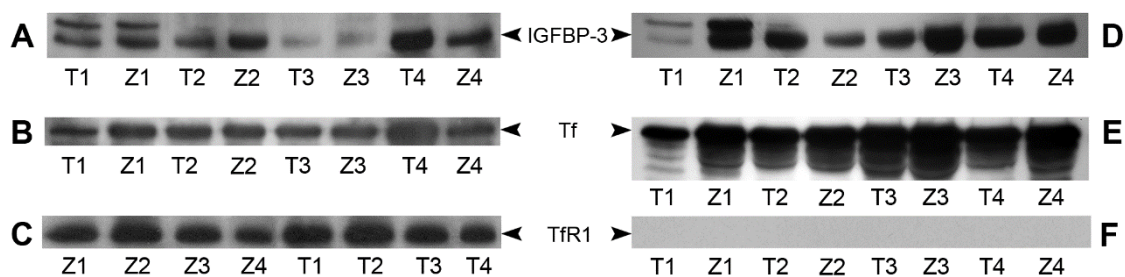
Tabela 8. Relativni odnosi IGFBP-3/Tf kompleksa izolovanih metodom imunoprecipitacije (ukupni, lektin-reaktivni i karbonilovani) i relativno prisustvo karakterističnih fragmenta detektovanih metodom SELDI-TOF MS koristeći različite čipove. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SD.

Relativna količina IGFBP-3/Tf kompleksa	Zdrave osobe n=25	Pacijenti sa CRC n=45
Ukupna količina kompleksa (DJ)	233 \pm 44,1	181 \pm 19,3*
SNA-reaktivni kompleksi (DJ)	74 \pm 10,3	103 \pm 7,2*
ECL-reaktivni kompleksi (DJ)	115 \pm 37,1	205 \pm 16,4*
Karbonilovani kompleksi (DJ)	52 \pm 38,0	147 \pm 64,6*
Relativna količina IGFBP-3/Tf fragmentana u SELDI-TOF MS	Zdrave osobe n=25	Pacijenti sa CRC n=45
Q10-reaktivni fragment 1 (DJ)	798 \pm 32,0	475 \pm 145,5*
CM10-reaktivni fragment 1 (DJ)	200 \pm 27,0	151 \pm 12,5*
IMAC30-reaktivni fragment 1 (DJ)	190 \pm 20,0	231 \pm 31,1*
H50-reaktivni fragment 1 (DJ)	118 \pm 20,5	120 \pm 18,7
Q10-reaktivni fragment 2 (DJ)	478 \pm 88,8	250 \pm 99,7*
CM10-reaktivni fragment 2 (DJ)	655 \pm 133,2	438 \pm 102*
IMAC30-reaktivni fragment 2 (DJ)	841 \pm 111,0	2123 \pm 204,4*
H50-reaktivni fragment 2 (DJ)	716 \pm 82,3	707 \pm 64,1

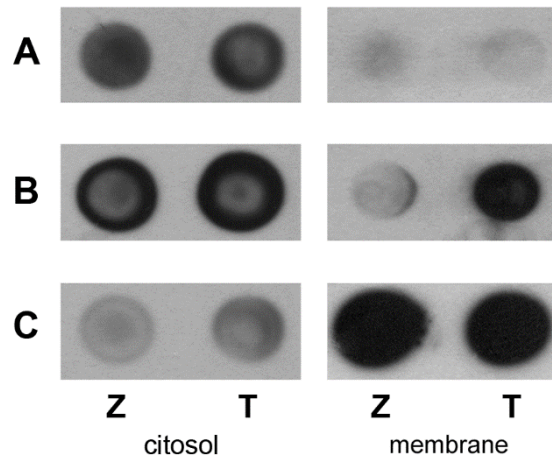
*Statistički značajna razlika između zdrave populacije i pacijenata sa tumorom debelog creva ($p < 0.05$).

5.6.3 Ispitivanje promene strukture i distribucije IGFBP-3/Tf kompleksa u tkivu debelog creva pacijenata sa tumorom

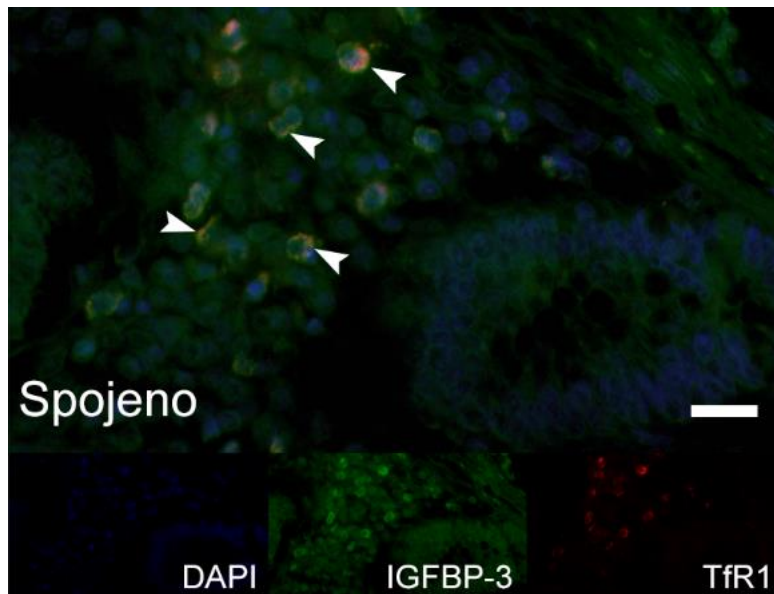
Prisustvo kompleksa IGFBP-3/Tf u tumorskom tkivu debelog creva i interakcija sa TfR1 su ispitivani na isti način kao kod netumorskog uzorka: imunoblotom, imunoprecipitacijom sa anti-TfR1 antitelom i imunohistohemijski (poglavlje 5.5.1). Pored toga, ispitan je i stepen karbonilovanja proteina tkiva debelog creva, da se utvrdi u kojoj meri su oni izloženi oksidativnom stresu. Tumorsko i netumorsko tkivo je dobijeno od iste osobe, a iz svakog uzorka je nezavisno analizirana membranska i citosolna frakcija. Rezultati IGFBP-3, Tf i TfR1 imunoblota su prikazani na **Slici 29** (po četiri para uzoraka), rezultati imunoprecipitacije i dot blota sa anti-IGFBP-3, anti-Tf i anti-TfR1 antitelima dati su na **Slici 30** (zbirni uzorak za membranske i citosolne preparate tumorskih i netumorskih tkiva), a rezultati imunohistohemijskog bojenja su prikazani na **Slici 31** (reprezentativni uzorak tumorskog tkiva, iste osobe čije je netumorsko tkivo prikazano na **Slici 25**). DNP imunoblot derivatizovanog tkivnog proteoma je prikazan na **Slici 32** (po četiri para uzoraka).



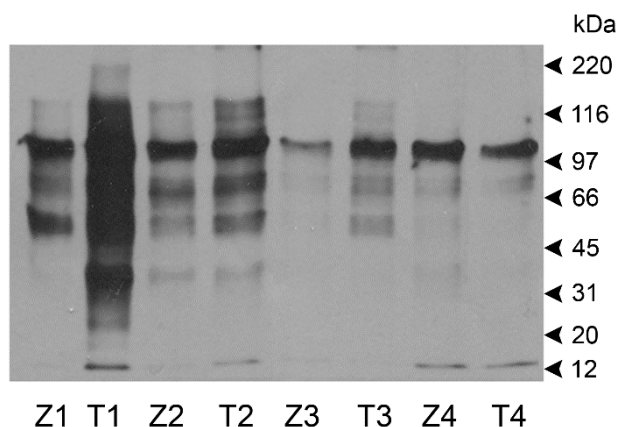
Slika 29. Imunoblot membranske (A-C) i citosolne (D-F) frakcije ćelija izolovanih iz netumorskog (zdravog) i tumorskog tkiva debelog creva (tkiva su prikazana u paru za istu osobu). Imunoreaktivni proteini su prepoznati u interakciji sa anti-IGFBP-3 (A, D), anti-Tf (B, E), odnosno anti-TfR antitelima (C, F).



Slika 30. Dot blot citosolne i membranske frakcije ćelija izolovanih iz netumorskog (zdravog) i tumorskog tkiva debelog creva (tkiva su prikazana u paru za istu osobu). Imunoreaktivni proteini su prepoznati u interakciji sa anti-IGFBP-3 (**A**), anti-Tf (**B**), odnosno anti-TfR antitelima (**C**).



Slika 31. Imunohistohemijska detekcija prisustva IGFBP-3 i TfR1 u tumorskom tkivu debelog creva i potvrda njihove ko-lokalizacije (označeno strelicama). Razmerna crta predstavlja dužinu od 20 μm .



Slika 32. Imunoblot DNP derivatizovanih proteina netumorskog (zdravog) i tumorskog tkiva debelog creva (tkiva su prikazana u paru za istu osobu). Imunoreaktivni proteini su prepoznati u interakciji sa anti-DNP antitelom.

Denzitometrijskom analizom IGFBP-3, Tf, TfR1 i DNP imunoblotova (**Slike 29** i **32**) dobijeni su kvantitativni podaci, koji su prikazani u **Tabeli 9**. Statistička obrada rezultata nije ukazala na značajnu razliku između tumorskih i netumorskih uzoraka za IGFBP-3 i Tf, dok je primećeno karakteristično odsustvo TfR1 trake na imunoblotu za citosol. Imunoprecipitacijom sa anti-TfR1 antitelom je potvrđeno prisustvo IGFBP-3 u kompleksu, u sličnim kvantitativnim odnosima IGFBP-3:Tf:TfR1 u citosolu tumorskog i netumorskog tkiva, dok je na membranama ćelija tumora uočen veći stepen zasićenja receptora samim Tf, ali ne i kompleksom (**Slika 30**). Sličan je bio intenzitet signala za IGFBP-3 u oba tipa membranskih uzoraka. Imunohistohemijski je potvrđena kolo-kalizacija IGFBP-3 i TfR1 i u tumorskom tkivu (**Slika 31**), ali bez statistički značajne razlike u stepenu prisustva između dve grupe uzoraka (**Tabela 9**). Stepenu prisustva je određen upoređivanjem intenziteta signala (gradacijom) na standardni način. Uočeno je da su kompleksi u većoj meri lokalizovani na površini ćelija (strelice na **Slici 31**). Na kraju, DNP imunoblot je pokazao da je skoro tri puta više proteinskih karbonilnih grupa u uzorcima tumorskog nego netumorskog tkiva (**Slika 32** i **Tabela 9**).

Tabela 9. Denzitometrijska analiza IGFBP-3, Tf, Tfr1 i DNP imunoblotova netumorskog i tumorskog tkiva pacijenata sa CRC. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SD.

Homogenati tkiva debelog creva n=22				
Relativna količina proteina u tkivnim preparatima	Solubilizovane membrane		Citosol	
	Netumorsko tkivo	Tumorsko tkivo	Netumorsko tkivo	Tumorsko tkivo
IGFBP-3 (DJ)	129 \pm 63,0	119 \pm 64,4	124 \pm 18,5	119 \pm 19,1
Tf (DJ)	122 \pm 24,3	120 \pm 35,6	2070 \pm 304,0	1824 \pm 346,2
Tfr1 (DJ)	160 \pm 30,2	172 \pm 35,5	ispod granice detekcije	ispod granice detekcije
Parafinski preparati tkiva debelog creva n=45				
Rezultat ko-lokalizacije	Netumorsko tkivo		Tumorsko tkivo	
IGFBP-3/Tfr1	1,3 \pm 0,91		1,1 \pm 0,88	
Homogenati tkiva debelog creva n=22				
Relativna količina karbonila u tkivnim preparatima (DJ)	1434 \pm 431,1		3822 \pm 2958,9*	

*Statistički značajna razlika između netumorskih i tumorskih uzoraka tkiva ($p < 0.05$).

Sumirajući sve rezultate koji se odnose na tkivo, može se pretpostaviti da je povećana ekspresija TfR1 na površini tumorskih ćelija (imunohistohemijski rezultat) moguća kompenzacija za smanjenu koncentraciju IGFBP-3/Tf kompleksa u cirkulaciji. Kao što je ranije rečeno, od egzogeno unetog IGFBP-3 se očekuje da učestvuje u proapoptotskim procesima u ćeliji, te je nedovoljno prisustvo IGFBP-3 mogući uzrok ili deo mehanizma koji omogućava duži život i deobu tumorskih ćelija. Prema dobijenim rezultatima, vezivanje za TfR1 je glavni put internalizacije IGFBP-3, pa je povećanje broja receptora na ćeliji mogući odgovor na smanjeno prisustvo IGFBP-3/Tf kompleksa u okolini ćelije. Ako se, osim kvantitativnog efekta, uzme u obzir i kvalitativni, odnosno post-translacione modifikacije kompleksa, a možda i TfR1 receptora (u tkivu sa izraženim oksidativnim promenama), funkcija IGFBP-3/Tf kompleksa takođe može biti izmenjena.

Rezultati koji su dobijeni sa pojedinačnim uzorcima (**Slika 29**) i sa zbirnim uzorcima (**Slika 30**) se u nekoj meri razlikuju. Razlika između tumorskog i netumorskog tkiva nije bila toliko uočljiva kada je rađeno sa pojedinačnim uzorcima, kao što je bila kada je rađeno sa zbirnim, uprosečnim uzorcima, koji su „uravnotežavali“ individualne razlike. Na osnovu zbirnih uzoraka se moglo videti da je TfR1 na membrani vezao daleko više Tf u tumorskom uzorku nego u netumorskom (**Slika 30**), mada je koncentracija Tf u cirkulaciji pacijenata bila manja nego kod zdravih osoba. Ovaj nalaz bi se mogao povezati i sa podatkom da je u tumorskim ćelijama nađena povećana koncentracija gvožđa [290, 347], kao i sa činjenicom da je jon gvožđa uzročnik stvaranja slobodnih radikala i oksidativnih promena fizioloških makromolekula [348-350]. U ovom momentu se još uvek ne mogu do kraja povezati prisustvo i uloge IGFBP-3, Tf, TfR1 i gvožđa u zajednički mehanizam kojim učestvuju u opstanku zdravih i tumorskih ćelija, ali je izvesno da je reč o procesima koji obuhvataju metabolizam gvožđa. Moguće je da, nakon internalizacije, jon gvožđa u kompleksu sa IGFBP-3 dospeva do ćelijskih odeljaka ili učestvuje u ćelijskim procesima u kojima ne bi bio prisutan kada je vezan samo za Tf.

6. Zaključci

- Stvaranje stabilnih kompleksa u serumu između vezujućeg proteina 3 za faktore rasta slične insulinu (IGFBP-3) i transferina (Tf) je univerzalna pojava kod ljudi.
- Izolovanje kompleksa IGFBP-3/Tf iz seruma i tkiva creva je moguće postići primenom imunohemijske metode dvostruke imunoprecipitacije: prvo se talože proteini reaktivni sa anti-Tf antitelima, a iz njih se dalje talože proteini reaktivni sa anti-IGFBP-3 antitelima.
- Relativni odnos koncentracija IGFBP-3 i Tf u cirkulaciji je $2,3 \pm 0,56$ mM/M, odnosno koncentracija IGFBP-3 u serumu je oko 1000 puta manja od koncentracije Tf. Prema tome, IGFBP-3 je determinanta od koje zavisi količina formiranih kompleksa IGFBP-3/Tf, te koncentraciju kompleksa treba određivati preko koncentracije IGFBP-3.
- Koncentracija IGFBP-3/Tf kompleksa u cirkulaciji zdravih odraslih ljudi je 241 ± 62 μ g/L, odnosno $5,4 \pm 1,02$ nM, što čini 5-7 % ukupnog IGFBP-3. Ovaj udeo nije zanemarljiv kad se govori o fiziološkim uslovima.
- Nakon uklanjanja IGFBP-3/Tf kompleksa iz seruma i dodatka metalnog jona u višku (više različitih vrsta), monomerne jedinice formiraju nove komplekse. Najviše kompleksa nastaje u prisustvu jona Fe^{3+} . Prema tome, metalni jon (posebno Fe^{3+}) je ključan element za stvaranje kompleksa.
- Izolovani kompleksi IGFBP-3/Tf interaguju sa metalnim jonima, imaju definisane pozitivno i negativno naelektrisane domene, kao i hidrofobni. Dominantni ugljeni hidrati u njihovoj strukturi su Gal β 4GlcNAc ostaci i terminalna sijalinska kiselina.
- U eksperimentima sa fiziološkim uzorcima seruma zaključeno je sledeće:
 - kod osoba sa povećanom koncentracijom gvožđa u cirkulaciji, a bez patologije, povećane su koncentracije IGFBP-3 i kompleksa IGFBP-3/Tf,
 - profesionalno bavljenje sportom, kada je intenziviran metabolizam gvožđa, ne utiče nužno na koncentraciju kompleksa IGFBP-3/Tf,
 - kod pacijenata sa dijagnozom anemije koncentracija IGFBP-3 je nepromenjena u cirkulaciji (kao i ukupnih proteina), dok je koncentracija kompleksa smanjena,
 - kod pacijenata sa tumorom debelog creva, kod kojih je anemija deo patologije, smanjene su koncentracije IGFBP-3, ukupnih proteina i kompleksa IGFBP-3/Tf, a povećana je koncentracija feritina,
 - iz gore navedenog sledi da formiranje IGFBP-3/Tf kompleksa u patofiziološkim uslovima u osnovi zavisi od koncentracije jona gvožđa, zatim od koncentracije IGFBP-3, ali i od drugih molekula koji vezuju gvožđe, kao što je feritin,

- kompleksi IGFBP-3/Tf u cirkulaciji pacijenata sa tumorom debelog creva imaju izmenjenu strukturu: povećan je stepen glikozilovanja i oksidacije, jača je interakcija sa metalnim jonima i izmenjen je raspored i/ili broj naelektrisanih grupa i
- reaktivnost IGFBP-3, u serumu pacijenata sa tumorom debelog creva, prema ligandu IGF-I je devet puta manja nego kod zdravih ljudi, što znači da post-translacione modifikacije (mimo pada koncentracije) drastično menjaju funkciju IGFBP-3, te vrlo verovatno i kompleksa u čijem je sastavu.
- U eksperimentima sa fiziološkim uzorcima tkiva debelog creva zaključeno je sledeće:
 - kompleksi IGFBP-3/Tf su prisutni u membranskoj i citosolnoj frakciji tkiva debelog creva (netumorskog i tumorskog) u koncentraciji znatno manjoj nego u cirkulaciji,
 - imunoprecipitacijom tercijarnog kompleksa IGFBP-3/Tf/TfR iz netumorskog tkiva creva i određivanjem relativnog odnosa njegovih članova zaključeno je da je (očekivano) neuporedivo više TfR na membrani nego u citosolu (frakcija internalizovanih TfR), da je zasićenje membranskih receptora sa Tf neuporedivo manje nego u slučaju citosolnih TfR (internalizuju se receptori tek po vezivanju Tf) i da je u oba slučaja prisutan IGFBP-3 (znatno više u citosolu, u kompleksu sa Tf),
 - u citosolnoj frakciji tumorskog tkiva je sličan relativni odnos IGFBP-3:Tf:TfR u kompleksima kao kod netumorskog tkiva, dok je na membranama tumorskog tkiva veći stepen zasićenja receptora samim Tf, ali ne i kompleksima IGFBP-3/Tf,
 - imunohistohemijskom analizom je utvrđen visoki stepen ko-lokalizacije IGFBP-3, Tf i TfR u obe vrste tkiva,
 - kod tumorskog tkiva je kompleks IGFBP-3/Tf/TfR u većoj meri lokalizovan na ćelijskim membranama, dok je kod netumorskog tkiva lokalizacija difuznog tipa, uključujući i jдро,
 - iz gore navedenog sledi da put internalizacije vanćelijskog IGFBP-3 ide pretežno preko kompleksa IGFBP-3/Tf, odnosno IGFBP-3/Tf/TfR, a ne preko drugih struktura koje prepoznaju IGFBP-3 (slab fluorescentni signal IGFBP-3 nezavisan od TfR),
 - povećana ekspresija TfR na površini tumorskih ćelija može biti kompenzacija za smanjenu koncentraciju IGFBP-3/Tf kompleksa u cirkulaciji i

- pošto se od egzogeno unetog IGFBP-3 očekuje da učestvuje u pro-apoptotskim procesima, od kojih se neki odvijaju u jedru, moguće je da nedovoljno prisustvo IGFBP-3, a posebno u jedru, omogućava duži život i deobu tumorskih ćelija.
- U ovom momentu se još uvek ne mogu do kraja povezati prisustvo i uloge IGFBP-3, Tf, TfR i gvožđa u zajednički mehanizam kojim učestvuju u opstanku zdravih i tumorskih ćelija. Moguće je da, nakon internalizacije, jon gvožđa u kompleksu sa IGFBP-3 dospeva do ćelijskih odeljaka ili učestvuje u ćelijskim procesima u kojima ne bi bio prisutan da je vezan samo za Tf.

7. Literatura

1. LeRoith D. The Insulin-Like Growth Factor System. *Experimental Diab. Res.* 2003;4:205–212.
2. Duan C, Xu Q. Roles of insulin-like growth factor (IGF) binding proteins in regulating IGF actions. *Gen. Comp. Endocr.* 2005;142:44–52
3. Salmon WD Jr, Daughaday WH. A hormonally controlled serum factor which stimulates sulfate incorporation by cartilage in vitro. *J. Lab. Clin. Med.* 1957;49:825–36.
4. Zapf J, Rinderknecht E, Humbel RE, Froesch ER. Nonsuppressible insulin-like activity (NSILA) from human serum: Recent accomplishments and their physiologic implications. *Metabolism.* 1978;27:1803–28.
5. Poffenbarger PL, Haberal MA. Role of serum nonsuppressible insulin-like activity (NSILA) in wound healing. I. Influence of thyroparathyroidectomy on serum NSILA and wound healing in the rat. *Surgery*;1976;80:608–16.
6. Schlumpf U, Heimann R, Zapf J, Froesch ER, Non-suppressible insulin-like activity and sulphaton activity in serum extracts of normal subjects, acromegalics and pituitary dwarfs. *Acta Endocrinol. (Copenh.)*;1976;81:28–42.
7. Clemmons DR, Klibanski A, Underwood LE, McArthur JW, Ridgway EC, Beitins IZ, Van Wyk JJ. Reduction of plasma immunoreactive somatomedin C during fasting in humans. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1981;53:1247–50.
8. Daughaday WH. A personal history of the origin of the somatomedin hypothesis and recent challenges to its validity. *Perspect. Biol. Med.* 1989;32:194–211.
9. Rinderknecht E, Humbel RE. The amino acid sequence of human insulin-like growth factor I and its structural homology with proinsulin. *J. Biol. Chem.* 1978; 253:2769–76.
10. Humbel RE. Insulin-like growth factors I and II. *Eur. J. Biochem.* 1990;190:445–62.
11. Laron Z. Insulin-like growth factor 1 (IGF-1): a growth hormone, *J. Clin. Pathol.: Mol. Pathol.* 2001;54:311–16.
12. Daughaday WH, Rotwein P. Insulin-Like Growth Factors I and II. Peptide, Messenger Ribonucleic Acid and Gene Structures, Serum, and Tissue Concentrations. *Endocr. Rev.* 1989;10:68–91.
13. Leventhal PS, Feldman EL. Insulin-like growth factors as regulators of cell motility: Signaling mechanisms. *Trends Endocrinol. Metab.* 1997;8:1–6.

14. Jones JJ, Clemmons DR. Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. *Endocr. Rev.* 1995;16:3–34.
15. Allen NE, Appleby PN, Davey GK, Kaaks R, Rinaldi S, Key TJ. The associations of diet with serum insulin-like growth factor I and its main binding proteins in 292 women meat eaters, vegetarians, and vegans. *Cancer Epidemiol. Biomarkers.* 2002;11:1441–48.
16. Annunziata M, Granata R, Ghigo E. The IGF system. *Acta Diabetol.* 2011;48:1–9.
17. Chen J, Fang Q, Chen B, Zhou Y, Luo Y. Study on the Imprinting Status of Insulin-Like Growth Factor II (IGF-II) Gene in Villus during 6-10 Gestational Weeks. *Obstet. Gynaecol. Int.* 2010;2010:art. ID. 965905:1–4.
18. Castilla-Cortázar I, García-Fernández M, Delgado G, Puche JE, Sierra I, Barhoum R, González-Barón S. Hepatoprotection and neuroprotection induced by low doses of IGF-II in aging rats. *J. Transl. Med.* 2011;9:103–11.
19. Dufourny B, Alblas J, Van Teeffelen HAAM, Van Schaik FMA, Van Der Burg B, Steenbergh PH, Sussenbach JS. Mitogenic Signalling of Insulin-like Growth Factor I in MCF-7 Human Breast Cancer Cells Requires Phosphatidylinositol 3-Kinase and Is Independent of Mitogen-activated Protein Kinase. *J. Biol. Chem.* 1997;272:31163–71.
20. Holt RI, Simpson HL, Sonksen PH. The role of the growth hormone-insulin-like growth factor axis in glucose homeostasis. *Diabet. Med.* 2003;20:3–15.
21. Parrizas M, Saltiel AR, LeRoith D. Insulin-like Growth Factor 1 Inhibits Apoptosis Using the Phosphatidylinositol 3-Kinase and Mitogen-activated Protein Kinase Pathways. *J. Biol. Chem.* 1997;272:154–61.
22. Niesler CU, Urso B, Prins JB, Siddle K. IGF-I inhibits apoptosis induced by serum withdrawal, but potentiates TNF-alpha-induced apoptosis, in 3T3-L1 preadipocytes. *J. Endocrinol.* 2000;167:165–74.
23. Galvan V, Logvinova A, Sperandio S, Ichijo H, Bredesen DE. Type 1 insulin-like growth factor receptor (IGF-IR) signaling inhibits apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1). *J. Biol. Chem.* 2003;278:13325–32.
24. McKinnon T, Chakraborty C, Gleeson LM, Chidiac P, Lala PK. Stimulation of human extravillous trophoblast migration by IGF-II is mediated by IGF type 2 receptor involving inhibitory G protein(s) and phosphorylation of MAPK. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2001;86:3665–3674.

25. Imai Y, Clemmons DR. Roles of phosphatidylinositol 3-kinase and mitogen-activated protein kinase pathways in stimulation of vascular smooth muscle cell migration and deoxyribonucleic acid synthesis by insulin-like growth factor-I. *Endocrinol.* 1999;140, 4228–4235.
26. Fottner C, Hoeflich A, Wolf E, Weber MM. Role of the insulinlike growth factor system in adrenocortical growth control and carcinogenesis. *Horm. Metab. Res.* 2004;36, 397–405.
27. Denley A, Cosgrove LJ, Booker GW, Wallace JC, Forbes BE. Molecular interactions of the IGF system. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2005;16:421–39.
28. Moschos SJ, Mantzoros CS. The Role of the IGF System in Cancer: From Basic to Clinical Studies and Clinical Applications, *Oncology* 2002;63:317–32.
29. Werner H, Weinstein D, Bentov I. Similarities and differences between insulin and IGF-I: Structures, receptors, and signalling pathways. *Arch. Physiol. Biochem.* 2008;114:17–22.
30. Pandini G, Frasca F, Mineo R, Sciacca L, Vigneri R, Belfiore A. Insulin/insulin-like growth factor I hybrid receptors have different biological characteristics depending on the insulin receptor isoform involved. *J. Biol. Chem.* 2002;277:39684–95.
31. Ullrich A, Gray A, Tam AW, Yang-Feng T, Tsubokawa M, Collins C, Henzel W, LeBon T, Kathuria S, Chen E. Insulin-like growth factor I receptor primary structure: comparison with insulin receptor suggests structural determinants that define functional specificity. *EMBO J.* 1986;5:2503–12.
32. Yamamoto K, Altschuler D, Wood E, Horlick K, Jacobs S, Lapetina E. Association of phosphorylated insulin-like growth factor-I receptor with the SH2 domains of phosphatidylinositol 3-kinase p85. *J. Biol. Chem.* 1992;267:11337–43.
33. Blakesley VA, Koval AP, Stannard BS, Scrimgeour A, LeRoith D. Replacement of tyrosine 1251 in the carboxyl terminus of the insulin-like growth factor-I receptor disrupts the actin cytoskeleton and inhibits proliferation and anchorage-independent growth. *J Biol Chem* 1998;273:18411–22.
34. LeRoith D, Roberts CT Jr. The insulin-like growth factor system and cancer. *Cancer Lett.* 2003;195:127–37.

35. Kasuga M, Hedou JA, Yamada KM, Kahn CR. The structure of insulin receptor and its subunits. Evidence for multiple nonreduced forms and a 210,000 possible proreceptor. *J. Biol. Chem.* 1982;257:10392–9.
36. Rechler MM, Nissley SP. The Nature and Regulation of the Receptors for Insulin-Like Growth Factors. *Annu. Rev. Physiol.* 1985;47:425–42.
37. Yamasaki H, Prager D, Melmed S. Structure-function of the human insulin-like growth factor-I receptor: A discordance of somatotroph internalization and signaling. *Mol. Endocrinol.* 1993;7:681–5.
38. McClain DA. Different ligand affinities of the two human insulin receptor splicevariants are reflected in parallel changes in sensitivity for insulin action. *Mol. Endocrinol.* 1991;5:734–9.
39. Frasca F, Pandini G, Scalia P, Sciacca L, Mineo R, Costantino A, Goldfine ID, Belfiore A, Vigneri R. Insulin receptor isoform A, a newly recognized, high-affinity insulin-like growth factor II receptor in fetal and cancer cells. *Mol. Cell. Biol.* 1999;19:3278–88.
40. Backer JM, Kahn CR, White MF. The dissociation and degradation of internalized insulin occur in the endosomes of rat hepatoma cells. *J. Biol. Chem.* 1990;265:14828–35.
41. Heron-Milhavet L, Karas M, Goldsmith CM, Baum BJ, LeRoith D. Insulin-like growth factor-I (IGF-I)receptor activation rescues UV-damaged cells through a p38 signaling pathway. Potential role of the IGF-receptor in DNA repair. *J. Biol. Chem.* 2001;276:18185–92.
42. Trojanek J, Ho T, Del VL, Nowicki M, Wang JY, Lassak A, Peruzzi F, Khalili K, Skorski T, Reiss K. Role of the insulin-like growth factor I/insulin receptor substrate 1 axis in Rad51 trafficking and DNA repair by homologous recombination. *Mol. Cell. Biol.* 2003;23:7510–24.
43. Gao X, Neufeld TP, Pan D. Drosophila PTEN Regulates Cell Growth and Proliferation through PI3K-Dependent and -Independent Pathways. *Dev. Biol.* 2000;221:404–18.
44. Ge C, Xiao G, Jiang D, Franceschi RT. Critical role of the extracellular signalregulatedkinase-MAPK pathway in osteoblast differentiation and skeletaldevelopment. *J. Cell Biol.* 2007;176:709–18.

45. Cusi K, DeFronzo R. Recombinant human insulin-like growth factor I treatment for 1 week improves metabolic control in type 2 diabetes by ameliorating hepatic and muscle insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000;85:3077–84.
46. Liu JP, Baker J, Perkins AS, Robertson EJ, Efstratiadis A. Mice carrying null mutations of the genes encoding insulin-like growth factor I (Igf-1) and type I IGF receptor (Igf1r). *Cell* 1993;75:59–72.
47. Bailyes EM, Navé BT, Soos MA, Orr SR, Hayward AC, Siddle K. Insulin receptor/IGF-I receptor hybrids are widely distributed in mammalian tissues: quantification of individual receptor species by selective immunoprecipitation and immunoblotting, *Biochem. J.* 1997;327:209–15.
48. Laureys G, Barton DE, Ullrich A, Francke U. Chromosomal mapping of the gene for the type II insulin-like growth factor receptor/cation-independent mannose 6-phosphate receptor in man and mouse. *Genomics* 1988;3:224–9.
49. Kiess W, Yang Y, Kessler U, Hoeflich A. Insulin-like growth factor II (IGF-II) and the IGF-II/mannose-6-phosphate receptor: the myth continues. *Horm. Res.* 1994;41:66–73.
50. Schmidt B, Kiecke-Siemsen C, Waheed A, Braulke T, von Figura K. Localization of the insulin-like growth factor II binding site to amino acids 1508-1566 in repeat 11 of the mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor. *J. Biol. Chem.* 1995;270:14975–82.
51. Grimme S, Honing S, von Figura K, Schmidt B. Endocytosis of insulin-like growth factor II by a mini-receptor based on repeat 11 of the mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor. *J. Biol. Chem.* 2000;275:33697–703.
52. DaCosta SA, Schumaker LM, Ellis MJ. Mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor 2 receptor, a bona fide tumor suppressor gene or just a promising candidate? *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 2000;5:85–94.
53. Schnarr B, Strunz K, Ohsam J, Benner A, Wacker J, Mayer D. Down-regulation of insulin-like growth factor-I receptor and insulin receptor substrate-1 expression in advanced human breast cancer. *Int. J. Cancer* 2000;89:506–13.
54. Bostedt KT, Schmid C, Ghirlanda-Keller C, Olie R, Winterhalter KH, Zapf J. Insulin-like Growth Factor (IGF) I Down-Regulates Type 1 IGF Receptor (IGF 1R) and Reduces the IGF I Response in A549 Non-Small-Cell Lung Cancer and Saos-2/B-10 Osteoblastic Osteosarcoma Cells. *Exp. Cell Res.* 2001;271:368–77.

55. Froesch ER, Zapf J. Insulin-like growth factors and insulin: comparative aspects. *Diabetologica* 1985;28:485–93.
56. Conover CA, Lee PD, Riggs BL, Powell DR. Insulin-like growth factor-binding protein-1 expression in cultured human bone cells: regulation by insulin and glucocorticoid. *Endocrinol.* 1996;137:3295–301.
57. Brismar K, Lewitt MS. IGF in disease states: The IGF and IGFBP system in insulin resistance and Diabetes Mellitus. *IGF and nutrition in health and disease*. Totowa, NJ: Humana Press, 2005.
58. Thissen JP, Ketelslegers JM, Underwood LE. Nutritional regulation of the insulin-like growth factors. *Endocr. Rev.* 1994;15:80–101.
59. Rajaram S, Baylink DJ, Mohan S. Insulin-Like Growth Factor-Binding Proteins in Serum and Other Biological Fluids: Regulation and Functions. *Endocr. Rev.* 1997;18:801–31.
60. Clemmons DR. Insulin-like Growth Factor Binding Proteins and their Role in Controlling IGF Actions, *Cytokine Growth F. Rev.* 1997;8:45–62.
61. Firth SM, Baxter RC. Cellular Actions of the Insulin-Like Growth Factor Binding Proteins. *Endocr. Rev.* 2002;23:824–54.
62. Rosenzweig SA. What's new in the IGF-binding proteins? *Growth Horm. IGF Res.* 2004;14:329–36.
63. Schedlich LJ, Young TF, Firth SM, Baxter RC. Insulin-like growth factor binding protein (IGFBP)-3 and IGFBP-5 share a common nuclear transport pathway in T47D human breast carcinoma cells. *J. Biol. Chem.* 1998;273:18347–52.
64. Binoux M. Insulin-like growth factor binding proteins (IGFBPs): physiological and clinical implications. *J. Pediatr. Endocrinol. Metabol.* 1996;9:Suppl. 3:285–8.
65. Bach LA, Headey SJ, Norton RS. IGF-binding proteins-the pieces are falling into place. *Trends Endocrinol. Metabol.* 2005;16:228–34.
66. Bunn RC, Fowlkes JL. Insulin-like growth factor binding protein proteolysis. *Trends Endocrinol. Metabol.* 2003;14:176–81.
67. Payet LD, Wang XH, Baxter RC, Firth SM. 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. *Endocrinol.* 2003;144:2797–806.

68. Allan GJ, Tonner E, Szymanowska M, Shand JH, Kelly SM, Phillips K, Clegg RA, Gow IF, Beattie J, Flint DJ. Cumulative mutagenesis of the basic residues in the 201-218 region of insulin-like growth factor-binding protein 5 results in progressive loss of both IGF-1 binding and inhibition of IGF-1 biological actions. *Endocrinol.* 2006;147:338–49.
69. Carrick FE, Forbes BE, Wallace JC. BIAcore analysis of bovine insulin-like growth factor (IGF)-binding protein-2 identifies major IGF binding site determinants in both the amino- and carboxyl-terminal domains. *J. Biol. Chem.* 2001;276:27120–28.
70. Kibbey MM, Jameson MJ, Eaton EM, Rosenzweig SA. Insulin-like growth factor binding protein-2: Contributions of the C-terminal domain to insulin-like growth factor-1 binding. *Mol. Pharm.* 2006;69:833–45.
71. Fernandez-Tornero C, Lozano RM, Rivas G, Jimenez MA, Ständker L, Diaz-Gonzalez D, Forssmann WG, Cuevas P, Romero A, Giménez-Gallego G. Synthesis of the blood circulating C-terminal fragment of insulin-like growth factor binding protein –4 in its native conformation. Crystallization, heparin and IGF binding, and osteogenic activity. *J. Biol. Chem.* 2005;280:18899–907.
72. Siwanowicz I, Popowicz GM, Wisniewska M, Huber H, Kuenkele KP, Lang K, Holak TA. Structural basis mfor the regulation of insulin-like growth factors by IGF binding proteins. *Structure* 2005;13:155–67.
73. Hwa V, Oh Y, Rosenfeld RG. The insulin-like growth factor-binding protein (IGFBP) superfamily. *Endocr. Rev.* 1999;20:761–87.
74. Houston MS, Holly J, Feldman E. *IGF and Nutrition in Health and Disease.* Totowa, NJ: Humana Press, 2005.
75. Voskuil DW, Vrieling A, van't Veer LJ, Kampman E, Rookus MA. The insulin-like growt hfactor system in cancer prevention: potential of dietary intervention strategies. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2005;14:195–203.
76. Roelfsema V, Lane MH, Clark RG. Insulin-like growth factor binding protein (IGFBP)displacers: relevance to the treatment of renal disease. *Pediatr. Nephrol.* 2000;14:584–8.
77. Kim HS, Rosenfeld RG, Oh Y. Biological roles of insulin-like growth factor binding proteins (IGFBPs). *Exp. Mol. Med.*1997;29:85–96.

78. Kubler B, Cowell S, Zapf J, Braulke T. Proteolysis of insulin-like growth factor binding proteins by a novel 50-kilodalton metalloproteinase in human pregnancy serum. *Endocrinol.* 1998;139:1556–63.
79. Bernard L, Babajko S, Binoux M, Ricort JM. The amino-terminal region of insulin-like growth factor binding protein-3, (1-95)IGFBP-3, induces apoptosis of MCF-7 breast carcinoma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2002;293:55–60.
80. Remacle-Bonnet MM, Garrouste FL, Pommier GJ. Surface bound plasmin induces selective proteolysis of insulin-like-growth-factor (IGF)-binding protein-4 (IGFBP-4) and promotes autocrine IGF-II bio-availability in human colon-carcinoma cells. *Int. J. Cancer* 1997;72:835–43.
81. Maile LA, Holly JM. Insulin-like growth factor binding protein (IGFBP) proteolysis: occurrence, identification, role and regulation. *Growth Horm. IGF Res.* 1999;9:85–95.
82. Zheng B, Clarke JB, Busby WH, Duan C, Clemmons DR. Insulin-like growth factor-binding protein-5 is cleaved by physiological concentrations of thrombin. *Endocrinol.* 1998;139:1708–14.
83. Gibson JM, Westwood M, Lauszus FF, Klebe JG, Flyvbjerg A, White A. Phosphorylated insulin-like growth factor binding protein 1 is increased in pregnant diabetic subjects. *Diabetes* 1999;48:321–26.
84. Ricort JM. Insulin-like growth factor binding protein (IGFBP) signalling. *Growth Horm. IGF Res.* 2004;14:277–86.
85. Miyakoshi N, Qin X, Kasukawa Y, Richman C, Srivastava AK, Baylink DJ, Mohan S. Systemic administration of insulin-like growth factor (IGF)-binding protein-4 (IGFBP-4) increases bone formation parameters in mice by increasing IGF bioavailability via an IGFBP-4 protease-dependent mechanism. *Endocrinol.* 2001;142:2641–48.
86. Miyakoshi, N. Richman C, Kasukawa Y, Linkhart TA, Baylink DJ, Mohan S. Evidence that IGF-binding protein-5 functions as a growth factor. *J. Clin. Invest.* 2001;107:73–81.
87. Jones JI, Doerr ME, Clemmons DR. Cell migration: Interactions among integrins, IGFs and IGFBPs. *Prog. Growth F. Res.* 1995;6:319–27.
88. Gapstur SM, Kopp P, Chiu BC, Gann PH, Colangelo LA, Liu K. Longitudinal associations of age, anthropometric and lifestyle factors with serum total insulin-

- like growth factor-I and 61 IGF binding protein-3 levels in Black and White men: the CARDIA Male Hormone Study. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2004;13:2208–16.
89. Saydah S, Graubard B, Ballard-Barbash R, Berrigan D. Insulin-like growth factors and subsequent risk of mortality in the United States. *Am. J. Epidemiol.* 2007;166:518–26.
 90. Jernstrom H, Deal C, Wilkin F, Chu W, Tao Y, Majeed N, Hudson T, Narod SA, Pollak M. Genetic and nongenetic factors associated with variation of plasma levels of insulin-like growth factor-I and insulinlike growth factor-binding protein-3 in healthy premenopausal women. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2001;10(4):377–384.
 91. Holmes MD, Pollak MN, Hankinson SE. Lifestyle correlates of plasma insulin-like growth factor I and insulin-like growth factor binding protein 3 concentrations. *Cancer Epidem. Biomar.* 2002;11(9):862–867.
 92. Holmes MD, Pollak MN, Willett WC, Hankinson SE. Dietary correlates of plasma insulinlike growth factor I and insulin-like growth factor binding protein 3 concentrations. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2002;11:852–61.
 93. Baxter RC. Nuclear actions of insulin-like growth factor binding protein-3. *Gene* 2015;569:7–13
 94. Rajah R, Valentinis B, Cohen P. Insulin-like Growth Factor (IGF)-binding Protein-3 Induces Apoptosis and Mediates the Effects of Transforming Growth Factor-b1 on Programmed Cell Death through a p53- and IGF-independent Mechanism. *J. Biol. Chem.* 1997;272:12181–88.
 95. Butt AJ, Firth SM, Baxter RC. The IGF axis and programmed cell death. *Immunol. Cell Biol.* 1999;77:256–62.
 96. Lee KW, Ma L, Yan X, Liu B, Zhang XK, Cohen P. Rapid Apoptosis Induction by IGFBP-3 Involves an Insulin-like Growth Factor-independent Nucleomitochondrial Translocation of RXR/Nur77. *J. Biol. Chem. Vol.* 2005;280:16942–48.
 97. Bhattacharyya N, Pechhold K, Shahjee H, Zappala G, Elbi C, Raaka B, Wiench M, Hong J, Rechler MM. Nonsecreted Insulin-like Growth Factor Binding Protein-3(IGFBP-3) Can Induce Apoptosis in Human Prostate Cancer Cells by IGF-independent Mechanisms without Being Concentrated in the Nucleus. *J. Biol. Chem.* 2006;281:24588–601.

98. Jogie-Brahim S, Feldman D, Oh Y. Unraveling Insulin-Like Growth Factor Binding Protein-3 Actions in Human Disease. *Endocr. Rev.* 2009;30:417–37.
99. Kelley KM, Oh Y, Gargosky SE, Gucev Z, Matsumoto T, Hwa V, Ng L, Simpson DM, Rosenfeld RG. Insulin-like growth factor-binding proteins (IGFBPs) and their regulatory dynamics. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 1996;28:619–37.
100. Erondur NE, Dake BL, Moser DR, Lin M, Boes M, Bar RS. Regulation of endothelial IGFBP-3 synthesis and secretion by IGF-I and TGF- β . *Growth Regulat.* 1996;6:1–9.
101. Chevalier X, Tyler JA. Production of binding protein and role of the insulin-like growth factor I binding protein 3 in human articular cartilage explants. *Br. J. Rheumatol.* 1996;35:515–22.
102. Rosenfeld RG, Roberts CT. *The IGF System*. Totowa, NJ: Humana Press, 1999.
103. 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* 37:6572–85
104. Neumann GM, Bach LA. 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.* 1999;274:14587–94.
105. Chelius D, Baldwin MA, Lu X, Spencer EM. Expression, purification and characterization of the structure and disulfide linkages of insulin-like growth factor binding protein-4. *J. Endocrinol.* 2001;168:283–96.
106. Mark S, Kubler B, Honing S, Oesterreicher S, John H, et al. 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* 2005;44:3644–52.
107. 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.* 1998;273:2631–8.
108. Galanis M, Firth SM, Bond J, Nathanielsz A, Kortt AA, Hudson PJ, Baxter RC. Ligand-binding characteristics of recombinant amino- and carboxyl-terminal fragments of human insulin-like growth factor-binding protein-3. *J. Endocrinol.* 2001;169:123–33.

109. Vorwerk P, Hohmann B, Oh Y, Rosenfeld RG, Shymko RM. Binding properties of insulin-like growth factor binding protein-3 (IGFBP-3), IGFBP-3 N- and C-terminal fragments, and structurally related proteins mac25 and connective tissue growth factor measured using a biosensor. *Endocrinol.* 2002;143:1677–85.
110. Yan X, Forbes BE, McNeil KA, Baxter RC, Firth SM. Role of N- and C-terminal Residues of Insulin-like Growth Factor(IGF)-binding Protein-3 in Regulating IGF Complex Formation and Receptor Activation. *J. Biol. Chem.* 2004;279:53232–40.
111. Fowlkes JL, Serra DM. Characterization of glycosaminoglycan-binding domains present in insulin-like growth factor-binding protein-3. *J. Biol. Chem.* 1996;271:14676–9
112. Baxter RC. Glycosaminoglycans inhibit formation of the 140 kDa insulin-like growth factor-binding protein complex. *Biochem. J.* 1990;271:773–7.
113. Arai T, Parker A, Busby WJr, Clemmons DR. 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.* 1994;269:20388–93.
114. Maile LA, Whellams EJ, Holly JM. 2000. Endogenous IGFBP-3 is protected from inducible IGFBP-3 protease activity in normal adult serum. *Growth Horm. IGF Res.* 2000;10:71–7.
115. Moller AV, Jorgensen SP, Chen JW, Larnkjaer A, Ledet T, Flyvbjerg A, Frystyk J. Glycosaminoglycans increase levels of free and bioactive IGF-I in vitro. *Eur. J. Endocrinol.* 2006;155:297–305.
116. Li W, Fawcett J, Widmer HR, Fielder PJ, Rabkin R, Keller GA. Nuclear transport of insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor binding protein-3 in opossum kidney cells. *Endocrinol.* 1997;138:1763–6.
117. Singh B, Charkowicz D, Mascarenhas D. 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.* 2004;279:477–87.
118. Burrows C, Holly JMP, Laurence NJ, Vernon EG, Carter JV, Clark MA, McIntosh J, McCaig C, Winters ZE, Perks CM. Insulin-Like Growth Factor Binding Protein 3 Has Opposing Actions on Malignant and Nonmalignant Breast Epithelial Cells that Are Each Reversible and Dependent upon

- Cholesterol-Stabilized Integrin Receptor Complexes. *Endocrinol.* 2005;147:3484–500.
119. Perks CM, Burrows C, Holly JMP. Intrinsic, pro-apoptotic effects of IGFBP3 on breast cancer cells are reversible: involvement of PKA Rho, and ceramide. *Front. Endocrinol.* 2010;2:Art. no.13.
120. Lee KW, Liu B, Ma L, Li H, Bang P, Koeffler HP, Cohen P. Cellular Internalization of Insulin-like Growth Factor Binding Protein-3. *J. Biol. Chem.* 2004;279:469–76.
121. Firth SM, Baxter RC. The role of glycosylation in the action of IGFBP-3, *Prog. Growth Factor Res.* 1995;6:223–9.
122. Firth SM, Baxter RC. Characterisation of recombinant glycosylation variants of insulin-like growth factor binding protein-3. *J. Endocrinol.* 1999;160:379–87.
123. Conover CA. 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. *Endocrinol.* 1991;129:3259–68.
124. Sommer A, Spratt SK, Tatsuno GP, Tressel T, Lee R, Maack CA. Properties of glycosylated and non-glycosylated human recombinant IGF binding protein-3 (IGFBP-3). *Growth Regulat.* 1993;3:46–9.
125. Yan X, Payet LD, Baxter RC, Firth SM. Activity of human pregnancy insulin-like growth factor binding protein-3: determination by reconstituting recombinant complexes. *Endocrinol.* 2009;150:4968–76.
126. Paharkova-Vatchkova V, Lee KW. Nuclear export and mitochondrial and endoplasmic reticulum localization of IGF-binding protein 3 regulate its apoptotic properties. *Endocr.-Relat. Cancer* 2010;17:293–302.
127. Micutkova L, Hermann M, Offterdinger M, Hess MW, Matscheski A, Pircher H, Muck C, Ebner HL, Laich A, Ferrando-May E, Zwerschke W, Huber LA, Jansen-Durr P. Analysis of the cellular uptake and nuclear delivery of insulin-like growth factor binding protein-3 in human osteosarcoma cells. *Int. J. Cancer* 2012;130:1544–57.
128. Maile LA, Gill ZP, Perks CM, Holly JM. The role of cell surface attachment and proteolysis in the insulin-like growth factor (IGF)-independent effects of IGF-binding protein-3 on apoptosis in breast epithelial cells. *Endocrinology.* 1999;140:4040–5.

129. Grkovic S, O'Reilly VC, Han S, Hong M, Baxter RC, Firth SM. IGFBP-3 binds GRP78, stimulates autophagy and promotes the survival of breast cancer cells exposed to adverse microenvironments. *Oncogene* 2013;32:2412–20.
130. Mishra S, Murphy LJ. Phosphorylation of Insulin-Like Growth Factor (IGF) Binding Protein-3 by Breast Cancer Cell Membranes Enhances IGF-I Binding. *Endocrinol.* 2003;144:4042–50.
131. Battistutta R. Protein kinase CK2 in health and disease: Structural bases of protein kinase CK2 inhibition. *Cellular and molecular life sciences : CMLS.* 2009;66:1868–89.
132. Coverley JA, Martin JL, Baxter RC. The effect of phosphorylation by casein kinase 2 on the activity of insulin-like growth factor-binding protein-3. *Endocrinol.* 2000;141:564–70.
133. Cobb LJ, Mehta H, Cohen P. Enhancing the apoptotic potential of insulin-like growth factor-binding protein-3 in prostate cancer by modulation of CK2 phosphorylation. *Mol. Endocrinol.* 2009;23:1624–33.
134. Cobb LJ, Liu B, Lee KW, Cohen P. Phosphorylation by DNA-dependent protein kinase is critical for apoptosis induction by insulin-like growth factor binding protein-3. *Cancer Res.* 2006;66:10878–84.
135. Schedlich LJ, Nilsen T, John AP, Jans DA, Baxter RC. Phosphorylation of insulin-like growth factor binding protein-3 by deoxyribonucleic acid-dependent protein kinase reduces ligand binding and enhances nuclear accumulation. *Endocrinol.* 2003;144:1984–93.
136. Giudice LC, Farrell EM, Pham H, Lamson G, Rosenfeld RG. Insulin-like growth factor binding proteins in maternal serum throughout gestation and in the puerperium: effects of a pregnancy-associated serum protease activity. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1990;71:806–16.
137. Hossenlopp P, Segovia B, Lassarre C, Roghani M, Bredon M, Binoux M. Evidence of enzymatic degradation of insulin-like growth factor-binding proteins in the 150K complex during pregnancy. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1990;71:797–805.
138. Bang P, Brismar K, Rosenfeld RG. 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.* 1994;78:1119–27.
139. Lassarre C, Binoux M. Insulin-like growth factor binding protein-3 is functionally altered in pregnancy plasma. *Endocrinol.* 1994;134:1254–62.
140. Cwyfan-Hughes SC, Cotterill AM, Molloy AR, Cassell TB, Braude N, Hinds CJ, Wass JA, Holly JMP. The induction of specific proteases for insulin-like growth factor-binding proteins following major heart surgery. *J. Endocrinol.* 1992;135:135–45.
141. Davenport ML, Isley WL, Pucilowska JB, Pemberton LB, Lyman B, Underwood LE, Clemmons DR. Insulin-like growth factor-binding protein-3 proteolysis is induced after elective surgery. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1992;75:590–5.
142. Frost RA, Nachman SA, Lang CH, Gelato MC. Proteolysis of insulin-like growth factor-binding protein-3 in human immunodeficiency virus-positive children who fail to thrive. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1996;81:2957–62.
143. Abribat T, Nedelec B, Jobin N, Garrel DR. Decreased serum insulin-like growth factor-I in burn patients: relationship with serum insulin-like growth factor binding protein-3 proteolysis and the influence of lipid composition in nutritional support. *Crit. Care Med.* 2000;28:2366–72.
144. Bereket A, Lang CH, Blethen SL, Fan J, Frost RA, Wilson TA. Insulin-like growth factor binding protein-3 proteolysis in children with insulin-dependent diabetes mellitus: a possible role for insulin in the regulation of IGFBP-3 protease activity. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1995;80:2282–8.
145. Zachrisson I, Brismar K, Carlsson-Skwirut C, Dahlquist G, Wallensteen M, Bang P. Increased 24 h mean insulin-like growth factor binding protein-3 proteolytic activity in pubertal type 1 diabetic boys. *Growth Horm. IGF Res.* 2000;10:324–31.
146. Ekstrom K, Salemyr J, Zachrisson I, Carlsson-Skwirut C, Ortqvist E, Bang P. Normalization of the IGF-IGFBP axis by sustained nightly insulinization in type 1 diabetes. *Diabetes Care* 2007;30:1357–63.
147. Bang P, Fielder PJ. Human pregnancy serum contains at least two distinct proteolytic activities with the ability to degrade insulin-like growth factor binding protein-3. *Endocrinol.* 1997;138:3912–17.

148. Hedstrom L. Serine Protease Mechanism and Specificity. *Chem. Rev.* 2002;102:4501–24.
149. Miyamoto S, Yano K, Sugimoto S, Ishii G, Hasebe T, Endoh Y, Kodama K, Goya M, Chiba T, Ochiai A. Matrix metalloproteinase-7 facilitates insulin-like growth factor bioavailability through its proteinase activity on insulin-like growth factor binding protein 3. *Cancer Res.* 2004;64:665–71.
150. Shahjee H, Bhattacharyya N, Zappala G, Wiench M, Prakash S, Rechler MM. An N-terminal fragment of insulin-like growth factor binding protein-3 (IGFBP-3) induces apoptosis in human prostate cancer cells in an IGF-independent manner. *Growth Horm. IGF Res.* 2008;18:188–97.
151. Mohanraj L, Kim HS, Li W, Cai Q, Kim KE, Shin HJ, Lee YJ, Lee WJ, Kim JH, Oh Y. IGFBP-3 inhibits cytokine-induced insulin resistance and early manifestations of atherosclerosis. *PLoS One* 2013;8:e55084.
152. Booth BA, Boes M, Bar RS. IGFBP-3 proteolysis by plasmin, thrombin, serum: heparin binding, IGF binding, and structure of fragments. *Am. J. Physiol.* 1996;271:E465–70.
153. Booth BA, Boes M, Dake BL, Bar RS. Isolation and characterization of plasmin-generated bioactive fragments of IGFBP-3. *Am. J. Physiol.* 1999;276:E450–4.
154. Gibson TL, Cohen P. Inflammation-related neutrophil proteases, cathepsin G and elastase, function as insulin-like growth factor binding protein proteases. *Growth Horm. IGF Res.* 1999;9:241–53.
155. Zwad O, Kubler B, Roth W, Scharf JG, Saftig P, Peters C, Bräulke T. Decreased intracellular degradation of insulin-like growth factor binding protein-3 in cathepsin L deficient fibroblasts. *FEBS Lett.* 2002;510:211–5.
156. Fielder PJ, Rosenfeld RG, Graves HC, Grandbois K, Maack CA, Sawamura S, Ogawa Y, Sommer A, Cohen P. Biochemical analysis of prostate specific antigen-proteolyzed insulin-like growth factor binding protein-3. *Growth Regul.* 1994;4:164–72.
157. Koistinen H, Paju A, Koistinen R, Finne P, Lovgren J. Prostate-specific antigen and other prostate-derived proteases cleave IGFBP-3, but prostate cancer is not associated with proteolytically cleaved circulating IGFBP-3. *Prostate* 2002;50:112–8.

158. Shi Z, Xu W, Loechel F, Wewer UM, Murphy LJ. ADAM 12, a disintegrin metalloprotease, interacts with insulin-like growth factor-binding protein-3. *J. Biol. Chem.* 2000;275:18574–80.
159. Cortizo AM, Gagliardino JJ. Changes induced by non-enzymatic glycosylation of IGF-binding protein-3: effects on its binding properties and on its modulatory effect on IGF-I mitogenic action. *J. Endocrinol.* 1995;144:119–26.
160. Cortizo AM, Lee PDK, Cédola NV, Jasper H, Gagliardino JJ. Relationship between non-enzymatic glycosylation and changes in serum insulin-like growth factor-1 (IGF-1 and IGF-binding protein-3 levels in patients with type 2 diabetes mellitus. *Acta Diabetol.* 1998;35:85–90.
161. Nedić O, Lagundžin D, Masnikosa R. Posttranslational modifications of the insulin-like growth factor-binding protein 3 in patients with type 2 diabetes mellitus assessed by affinity chromatography. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 2012;904:93–8
162. Yamada PM, Lee KW. Perspectives in mammalian IGFBP-3 biology: local vs. systemic action. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2009;296:C954–C976.
163. Koedam JA, Hoogerbrugge CM, Van Buul-Offers SC. Insulin-like Growth Factor Binding Proteins-3 and -5 Form Sodium Dodecyl Sulfate-Stable Multimers. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 1997;240:707–14.
164. 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 Bio. Med.* 2013;65:1195–200.
165. Santer FR, Bacher N, Moser B, Morandell D, Ressler S, Firth SM, Spoden GA, Sergi C, Baxter RC, Jansen-Dürr P, Zwerschke W. Nuclear Insulin-Like Growth Factor Binding Protein-3 Induces Apoptosis and Is Targeted to Ubiquitin/Proteasome-Dependent Proteolysis. *Cancer Res.* 2006;66:3024–33.
166. Khosravi MJ, Diamandi A, Mistry J, Krishna RG, Khare A. Acid-Labile Subunit of Human Insulin-Like Growth Factor-Binding Protein Complex: Measurement, Molecular, and Clinical Evaluation. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1997;82:3944–51.
167. Juul A, Møller S, Mosfeldt-Laursen E, Rasmussen MH, Scheike T, Pedersen SA, Kastrup KW, Yu H, Mistry J, Rasmussen S, Müller J, Henriksen J, Skakkebaek NE. The Acid-Labile Subunit of Human Ternary Insulin-Like

- Growth Factor Binding Protein Complex in Serum: Hepatosplanchnic Release, Diurnal Variation, Circulating Concentrations in Healthy Subjects, and Diagnostic Use in Patients with Growth Hormone Deficiency. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1998;83:4408–15.
168. Janosi JBM, Ramsland PA, Motti MR, Firth SM, Baxter RC, Delhanty PJD. The acid-labile subunit of the serum insulin-like growth factor-binding protein complexes structural determination by molecular modeling and electron microscopy. *J. Biol. Chem.* 1999;274:23328–32.
169. Boisclair YR, Rhoads RP, Ueki I, Wang J, Ooi GT. 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.* 2001;170:63–70.
170. McCusker RH, Camacho-Hubner C, Bayne ML, Cascieri MA, Clemmons DR. Insulin-like growth factor (IGF) binding to human fibroblast and glioblastoma cells: the modulating effect of cell released IGF binding proteins (IGFBPs). *J. Cell. Physiol.* 1990;144:244–53.
171. McCusker RH, Busby WH, Dehoff MH, Camacho-Hubner C, Clemmons, DR. Insulin-like growth factor (IGF) binding to cell monolayers is directly modulated by the addition of IGF-binding proteins. *Endocrinol.* 1991;129:939–49.
172. Forsten KE, Akers RM, San Antonio JD. Insulin-like growth factor (IGF) binding protein-3 regulation of IGF-I is altered in an acidic extracellular environment. *J. Cell. Physiol.* 2001;189:356–65.
173. Valentinis B, Bhalra A, DeAngelis T, Baserga R, Cohen P. The human insulin-like growth factor (IGF) binding protein-3 inhibits the growth of fibroblasts with a targeted disruption of the IGF-I receptor gene, *Mol. Endocrinol.* 1995;9:361–67.
174. Martin JL, Weenink SM, Baxter RC. Insulin-like growth factor-binding protein-3 potentiates epidermal growth factor action in MCF-10A mammary epithelial cells. Involvement of p44/42 and p38 mitogen-activated protein kinases. *J. Biol. Chem.* 2003;278:2969–76.
175. Kim HS, Ingermann AR, Tsubaki J, Twigg SM, Walker GE, Oh Y. Insulin-like growth factor-binding protein 3 induces caspase-dependent apoptosis through a death receptor-132 mediated pathway in MCF-7 human breast cancer cells. *Cancer Res.* 2004;64:2229–37.

176. Oh Y, Müller HL, Pham H, Rosenfeld RG. Demonstration of receptors for insulin-like growth factor binding protein-3 on Hs578T human breast cancer cells. *J. Biol. Chem.* 1993;268:26045–48.
177. Oh Y, Müller HL, Lamson G, Rosenfeld RG. Insulin like growth factor (IGF)-independent action of IGFBP-3 in Hs578T human breast cancer cells. Cell surface binding and growth inhibition. *J. Biol. Chem.* 1993;268:14964–71.
178. Spoerri PE, Caballero S, Wilson SH, Shaw LC, Grant MB. Expression of IGFBP-3 by Human Retinal Endothelial Cell Cultures: IGFBP-3 Involvement in Growth Inhibition and Apoptosis. *Invest. Ophth. Vis. Sci.* 2003;44:365–9.
179. Ikonen M, Liu B, Hashimoto Y, Ma L, Lee KW, Niikura T, Nishimoto I, Cohen P. Interaction between the Alzheimer's survival peptide humanin and insulin-like growth factor-binding protein 3 regulates cell survival and apoptosis. *Procl. Natl. Acad. Sci.* 2003;100:13042–7.
180. Leibowitz BJ, Agostini-Dreyer A, Jetzt AE, Krumm CS, Cohick WS. IGF Binding Protein-3 Mediates Stress-Induced Apoptosis in Non-Transformed Mammary Epithelial Cells. *J. Cell. Physiol.* 2013;228:734–42.
181. Lee HS, Woo SJ, Koh HW, Ka SO, Zhou L, Jang KY, Lim HS, Kim HO, Lee SI, Park BH. Regulation of Apoptosis and Inflammatory Responses by Insulin-like Growth Factor Binding Protein 3 in Fibroblast-like Synoviocytes and Experimental Animal Models of Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Rheum.* 2014;66:863–73.
182. Butt AJ, Firth SM, King MA, Baxter RC. Insulin-like growth factor binding protein-3 modulates expression of Bax and Bcl-2 and potentiates p53-independent radiation induced apoptosis in human breast cancer cells. *J. Biol. Chem.* 2000;275:39174–81.
183. Fowler CA, Perks CM, Newcomb PV, Savage PB, Farndon JR, Holly JM. Insulin-like growth factor binding protein-3 potentiates paclitaxel-induced apoptosis in human breast cancer cells. *Int. J. Cancer* 2000;88:448–53.
184. Fraser A, Evan G. A license to kill. *Cell* 1996;85:781–84.
185. Li J, Yuan J. Caspases in apoptosis and beyond. *Oncogene* 2008;27:6194–206.
186. Ingermann AR, Yang YF, Han J, Mikami A, Garza AE, Mohanraj L, Fan L, Idowu M, Ware JL, Kim HS, Lee DY, Oh Y. Identification of a Novel Cell Death Receptor Mediating IGFBP-3-induced Anti-tumor Effects in Breast and Prostate Cancer. *J. Biol. Chem.* 2010;285:30233–46.

187. Williams AC, Smartt H, H-Zadeh AM, MacFarlane M, Paraskeva C, Collard TJ. Insulin-like growth factor binding protein 3 (IGFBP-3) potentiates TRAIL-induced apoptosis of human colorectal carcinoma cells through inhibition of NF- κ B. *Cell Death Differ.* 2007;14:137–45.
188. Han J, Jogie-Brahim S, Harada A, Oh Y. Insulin-like growth factor-binding protein-3 suppresses tumor growth via activation of caspase-dependent apoptosis and cross-talk with NF- κ B signaling, *Cancer Lett.* 2011;307:200–10.
189. Sovak MA, Bellas RE, Kim DW, Zanieski GJ, Rogers AE, Traish AM, Sonenshein GE. Aberrant nuclear factor-kappaB/Rel expression and the pathogenesis of breast cancer. *J. Clin. Invest.* 1997;100:2952–60.
190. Palayoor ST, Youmell MY, Calderwood SK, Coleman CN, Price BD. Constitutive activation of IkappaB kinase alpha and NF-kappaB in prostate cancer cells is inhibited by ibuprofen. *Oncogene* 1999;18:7389–94.
191. H-Zadeh AM, Collard TJ, Malik K, Hicks DJ, Paraskeva C, Williams AC. Induction of apoptosis by the 16-kDa amino-terminal fragment of the insulin-like growth factor binding protein 3 in human colonic carcinoma cells. *Int. J. Oncol.* 2006;29:1279–86.
192. Cohen P, Rajah R, Rosenbloom J, Herrick DJ. IGFBP-3 mediates TGF-1-induced cell growth in human airway smooth muscle cells. *Am. J. Physiol.* 2000;278:L545–L51.
193. Kansra S, Ewton DZ, Wang J, Friedman E. IGFBP-3 mediates TGF1 proliferative response in colon cancer cells. *Int. J. Cancer* 2000;87:373–378
194. Takaoka M, Kim SH, Okawa T, Michaylira CZ, Stairs DB, Johnstone CN, Andl CD, Rhoades B, Lee JJ, Klein-Szanto AJP, El-Deiry WS, Nakagawa H. IGFBP-3 Regulates Esophageal Tumor Growth Through IGF Dependent and Independent Mechanisms. *Cancer Biol. Ther.* 2007;6:534–40.
195. Chang KH, Chan-Ling T, McFarland EL, Afzal A, Pan H, Baxter LC, Shaw LC, Caballero S, Sengupta N, Li Calzi S, Sullivan SM, Grant MB. IGF binding protein-3 regulates hematopoietic stem cell and endothelial precursor cell function during vascular development. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2007;104:10595–600.
196. Lofqvist C, Chen J, Connor KM, Smith AC, Aderman CM, Liu N, Pintar JE, Ludwig T, Hellstrom A, Smith LE. IGFBP3 suppresses retinopathy through

- suppression of oxygen-induced vessel loss and promotion of vascular regrowth. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2007;104:10589–94.
197. Leal SM, Liu Q, Huang SS, Huang JS. The type V transforming growth factor beta receptor is the putative insulin-like growth factor-binding protein 3 receptor. *J. Biol. Chem.* 1997;272:20572–6.
198. Huang SS, Leal SM, Chen CL, Liu IH, Huang JS. Identification of insulin receptor substrate proteins as key molecules for the TbetaR-V/ LRP-1-mediated growth inhibitory signaling cascade in epithelial and myeloid cells. *Faseb J.* 2004;18:1719–21.
199. Smart EJ, Graf GA, McNiven MA, Sessa WC, Engelman JA, Scherer PE, Okamoto T, Lisanti MP. Caveolins, liquid-ordered domains, and signal transduction. *Mol. Cell. Biol.* 1999;19:7289–304.
200. Weinzimer SA, Gibson TB, Collett-Solberg PF, Khare A, Liu B, Cohen P. Transferrin is an insulin-like growth factor-binding protein-3 binding protein. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2001;86:1806–13.
201. Yamanaka Y, Fowlkes JL, Wilson EM, Rosenfeld RG, Oh Y. Characterization of insulin-like growth factor binding protein-3 (IGFBP-3) binding to human breast cancer cells: kinetics of IGFBP-3 binding and identification of receptor binding domain on the IGFBP-3 molecule. *Endocrinol.* 1999;140:1319–28.
202. Radulescu RT. Nuclear localization signal in insulin-like growth factor-binding protein type 3. *Trends Biochem. Sci.* 1994;19:278.
203. Schedlich LJ, Le Page SL, Firth SM, Briggs LJ, Jans DA, Baxter RC. Nuclear import of Insulin-like Growth Factor-binding Protein-3 and -5 is mediated by the importin β subunit. *J. Biol. Chem.* 2000;275:23462–70.
204. Liu B, Lee HY, Weinzimer SA, Powell DR, Clifford JL, Kurie JM, Cohen P. Direct functional interactions between insulin-like growth factor-binding protein-3 and retinoid X receptor-alpha regulate transcriptional signaling and apoptosis. *J. Biol. Chem.* 2000;275:33607–13.
205. Schedlich LJ, O’Han MK, Leong GM, Baxter RC. Insulin-like growth factor binding protein-3 prevents retinoid receptor heterodimerization: implications for retinoic acid-sensitivity in human breast cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2004;314:83–8.

206. Lee KW, Cobb LJ, Paharkova-Vatchkova V, Liu B, Milbrandt J, Cohen P. Contribution of the orphan nuclear receptor Nur77 to the apoptotic action of IGFBP-3. *Carcinogenesis* 2007;28:1653–8.
207. Liu B, Lee KW, Li H, Ma L, Lin GL, Chandraratna RA, Cohen P. Combination therapy of insulin-like growth factor binding protein-3 and retinoid X receptor ligands synergize on prostate cancer cell apoptosis in vitro and in vivo. *Clin. Cancer Res.* 2005;11:4851–6.
208. Liao L, Dearth RK, Zhou S, Britton OL, Lee AV, Xu J. Liver-specific overexpression of the insulin-like growth factor-I enhances somatic growth and partially prevents the effects of growth hormone deficiency. *Endocrinol.* 2006;147:3877–88.
209. DiGirolamo DJ, Mukherjee A, Fulzele K, Gan Y, Cao X, Frank SJ, Clemens TL. Mode of growth hormone action in osteoblasts. *J. Biol. Chem.* 2007;282:31666–74.
210. Blum WF. Insulin-like growth factors and IGF-binding proteins: their use for diagnosis of growth hormone deficiency. *Growth Hormone in Adults: Physiological and Clinical Aspects*. Cambridge, UK: Cambridge University Press, 1996.
211. Marzullo P, DiSomma C, Pratt KL, Khosravi J, Diamandis A, Lombardi G, Colao A, Rosenfeld RG. Usefulness of different biochemical markers of the insulin-like growth factor (IGF) family in diagnosing growth hormone excess and deficiency in adults. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2001;86:3001–8.
212. Arosio M, Garrone S, Bruzzi P, Faglia G, Minuto F, Barreca A. Diagnostic value of the acid-labile subunit in acromegaly: evaluation in comparison with insulin-like growth factor (IGF) I, and IGF-binding protein-1, -2, and -3. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:1091–8.
213. Martin JL, Ballesteros M, Baxter RC. Insulin-like growth factor-I (IGF-I) and transforming growth factor-1 release IGFbinding protein-3 from human fibroblasts by different mechanisms. *Endocrinol.* 1992;131:1703–10.
214. Oh Y, Muller HL, Ng L, Rosenfeld RG. Transforming growth factor- β -induced cell growth inhibition in human breast cancer cells is mediated through insulin-like growth factor-binding protein-3 action. *J. Biol. Chem.* 1995;270:13589–92.

215. Gucev ZS, Oh Y, Kelley KM, Rosenfeld RG. Insulin-like growth factor binding protein 3 mediates retinoic acid- and transforming growth factor β 2-induced growth inhibition in human breast cancer cells. *Cancer Res.* 1996;56:1545–50.
216. Yateman ME, Claffey DC, Cwyfan Hughes SC, Frost VJ, Wass JA, Holly JM. Cytokines modulate the sensitivity of human fibroblasts to stimulation with insulin-like growth factor-I (IGF-I) by altering endogenous IGF-binding protein production. *J. Endocrinol.* 1993;137:151–9.
217. Besset V, Le Magueresse-Battistoni B, Collette J, Benahmed M. Tumor necrosis factor alpha stimulates insulin-like growth factor binding protein 3 expression in cultured porcine Sertoli cells. *Endocrinology* 1996;137:296–303.
218. Olney RC, Wilson DM, Mohtai M, Fielder PJ, Smith RL. Interleukin-1 and tumor necrosis factor-alpha increase insulin-like growth factor binding protein-3 production and IGFBP-3 protease activity in human articular chondrocytes. *J. Endocrinol.* 1995;146:279–86.
219. Nickerson T, Pollak M. Bicalutamide (Casodex)-induced prostate regression involves increased expression of genes encoding insulin-like growth factor binding protein. *Urology* 1999;54:1120–5.
220. Boyle BJ, Zhao XY, Cohen P, Feldman D. Insulin-like growth factor binding protein-3 mediates 1 alpha ,25-dihydroxyvitamin d(3) growth inhibition in the LNCaP prostate cancer cell line through p21/WAF1. *J. Urol.* 2001;165:1319–24.
221. Peng L, Malloy PJ, Feldman D. Identification of a functional vitamin D response element in the human insulin-like growth factor binding protein-3 promoter. *Mol. Endocrinol.* 2004;18:1109–19.
222. Huynh H, Yang X, Pollak M. Estradiol and antiestrogens regulate a growth inhibitory insulin-like growth factor binding protein 3 autocrine loop in human breast cancer cells. *J. Biol. Chem.* 1996;271:1016–21.
223. Peng L, Wang J, Malloy PJ, Feldman D. The role of insulin-like growth factor binding protein-3 (IGFBP-3) in the growth inhibitory actions of androgens in LNCaP human prostate cancer cells. *Int. J. Cancer* 2008;22:558–66.
224. Buckbinder L, Talbott R, Velasco-Miguel S, Takenaka I, Faha B, Seizinger BR, Kley N. Induction of the growth inhibitor IGF-binding protein-3 by p53. *Nature* 1995;377:646–9.

225. Bourdon JC, Deguin-Chambon V, Lelong JC, Dessen P, May P, Debuire B, May E. Further characterization of the p53 responsive element-identification of new candidate genes for trans-activation by p53. *Oncogene* 1997;14:85–94.
226. Jenuwein T, Allis CD. Translating the histone code. *Science* 2001;293:1074–80.
227. Feinberg AP, Vogelstein B. Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts. *Nature* 1983;301:89–92.
228. Jones PA, Laird PW. Cancer epigenetics comes of age. *Nature Genet.* 1999;21:163–7.
229. Baylin SB, Esteller M, Rountree MR, Bachman KE, Schuebel K, Herman JG. Aberrant patterns of DNA methylation, chromatin formation and gene expression in cancer. *Hum. Mol. Genet.* 2001;10:687–92.
230. Esteller M, Corn PG, Baylin SB, Herman JG. A gene hypermethylation profile of human cancer. *Cancer Res* 2001;61:3225–9.
231. Tomii K, Tsukuda K, Toyooka S, Dote H, Hanafusa T, Asano H, Naitou M, Doihara H, Kisimoto T, Katayama H, Pass HI, Date H, Shimizu N. Aberrant promoter methylation of insulin-like growth factor binding protein-3 gene in human cancers. *Int. J. Cancer* 2007;120:566–73.
232. Wiley A, Katsaros D, Fracchioli S, Yu H. Methylation of the insulin-like growth factor binding protein-3 gene and prognosis of epithelial ovarian cancer. *Int. J. Gynecol. Cancer* 2006;16:210–8.
233. Ibanez de Caceres I, Dulaimi E, Hoffman AM, Al-Saleem T, Uzzo RG, Cairns P. Identification of novel target genes by an epigenetic reactivation screen of renal cancer. *Cancer Res.* 2006;66:5021–8.
234. Hanafusa T, Yumoto Y, Nouse K, Nakatsukasa H, Onishi T, Fujikawa T, Taniyama M, Nakamura S, Uemura M, Takuma Y, Yumoto E, Higashi T, Tsuji T. Reduced expression of insulin-like growth factor binding protein-3 and its promoter hypermethylation in human hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett.* 2002;176:149–58.
235. Paquette J, Bessette B, Ledru E, Deal C. Identification of upstream stimulatory factor binding sites in the human IGFBP3 promoter and potential implication of adjacent single-nucleotide polymorphisms and responsiveness to insulin. *Endocrinol.* 2007;148:6007–18.
236. Prieur A, Tirode F, Cohen P, Delattre O. EWS/FLI-1 silencing and gene profiling of Ewing cells reveal downstream oncogenic pathways and a crucial

- role for repression of insulin-like growth factor binding protein-3. *Mol. Cell. Biol.* 2004;24:7275–83.
237. Chun SY, Chen F, Washburn JG, MacDonald JW, Innes KL, Zhao R, Cruz-Correa MR, Dang LH, Dang DT. CDX2 promotes anchorage-independent growth by transcriptional repression of IGFBP-3. *Oncogene* 2007;26:4725–29.
238. Lippard SJ, Berg JM. *Principles of Bioinorganic Chemistry*. Mill Valley: University Science Books, 1994.
239. Ganz T, Nemeth E. Heparin and iron homeostasis. *Biochim. Biophys. Acta* 2012;1823:1434–43.
240. Aisen P. Iron transport and storage proteins, *Annu. Rev. Biochem.* 1980;49:357–93.
241. Beutler E, Gelbart T, Lee P, Trevino R, Fernandez MA, Fairbanks VF. Molecular characterization of a case of atransferrinemia. *Blood* 2000;96:4071-4.
242. Suire S, Fontaine I, Guillou F. Transferrin gene expression and secretion in rat Sertoli cells. *Mol. Reprod. Dev.* 1997;48:168–75.
243. Lecureuil C, Saleh MC, Fontaine I, Baron B, Zakin MM, Guillou F. Transgenic mice as a model to study the regulation of human transferrin expression in Sertoli cells. *Hum. Reprod.* 2004;6:1300–7.
244. Tsutsumi M, Skinner MK, Sanders-Bush E. Transferrin gene expression and synthesis by cultured choroid plexus epithelial cells. Regulation by serotonin and cyclic adenosine 3',5'-monophosphate. *J. Biol. Chem.* 1989;264: 9626–31.
245. Bloch B, Popovici T, Levin MJ, Tuil D, Kahn A. Transferrin gene expression visualised in oligodendrocytes of the rat brain by using in situ hybridization and immunohistochemistry. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1985; 82, 6706–10.
246. Nicolson GL, Inoue T, Van Pelt CS, Cavanaugh PG. Differential expression of a Mr approximately 90,000 cell surface transferrin receptor-related glycoprotein on murine B16 metastatic melanoma sublines selected for enhanced brain or ovary colonization. *Cancer Res.* 1990;50:515–20.
247. Inoue T, Cavanaugh PG, Steck PA, Brünner N, Nicolson GL. Differences in transferrin response and numbers of transferrin receptors in rat and human mammary carcinoma lines of different metastatic potentials. *J. Cell. Physiol.* 1993;156:212–7.

248. Qian ZM, Li H, Sun H, Ho K. Targeted drug delivery via the transferrin receptor-mediated endocytosis pathway. *Pharmacol. Rev.* 2002;54:561–87.
249. Gomme PT, McCann KB. Transferrin: structure, function and potential therapeutic actions. *Drug Discov. Today* 2005;10:267-73.
250. Parkkinen J, von Bonsdorff L, Ebeling F, Sahlstedt L. Function and therapeutic development of apotransferrin. *Vox Sang.* 2003;83:Suppl. 1:321–6.
251. Thorstensen K, Romslo I. The role of transferrin in the mechanism of cellular iron uptake. *Biochem. J.* 1990;271:1–10.
252. Schrieber WE. Iron, porphyrin, and bilirubin metabolism. *Clinical Chemistry: Theory, analysis, and correlation.* St. Louis: The C.V. Mosby Company, 1989.
253. Anderson BF, Baker HM, Dodson EJ, Norris GE, Rumball SV, Waters JM, Baker EN.. Structure of human lactoferrin at 3.2 Å resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1987;84:1769–73.
254. He QY, Mason AB. Molecular aspects of release of iron from transferrin. *Molecular and Cellular Iron Transport.* New York, Basel: Marcel Dekker, 2002.
255. Aisen P, Leibman A, Zweier J. Stoichiometric and site characteristics of the binding of iron to human transferrin. *J. Biol. Chem.* 1978;253:1930–7.
256. Welch S. A comparison of the structure and properties of serum transferrin from 17 animal species. *Comp. Biochem. Physiol. Part B: Comparative Biochem.* 1990;97:417–27.
257. de Jong G, van Dijk JP, van Eijk HG. The biology of transferrin. *Clin. Chim. Acta* 1990;190:1–46.
258. Rohrer JS, Avdalović N. Separation of Human Serum Transferrin Isoforms by High-Performance Pellicular Anion-Exchange Chromatography. *Protein Expres. Purif.* 1996;7:39–44.
259. Kleinert P, Kuster T, Durka S, Ballhausen D, Bosshard NU, Steinmann B, Hänseler E, Jaeken J, Heizmann CW, Troxler H. Mass Spectrometric Analysis of Human Transferrin in Different Body Fluids. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2003; 41:1580–88.
260. Fenton HJH. Oxidation of tartaric acid in presence of iron. *J. Chem. Soc.* 1894; 65:899–910.

261. van Campenhout A, van Campenhout CM, Lagrou AR, Manuel-y-Keenoy B. Transferrin modifications and lipid peroxidation: Implications in diabetes mellitus. *Free Radic. Res.* 2003;37:1069–77.
262. Rice-Evans C. Oxidised low density lipoproteins. *Free Radicals: From Basic Science to Medicine*. Basel: Birkhäuser Verlag, 2003.
263. Sun H, Li H, Sadler PJ. Transferrin as a Metal Ion Mediator. *Chem. Rev.* 1999; 99:2817–42.
264. Vincent JB, Love S. The binding and transport of alternative metals by transferrin, *Biochim. Biophys. Acta* 2012;1820:362–78.
265. Harris WR. Anion binding properties of the transferrins. Implications for function. *Biochim. Biophys. Acta* 2012;1820:348–61.
266. El Hage Chahine JM, Hémadi M, Ha-Duong NT. Uptake and release of metal ions by transferrin and interaction with receptor 1. *Biochim. Biophys. Acta* 2012;1820:334–47.
267. Beutler E, Hoffbrand AV, Cook JD. Iron deficiency and overload. *Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program* 2003:40–61.
268. Von Bonsdorff L, Sahlstedt L, Ebeling F, Ruutu T, Parkkinen J. Apotransferrin administration prevents growth of *Staphylococcus epidermidis* in serum of stem cell transplant patients by binding of free iron. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 2003;37:45–51.
269. Ardehali R, Shi L, Janatova J, Mohammad SF, Burns GL. The inhibitory activity of serum to prevent bacterial adhesion is mainly due to apo-transferrin. *J. Biomed. Mater. Res.* 2003;66:21–8.
270. Shimo-Oka T, Hagiwara Y, Ozawa E. Class specificity of transferrin as a muscle trophic factor. *J. Cell. Physiol.* 1986;126:341–51.
271. Sirbasku DA, Pakala R, Sato H, Eby JE. Thyroid hormone dependent pituitary tumor cell growth in serum-free chemically defined culture. A new regulatory role for apo-transferrin. *Biochemistry* 1991;30:7466–77.
272. Bruinink A, Sidler C, Birchler F. Neurotrophic effects of transferrin on embryonic chick brain and neural retinal cell cultures. *Int. J. Dev. Neurosci.* 1996;1:785–95.
273. Carlevaro MF, Albini A, Ribatti D, Gentili C, Benelli R, Cermelli S, Cancedda R, Cancedda FD. Transferrin promotes endothelial cell migration and invasion: implication in cartilage neovascularization. *J. Cell Biol.* 1997;136:1375–84.

274. Ohtsuka N, Urase K, Momoi T, Nogawa H. Induction of bud formation of embryonic mouse tracheal epithelium by fibroblast growth factor plus transferrin in mesenchyme-free culture. *Dev. Dyn.* 2001;222:263–72.
275. Paez PM, Marta CB, Moreno MB, Soto EF, Pasquini JM. Apotransferrin decreases migration and enhances differentiation of oligodendroglial progenitor cells in an in vitro system. *Dev. Neurosci.* 2002;24:47–58.
276. Enns CA. The Transferrin Receptor. *Molecular and Cellular Iron Transport*. New York: Marcel Dekker Inc, 2002.
277. Li H, Qian ZM. Transferrin/Transferrin Receptor-Mediated Drug Delivery, Inc. *Med. Res. Rev.* 2002;22:225–50.
278. Deaglio S, Capobianco A, Cali A, Bellora F, Alberti F, Righi L, Sapino A, Camaschella C, Malavasi F. Structural, functional, and tissue distribution analysis of human transferrin receptor-2 by murine monoclonal antibodies and a polyclonal antiserum. *Blood* 2002;100:3782–9.
279. Camaschella C. Why do humans need two types of transferrin receptor? Lessons from a rare genetic disorder. *Haematologica* 2005;90:296–8.
280. Chloupková M, Zhang AS, Enns CA. Stoichiometries of Transferrin Receptors 1 and 2 in Human Liver. *Blood Cells Mol. Dis.* 2010;44:28–33.
281. Hèmedi M, Kahn PH, Miquel G, El Hage Chahine JM. Transferrin's mechanism of interaction with receptor 1. *Biochemistry* 2004;43:1736–45.
282. Paterson S, Armstrong NJ, Iacopetta BJ, McArdle HJ, Morgan EH. Intravesicular pH and iron uptake by immature erythroid cells. *J. Cell. Physiol.* 1984;120:225–32.
283. Jakupec MA, Keppler BK. Gallium and other main group metal compounds as antitumor agents. *Met. Ions Biol. Syst.* 2004;42:425–62.
284. Weaver M, Laske DW. Transferrin receptor ligand-targeted toxin conjugate (Tf-CRM107) for therapy of malignant gliomas. *J. Neurooncol.* 2003;65:3–13.
285. Beyer U, Roth T, Schumacher P, Maier G, Unold A, Frahm AW, Fiebig HH, Unger C, Kratz F. Synthesis and in vitro efficacy of transferrin conjugates of the anticancer drug chlorambucil. *J. Med. Chem.* 1998;41:2701–8.
286. Wang F, Jiang X, Yang DC, Elliott RL, Head JF. Doxorubicin-galliumtransferrin conjugate overcomes multidrug resistance: evidence for drug accumulation in the nucleus of drug resistant MCF-7/ADR cells. *Anticancer Res.* 2000;20:799–808.

287. Sahoo SK, Ma W, Labhasetwar V. Efficacy of transferrin conjugated paclitaxel-loaded nanoparticles in a murine model of prostate cancer. *Int. J. Cancer* 2004;112:335–40.
288. Schnierle BS, Groner B. Retroviral targeted delivery. *Gene Ther.* 1996;3:1069–73.
289. Ali SA, Joao HC, Hammerschmid F, Eder J, Steinkasserer A. Transferrin Trojan horses as a rational approach for the biological delivery of therapeutic peptide domains. *J. Biol. Chem.* 1999;274:24066–73.
290. Torti SV, Torti FM. Ironing Out Cancer. *Cancer Res*; 2011;71:1511–4.
291. Cook JD, Barry WE, Hershko C, Fillet G, Finch CA. Iron kinetics with emphasis on iron overload. *Am. J. Pathol.* 1973;72:337–43.
292. Fleming MD, Trenor CC III, Su MA, Foernzler D, Beier DR, Dietrich WF, Andrews NC. Microcytic anaemia mice have a mutation in Nramp2, a candidate iron transporter gene. *Nat Genet* 1997;16:383–6.
293. Gunshin H, Mackenzie B, Berger UV, Gunshin Y, Romero MF, Boron WF, Nussberger S, Gollan JL, Hediger MA. Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter. *Nature* 1997;388:482–8.
294. Vulpe CD, Kuo YM, Murphy TL, Cowley L, Askwith C, Libina N, Gitschier J, Anderson GJ. Hephaestin, a ceruloplasmin homologue implicated in intestinal iron transport, is defective in the sla mouse. *Nature Genet.* 1999;21:195–9.
295. McKie AT, Marciani P, Rolfs A, Brennan K, Wehr K, Barrow D, Miret S, Bomford A, Peters TJ, Farzaneh F, Hediger MA, Hentze MW, Simpson RJ. A novel duodenal iron-regulator transporter, IREG1, implicated in the basolateral transfer of iron to the circulation. *Mol Cell* 2000;5:299–309.
296. Andrews NC. Disorders of iron metabolism. *New Eng. J. Med.* 1999;341:1986–95.
297. Andrews NC, Schmidt PJ. Iron Homeostasis. *Annu. Rev. Physiol.* 2007;69:69–85.
298. Harrison PM, Arosio P. The ferritins: molecular properties, iron storage function and cellular regulation. *Biochim. Biophys. Acta-Bioenergetics* 1996;1275:161–203.
299. Adams GR. Invited Review: Autocrine/paracrine IGF-I and skeletal muscle adaptation. *J. Appl. Physiol.* 2002;93:1159–67.

300. Borst SE, De Hoyos DV, Garzarella L, Vincent K, Pollock BH, Lowenthal DT, Pollock ML. Effects of resistance training on insulin-like growth factor-I and IGF binding proteins. *Med. Sci. Sports Exerc.* 2001;33:648–53.
301. Elloumi M, El Elj N, Zaouali M, Maso F, Filaire E, Tabka Z, Lac G. IGFBP-3, a sensitive marker of physical training and overtraining. *Br. J. Sports Med.* 2005;39:604–10.
302. Izquierdo M, Ibañez J, González-Badillo JJ, Häkkinen K, Ratamess NA, Kraemer WJ, French DN, Eslava J, Altadill A, Asiain X, Gorostiaga EM. Differential effects of strength training leading to failure versus not to failure on hormonal responses, strength, and muscle power gains. *J. Appl. Physiol.* 2006;100:1647–56.
303. Nindl BC, Pierce J. Insulin-like growth factor I as a biomarker of health, fitness, and training status. *Med. Sci. Sports Exerc.* 2010;42:39–49.
304. Gatti R, De Palo EF, Antonelli G, Spinella P. IGF-I/IGFBP system: Metabolism outline and physical exercise. *J. Endocrinol. Invest.* 2012;35:699–707.
305. Bermon S, Ferrari P, Bernard P, Altare S, Dolisi C. Responses of total and free insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor binding protein-3 after resistance exercise and training in elderly subjects. *Acta Physiol. Scand.* 1999;165:51–6.
306. Dall R, Lange KH, Kjaer M, Jørgensen JO, Christiansen JS, Orskov H, Flyvbjerg A. No evidence of insulin-like growth factor-binding protein 3 proteolysis during a maximal exercise test in elite athletes. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2001;86:669–74.
307. Schmidt W, Maassen N, Trost F, Boning D. Training induced effects on blood volume, erythrocyte turnover and haemoglobin oxygen binding properties. *Eur. J. Appl. Physiol. Occup. Physiol.* 1988;57:490–8.
308. Convertino VA. Blood volume: its adaptation to endurance training. *Med. Sci. Sports Exerc.* 1991;23:1338–48.
309. Schmidt W, Maassen N, Tegtbur U, Braumann KM. Changes in plasma volume and red cell formation after a marathon competition. *Eur. J. Appl. Physiol. Occup. Physiol.* 1989;58:453–8.
310. Clarkson PM, Haymes EM. Exercise and mineral status of athletes: calcium, magnesium, phosphorus, and iron. *Med. Sci. Sports Exerc.* 1995;27:831–43.

311. Schumacher YO, Schmid A, Grathwohl D, Bültermann D, Berg A. Hematological indices and iron status in athletes of various sports and performances, *Med. Sci. Sports Exerc.* 2002;34:869–75.
312. Schumacher YO, Schmid A, König D, Berg A. Effects of exercise on soluble transferrin receptor and other variables of the iron status. *Br. J. Sports Med.* 2002;36:195–200.
313. Malcovati L, Pascutto C, Cazzola M. Hematologic passport for athletes competing in endurance sports: A feasibility study. *Haematologica* 2003;88:570–81.
314. Berlin T, Meyer A, Rotman-Pikielny P, Natur A, Levy Y. Soluble transferrin receptor as a diagnostic laboratory test for detection of iron deficiency anemia in acute illness of hospitalized patients. *Isr. Med. Assoc. J.* 2011;13:96–8.
315. Siah CW, Ombiga J, Adams LA, Trinder D, Olynyk JK. Normal Iron Metabolism and the Pathophysiology of Iron Overload Disorders. *Clin. Biochem. Rev.* 2006;27:5–16.
316. Feder JN, Gnirke A, Thomas W, Tsuchihashi Z, Ruddy DA, Basava A, Dormishian F, Domingo R Jr, Ellis MC, Fullan A, Hinton LM, Jones NL, Kimmel BE, Kronmal GS, Lauer P, Lee VK, Loeb DB, Mapa FA, McClelland E, Meyer NC, Mintier GA, Moeller N, Moore T, Morikang E, Prass CE, Quintana L, Starnes SM, Schatzman RC, Brunke KJ, Drayna DT, Risch NJ, Bacon BR, Wolff RK. A novel MHC class I-like gene is mutated in patients with hereditary hemochromatosis. *Nat. Genet.* 1996;13:399–408.
317. Zoller H, Koch RO, Theurl I, Obrist P, Pietrangelo A, Montosi G, Haile DJ, Vogel W, Weiss G. Expression of duodenal iron transporters divalent-metal transporter 1 and ferroportin 1 in iron deficiency and iron overload. *Gastroenterology* 2001;120:1412–9.
318. Tung BY, Emond MJ, Bronner MP, Raaka SD, Cotler SJ, Kowdley KV. Hepatitis C, iron status and disease severity: relationship with HFE mutations. *Gastroenterology* 2003;124:318–26.
319. Stuart KA, Anderson GJ, Frazer DM, Powell LW, McCullen M, Fletcher LM, Crawford DH. Duodenal expression of iron transport molecules in untreated haemochromatosis subjects. *Gut* 2003;52:953–9.
320. Ludwig J, Hashimoto E, Porayko MK, Moyer TP, Baldus WP. Hemosiderosis in cirrhosis: a study of 447 native livers. *Gastroenterology* 1997;112:882–8.

321. Batey RG, Johnston R. Effects of alcohol, carbon tetrachloride, and choline deficiency on iron metabolism in the rat. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 1993;17:931–4.
322. Hallberg L, Brune M, Rossander L. The role of vitamin C in iron absorption. *Int. J. Vitam. Nutr. Res. Suppl.* 1989;30:103–8.
323. Looker AC, Dallman PR, Carroll MD, Gunter EW, Johnson CL. Prevalence of iron deficiency in the United States. *J. Am. Med. Assoc.* 1997;277:973–6.
324. Schrieber WE. Iron, porphyrin, and bilirubin metabolism. *Clinical Chemistry: Theory, analysis, and correlation*. St. Louis: The C.V. Mosby Company, 1989.
325. Weinstein DA, Roy CN, Fleming MD, Loda MF, Wolfsdorf JI, Andrews NC. Inappropriate expression of hepcidin is associated with iron refractory anemia: implications for the anemia of chronic disease. *Blood* 2002;100:3776–81.
326. Cohen EWE. *Pernicious anemia*, 2004. Sa
<http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/ency/article/000569.htm>
327. Buchanan GR, Sheehan RG. Malabsorption and defective utilization of iron in three siblings. *J. Pediatr.* 1981;98:723–8.
328. Hamill RL, Woods JC, Cook BA. Congenital atransferrinemia: a case report and review of the literature. *Am. J. Clin. Pathol.* 1991;96:215–8.
329. Hayashi A, Wada Y, Suzuki T, Shimizu A. Studies on familial hypotransferrinemia: unique clinical course and molecular pathology. *Am. J. Hum. Genet.* 1993;53:201–13.
330. Schreier H, Moran P, Caras WI. Targeting of liposomes to cells expressing CD4 using glycoposphatidylinositol-anchored gp120. *J. Biol. Chem.* 1994;269:9090–8.
331. Hartman KR, Barker JA. Microcytic anemia with iron malabsorption: an inherited disorder of iron metabolism. *Am. J. Hematol.* 1996;51:269–75.
332. Liotta LA, Kohn EC. The microenvironment of the tumour-host interface. *Nature*, 2001;411:375–9.
333. Grimberg A, Cohen P. Role of insulin-like growth factors and their binding proteins in growth control and carcinogenesis. *J. Cell Physiol.* 2000;183:1–9.
334. De Souza AT, Hankins GR, Washington MK, Fine RL, Orton TC, Jirtle RL. Frequent loss of heterozygosity on 6q at the mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor. *Oncogene* 1995;10:1725–9.

335. Ouyang H, Shiwaku HO, Hagiwara H, Miura K, Abe T, Kato Y, Ohtani H, Shiiba K, Souza RF, Meltzer SJ, Horii A. The insulin-like growth factor II receptor gene is mutated in genetically unstable cancers of the endometrium, stomach, and colorectum. *Cancer Res.* 1997;57:1851–4.
336. Stubbs MC, Kim YM, Krivtsov AV, Wright RD, Feng Z, Agarwal J, Kung AL, Armstrong SA. MLL-AF9 and FLT3 cooperation in acute myelogenous leukemia: development of a model for rapid therapeutic assessment. *Leukemia* 2008;22:66–77.
337. Rabiau N, Dechelotte P, Adjakly M, Kemeny JL, Guy L, Boiteux JP, Kwiatkowski F, Bignon YJ, Bernard-Gallon D. BRCA1, BRCA2, AR and IGF-I expression in prostate cancer: correlation between RT-qPCR and immunohistochemical detection. *Oncol. Rep.* 2011;26:695–702.
338. Kuhlmann JD, Schwarzenbach H, Otterbach F, Heubner M, Wimberger P, Worm KH, Kimmig R, Kasimir-Bauer S. Loss of heterozygosity proximal to the M6P/IGF2R locus is predictive for the presence of disseminated tumor cells in the bone marrow of ovarian cancer patients before and after chemotherapy. *Genes Chromosome. Canc.* 2011;50:598–605.
339. Kuklinski A, Kamocki Z, Cepowicz D, Gryko M, Czyzewska J, Pawlak K, Kedra B. Relationships between insulin-like growth factor I and selected clinico-morphological parameters in colorectal cancer patients. *Pol. J. Surg.* 2011;83:250–7.
340. Barbosa FR, Vieira NL, Lima GA, Wildemberg LE, Portugal R, Gadelha MR. Hematologic neoplasias and acromegaly. *Pituitary* 2011;14:377–81.
341. Al-Delaimy WK, Flatt SW, Natarajan L, Laughlin GA, Rock CL, Gold EB, Caan BJ, Parker BA, Pierce JP. IGF1 and risk of additional breast cancer in the WHEL study. *Endocr.-Relat. Cancer* 2011;18:235–44.
342. Takahara K, Tearle H, Ghaffari M, Gleave ME, Pollak M, Cox ME. Human prostate cancer xenografts in lit/lit mice exhibit reduced growth and androgen-independent progression. *Prostate* 2011;71:525–37.
343. Kim JS, Kim ES, Liu D, Lee JJ, Solis L, Behrens C, Lippman SM, Hong WK, Wistuba II, Lee HY. Prognostic impact of insulin receptor expression on survival of patients with nonsmall cell lung cancer. *Cancer* 2012;118:2454–65.

344. Gao Y, Katki H, Graubard B, Pollak M, Martin M, Tao Y, Schoen RE, Church T, Hayes RB, Greene MH, Berndt SI. Serum IGF1, IGF2 and IGFBP3 and risk of advanced colorectal adenoma. *Int. J. Cancer* 2012;131:E105–13.
345. Baxter RC. IGF binding proteins in cancer: mechanistic and clinical insights. *Nat. Rev. Cancer* 2014;14:329–41.
346. Xue X, Shah YM. Intestinal Iron Homeostasis and Colon Tumorigenesis. *Nutrients*. 2013;5:2333–51.
347. Torti SV, Torti FM. Iron and cancer: more ore to be mined. *Nat. Rev. Cancer* 2013;13:342–55.
348. Weinberg ED. The role of iron in cancer. *Eur. J. Cancer Prev.* 1996;5:19–36.
349. Bacon BR, Britton RS. The Pathology of Hepatic Iron Overload: A Free Radical -Mediated Process? *Hepatology* 1990;11:127–37.
350. Hardy JA, Aust AE. Iron in Asbestos Chemistry and Carcinogenicity. *Chem. Rev.* 1995;95:97–118.
351. Taetle R, Honeysett JM. Effects of monoclonal anti-transferrin receptor antibodies on in vitro growth of human solid tumor cells. *Cancer Res.* 1987;47:2040–4.
352. Kwok J, Richardson DR. The iron metabolism of neoplastic cells: alterations that facilitate proliferation? *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 2002;42:65–78.
353. Semenza GL, Nejfelt MK, Chi SM, Antonarakis SE. Hypoxia-inducible nuclear factors bind to an enhancer element located 3' to the human erythropoietin gene, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1991;88:5680–4.
354. Ammann RW, Muller E, Banský J, Schuler G, Hacki WH. High incidence of extrahepatic carcinomas in idiopathic hemochromatosis. *Scand. J. Gasstroenterol.* 1980;15:733–6.
355. Bradbear RA, Bain C, Siskind V, Schofield FD, Webb S, Axelsen EM, Halliday JW, Bassett ML, Powell LW. Cohort study of internal malignancy in genetic hemochromatosis and other chronic non-alcoholic liver diseases. *J. Natl. Cancer Inst.* 1985;75:81–4.
356. Kato J, Miyanishi K, Kobune M, Nakamura T, Takada K, Takimoto R, Kawano Y, Takahashi S, Takahashi M, Sato Y, Takayama T, Niitsu Y. Long-term phlebotomy with low-iron diet therapy lowers risk of development of hepatocellular carcinoma from chronic hepatitis C. *J. Gastroenterol.* 2007;42:830–6.

357. Jiang L, Nagai H, Ohara H, Hara S, Tachibana M, Hirano S, Shinohara Y, Kohyama N, Akatsuka S, Toyokuni S. Characteristics and modifying factors of asbestos-induced oxidative DNA damage. *Cancer Sci.* 2008;99:2142–51.
358. Santer FR, Moser B, Spoden GA, Jansen-Durr P, Zwerschke W. Human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein inhibits apoptosis mediated by nuclear insulin-like growth factor-binding protein-3 by enhancing its ubiquitin/proteasome-dependent degradation. *Carcinogenesis* 2007;28:2511–20.
359. Ahlsen M, Carlsson-Skwirut C, Jonsson AP, Cederlund E, Bergman T, Bang P. A 30-kDa fragment of insulin-like growth factor (IGF) binding protein-3 in human pregnancy serum with strongly reduced IGF-I binding. *Cell. Mol. Life Sci.* 2007;64:1870–80.
360. Baxter RC, Martin JL, Beniac VA. High molecular weight insulin-like growth factor binding protein complex. Purification and properties of the acid-labile subunit from human serum. *J. Biol. Chem.* 1989;264:11843–48.
361. Schedlich LJ, Graham LD, O'Han MK, Muthukaruppan A, Yan X, Firth SM, Baxter RC. Molecular basis of the interaction between IGFBP-3 and retinoid X receptor: role in modulation of RAR-signaling. *Arch. Biochem. Biophys.* 2007;465:359–69.
362. Liu B, Weinzimer SA, Gibson TB, Mascarenhas D, Cohen P. Type I alpha collagen is an IGFBP-3 binding protein. *Growth Horm. IGF Res.* 2003;13:89–97.
363. Goda N, Tenno T, Inomata K, Shirakawa M, Tanaka T, Hiroaki H. Intracellular protein delivery activity of peptides derived from insulin like growth factor binding proteins 3 and 5. *Exp. Cell Res.* 2008;314:2352–61.
364. Campbell PG, Durham SK, Hayes JD, Suwanichkul A, Powell DR. Insulin-like growth factor-binding protein-3 binds fibrinogen and fibrin. *J. Biol. Chem.* 1999;274:30215–21.
365. Gui Y, Murphy LJ. Insulin-like growth factor (IGF)-binding protein-3 (IGFBP-3) binds to fibronectin (FN): demonstration of IGF-I/IGFBP-3/fn ternary complexes in human plasma. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2001;86:2104–10.
366. Campbell PG, Durham SK, Suwanichkul A, Hayes JD, Powell DR. Plasminogen binds the heparin-binding domain of insulin-like growth factor-binding protein-3. *Am. J. Physiol.* 1998;275:E321–31.

367. Buckway CK, Wilson EM, Ahlsen M, Bang P, Oh Y, Rosenfeld RG. Mutation of three critical amino acids of the N-terminal domain of IGF-binding protein-3 essential for high affinity IGF binding. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2001;86:4943–50.
368. Sakai K, Busby WH Jr, Clarke JB, Clemmons DR. Tissue Transglutaminase Facilitates the Polymerization of Insulin-like Growth Factor-binding Protein-1 (IGFBP-1) and Leads to Loss of IGFBP-1's Ability to Inhibit Insulin-like Growth Factor-I-stimulated Protein Synthesis. *J. Biol. Chem.* 2001;276:8740–5.
369. Šunderić M, Malenković V, Nedić O. Complexes between insulin-like growth factor binding proteins and alpha-2-macroglobulin in patients with tumor. *Exp. Mol. Pathol.* 2015;98:173–7.
370. Nam TJ, Busby W Jr, Clemmons DR. Insulin-like growth factor binding protein-5 binds to plasminogen activator inhibitor-I. *Endocrinol.* 1997;138:2972–8.
371. Moralez AM, Maile LA, Clarke J, Busby WH Jr, Clemmons DR. Insulin-like growth factor binding protein-5 (IGFBP-5) interacts with thrombospondin-1 to induce negative regulatory effects on IGF-I actions. *J. Cell Physiol.* 2005;203:328–34.
372. Nam T, Moralez A, Clemmons D. Vitronectin binding to IGF binding protein-5 (IGFBP-5) alters IGFBP-5 modulation of IGF-I actions. *Endocrinol.* 2002;143:30–6.
373. Imam-Sghiouar N, Joubert-Caron R, Caron M. Application of metal-chelate affinity chromatography to the study of the phosphoproteome. *Amino Acids* 2005;28:105–9.
374. Wei X, Li L. Comparative glycoproteomics: approaches and applications. *Brief. Funct. Genomics Proteomic.* 2008;8:104-13.
375. McDowell JM. *Plant Immunity*. Blackburg, VA: Humana Press, 2011.
376. Porath J. Immobilized metal ion affinity chromatography. *Protein Expr. Purif.* 1992;3:263–81.
377. Kumar A, Galaev I Yu, Mattiasson B. Metal chelate affinity precipitation: a new approach to protein purification. *Bioseparation* 1999;7:185–94.
378. Ito H, Kuno A, Sawaki H, Sogabe M, Ozaki H, Tanaka Y, Mizokami M, Shoda J, Angata T, Sato T, Hirabayashi J, Ikehara Y, Narimatsu H. Strategy for

- glycoproteomics: identification of glyco-alteration using multiple glycan profiling tools. *J. Proteome Res.* 2009;8:1358–67.
379. Wu AM, Lisowska E, Duk M, Yang Z. Lectins as tools in glycoconjugate research. *Glycoconj. J.* 2009;26:899–913.
380. Miyamoto S. Clinical applications of glycomic approaches for the detection of cancer and other diseases. *Curr. Opin. Mol. Ther.* 2006;8:507–13.
381. Madera M, Mann B, Mechref Y, Novotny MV. Efficacy of glycoprotein enrichment by microscale lectin affinity chromatography. *J. Sep. Sci.* 2008;31:2722–32.
382. Huang L, Fang X. Immunoaffinity fractionation of plasma proteins by chicken IgY antibodies. *Methods Mol. Biol.* 2008;425:41–51.
383. Kohn J, Wilchek M. The use of cyanogen bromide and other novel cyanylating agents for the activation of polysaccharide resins. *Appl. Biochem. Biotech.* 1984;9:285–305.
384. Ryan BJ, Ó'Fágáin C. Arginine-to-lysine substitutions influence recombinant horseradish peroxidase stability and immobilisation effectiveness. *BMC Biotechnol.* 2007;7:Art. No. 86.
385. Laurell CB. Quantitative estimation of proteins by electrophoresis in agarose gel containing antibodies. *Anal. Biochem.* 1966;15:45–52.
386. Bons JAP, Michielsen ECHJ, de Boer D, Bouwman FG, Jaeken J, van Dieijen-Visser MP, Rubio-Gozalbo ME, Wodzig WKWH. A specific immunoprecipitation method for isolating isoforms of insulin-like growth factor binding protein-3 from serum. *Clin. Chim. Acta* 2008;387:59–65.
387. Quarles CD Jr, Marcus RK, Brumaghim JL. Competitive binding of Fe^{3+} , Cr^{3+} , and Ni^{2+} to transferrin. *J. Biol. Inorg. Chem.* 2011;16:913–21.
388. Turgut S, Kaptanoğlu B, Turgut G, Emmungil G, Genç O. Effects of Cadmium and Zinc on Plasma Levels of Growth Hormone, Insulin-like Growth Factor I, and Insulin-like Growth Factor-Binding Protein 3. *Biol. Trace Elem. Res.* 2005;108:197–204.
389. Huq A, Singh B, Meeker T, Mascarenhas D. The metal-binding domain of IGFBP-3 selectively delivers therapeutic molecules into cancer cells. *Anti-Cancer Drug.* 2009;20:21–31.

390. Seurin D, Lombet A, Babajko S, Godeau F, Ricort JM. Insulin-Like Growth Factor Binding Proteins Increase Intracellular Calcium Levels in Two Different Cell Lines. *Plos One* 2013;8: e59323.
391. Oufattole M, Lin SWJ, Liu B, Mascarenhas D, Cohen P, Rodgers BD. Ribonucleic Acid Polymerase II Binding Subunit 3 (Rpb3), a Potential Nuclear Target of Insulin-Like Growth Factor Binding Protein-3. *Endocrinol.* 2006;147:2138–214.
392. Cowan JA. Structural and catalytic chemistry of magnesium-dependent enzymes. *Biometals* 2002;15:225–235.
393. Lipscomb WN, Sträter N. Recent Advances in Zinc Enzymology. *Chem. Rev.* 1996;96:2375–434.
394. Fiedler K, Simons K. The Role of N-Glycans in the Secretory Pathway. *Cell* 1995;81:309–12.
395. Gagneux P, Varki A. Evolutionary considerations in relating oligosaccharide diversity to biological function. *Glycobiology* 1999;9:747–55.
396. Parodi AJ. Protein glycosylation and its role in protein folding. *Annu. Rev. Biochem.* 2000;69:69-93.
397. Helenius A, Aebi M. Intracellular functions of N-linked glycans. *Science* 2001;291:2364–9.
398. Marth JD, Grewal PK. Mammalian glycosylation in immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 2008;8:874–87.
399. Sato T. Lectin-probed western blot analysis. *Methods Mol. Biol.* 2014;1200:93-100.
400. Sanz-Nebot V, Balaguer E, Benavente F, Neusüß C, Barbosa J. Characterization of transferrin glycoforms in human serum by CE-UV and CE-ESI-MS. *Electrophoresis* 2007;28:1949–57.
401. Masnikosa R, Baričević I, Lagundžin D, Nedić O. Characterisation of N-glycans bound to IGFBP-3 in sera from healthy adults. *Biochimie* 2010;92:97–101.
402. Link AJ, Eng J, Schieltz DM, Carmack E, Mize GJ, Morris DR, Garvik BM, Yates JR III. Direct analysis of protein complexes using mass spectrometry. *Nat. Biotechnol.* 1999;17:676–82.
403. Heck AJR, van den Heuvel RHH. Investigation of intact protein complexes by mass spectrometry. *Mass Spec. Rev.* 2004;23:368–89.

404. Gingras AC, Gstaiger M, Raught B, Aebersold R. Analysis of protein complexes using mass spectrometry. *Nat. Rev. Mol. Cell Bio.* 2007;8:645–54.
405. ten Have S, Boulon S, Ahmad Y, Lamond AI. Mass spectrometry-based immuno-precipitation proteomics - The user's guide. *Proteomics* 2011;11: 1153–9.
406. Issaq HJ, Veenstra TD, Conrads TP, Felschow D. The SELDI-TOF MS Approach to Proteomics: Protein Profiling and Biomarker Identification. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2002;292:587–92.
407. Petricoin EF, Liotta LA. SELDI-TOF-based serum proteomic pattern diagnostics for early detection of cancer. *Curr. Opin. Biotech.* 2004;15:24–30.
408. Suzuki YJ, Carini M, Butterfield DA. Protein carbonylation. *Antioxid. Redox Signal.* 2010;12:323–5.
409. Beard J, Tobin B. Iron status and exercise. *Am. J. Clin. Nutr.* 2000;72:594S–7S.
410. Fallon KE. The acute phase response and exercise: the ultramarathon as prototype exercise. *Clin. J. Sport Med.* 2001;11:38–43.
411. Collard TJ, Guy M, Butt AJ, Perks CM, Holly JMP, Paraskeva C, Williams AC. Transcriptional upregulation of the insulin-like growth factor binding protein IGFBP-3 by sodium butyrate increases IGF-independent apoptosis in human colonic adenoma-derived epithelial cells. *Carcinogenesis* 2003;24:393–401.
412. Harel E, Rubinstein A, Nissan A, Khazanov E, Milbauer MN, Barenholz Y, Tirosh B. Enhanced Transferrin Receptor Expression by Proinflammatory Cytokines in Enterocytes as a Means for Local Delivery of Drugs to Inflamed Gut Mucosa. *Plos One* 2011;6:e24202.
413. Mandel JS, Bond JH, Church TR, Snover DC, Bradley GM, Schuman LM, Ederer F. Reducing mortality from colorectal cancer by screening for fecal occult blood. *New Engl. J. Med.* 1993;328:1365–71.
414. Regula J, Rupinski M, Kraszewska E, Polkowski M, Pachlewski J, Orłowska J, Nowacki MP, Butruk E. Colonoscopy in colorectal-cancer screening for detection of advanced neoplasia. *New Engl. J. Med.* 2006;355:1863–72.
415. Shah R, Jones E, Vidart V, Kuppen PJK, Conti JA, Francis NK. Biomarkers for early detection of colorectal cancer and polyps: systematic review. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2014;23:1712–28.
416. Wong CKH, Chen J, Yu CLY, Sham M, Lam CLK. Systematic review recommends the European Organization for Research and Treatment of Cancer

- colorectal cancer-specific module for measuring quality of life in colorectal cancer patients. *J. Clin. Epidemiol.* 2015;68:266–78.
417. Karahalios A, English DR, Simpson JA. Weight change and risk of colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *Am. J. Epidemiol.* 2015;181:832–45.
418. Lee J, Jeon JY, Meyerhardt JA. Diet and lifestyle in survivors of colorectal cancer. *Hematol. Oncol. Clin. North. Am.* 2015;29:1–27.
419. Belov L, Zhou J, Christopherson RI. Cell surface markers in colorectal cancer prognosis. *Int. J. Mol. Sci.* 2010;12:78–113.
420. de Wit M, Fijneman RJ, Verheul HM, Meijer GA, Jimenez CR. Proteomics in colorectal cancer translational research: biomarker discovery for clinical applications. *Clin. Biochem.* 2013;46:466–79.
421. Wang K, Huang C, Nice EC. Proteomics, genomics and transcriptomics: their emerging roles in the discovery and validation of colorectal cancer biomarkers. *Expert Rev. Proteomics* 2014;11:179–205.
422. Di Franco S, Todaro M, Dieli F, Stassi G. Colorectal cancer defeating? Challenge accepted! *Mol. Aspects Med.* 2014;39:61–81.
423. Herszényi L, Barabás L, Hritz I, István G, Tulassay Z. Impact of proteolytic enzymes in colorectal cancer development and progression. *World J. Gastroenterol.* 2014;20:13246–57.
424. Ritchie RF, Palomaki GE, Neveux LM, Navolotskaia O, Ledue TB, Craig WY. Reference distributions for the negative acute-phase serum proteins, albumin, transferrin and transthyretin: a practical, simple and clinically relevant approach in a large cohort. *J. Clin. Lab. Anal.* 1999;13:273–9.
425. Adams P. Management of elevated serum ferritin levels. *Gastroenterol. Hepatol.* 2008;4:333–4.
426. Kell DB, Pretorius E. Serum ferritin is an important inflammatory disease marker, as it is mainly a leakage product from damaged cells. *Metallomics.* 2014;6:748–73.
427. Chang, D, Wang F, Zhao YS, Pan HZ. Evaluation of oxidative stress in colorectal cancer patients. *Biomed. Environ. Sci.* 2008;21:286–9.
428. Murlikiewitz L, Sygut A, Trzciński R. Oxidative protein damage in patients with colorectal cancer. *Pol. J. Surg.* 2010;82:454–8.

429. Silvera D, Formenti SC, Schneider RJ. Translational control in cancer. *Nat. Rev. Cancer* 2010;10:254–66.
430. Garbett EA, Reed MW, Brown NJ. Proteolysis in colorectal cancer. *Mol. Pathol.* 1999;52:140–5.
431. Lodish H, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J. *Molecular Cell Biology*. New York: Freeman HW, 2000.
432. Daabiss M. American Society of Anaesthesiologists physical status classification. *Indian J. Anaesth.* 2011;55:111-5.

Изјава о ауторству

Потписани-а _____ Горан Миљуш _____

број индекса _____ дб 12/2009 _____

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Изоловање, карактеризација и улога комплекса трансферина са везујућим протеином 3 за факторе раста сличне инсулину

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

Потпис докторанда

У Београду, _____ 01.09.2015. _____

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора _____ Горан М. Миљуш _____

Број индекса _____ дб 12/2009 _____

Студијски програм _____ Доктор биохемијских наука _____

Наслов рада _____ Изоловање, карактеризација и улога комплекса трансферина са
везујућим протеином 3 за факторе раста сличне инсулину _____

Ментор _____ др. Марија Гавровић-Јанкуловић, др. Олгица Недић _____

Потписани/а _____ Горан Миљуш _____

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

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

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

Потпис докторанда

У Београду, _____ 01.09.2015. _____

Изјава о коришћењу

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

Изоловање, карактеризација и улога комплекса трансферина са везујућим протеином 3 за факторе раста сличне инсулину

која је моје ауторско дело.

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

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

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

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

Потпис докторанда

У Београду, 01.09.2015.

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

Biografija

Goran M. Miljuš rođen je 25. septembra 1984. godine u Somboru. Osnovnu školu i gimanziju, prirodno-matematički smer, završio je takođe u Somboru. 2003. godine upisao je Prirodno-matematički fakultet u Novom Sadu, smer diplomirani hemičar-biohemija. Sve obaveze predviđene planom stidiranja je ispunio i diplomirao 2009. godine sa prosečnom ocenom 8,97 i ocenom 10 za diplomski rad. Iste godine upisao je doktorske studije na Hemisjkom fakultetu univerziteta u Beogradu, smer Biohemija.

Od novembra 2009. godine radi u Institutu za primenu nuklearne energije (INEP), kao istraživač-pripravnik, na projektu pod nazivom: „Insulinu slični faktori rasta (IGF), njihovi vezujući proteini (IGFBP) i receptori (IGF-R) kod ljudi u različitim fiziološkim i patofiziološkim stanjima” (MNTR RS, broj projekta 143019). Od 2011. godine je angažovan na projektu „Strukturne karakteristike vezujućih proteina i receptora za insulinu slične faktore rasta (IGF), njihove interakcije sa drugim fiziološkim molekulima i promene kod poremećaja metabolizma” (MPN RS, broj projekta 173042), a iste godine je izabran u zvanje istarživač-saradnik. Pored projekta finansiransih od strane ministarstva prosveta, nauke i tehnološkog razvoja, Goran je učesnik i na međunarodnim projektima: COST projekat „Chemistry of non-enzymatic protein modifications - modulation of protein structure and function” (broj projekta CM1001, 2011-2014); i dva bilateralna projekata sa Slovačkom republikom (br. projekata: 680-00-140/2012-09/01 i 451-03-545/2015-09/01).

U okviru napred navedenih projekata, pohađao je školu masene spektrometrije u Birmingemu, 2013. godine i bio na dva studijska boravka kod partnera iz Slovačke akademije nauka u Bratislavi.

Član je Srpskog hemijskog društva od 2009. godine, Biohemijskog društva Srbije od 2011. godine i Srpske asocijacije za proteomiku od 2015. godine.

Goran Miljuš je koautor devet radova štampanih u međunarodnim časopisima, tri saopštenja na međunarodnim skupovima i jedno na domaćem skupu, uz jedno gostujuće predavanje na Institutu za biološka istraživanja „Dr. Siniša Stanković“ 2014. godine.