



PD 17991



300125025

COBISS ©

BIOLOŠKI FAKULTET
UNIVERZITET U BEOGRADU

**KARAKTERIZACIJA HUMANOG MIŠIĆNOG
PROTEINA Ankrd2**

doktorska disertacija

Kojić Snežana

Beograd, 2003



PA 14991

u1-26003471



BIOLOŠKI FAKULTET
UNIVERZITET U BEOGRADU

KARAKTERIZACIJA HUMANOG MIŠIĆNOG PROTEINA Ankrd2



Kojić Snežana

Beograd, 2002

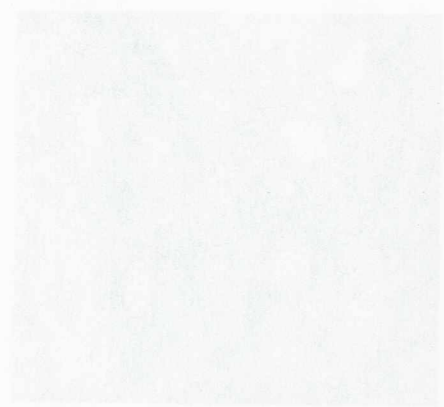
УНИВЕРЗИТЕТСКА БИБЛИОТЕКА
"СВЕТОЗАР МАРКОВИЋ"-БЕОГРАД
И. Бр. 125025

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ
БИОЛОШКИ ФАКУЛТЕТ

КАРАКТЕРИЗАЦИЈА ХУМАНОГ МИШИНОГ



ПРОТЕИНА



Beograd, 2002
Kojić Snežana

Ovaj rad je urađjen u Laboratoriji za molekularnu biologiju misicne celije Internacionalnog centra za genetičko inženjerstvo i biotehnologiju u Trstu, Italija, pod neposrednim rukovodstvom dr Georgine Faulkner u periodu od septembra 1998. do decembra 2001. godine.

Najtoplije se zahvaljujem dr Georgine Faulkner, jednoj izuzetnoj zeni, na ukazanom poverenju, na predivnom putovanju kroz svet proteina i na cvrstom prijateljstvu koje se razvilo medju nama tokom boravka u njenoj laboratoriji. Posebno zadovoljstvo je bilo raditi u jednoj opustenoj i stimulatinoj atmosferi, u laboratoriji u kojoj je sve bilo dostupno i u kojoj se svaka dobra ideja mogla sprovesti u delo.

Mojoj profesorki dr Ani Savic se najtoplije zahvaljujem na podrsci i poverenju i cast mi je sto sam kod nje odsluzila svoj segrtski vek, od diplomskog do doktorskog rada.

Dr Gordani Matić se zahvaljujem na kritickoj oceni ovog rada.

Dr Dragani Stefanovic se zahvaljujem na pomoci u izvodjenju i tumacenju EMSA eksperimenata, na strucnim i zivotnim savetima kao i na kritickoj oceni ovog rada.

Dr Svetlani Radovic se zahvaljujem na velikoj pomoci oko pripreme ovog rada za odbranu, kao i na njegovoj kritickoj oceni.

Za prakticnu obuku, savete, konstruktivne diskusije, sate provedene pored mikroskopa i u sobi za celijsku kulturu, kao i prijatne trenutke i u laboratoriji a i van nje zahvaljujem se Ani (Anna Comelli).

Rukovodiocima Instituta, profesoru Falaskom (A. Falaschi) i profesoru Baraleu (F. Baralle) se zahvaljujem na podrsci i stipendiji i nadam se da sam uspela da opravdam svoj beneficirani status.

Prof dr C. Valle-u zahvaljujem na inspirativnim sugestijama, zajednickim diskusijama nase i njegove grupe u Padovi, kao i na pomoci u pripremi slika za ovaj rad.

Svim prijateljima iz ICGEB-a posebno iz Laboratorije za bakteriologiju u kojoj je radio moj suprug zahvaljujem na nesebinoj pomoci i drugarstvu. Oni su nam pomogli da se snadjemo u tudjini, da savladamo italijanski jezik, da se izborimo sa dobro poznatom italijanskom administracijom i ucinili su nas boravak u Italiji nezaboravnim i divnim iskustvom.

Mom bratu Miki se zahvaljujem na on line pomoci vezanoj za kompjutersku obradu teksta i PC back up -u u slucaju nepopravljivog kvara mog iMac-a.

Ovaj rad ostaje kao uspomena na godine koje smo kao porodica proveli u Trstu. 2002. godina nam je donela jos mnogo radosti a najveca od njih je rodjenje nase bebe Ivane. Starijoj cerki Ani i Mikiju se zahvaljujem na bezgranicnoj podrsci, pomoci i trpeljivosti.

ABSTRACT

The object of this study was the new human muscle protein Ankrd2 found preferentially in slow muscle fibers that is possibly a transcription factor up-regulated in hypertrophy. It is a protein of 37 kDa, which has a signal for nuclear targeting, four ankyrin repeat motifs and shows significant similarity to a cytokine inducible nuclear protein C-193 from human endothelial cells. The rat and mouse orthologs of human C-193 called respectively CARP and MARP are mainly expressed in heart and probably involved in the control of cardiac hypertrophy. It is possible that Ankrd2 may play a similar role to CARP/MARP/C-193, but in skeletal muscle rather than heart. For intracellular localization and tissue distribution of Ankrd2 three mouse polyclonal antibodies (raised against the full length, N-terminal and C-terminal regions of the protein) and one monoclonal antibody (raised against C-terminal region of Ankrd2) were made. Western blot analysis of protein extracts isolated from different human tissues showed that Ankrd2 is expressed mainly in human skeletal muscle and to a lesser extent in heart and kidney. During muscle cell differentiation there is an increase of Ankrd2 signal in both mouse (C2C12) and human (CHQ5B) muscle cells that can be detected by Western blot analysis. Immunofluorescence experiments were undertaken in primary human myoblasts and myotubes with the scope of pinpointing the intracellular localization of Ankrd2 protein. In general, during differentiation both the number of fluorescing cells and the intensity of signal increase. Also, in human myoblasts but not in differentiated myotubes very specific nuclear fluorescence can be detected. The nuclear signal is in the form of speckles and co-localization experiments showed that Ankrd2 and PML co-localize in PML nuclear bodies. In order to study protein-protein interactions GST recombinant proteins F-Ankrd2 (5-333 aa), N-Ankrd2 (5-120 aa) and C-Ankrd2 (279-333 aa) were prepared and used for the GST „pull-down” experiments. Results show that Ankrd2 interacts with several proteins, but so far these proteins are not identified. The deduced amino acid sequence of Ankrd2 contains four putative casein kinase II (CKII) phosphorylation sites. Ankrd2 can be phosphorylated *in vitro* with CKII, but only the fourth site (318-321 aa, SGRE) is phosphorylated. In order to discover whether Ankrd2 has a similar function to I κ B, the inhibitor of transcriptional factor NF κ B (as they have structural similarities (ankyrin repeats, nuclear localization signal, phosphorylation sites)) electromobility shift assays (EMSA) were performed. Ankrd2 does not prevent the formation of a complex between NF κ B and its DNA binding site whereas I κ B in the same experiments was able to do so, thus suggesting that Ankrd2 does not function as muscle specific I κ B protein.

APSTRAKT

Predmet istraživanja ovog rada je humani mišićni protein Ankrd2 koji se eksprimira u sporim mišićnim vlaknima i potencijalni je transkripcioni faktor čija je količina povećana u toku hipertrofije skeletnih mišića. To je protein od 37 kDa koji poseduje signal za lokalizaciju u jedru, četiri ankirinska ponovka i veoma je sličan jedarnom proteinu humanih endotelnih ćelija, C-193, čija je ekspresija indukovana citokinima. Pacovski i mišji ortologoni humanog proteina C-193, CARP odnosno MARP su pretežno ekspimirani u srcu i verovatno su uključeni u kontrolu hipertrofije srca. Pretpostavlja se da Ankrd2 u skeletnim mišićima ima sličnu funkciju kao CARP/MARP/C-193 u srcu. Za utvrđivanje intraćelijske lokalizacije i ekspresije proteina Ankrd2 u različitim tkivima napravljena su tri mišja poliklonska antitela (na ceo protein, N-terminalni i C-terminalni region) i monoklonsko antitelo (na C-terminalni region proteina Ankrd2). Western blot analizom proteinskih ekstrakata različitih humanih tkiva pokazano je da se protein Ankrd2 eksprimira uglavnom u skeletnim mišićima i u manjoj meri u srcu i bubregu. U toku diferencijacije humanih (CHQ5B) i mišjih (C2C12) mišićnih ćelija dolazi do povećanja količine proteina Ankrd2. U cilju detaljne analize intraćelijske lokalizacije proteina Ankrd2 uradjeni su eksperimenti indirektno imunofluorescencije koristeći humane mioblaste i miotube. Generalno, u toku diferencijacije povećava se i broj ćelija koje fluoresciraju i intenzitet signala. Takodje, u humanim mioblastima, za razliku od miotuba, detektovana je specifična jedarna fluorescencija. Jedarni signal je u obliku tački i eksperimenti kolokalizacije su pokazali da se proteini Ankrd2 i PML nalaze u istim jedarnim strukturama nazvanim PML jedarna tela. U cilju izučavanja proteinsko-proteinskih interakcija pripremljeni su rekombinantni proteini fuzionisani sa GST markerom (F-Ankrd2 (5-333 ak), N-Ankrd2 (5-120 ak) i C-Ankrd2 (279-333 ak)) koji su korišćeni u GST „pull-down” eksperimentima. Ovom metodom je pokazano da protein Ankrd2 interaguje sa nekoliko, za sada neidentifikovanih, proteina. U aminokiselinskoj sekvenci proteina Ankrd2 nalaze se četiri potencijalna mesta za fosforilaciju kazein kinazom II (CKII). U ovom radu je pokazano da protein Ankrd2 može biti fosforilisan *in vitro* ovom kinazom, s tim što je samo četvrto mesto (SGRE, 318-321 ak) fosforilisano. Eksperimenima retardacije DNK na gelu utvrđeno je da proteini Ankrd2 i IκB, inhibitor transkripcionog faktora NFκB, nemaju sličnu funkciju iako imaju strukturne sličnosti (oba proteina poseduju ankirinske ponovke, signal za lokalizaciju u jedru i mesta za fosforilaciju raznim kinazama). Za razliku od IκB, protein Ankrd2 ne sprečava formiranje kompleksa između DNK i NFκB.

SADRŽAJ

I OPŠTI DEO	1
I.1. Uvod.....	1
I.2. Protein Ankrd2/Arpp.....	4
I.2.1. Sekvenciranje humane i miške cDNK Ankrd2.....	4
I.2.2. Genomska organizacija gena Ankrd2.....	6
I.2.3. Analiza promotorskog regiona gena Ankrd2.....	6
I.2.4. Ekspresija iRNK Ankrd2.....	7
I.2.5. Ekspresija proteina Ankrd2.....	9
I.2.6. Ekspresija proteina Ankrd2 u ćelijskim linijama kancera.....	10
I.2.7. Lokalizacija proteina Ankrd2 u mišićnim ćelijama.....	11
I.3. Protein CARP/MARP/C-193.....	11
I.4. Ankirinski ponovci.....	16
I.5. Jedarna tela.....	17
I.5.1. PML jedarna tela.....	18
I.5.1.1. Komponente PML jedarnih tela.....	18
I.5.1.2. Funkcija PML jedarnih tela.....	20
I.6. Transkripcioni faktor NFkB i njegova uloga u diferencijaciji mišićnih ćelija.....	21
II. CILJ RADA	25
III. MATERIJAL I METODE	26
III.1. Biološki materijal.....	26
III.1.1. Bakterijski sojevi.....	26
III.1.2. Ćelije u kulturi.....	26
III.2. Medijumi za gajenje bakterija.....	26
III.3. Kloniranje cDNK fragmenata Ankrd2 u ekspresione vektore.....	27
III.3.1. Kloniranje F-Ankrd2 i N-Ankrd2 u vektor pQE30.....	29
III.3.2. Kloniranje F-Ankrd2, N-Ankrd2, C-Ankrd2, AC-Ankrd2, UC-Ankrd2 i DC-Ankrd2 u vektor pGEX-6P-3.....	29
III.3.3. Kloniranje oligoC-Ankrd2 u vektor pGEX-6P-3.....	30
III.3.4. Ekspresioni vektori.....	30
III.4. Reakcija lančanog umnožavanja segmenata DNK (PCR).....	32

III.5. Pripremanje dvolančanih oligonukleotida.....	33
III.6. Ekstrakcija DNK iz agaroznog gela.....	34
III.7. Elektroforeza DNK.....	34
III.8. Digestija DNK restrikcionim enzimima.....	34
III.9. Ligacija fragmenata DNK.....	35
III.10. Transformacija bakterijskih ćelija.....	35
III.11. Pripremanje kompetentnih ćelija.....	36
III.12. Analiza transformata.....	36
III.13. Izolovanje DNK.....	37
III.14. Produkcija poliklonskih antitela.....	39
III.14.1. Indukcija ekspresije rekombinantnih proteina sa His markerom u <i>E. coli</i>	39
III.14.2. Prečišćavanje rekombinantnih proteina sa His markerom u denaturišućim uslovima.....	39
III.14.3. Pripremanje proteina za imunizaciju miševa.....	40
III.14.4. Imunizacija miševa.....	40
III.15. Elektroforeza proteina.....	41
III.16. Prenos proteina na membranu.....	42
III.17. Western blot analiza.....	42
III.18. Pripremanje rekombinantnih proteina za izučavanje proteinsko-proteinskih interakcija.....	43
III.18.1. Indukcija ekspresije rekombinantnih proteina sa GST u <i>E. coli</i>	43
III.18.2. Prečišćavanje rekombinantnih proteina sa GST u nedenaturišućim uslovima.....	43
III.19. Određivanje koncentracije proteina.....	44
III.20. Proteinazni i fosfatazni inhibitori.....	44
III.21. Ćelijska kultura.....	45
III.22. Pripremanje ćelijskih ekstrakata.....	46
III.23. <i>In vitro</i> obeležavanje ćelija radioaktivno obeleženim aminokiselinama ³⁵ S-metioninom i ³⁵ S cisteinom.....	47
III.24. GST „pull down”.....	48
III.25. Indirektna imunofluorescencija.....	49
III.25.1. Priprema pokrovnih stakala za imunofluorescenciju.....	50

III.26. <i>In vitro</i> fosforilacija proteina kazein kinazom II.....	51
III.27. Utvrđivanje promene elektroforetske pokretljivosti pri formiranju nukleoproteina (EMSA-Electrophoretic mobility shift assay).....	52
III.27.1. Obeležavanje oligonukleotidne probe.....	52
III.27.2. Pripremanje proteinskih ekstrakata.....	53
III.27.2.1. Tretiranje humanih mišićnih ćelija CHQ5B nekrotičnim faktorom tumora.....	53
III.27.2.2. Pripremanje totalnih ekstrakata.....	53
III.27.2.3. Pripremanje jedarnih ekstrakata.....	54
III.27.3. <i>In vitro</i> sinteza proteina.....	54
III.27.4. Pripremanje kompetitorske DNK.....	55
III.27.5. Izvodjenje testa EMSA.....	55
IV. REZULTATI	57
IV.1. Strukturna analiza proteina Ankrd2.....	57
IV.2. Pripremanje poliklonskih antitela na protein Ankrd2.....	58
IV.2.1. Dobijanje antigena.....	58
IV.2.2. Dobijanje antitela.....	59
IV.2.3. Mapiranje antigenih epitopa.....	60
IV.3. Ekspresija Ankrd2 u humanim tkivima.....	66
IV.4. Lokalizacija proteina Ankrd2 u mišićnim ćelijama tokom njihove diferencijacije.....	69
IV.5. Interakcija proteina Ankrd2 sa drugim mišićnim proteinima.....	74
IV.6. Protein Ankrd2 je lokalizovan u PML jedarnim telima.....	76
IV.7. <i>In vitro</i> fosforilacija proteina Ankrd2 kazein kinazom II.....	78
IV.8. Protein Ankrd2 ne sprečava formiranje kompleksa između transkripcionog faktora NFkB i DNK.....	80
V. DISKUSIJA	84
VI. ZAKLJUČCI	92
VII. LITERATURA	93

I. OPŠTI DEO

I.1. UVOD

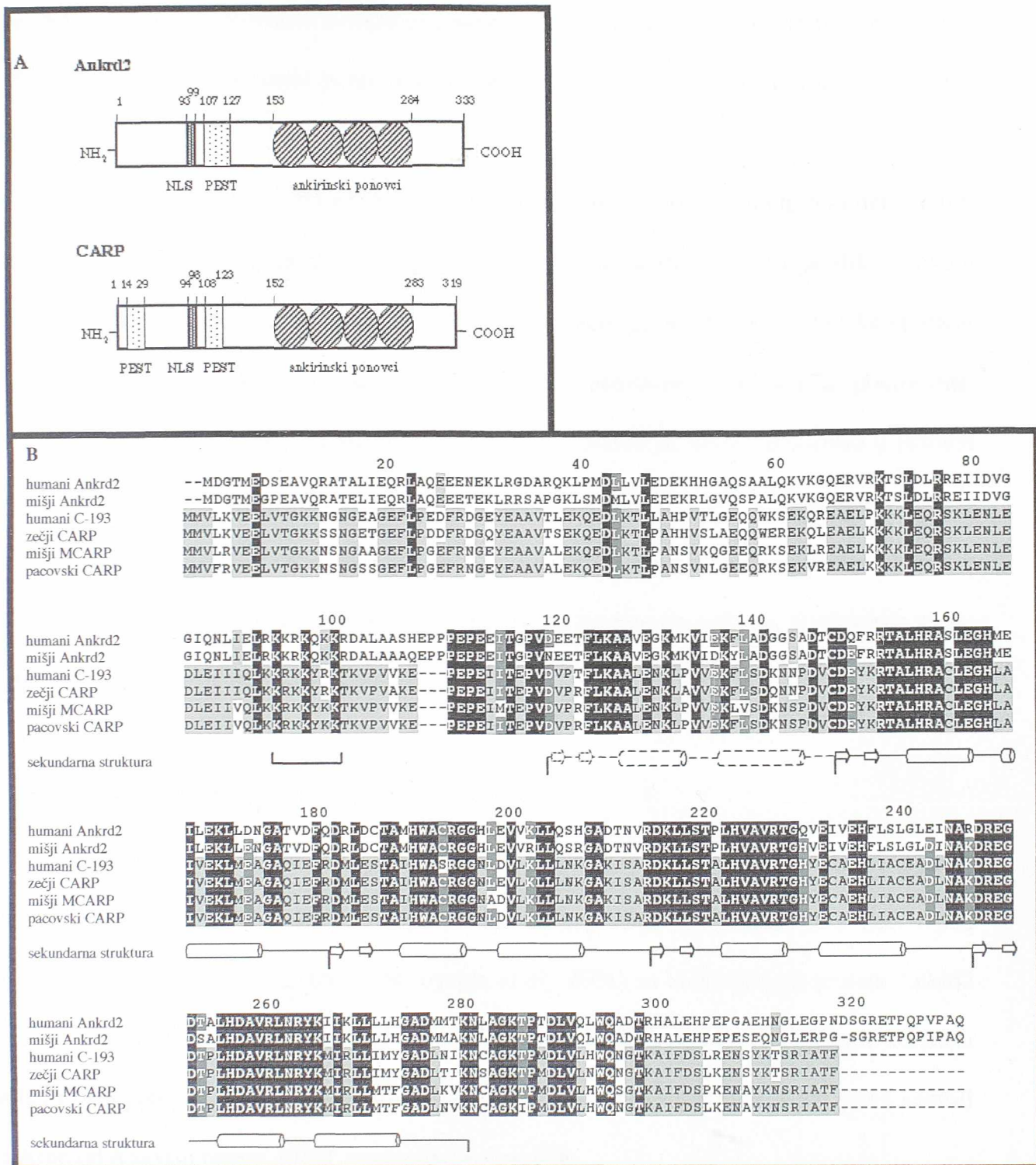
Između fizioloških zahteva koji se postavljaju pred skeletne mišiće i veličine do koje pojedinačni mišić može da raste postoji direktna veza. Povećano istezanje i opterećenje mišića zahteva veću kontraktilnu moć pa tokom vremena dolazi do povećanja dijametra mišića. Ova dinamička veza je delimično ograničena genetskim faktorima kao što su, na primer, oni koji upravljaju embrionalnim razvićem mišića sastavljenih od sporih i brzih vlakana. Osnovni genetski obrasci mogu biti modifikovani stimulusima iz spoljašnje sredine kao što su nervna aktivnost, istezanje, opterećenje ili nivo hormona tiroidne žlezde. Individualni skeletni mišići, kao odgovor na povećano opterećenje ili istezanje u toku intenzivnog i dugotrajnog vežbanja, se povećavaju (hipertrofiraju), jačaju i zadebljavaju. Posledice istezanja su povećanje obima mišića dodavanjem sarkomera paralelno i izduživanje mišića dodavanjem sarkomera serijski. Na molekularnom nivou, stimulacija mišića istezanjem dovodi do niza promena na nivou iRNK koje kodiraju različite proteine, kao što su izoforme lakog i teškog lanca miozina koje ulaze u sastav različitih tipova kontraktilnih vlakana (brza i spora vlakna). Za razliku od sistematskog rasta mišića u toku normalnog razvića, istezanje dovodi do selektivne hipertrofije samo onih vlakana koja su izložena stimulusu. Dakle, sistemi koji primaju nadražaj izazvan istezanjem i opterećenjem i sistemi koji transformišu nadražajne signale u specifične promene ekspresije gena i sinteze proteina karakteristični su samo za mišićne ćelije i verovatno funkcionišu na nivou individualnih mišićnih vlakana. Do sada je identifikovano nekoliko faktora koji učestvuju u procesu mišićne hipertrofije kao što su IGF-1 (insulin-like growth faktor-1), MGF (mechano growth factor), $PGF_2\alpha$ (prostaglandin $F_2\alpha$), ali je još uvek nepoznato da li su oni jedini i na koji način se signali prenose u jedro i prevode u specifičnu promenu ekspresije gena. U potrazi za faktorima koji učestvuju u procesu hipertrofije identifikovan je mišji protein Ankrd2 (ankyrin-repeat domain 2 (stretch-responsive muscle)) (Kemp *et al.*,



2000) čija je količina znatno povećana u TA (tibialis anterior) mišiću miša izloženom pasivnom istezanju.

Koristeći sistematsko sekvenciranje cDNK biblioteka kao jedan od najčešćih pristupa za brzu identifikaciju i sistematizaciju gena u različitim organizmima pri čemu se kao rezultat dobijaju kratke parcijalne sekvence nazvane ESTs (expressed sequence tags), u CRIBI centru za biotehnologiju Univerziteta u Padovi, Italija, identifikovano je oko 5300 transkripata iz preko 30000 EST-ova specifično eksprimiranih u mišićnom tkivu čoveka (Lanfranchi *et al.*, 1996). Rezultati su sistematizovani u bazi podataka nazvanoj TRAIT koja sadrži sekvence transkripata specifično eksprimiranih u mišićnoj ćeliji (<http://muscle.cribi.unipd.it>). U potrazi za potencijalnim transkripcionim faktorima koji bi učestvovali u regulaciji molekularnih mehanizama specifičnih za mišićnu ćeliju identifikovan je transkript HSPD02860 koji se pokazao izuzetno zanimljivim pokazujući 52 % identičnosti na aminokiselinskom nivou sa proteinom CARP/MARP/C-193 i 89 % identičnosti na aminokiselinskom nivou sa proteinom Ankrd2 miša. Protein CARP/MARP/C-193 je identifikovan u različitim organizmima: mišu (CARP) (Zou *et al.*, 1997), pacovu (MARP) (Baumeister *et al.*, 1997) i čoveku (C-193) (Chu *et al.*, 1995) i smatra se da ima ulogu kofaktora u lokalnim signalnim procesima kao što su morfogeneza mišića (Baumeister *et al.*, 1997) i hipertrofija srca (Jeyasseelan *et al.*, 1997). Šematski prikaz proteina Ankrd2 i CARP/MARP/C-193 sa naznačenim proteinskim motivima, kao i njihova uporedna sekvenca dati su na Slici 1.

U Laboratoriji za molekularnu biologiju mišića, Trst, Italija, u kojoj je urađen ovaj rad, protein Ankrd2 je izučavan kao jedan od novootkrivenih proteina koji se specifično eksprimira u humanoj mišićnoj ćeliji i potencijalni je transkripcioni faktor. Ankrd2 je protein od 333 aminokiseline (ak), molekulske mase 37,15 kDa. U njegovoj sekvenci su prisutni brojni proteinski motivi: signal za lokalizaciju u jedru, ATP/GTP vezujući motiv (samo u proteinu miša), mesta za fosforilaciju c-AMP zavisnom protein kinazom i kazein kinazom II (CKII),



Slika 1. Šematski prikaz proteina Ankrd2 i CARP/MARP/C-193 i njihova uporedna sekvenca.

A) Različito osenčenim pravougaonicima i krugovima označeni su proteinski motivi prisutni u oba proteina, a brojevi pokazuju njihovu poziciju. B) Uporedna sekvenca humanog i mišjeg proteina Ankrd2 i njegovog homologona CARP/MARP/C-193 identifikovanog u različitim organizmima (humani C-193, zečji CARP, mišji MCARP i pacovski CARP). Aminokiseline konzervisane u četiri, pet ili šest proteina koji se upoređuju oivičene su sivom bojom rastućeg intenziteta. Sekundarna struktura ankirinskih ponovaka je predstavljena strelicama (beta-ploče) i cilindrima (alfa-spirale). Potencijalni signal za lokalizaciju proteina u jedru podvučen je crnom linijom (Pallavicini *et al.*, 2001).

dve PEST sekvence odgovorne za brzu degradaciju proteina (Rogers *et al.*, 1986; Rechsteiner and Rogers, 1996) i ankirinski ponovci koji učestvuju u proteinsko-proteinskim interkcijama (Michaely and Bennett, 1992).

Pošto je više laboratorija u isto vreme izučavalo protein Ankrd2 u Opštem delu će biti dat pregled rezultata koje su dobili drugi autori radi sticanja što kompletnije slike o ovom veoma zanimljivom proteinu. Takodje će biti opisan protein CARP/MARP/C-193 kao protein najbližnji proteinu Ankrd2. Jedno poglavlje će biti posvećeno ankirinskim ponovcima, proteinskom motivu prisutnom u oba proteina. Protein Ankrd2 se može detektovati u jedrima mišićnih ćelija, i to u subjedarnim strukturama koje se nazivaju PML jedarna tela, pa će u Opštem delu i o njima biti reči. Na kraju, biće opisana uloga transkripcionog faktora NFkB u diferencijaciji mišićnih ćelija jer su postojale indicije da protein Ankrd2 ima regulatornu ulogu u signalnom putu ovog transkripcionog faktora.

I.2. PROTEIN Ankrd2/Arpp

Više nezavisnih autora je izučavalo mišji i humani gen/protein Ankrd2 i njihovi rezultati će biti izneti u ovom poglavlju. U literaturi, protein Ankrd2 se može naći i pod imenom Arpp. Moriyama i koautori (Moriyama *et al.*, 2001) su identifikovali protein Ankrd2 pretraživanjem cDNK biblioteke TE1 humane ćelijske linije karcinoma ezofagusa koristeći antitelo na hipotetički protein kodiran nekodirajućim lancem informativne RNK p53 i nazvali ga Arpp od Ankyrin repeat, PEST sequence, proline rich.

I.2.1. Sekvenciranje humane i mišje cDNK Ankrd2

Kompletne sekvence cDNK humanog i mišjeg Ankrd2 se nalaze u EMBL bazi podataka pod brojevima AJ304805 i AJ011118 i prikazane su na Slici 2. Humani i mišji transkripti se razlikuju po dužini, humani je veličine 1159 nukleotida (nt), dok je mišji

Human	AGAGGCGGTT	Met	Asp	Gly	Thr	Met	Glu	Asp	Ser	Glu	Ala	Val	Gln	Arg	Ala	Thr	Ala	Leu	Ile	Glu	Gln	Arg	Leu	Ala	23				
Mouse	...AA.A...CG	...TGG	C...AAT	...C	79					
Human	Gln	Glu	Glu	Glu	Asn	Glu	Lys	Leu	Arg	Gly	Asp	Thr	Arg	Gln	Ala	Val	Gln	Arg	Ala	Thr	Ala	Leu	Ile	Glu	Gln	Arg	Leu	Ala	235
MouseACTA	...TC	...G	...T	...CT	...GGTAAAA	...	157
Human	Lys	His	His	Gly	Ala	Gln	Ser	Ala	Ala	Leu	Gln	Lys	Val	Lys	Gly	Gln	Glu	Arg	Val	Arg	Lys	Thr	Ser	Leu	Asp	Leu	49		
MouseG	...TCTA	...ATAAAA	...	157	
Human	Arg	Arg	Glu	Ile	Ile	Asp	Val	Gly	Gly	Ile	Gln	Asn	Leu	Ile	Glu	Leu	Arg	Lys	Lys	Arg	Lys	Gln	Lys	Lys	Arg	Asp	Leu	75	
MouseArg	...LeuValProT	...A	...AT	235	
Human	Arg	Arg	Glu	Ile	Ile	Asp	Val	Gly	Gly	Ile	Gln	Asn	Leu	Ile	Glu	Leu	Arg	Lys	Lys	Arg	Lys	Gln	Lys	Lys	Arg	Asp	Leu	101	
MouseA	...TTTT	...AAAAA	...T	...T	313	
Human	Ala	Leu	Ala	Ala	Ser	His	Glu	Pro	Pro	Pro	Glu	Pro	Glu	Glu	Ile	Thr	Gly	Pro	Val	Asp	Glu	Glu	Thr	Phe	Leu	Lys	127		
MouseT	...A	...G	...C	...G	...T	...TAYAAsn	391	
Human	Ala	Ala	Val	Glu	Gly	Lys	Met	Lys	Val	Ile	Glu	Lys	Phe	Leu	Ala	Asp	Gly	Gly	Ser	Ala	Asp	Thr	Cys	Asp	Gln	Phe	153		
MouseAACAGA	...TGC	...T	...T	...G	469	
Human	Arg	Arg	Thr	Ala	Leu	His	Arg	Ala	Ser	Leu	Glu	Gly	His	Met	Glu	Ile	Leu	Glu	Lys	Leu	Leu	Asp	Asn	Gly	Ala	Thr	179		
MouseT	...G	...CG	...AG	...AAGlu	547	
Human	Val	Asp	Phe	Gln	Asp	Arg	Leu	Asp	Cys	Thr	Ala	Met	His	Trp	Ala	Cys	Arg	Gly	Gly	His	Leu	Glu	Val	Val	Lys	Leu	205		
MouseCTC	...GG	...C	...	626	
Human	Leu	Gln	Ser	His	Gly	Ala	Asp	Thr	Asn	Val	Arg	Asp	Lys	Leu	Leu	Ser	Thr	Pro	Leu	His	Val	Ala	Val	Arg	Thr	Gly	231		
MouseArg	...G	...G	...CCA	...CAT	...CTCT	...T	...A	...	703	
Human	Gln	Val	Glu	Ile	Val	Glu	His	Phe	Leu	Ser	Leu	Gly	Leu	Glu	Ile	Asn	Ala	Arg	Asp	Arg	Glu	Gly	Asp	Thr	Ala	Leu	257		
MouseA	...TTTTAAC	...GA	...	781	
Human	His	Asp	Ala	Val	Arg	Leu	Asn	Arg	Tyr	Lys	Ile	Ile	Lys	Leu	Leu	Leu	Leu	His	Gly	Ala	Asp	Met	Met	Thr	Lys	Asn	283		
MouseT	...CATGA	859	
Human	Leu	Ala	Gly	Lys	Thr	Pro	Thr	Asp	Leu	Val	Gln	Leu	Trp	Gln	Ala	Asp	Thr	Arg	His	Ala	Leu	Glu	His	Pro	Glu	Pro	309		
MouseGCCA	...A	...CTCA	...	937	
Human	Gly	Ala	Glu	His	Asn	Gly	Leu	Glu	Gly	Pro	Asn	Asp	Ser	Gly	Arg	Glu	Thr	Pro	Gln	Pro	Val	Pro	Ala	Gln	*	333			
MouseAA	...TGAAGGG	---C	...TAAATAA	...	1012		
Human	ATGCGTGCSCCAGCCAGCCAGCTCTCTGTGTGCAGCCGAGGGTCTTAAGAATGGTCCCGGAGCTAACTGAGGGCCAGCCTTTTTTCTGCATGATCCAGG	1115																											
Mouse	AGCACATACCACAACTACCACAAATAAAAAAGCTTGTTTTGG-poly(A)	1159																											
Human	ATACCTACCCGGAGCTGGGCACCCATGAGCTGCCTGCAGCCAGTCTAGCAGGAACACCCCTAGATGCAACACAATAAAGTGTGGCTTTGCT-poly(A)	1101																											

Slika 2. cDNK i aminokiselinska sekvenca humanog i mišjeg proteina Ankrd2.

U kodirajućem delu sekvence mišjeg proteina konzervirani nukleotidi i aminokiseline su predstavljeni tačkama. Crticama je označena praznina u mišjoj sekvenci (u mišjem proteinu nedostaje Asp na poziciji 321) u cilju preklapanja dve sekvence (Pallavicini *et al.*, 2001).

transkript nešto kraći u 3' nekodirajućem regionu (1101 nt). Sekvence humanog i mišjeg gena/proteina Ankrd2 pokazuju veliku sličnost: identičnost na nukleotidnom nivou je 85 %, dok je identičnost na aminokiselinskom nivou još veća i iznosi 89 %. Razlike u primarnoj strukturi između ova dva proteina su ravnomerno rasporedjene duž sekvence, osim niza od 5 aminokiselina blizu N-terminusa koje se razlikuju između čoveka i miša. Otvoreni okviri čitanja humanog i mišjeg gena Ankrd2 su 999, odnosno 996 baza i kodiraju proteine od 333 i 332 aminokiseline, molekulskih masa 37,150 i 37,124 kDa. Medjutim, ovi proteini u SDS poliakrilamidnom gelu pokazuju drugačiju pokretljivost i putuju kao protein od 42 kDa.

I.2.2. Genomska organizacija gena Ankrd2

Gen Ankrd2 mapira na desetom humanom hromozomu, u regionu 10q23.31-23.32. Najbliži marker je WI-3011, na udaljenosti 4,29 centiRay (Pallavicini *et al.*, 2001). Analizom sekvence utvrđeno je da je i mišji i humani gen izdijeljen u 9 egzona i da svaki od egzona 5, 6, 7 i 8 kodira po jedan ankirinski ponovak (Kemp *et al.*, 2000; Pallavicini *et al.*, 2001).

I.2.3. Analiza promotorskog regiona gena Ankrd2

Analizom promotorskog regiona gena za Ankrd2 detektovana su mesta za vezivanje mišićno specifičnih transkripcionih faktora kao što su MyoD i E-blok (Slika 3) koji su odgovorni za ekspresiju mišićno specifičnih gena. E-blok je prisutan u promotorima i stimulatorima mnogih gena koji kodiraju proteine koji se specifično eksprimiraju u mišićnim ćelijama, kao što su srčani α -aktin (Biesiada *et al.*, 1999), tip 1 Na⁺ kanala (Kraner *et al.*, 1998), mišićna kreatin kinaza (Shield *et al.*, 1996), kao i protein CARP/MARP/C-193 (Kuo *et al.*, 1999). Takodje postoji i mesto za vezivanje transkripcionog faktora NF-kB ukazujući na mogućnost regulacije genske ekspresije Ankrd2 u NF-kB signalnom putu kao što je pretpostavljeno za C-193 (Chu *et al.*, 1995).

Koristeći seriju konstrukata koji su sadržavali različite delove promotora gena *Ankrd2* ispred reporterskog gena koji kodira luciferazu, identifikovan je minimalni promotorski region, 280 bp uzvodno od mesta od koga otpočinje transkripcija (Slika 3, region je označen strelicama), koji je dovoljan da obezbedi tkivno i vremenski specifičnu ekspresiju gena *Ankrd2* (Pallavicini *et al.*, 2001).

mouse promoter	GGTTCATGGCTAATGGACAC-----GCCATGCAGCATAGCCG-TGTTTCCCTAGGGCCCATGGGACCCATAGCAGCCAC	-512
human promoter	TGCCGAAGGCCAGCGTGAGCTGTGATCAGAGAGGGAGACAGCTGCCCTTCTGCTACCACGGCCCTGGCCTGGACAAG	-493
	* * * * *	
	CAGAGGGCAGCAGCCGTTCCAGCT-----CTTGCTTGGAGAAGGTCTCGGATGCCACAGGTCTGCTGGGGCTCATACTTGGTTTTTCAG	-427
	TAGAGTGTGACCCCTCCTCACAGCCAGCAGGGCCTGTCTGCAGGACAGCCCTGGGAGTACAGAAGTCTCCTGGGTCCCGCTTGGTTTT-CAG	-402
	***** * * * * *	
	E47 MyoD	
	GCTCCCCTGCCTGGCACAAGCTAGACAGCATTCTGGGCATCCAGCAGGTGGCACT-CCAGCCAGACCAATG---GCAGCATGTAGGTCC--	-340
	GCCCTCTT-CCTGGAGCTGGCTGAGCAGGGTTCCAGGCATCCAGCAGGTGGCACTGTCATCTGGGCTGGAGCATGCAGCCAGCAGTCCCT	-311
	** * * * * * * * * * *	
	└▶	
	TTTGACAGCCCGTTCAACCCTGGCTAAGACTTAGCCAGTCCCAGCACTGAGGACACA--CTGGACAGGCCTCTTCCCGCAGCTGTCCT-TCG	-251
	TTTGCAACTCAGTTGCCTTGGCTAAGGCCCAACCAGTCCCAGTGTCTCAGGACAGAGGCTGGACGGGC-TCCTTCTGCACCCCTGCTCTTG	-220
	***** * * * * *	
	NF-kB	
	GGGCGGTGTGCCTTCTGGCTCTGGTAGGCCAGAGGTTAGGGGAGGGGCAAGTCCCTGGCCTGGACAGTGGCTTCCCATGCTCCCTGGGGCT	-159
	GGACACAGTGCCCTCCGGCTCTAATAGGCCAGGAGTTGGGGGGCAACTGGCTCTGCTCCCTGGCCC-TGGCTCCCGCTGCTCCCTGGGGCT	-129
	** * * * * * * * * * *	
	MyoD MyoD	
	GTCCGAGGTGAAGGTGACAGGTGGGGAGGCAGGTGGAGAGTTGAGCTAGTAAGCTCATGACAGATGGAGAAACGAGCCTGTGAGCTAATGA	-67
	GCCCGAGGTGAAGGTGACAGGTGGGGAGGCAGGTGGAGAATTGGGCCAGTGTGAGCTCATGG-----	-68
	* * * * * * * * * * *	
	TATA box +1 ◀	
	CAAAGGCGCCAG-TGGGC-GGGGTGGGTGCTTGGGCCTATAAAGACCCCAT-GCCCTGTGGCTTGCAGAAACAGTCATGGAGGGTACCATG	+23
	CAAAGGCGCCAGCTGGGCAGGGGTGGGTGCTCTGGCCTATAAAGCCCCGAGGCCCTGTGGCCTGCAGAGGCGGTTATGGACGGCACCATG	+25
	***** * * * * *	

Slika 3. Uporedne sekvence promotorskog regiona mišjeg i humanog *Ankrd2*.

Veživna mesta za transkripcione faktore E47, MyoD, NF-kB i TATA blok su označeni masnim slovima. Nukleotid od koga otpočinje transkripcija, kao i prva dva ATG kodona su takodje obeleženi masnim slovima. Strelicama je označen region promotora odgovoran za mišićno specifičnu ekspresiju (Pallavicini *et al.*, 2001).

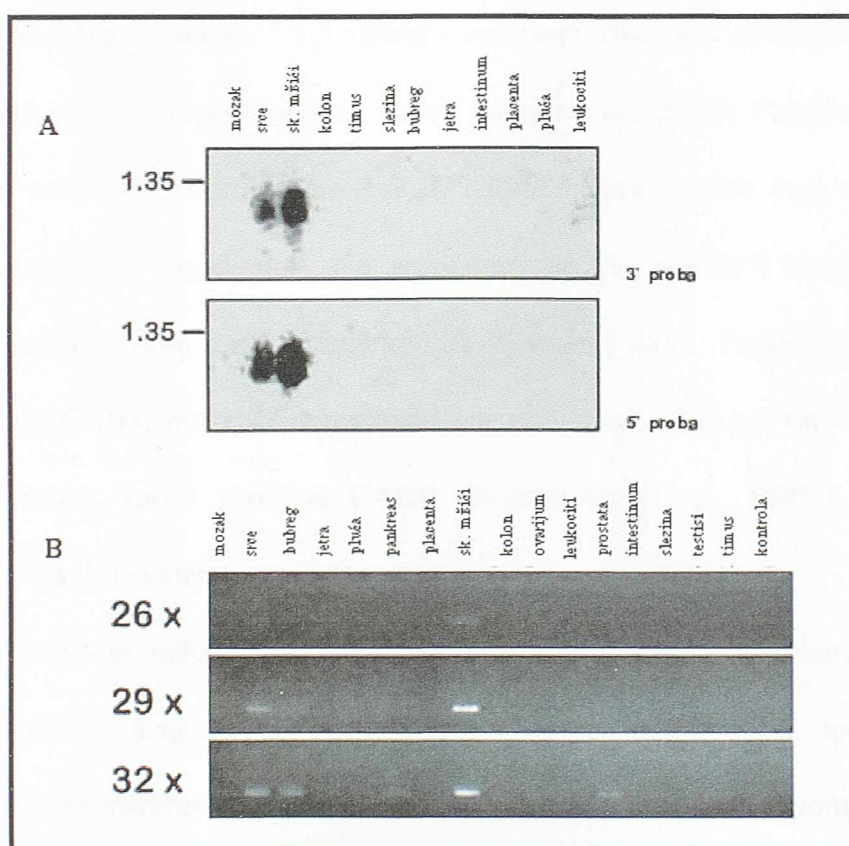
I.2.4. Ekspresija iRNK *Ankrd2*

Northern blot analizom 12 različitih humanih tkiva (Slika 4, A), korišćenjem 3' ili 5' nekodirajućih regiona *Ankrd2* kao proba za hibridizaciju, potvrđeno je da su skeletni mišići glavno mesto ekspresije ovog gena, dok je slabiji signal dobijen u srcu. Detektovanje samo



jedne trake hibridizacijom sa obe probe ukazuje na postojanje samo jednog produkta u mišićnoj ćeliji, tj. da nema alternativne obrade transkripta (Pallavicini *et al.*, 2001).

I metodom reverzne amplifikacije (RT-PCR) (Slika 4, B) potvrđeno je da se iRNK Ankrd2 specifično eksprimira u skeletnim mišićima. Nakon 26, 29 i 32 ciklusa umnožavanja, produkti su analizirani elektroforezom na agaroznom gelu. Manje količine Ankrd2 transkripta detektovane su i u srcu, bubregu i prostati nakon 29 ciklusa umnožavanja (Pallavicini *et al.*, 2001).



Slika 4. Detekcija iRNK Ankrd2 u humanim tkivima Northern blot analizom i metodom reverzne amplifikacije (RT-PCR).

A) Northern blot analiza humanih tkiva. Panel sa iRNK dvanaest humanih adultnih tkiva je hibridizovan sa radioaktivno obeleženim PCR fragmentima dobijenim umnožavanjem 3' ili 5' nekodirajućeg regiona Ankrd2. Brojevi sa strane označavaju veličinu DNK fragmenta u kb. B) RT-PCR raznih humanih tkiva. Umnožavano je 16 različitih cDNK korišćenjem graničnika specifičnih za 3' region iRNK Ankrd2. Broj ciklusa lančane polimerizacije dat je brojevima sa strane (Pallavicini *et al.*, 2001).

I.2.5. Ekspresija proteina Ankrd2

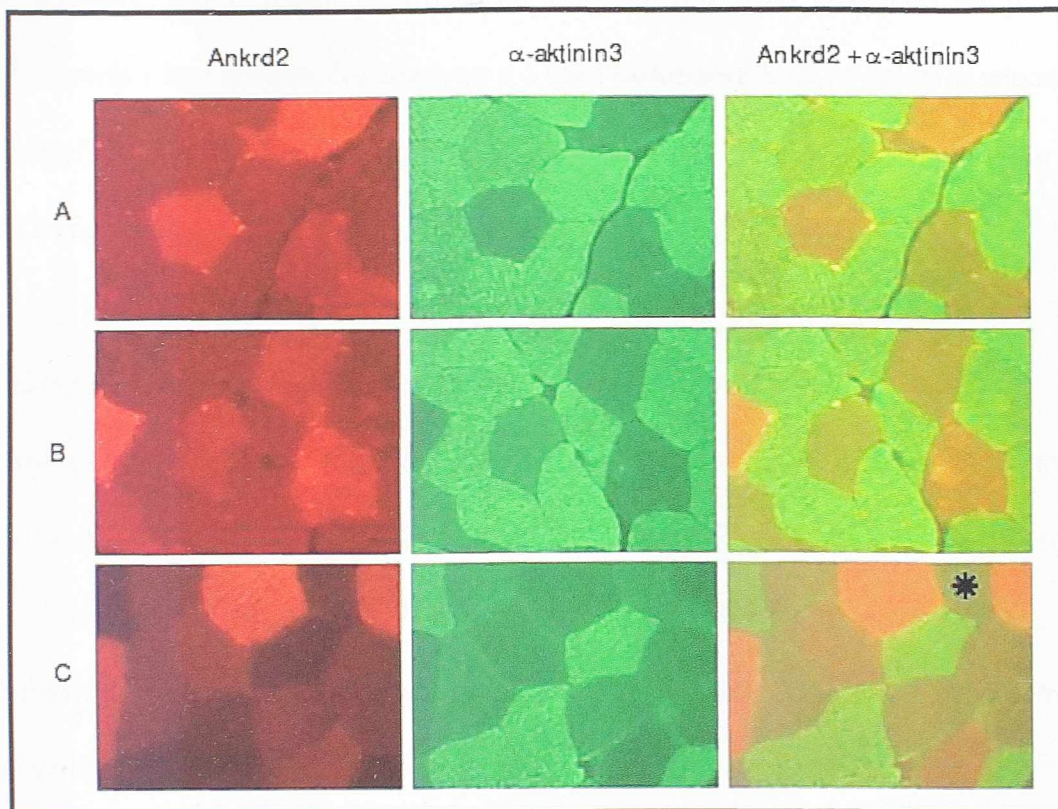
Ekspresija ovog proteina je ograničena na skeletne mišiće i srce. Za razliku od proteina CARP/MARP/C-193 koga ima najviše u srcu, protein Ankrd2 je mnogo više eksprimiran u skeletnim mišićima nego u srcu.

Za humani protein Ankrd2 je pokazano da se specifično eksprimira u skeletnim mišićima, i to u sporim mišićnim vlaknima (Slika 5) (Pallavicini *et al.*, 2001; Ishiguro *et al.*, 2002). I mišji protein Ankrd2 je takodje eksprimiran u mišićima koji su sastavljeni isključivo od sporih vlakana kao što su soleus i TA (tibialis anterior), dok nije detektovan u jeziku i drugim mišićima koji ne sadrže spora mišićna vlakna (Kemp *et al.*, 2000). Potrebno je naglasiti da sva spora vlakna ne ekspimiraju protein Ankrd2 (Slika 5, sporo vlakno koje ne ekspimira protein Ankrd2 je označeno zvezdicom). Na uzdužnom preseku mišićnih vlakana pozitivan signal se poklapa sa strijacijom karakterističnom za mišićna vlakna. Protein Ankrd2, kao i protein CARP/MARP/C-193, može se detektovati i u skeletnim mišićima fetusa. Ekspresija mišjeg proteina Ankrd2, kao i proteina CARP (Baumeister *et al.*, 1997)), je značajno indukovana u denervisanim skeletnim mišićima (Tsukamoto *et al.*, 2002).

U adultnom srčanom mišiću protein Ankrd2 je pretežno eksprimiran u kardiomiocitama komora, međukomornoj pregradi i apeksu, dok je, za razliku od njega, protein CARP/MARP/C-193 eksprimiran i u komorama i u pretkomorama. U fetalnom srcu protein CARP/MARP/C-193 je jako eksprimiran, dok se protein Ankrd2 može detektovati samo u tragovima. Ekspresija proteina Ankrd2 ograničena na komore ukazuje da on može imati fiziološku funkciju u adultnom srcu.

Iz navedenih rezultata može se zaključiti da su ekspresioni profili proteina CARP/MARP/C-193 i Ankrd2 recipročni, prvi je važniji u srcu, a drugi u skeletnim mišićima, posebno u mišićima sastavljenim od sporih vlakana. Sličnosti izmedju ova dva proteina na

nivou primarne strukture cDNK i u pogledu veličine i strukture proteina ukazuju da oni mogu funkcionisati na sličan način.



Slika 5. Ekspresija proteina Ankrd2 u humanim skeletnim mišićima.

Protein Ankrd2 (crveno) je detektovan u normalnom skeletnom mišiću sa antitelima na N-terminalni region (A), ceo protein (B) i C-terminalni region proteina Ankrd2. Brza mišićna vlakna (tip II) su obojena zeleno usled prisustva α -aktinina 3. Zvezdicom je označeno vlakno u kome nije detektovan ni α -aktinin 3, ni Ankrd2 (Pallavicini et al., 2001).

I.2.6. Ekspresija proteina Ankrd2 u ćelijskim linijama kancera

Protein Ankrd2 se eksprimira i funkcioniše i u jedru i u citoplazmi TE1 ćelija karcinoma ezofagusa, kao i u HeLa ćelijama transfektovanim konstruktom sa koga se eksprimira protein Arpp (Moriyama et al., 2001). Protein nije detektovan u drugim kanceroznim ćelijama (ćelije limfoma, karcinoma endometrijuma, želuca i kolona, HeLa ćelijama), a ni u normalnom ezofagusu, želucu, kolonu, uterusu i limfoidnim organima.

1.2.7. Lokalizacija proteina Ankrd2 u mišićnim ćelijama

Što se tiče intraćelijske lokalizacije, protein Ankrd2 se može detektovati i u jedru i u citoplazmi mišićnih ćelija. Imunoelektronskom mikroskopijom je pokazano da je protein Ankrd2, i kod miša i kod čoveka, lokalizovan u I traci sarkomere koja se nalazi u neposrednoj blizini Z trake (Tsukamoto, 2002). I protein CARP je takodje lokalizovan i u jedru i u I traci sarkomera (Bang *et al.*, 2001; Zou *et al.*, 1997).

1.3. PROTEIN CARP/MARP/C-193

Nekoliko autora je nezavisno identifikovalo ovaj protein i zato se u literaturi može naći pod različitim imenima: CARP (Cardiac Ankyrin Repeat Protein ili Cardiac Adriamycin Responsive Protein) (Zou *et al.*, 1997; Jeyaseelan *et al.*, 1997; Kuo *et al.*, 1999), MARP (Muscle Ankyrin Repeat Protein) (Baumaister *et al.*, 1997) i C-193 (Chu *et al.*, 1995). Protein je ispitan u različitim kontekstima:

-posle denervacije mišićnih vlakana (MARP)

-u toku kardiogeneze (CARP)

-za vreme aktivacije endotelnih ćelija u toku inflamatornih procesa (C-193)

-u toku izučavanja srčane hipertrofije kada se ponovo aktivira embrionalni program genske ekspresije i reaktivira se kardiogeneza.

Protein CARP/MARP/C-193 se sastoji od 319 ak, ima molekulska masu 36 kDa i poseduje brojne motive: pet ankirinskih ponovaka, četiri potencijalna signala za lokalizaciju u jedru, PEST sekvencu, pet potencijalnih mesta za fosforilaciju protein kinazom C, jedno mesto za fosforilaciju cAMP zavisnom protein kinazom, četiri mesta za fosforilaciju kazein kinazom II, dva mesta za N-glikolizaciju i jedno mesto za amidaciju.

U srčanim mišićnim ćelijama ima ulogu koregulatora ekspresije gena specifičnih za srčane mišićne ćelije, a koji se nalaze nizvodno od homeotskog gena Nkx2-5. U adultnom mišu



protein CARP/MARP/C-193 je primarno eksprimiran u srcu i velikim krvnim sudovima, a u skeletnim mišićima se može detektovati samo u tragovima (Baumeister *et al.*, 1997, Zou *et al.*, 1997). Za vreme embrionalnog razvića protein CARP/MARP/C-193 je uniformno eksprimiran u srčanom zametku, a i u miotomu (embrionalnom začetku skeletnih mišića) (Baumeister *et al.*, 1997).

Zou i koautori (Zou *et al.*, 1997) su identifikovali protein CARP/MARP/C-193 kao jedan od proteina koji se vezuju za transkripcioni faktor YB-1, koji ima važnu ulogu u regulaciji ekspresije gena koji se specifično eksprimiraju u srčanoj komori. Transkripcioni faktor YB-1 se vezuje za HF-1 cis element koji se nalazi u promotorskom regionu gena za laki lanac miozina srčane komore (MLC-2v, ventricular specific myosin light chain-2). Od svih gena koji se specifično eksprimiraju u srčanoj komori ovaj gen se najranije eksprimira u toku embriogeneze. Protein CARP/MARP/C-193 se preko ankirinskih ponovaka vezuje za transkripcioni faktor YB-1 i ima ulogu negativnog regulatora transkripcije. Specifično se eksprimira u miokardijumu i njegova ekspresija je prostorno i vremenski regulisana tokom kardiogeneze. U novorodjenim i adultnim miševima protein CARP/MARP/C-193 je eksprimiran u srčanom mišiću. Njegova ekspresija nije detektovana u skeletnim mišićima, ni u jednom stupnju embrionalnog razvića miša.

Ekspresija proteina CARP/MARP/C-193 je dramatično redukovana u Nkx2-5^{-/-} mutantima. Homeotski gen Nkx2-5 je sisarski homologon tinman gena vinske mušice. Nedostatak ovog gena dovodi do gubitka ekspresije gena za laki lanac miozina srčane komore MLC-2v čime se prekida morfogeneza srca. Proizvod gena Nkx2-5 direktno ili indirektno reguliše CARP/MARP/C-193 na transkripcionom nivou i u srčanim miocitama i *in vivo* u toku kardiogeneze. CARP/MARP/C-193 je prvi identifikovani srčano-specifični gen regulisan homeotskim genom Nkx2-5 sa ulogom negativnog regulatora ekspresije gena koji u promotoru imaju HF-1 element i koji se specifično eksprimiraju u srčanoj komori.

Jeyaseelan i koautori su identifikovali CARP/MARP/C-193 kao jedarni protein koji se konstitutivno i specifično eksprimira u srčanom mišiću i čija je iRNK osetljiva na doxorubicin (Dox, doxorubicin), hemoterapeutski agens koji ima kardiotoksični efekt, tj. utiče na transkripciju gena u srčanom mišiću. Već nakon nekoliko sati tretmana primarnih kardiomiocita novorođenog pacova doxorubicinom CARP/MARP/C-193 se ne može detektovati. CARP/MARP/C-193 iRNK je tkivno specifična i može se detektovati samo u srcu, i to veoma rano u toku embrionalnog razvića srca. Transkripcija gena koji kodira protein CARP/MARP/C-193 u srcu i za vreme embrionalnog razvića i posle rođenja ukazuje da ovaj protein ima ulogu u rastu i/ili morfogenezi srčanog mišića. Protein CARP/MARP/C-193 negativno reguliše transkripciju sa najmanje dva promotora specifična za srčane ćelije, inhibira promotore gena za ANF (atrial natriuretic factor) i cTnC (cardiac troponin C), a nema uticaja na aktivnost gena za β aktin koji se ne eksprimira specifično u srcu, već i u drugim mišićima.

Endogena forma proteina CARP/MARP/C-193 se osim u jedrima može detektovati i u I traci mišićnih vlakana što ukazuje da je komponenta miofibrila. Ovaj protein interaguje sa N-terminalnim regionom miopaladina (Bang *et al.*, 2001) unutar sarkomerne I trake (nalazi se uz samu Z traku, sa obe strane) i u srčanim i u poprečnoprugastim mišićima. Miopaladin je protein od 145 kDa koji se specifično eksprimira u poprečno-prugastim mišićima i ima regulatornu ulogu u održanju strukture sarkomera. Ovaj protein interaguje sa nebulinom (direktno) i titinom i tankim filamentima (indirektno, preko α -aktininskih filamenata) pri čemu dolazi do formiranja unutrašnje mreže Z trake. Protein CARP/MARP/C-193 nije detektovan u I-Z-I (precursor Z-line/stress-fiber-like) strukturama koje se nalaze na krajevima srčanih miocita u kulturi.

Regulatorni mehanizmi koji kontrolišu specifikaciju kardiomiocita i njihovu diferencijaciju u različite ćelijske linije od kojih će biti sastavljeni različiti delovi srca (komore, pretkomore i veliki krvni sudovi) su predmet intenzivnih istraživanja. Protein CARP/MARP/C-

193 je korišćen kao molekularni model sistema prilikom determinacije zasebnih regulatornih puteva koji kontrolišu region-specifičnu ekspresiju gena koji se specifično ekspimiraju u srcu za vreme kardiogeneze (Kuo *et al.*, 1999). S obzirom da je protein CARP/MARP/C-193 ekspimiran u kardiomiocitama svih delova srca utvrđeno je da do njegove uniformne ekspresije u srcu dolazi usled prisustva različitih *cis* regulatornih elemenata u genu koji kodira protein CARP/MARP/C-193 odgovornih za specifičnu ekspresiju ovog proteina u pojedinim delovima srca, tj. da je ekspresija ovog proteina u različitim delovima srca kontrolisana zasebnim regulatornim putevima.

Ekspresija gena CARP/MARP/C-193 je smanjena u adultnom srcu u odnosu na fetalno srce, dok je dramatično povećana u toku hipertrofije srca (Kuo *et al.*, 1999). Protein CARP/MARP/C-193 se smatra markerom hipertrofije srca (Aihara *et al.*, 2002). Za razliku od drugih gena koji se aktiviraju u toku hipertrofije srca (ANF, teški lanac β miozina i α -aktin skeletnih mišića), protein CARP/MARP/C-193 se ekspimirira rano u toku embriogeneze i njegova količina raste u toku razvića srca. Povećanje količine CARP/MARP/C-193 iRNK je brzo i njen nivo se održava u toku hipertrofije za razliku od ostalih jedarnih faktora (c-fos, c-jun, c-myc i egr-1) koji se konstitutivno ekspimiraju, dok im se količina prolazno povećava kao odgovor na preopterećenost srca.

Gen koji kodira protein CARP/MARP/C-193 je diskontinuiran, sastoji se od 9 egzona, a egzoni 5, 6, 7 i 8 kodiraju po jedan ankirinski ponovak sastavljen od 33 aminokiseline. Analizom promotorske sekvence ovog gena ustanovljeno je prisustvo mesta za vezivanje transkripcionog faktora GATA-4 koji kontroliše ekspresiju većeg broja gena koji se specifično ekspimiraju u srcu (Kuo *et al.*, 1999). Poznato je da transkripcioni faktori Nkx2.5 i GATA-4 kooperativno deluju da bi regulisali ekspresiju nekoliko gena koji se ekspimiraju u srcu, kao što su geni za ANF i srčani α -aktin. Pokazano je da i gen koji kodira protein CARP spada u tu grupu i da je kooperativna regulacija promotora ovog gena transkripcionim faktorima Nkx2.5 i

GATA-4 zavisna od vezivanja GATA-4 za svoju sekvencu unutar promotora i da transkripcioni faktor Nkx2.5 reguliše ekspresiju CARP gena preko GATA-4.

U potrazi za genima uključenim u regulaciju genske ekspresije u mišićima i u formiranje neuromišićnih sinapsi napravljena je i pretražena biblioteka cDNK obogaćena kodirajućim sekvencama gena koji se indukuju denervacijom skeletnih mišića (Baumeister *et al.*, 1997). Jedan od klonova je kodirao jedarni protein sa četiri ankirinska ponovka koji se eksprimira u poprečnoprugastim mišićima i vaskularnim epitelijalnim ćelijama. Zbog pretežne ekspresije u poprečnoprugastim mišićima protein je nazvan MARP od muscle ankyrin repeat protein. U skladu sa mogućom ulogom signalnog faktora, protein CARP/MARP/C-193 se brzo degraduje u ćeliji, ali se degradacija može usporiti dodavanjem nekoliko aminokiselina na COOH kraj proteina. U transfektovanim ćelijama protein CARP/MARP/C-193 se može detektovati i u jedru i u citoplazmi. Citoplazmatična forma proteina je često akumulirana u agregatima koji možda predstavljaju mesta degradacije proteina. CARP/MARP/C-193 je strogo regulisan na posttranskripcionom i posttranslacionom nivou što je karakteristika regulatornih gena primarnog odgovora. Još jedan podatak govori u prilog činjenici da CARP/MARP/C-193 pripada genima primarnog odgovora, a to je povećan nivo CARP/MARP/C-193 iRNK u ćelijama tretiranim cikloheksimidom koji inhibira sintezu proteina. CARP/MARP/C-193 transkript se akumulira na krajevima primarnih miotuba u toku morfogeneze mišića.

Kao odgovor na različite inflamatorne stimuluse, kao što su interleukin-1 α (IL-1 α), nekrotični faktor tumora (TNF α) i lipopolisaharidi bakterija (LPS), u epitelnim ćelijama dolazi do velikih promena u ekspresiji seta gena koji su nazvani geni primarnog odgovora. Njihova ekspresija je brza i prolazna, a transkripcija ovih gena ne zahteva *de novo* sintezu proteina. Veliki broj gena primarnog odgovora kodira faktore koji učestvuju u regulaciji transkripcije. Jedan od ovih gena je i CARP/MARP/C-193 čija se ekspresija indukuje citokinima (Chu *et al.*,

1995). Imunoprecipitacijom jedarnih proteina i indirektnom fluorescencijom pokazano je da je protein CARP/MARP/C-193 lokalizovan pretežno u jedrima COS ćelija koje su transfektovane vektorom koji je sadržavao CARP/MARP/C-193 cDNK. Gen koji kodira CARP/MARP/C-193 se nalazi na desetom humanom hromozomu, a detektovan je i kod miša, hrčka, majmuna i zeca (ne nalazi se kod kvasca i vinske mušice), što ukazuje na konzerviranost gena u sisara.

Brza indukcija ekspresije CARP/MARP/C-193 posle stimulacije ćelija citokinima, nezavisna od *de novo* sinteze proteina, jedarna lokalizacija CARP/MARP/C-193, prisustvo ankirinskih ponovaka i sličnost sa proteinom I κ B (inhibitor transkripcionog faktora NF κ B) ukazuju na moguću ulogu CARP/MARP/C-193 u regulaciji ekspresije gena. Ovu pretpostavku dodatno potvrđuje i DNK vezujuća aktivnost CARP/MARP/C-193 koja je utvrđena specifičnim vezivanjem rekombinantnog proteina CARP/MARP/C-193-FLAG za DNK celulozu (Chu *et al.*, 1995).

I.4. ANKIRINSKI PONOVC

Ankirinski ponovci su prisutni u velikom broju proteina različitih funkcija kao što su regulatori ćelijskog ciklusa, proteini membrana, strukturni proteini, regulatori transkripcije (Bork *et al.*, 1993), a zajednička osobina svih je da učestvuju u proteinsko-proteinskim interakcijama (Michaely and Bennett, 1992). Proteini koji poseduju ankirinske ponovke mogu biti lokalizovani i u ćelijskom jedru i u citoplazmi.

Prvo su ih opisali Breedon i Nasmyth (Breedon and Nasmyth, 1987), označavajući varijacije motiva od 33 aminokiseline koje se tandemski ponavljaju. Jedan protein, najčešće, može imati od dva do sedam ponovaka, ali postoje i proteini koji poseduju veći broj ankirinskih ponovaka kao što su ankirini sa 22-24 ponovka (Bennett, 1992). Arhetipski ankirin je glavni produkt ANK-1 genskog lokusa i pripada familiji proteina koji povezuju jonske kanale sa ćelijskim citoskeletom crvenih krvnih zrnaca. On poseduje 22 ankirinska ponovka, a

u svakom ponovku određene aminokiseline su strogo konzervisane, dok druge mogu da variraju. Konsenzusna sekvenca humanog ankirina je --G-TPLH-AA---GH---V---LL---GA--N---. Strukturno, ankirinski ponovci se sastoje od alfa spirala povezanih beta ukosnicama (Jacobs and Harrison, 1998).

Ankirinski ponovci su prisutni i u nekim proteinima koji se specifično eksprimiraju u mišićnom tkivu, kao što je subjedinica miozin fosfataze glatkih mišića koja se vezuje za miozin i ima osam ankirinskih ponovaka u N-terminalnom regionu proteina (Shimizu *et al.*, 1994), diacilglicerol kinaza zeta, protein koji se eksprimira u humanim skeletnim mišićima (Ding *et al.*, 1997), domen 1 proteina AnkG 119 koji ima trinaest ankirinskih ponovaka (Devarajan *et al.*, 1996) i protein mišjih skeletnih mišića Ank1 (Zhou *et al.*, 1997).

I.5. JEDARNA TELA

Interfazno jedro je visoko organizovana i strogo regulisana sredina i može biti izdvojeno u diskretne strukture i funkcionalne domene. U strukturnom smislu, u jedru dominiraju nukleolusi i hromatin u različitom stepenu kondenzacije. Individualni hromozomi zauzimaju diskretne prostore nazvane hromozomske teritorije koje su medjusobno razdvojene kanalima nazvanim interhromozomski domeni. Geni koji se aktivno transkribuju se nalaze na periferiji hromozomskih teritorija, dok se RNK transkripti nalaze u interhromozomskim domenima gde se dodatno obraduju i transportuju. Interhromatinski regioni obično sadrže ograničen broj karakterističnih struktura kao što su perihromatinski fibrili i granule, interhromatinske granule i jedarna tela. Jedarna tela se, pod mikroskopom, vide kao tačkaste strukture i obuhvataju različite dinamičke strukture uključene u održavanje i replikaciju DNK i sintezu, obradu i transport RNK. To su tzv. replication foci, transcript foci, speckled domains, coiled bodies, gems, i PML (promyelocytic leukemia protein) nuclear bodies. Na primer, u strukturama zvanim coiled bodies se nalaze mali jedarni nukleoproteini (snRNP) splajsozoma i ostali

faktori koji učestvuju u obradi RNK. Jedarna tela mogu biti dijametra od 0,3-1,5 μm i obično su okrugla. Jasno se razlikuju od hromatina, veća su od RNP granula, a manja od tipičnih nukleolusa. Detektovana su i u normalnim i u poremećenim uslovima rasta, u raznim tipovima ćelija i tkiva, kako biljnih, tako i životinjskih. Jedarna tela se sastoje uglavnom iz proteina i RNK (Brasch and Ochs, 1992).

I.5.1. PML JEDARNA TELA

PML jedarna tela su makromolekulski multiproteinski kompleksi prisutni u svim ćelijskim linijama u kulturi kao i *in vivo*. Ova tela su najpre opisana kao meta autoantigenog odgovora u pacijenata sa primarnom bilijarnom cirozom (primary biliary cirrhosis) i nazvana su multipne jedarne tačke (multiple nuclear dots). Dalja istraživanja su pokazala da se proto-onkoprotein PML humane akutne promijelocitne leukemije (APL) nalazi u ovim strukturama koje su danas poznate pod više imena: PML NBs (PML nuclear bodies), ND10 (nuclear domain 10), Kr bodies (Kramer bodies), PODs (PML oncogenic domains) i PML bodies. Njihov broj u jednom jedru varira od 10 do 30 i obično imaju prečnik između 0,2 i 1 μm , mada njihov oblik i veličina variraju tokom ćelijskog ciklusa. Imunoelektronskom mikroskopijom je utvrđeno da su PML tela oblika krofne sa rupom u sredini i sastoje se od fibroznog prstena koji sadrži protein PML i okružuje centralno jezgro koje ne sadrži PML (Sternsdorf *et al.*, 1997). Pretpostavlja se da su PML tela vezana za jedarni matriks jer su rezistentna na RNazu i DNazu (Ascoli and Maul., 1991).

I.5.1.1. Komponente PML jedarnih tela

Protein PML je glavna komponenta PML jedarnih tela i on je originalno identifikovan kao fuzioni partner receptora za retinoičnu kiselinu ($\text{RAR}\alpha$) prilikom hromozomske translokacije t(15;17) kod pacijenata sa akutnom promielocitnom leukemijom (APL). PML

pripada familiji proteina koji poseduju RBCC ili tripartitni motiv. Ovaj motiv se sastoji od C3HC4 cinkanih prstiju (zinc-finger ili RING finger motiv), jednog ili dva zink vezujuća regiona bogata cisteinom (B-blokovi) i superspiralizovanog (coiled-coil) regiona bogatog leucinom. RBCC domen omogućava homodimerizaciju proteina PML, njegovu interakciju sa drugim proteinima, kao i lokalizaciju u jedarnim telima. Protein PML postoji u više izoformi molekulske mase od 47 do 160 kDa koje se dobijaju alternativnom obradom iRNK i različitim dužinama C-terminalnog regiona (Grimwade and Solomon, 1997). PML ima ulogu supresora nekontrolisanog ćelijskog rasta (Mu *et al.*, 1994; Ahn *et al.*, 1995; Koken *et al.*, 1995; Le *et al.*, 1996) koja se ogleda u kontroli rasta ćelija, preživljavanju ćelija i održavanju genomske stabilnosti. PML može da ima ulogu i koaktivatora i korepresora transkripcije. Ulogu koaktivatora ima u transkripcionom kompleksu RAR α -RXR α , interagujući sa transkripcionim koaktivatorima CBP i/ili TIF1 α ili učešćem u transkripciono aktivnom kompleksu DRIP (Zhong *et al.*, 1999; Doucas *et al.*, 1999). PML može onemogućiti vezivanje transkripcionog faktora Sp1 za promotor gena EGF receptora i tako imati ulogu korepresora transkripcije.

Osim proteina PML, u PML telima se nalaze i drugi proteini koji su medjusobno funkcionalno različiti kao što su: negativni regulator ćelijske deobe ISG20 (Gongora *et al.*, 1997), ubikvitin-specifična proteaza HAUSP (Everett *et al.*, 1997), koaktivator većeg broja transkripcionih faktora CBP (Shikama *et al.*, 1997) i drugi.

SUMO-1 (PIC1) je protein sličan ubikvitinu i on se kovalentno vezuje za protein PML (Boddy *et al.*, 1996; Muller *et al.*, 1998). Ova modifikacija je reverzibilna i zavisna od fosforilacije. Nemodifikovan PML se nalazi u solubilnoj nukleoplazmatičnoj frakciji, dok je modifikovana forma vezana za jedarni matriks (Muller *et al.*, 1998). SUMO-1 je sličan proteinu SMT3 izolovanom iz kvasca *Saccharomyces cerevisiae* (73% homologije na proteinskom nivou) koji ima funkciju supresora mutacija u genu MIF2 čiji produkt obezbeđuje integritet mitotičkog vretena u toku anafaze ćelijskog ciklusa (Boddy *et al.*, 1996).

Osim proteina, u PML telima je lokalizovana i nascentna RNK što ukazuje da ove strukture deluju i kao regulatori transkripcije (LaMorte *et al.*, 1998).

I.5.1.2. Funkcija PML jedarnih tela

Poznato je da je ispravna organizacija komponenata PML jedarnih tela esencijalna za normalnu proliferaciju ćelija, ali njihova funkcija još uvek nije u potpunosti rasvetljena. Istraživanja na mišu kome je PML inaktiviran homolognom rekombinacijom i ćelijskih linija različitog histološkog porekla u kojima je PML overekspimiran pokazala su da PML ima veoma važnu ulogu u nekoliko fizioloških procesa. Miševi sa fenotipom PML^{-/-} su vijabilni, ali su podložni tumorima i infekcijama (Wang *et al.*, 1998a). Ovi rezultati govore u prilog tezi da PML ima ulogu negativnog regulatora rasta, tumorskog supresora i specifičnog regulatora hematopoeze. Prisustvo nascentne RNK i transkripcionog kofaktora CBP u jezgru PML jedarnih tela ukazuje na njihovu ulogu u regulaciji transkripcije (LaMorte *et al.*, 1998), i zaista je nadjeno da PML može sprečiti aktivaciju transkripcije regulisanu glukokortikoidnim receptorima preko pRB (Alcalay *et al.*, 1998). PML tela su blisko povezana sa replikacionim domenima u S fazi ćelijskog ciklusa (Grande *et al.*, 1996). Mesta virusne transkripcije i replikacije su lokalizovana uz PML tela što govori da su neke komponente PML tela neophodne za taj proces (Ishov *et al.*, 1997). PML učestvuje i u apoptozi. Miševi i ćelije sa fenotipom PML^{-/-} ne podležu apoptotičnim procesima izazvanim signalima kao što su Fas, TNF, keramid, interferoni i jonizujuće zračenje (Wang *et al.*, 1998b), dok je u ćelijama sa overekspimiranim proteinom PML apoptoza povećana (Borden *et al.*, 1997, Quignon *et al.*, 1998, Fagioli *et al.*, 1998).

Tačan molekularni mehanizam kojim PML i PML tela obavljaju navedene funkcije je za sada nepoznat. Jedna od pretpostavki je da se PML tela ponašaju kao jedarne rupe (nuclear dumps) ili domeni za skladištenje proteina (storage PODs) gde različiti proteini mogu biti

deponovani ili čuvani, a kada je potrebno raspoređeni na mesta svoga delovanja. Alternativna teorija je da PML tela smeštaju svoje komponente na mesta njihove aktivnosti koja su ili unutar samih tela ili neposredno uz njih.

Zhong i autori (Zhong *et al.*, 2000) su predložili tri različite funkcije PML tela u kontroli transkripcije koje se međusobno ne isključuju, a to su:

Titracija. Transkripcija se odigrava izvan PML tela koja u ovom slučaju služe kao skladišta koja regulišu koncentraciju aktivnih transkripcionih faktora i kofaktora u solubilnoj jedarnoj frakciji tj. na mestima gde se odigrava transkripcija.

Modifikacija. Transkripcija se odigrava izvan jedarnih tela koja u ovom slučaju kontrolišu regulatorne puteve koji su važni za transkripciju i to putem modifikacije (sumolacija, acetilacija) transkripcionih faktora ili kofaktora.

Kompartimentalizacija. U ovom slučaju PML tela mogu predstavljati okvir u kome se organizuju kompleksi transkripcionih kofaktora a koji će biti naknadno upotrebljeni od strane transkripcionih faktora.

(Hodges *et al.*, 1998, Zhong *et al.*, 2000)

I.6. TRANSKRIPCIONI FAKTOR NFkB I NJEGOVA ULOGA U DIFERENCIJACIJI MIŠIĆNIH ĆELIJA

Jedarni faktor NFkB (nuclear factor kB) je evolutivno konzervisani transkripcioni faktor koji kontroliše ekspresiju velikog broja gena koji učestvuju u različitim biološkim procesima. Ovaj DNK vezivni protein reguliše ekspresiju ćelijskih gena, posebno onih koji učestvuju u imunom odgovoru i inflamatornim procesima. NFkB takodje učestvuje i u procesima proliferacije i programirane ćelijske smrti. Za stimulaciju i aktivaciju transkripcionog faktora NFkB nije potrebna sinteza proteina, te je aktivacija ciljnih gena brza i efikasna. U nestimulisanim ćelijama, NFkB je prisutan u citoplazmi kao neaktivan kompleks

sa inhibitornim proteinima iz familije I κ B. Izlaganje ćelija nekom stimulansu izaziva degradaciju faktora I κ B, a oslobodjeni NF κ B se translocira u jedro i aktivira transkripciju ciljnih gena koji u svom promotoru sadrže mesto za vezivanje ovog transkripcionog faktora (kB).

Trankripcioni faktor NF κ B ima formu dimera sačinjenog od proteina koji pripadaju multigenskoj familiji Rel/NF κ B koju čine: p50 (NF κ B1), p65 (RelA), NF κ B2 (p52) i RelB. Svi proteini familije poseduju aminoterminalni domen RHD (Rel homology domain) od oko 300 aminokiselina u kome se nalaze motivi za vezivanje za DNK (za kB mesta) i dimerizaciju, kao i signal za lokalizaciju u jedru (NLS, nuclear localization signal). Većina članova familije može da formira homo- i heterodimere *in vitro* osim RelB koji može da formira dimere samo sa p50 ili p52. Subjedinice p50 i p52 se sintetišu kao citoplazmatični prekursori p105 i p100 koji se ponašaju kao I κ B inhibitori i sprečavaju svoje vezivanje za DNK. I NF κ B1 takodje stvara jednog od članova I κ B familije, I κ B γ , sa internog intronskog promotora. Za razliku od p50 i p52, drugi članovi Rel/NF κ B familije (p65, c-Rel, RelB, Dorsal, Dif) se ne stvaraju od prekursora i poseduju trans-aktivacioni domen na C-terminusu. Na taj način Rel/NF κ B dimeri mogu da se ponašaju kao transkripcioni aktivatori ili represori u zavisnosti od toga da li neka od subjedinica dimera poseduje ili ne trans-aktivacioni domen.

Veliki broj različitih agenasa indukuje aktivnost transkripcionog faktora NF κ B u različitim tipovima ćelija. To su: citokini (TNF α , IL-1 i IL-2), bakterijski lipopolisaharidi, virusna infekcija (HIV-1, HTLV-1 i hepatiti B virus), virusni proteini (tax, X i E1A), stimulacija antigenih receptora T i B ćelija, kalcijumske jonofore, inhibitori sinteze proteina, UV i X zračenje, itd.

Mesta za vezivanje transkripcionog faktora NF κ B (kB) su prisutna u regulatornim regionima gena koji učestvuju u imunom odgovoru (I κ g, IL-2 i IL-2Ra), inflamatornim procesima (IL-1, IL-6, TNF α , TNF β i serum amiloid A protein), virusnih genoma (HIV-LTR,

SV40, CMV i adenovirus), gena koji kodiraju članove Rel/NF κ B familije (c-Rel, NF κ B1, NF κ B2 i RelB), I κ B familije (I κ B α , I κ B γ , p105, p100 i Bcl-3), proteine koji učestvuju u kontroli rasta (p53, c-Myc, Ras), kao i u velikom broju drugih gena. I gen za Ankrd2 sadrži vezivno mesto za NF κ B.

Aktivacija i regulacija faktora NF κ B je strogo kontrolisana proteinima koji se nazivaju I κ B. Oni, nekovalentnim interakcijama, maskiraju signal za lokalizaciju u jedru faktora NF κ B i na taj način sprečavaju translokaciju NF κ B u jedro. Nakon stimulacije signalnim molekulima, kao što su nekrotični faktor tumora α (TNF α) ili lipopolisaharidi (LPS), dolazi do fosforilacije, poliubikvitinacije i degradacije I κ B u proteazomima, a NF κ B se oslobadja iz kompleksa sa I κ B i odlazi u jedro gde reguliše transkripciju ciljnih gena. I κ B α , koji se brzo resintetiše nakon degradacije, migrira u jedro i izaziva disocijaciju NF κ B sa DNK. U sisara postoji više I κ B proteina (I κ B α , I κ B β , I κ B γ , I κ B ϵ , Bcl-3, p100, p105, I κ BR) i svi poseduju N- i C-terminalne domene varijabilne dužine, kao i konzervisani centralni proteinski motiv, ankirinske ponovke, koji su neophodni za asocijaciju sa proteinima familije Rel/NF κ B. U ovim proteinima je prisutan i region sa kiselim aminokiselinama na COOH terminusu koji je odgovoran za inhibiciju DNK vezujuće aktivnosti, kao i PEST sekvenca, takodje na COOH terminusu proteina, koja je važna u regulaciji poluživota ovih proteina (Verma *et al.*, 1995).

Učešće transkripcionog faktora NF κ B u diferencijaciji mišićnih ćelija je proučavano na različitim model sistemima, a dobijeni rezultati su u neku ruku kontradiktorni. Rezultati jedne grupe autora pokazuju da on deluje na taj način što inhibira diferencijaciju mišićnih ćelija. U toku diferencijacije miocita dolazi do značajnog smanjenja DNK vezivne (Lehtinen *et al.*, 1996) i transkripcione (Langen *et al.*, 2001) aktivnosti transkripcionog faktora NF κ B, dok u isto vreme dolazi do povećane ekspresije proteina specifičnih za mišićne ćelije i fuzije mioblasta u miotube. Smanjena aktivnost faktora NF κ B praćena je povećanjem nivoa inhibitornog faktora I κ B β , dok količina faktora I κ B α ostaje nepromenjena u toku

diferencijacije miocita.

Kaliman i koautori (Kaliman *et al.*, 1996) su pokazali da signalna kaskada, inicirana faktorom rasta IGF-II (insulin-like growth factor-II) koja vodi do morfoloških i biohemijskih promena koje karakterišu diferencijaciju mišićnih ćelija, uključuje sledeće događaje: aktivaciju PI 3 kinaze, degradaciju I κ B α i disocijaciju iz kompleksa sa p65 NF κ B, aktivaciju NF κ B i ekspresiju i aktivaciju inducibilne NO sintetaze (iNOS). Iz njihovih rezultata proizlazi da je NF κ B neophodan za diferencijaciju mišićnih ćelija i neslaganje svojih rezultata sa rezultatima drugih autora objašnjavaju na sledeći način: u ćelijama koje su gajene u medijumu bez seruma dolazi do smanjenja količine transkripcionog faktora NF κ B u odnosu na količinu prisutnu u nediferenciranim ćelijama, ali je to dovoljno i neophodno za njihovu diferencijaciju. U prilog ovoj tezi govori i podatak da je za fuziju mioblasta embriona pileta u medijumu sa niskim sadržajem seruma neophodna aktivnost transkripcionog faktora NF κ B (Lee *et al.*, 1997).

II. CILJ RADA

U Laboratoriji za molekularnu biologiju mišića Internacionalnog centra za genetičko inženjerstvo i biotehnologiju u Trstu, Italija, proučavaju se novootkriveni proteini koji se specifično eksprimiraju u mišićnoj ćeliji. U ovoj laboratoriji su identifikovana i okarakterisana tri proteina Z trake sarkomere: teletonin (Valle *et al.*, 1997), ZASP (Faulkner *et al.*, 1999) i FATZ (Faulkner *et al.*, 2000). Cilj ovog rada je karakterisanje četvrtog proteina, nazvanog Ankrd2, koji je sa pomenutim proteinima bio predmet višegodišnjeg istraživanja ove laboratorije. U te svrhe potrebno je najpre napraviti specifična antitela na protein Ankrd2, a, zatim, korišćenjem različitih molekularno-bioloških tehnika i metoda utvrditi ekspresiju ovog proteina u humanim tkivima, njegovu lokalizaciju u mišićnim ćelijama u kulturi kao i profil njegove ekspresije tokom diferencijacije mišićnih ćelija. Takodje je potrebno utvrditi da li protein Ankrd2 interaguje sa drugim proteinima mišićne ćelije i ako interaguje identifikovati te proteine. Krajnji cilj je utvrditi funkciju ovog proteina, to jest odgovoriti na pitanje koja je njegova specifična uloga u mišićnoj ćeliji.

III. MATERIJAL I METODE

III.1. BIOLOŠKI MATERIJAL

III.1.1. Bakterijski sojevi

U ovom radu korišćeni su sledeći sojevi *E. coli*:

-za propagaciju različitih konstrukata i izolovanje plazmidne DNK (mini i mega prep izolovanja) korišćen je soj DH5 α (*supE44*, Δ *lacU169*, (ϕ 80 *lacZ* Δ M15), *hsdR17*, *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *relA1*).

-za ekspresiju rekombinantnih proteina fuzionisanih sa His markerom korišćen je soj M15 [pREP4] (Nal^s, Str^s, Rif^s, Lac⁻, Ara⁻, Gal⁻, Mtl⁻, F⁻, RecA⁺, Uvr⁺), derivat soja K-12, koji sadrži plazmid pREP4 sa genom za represor LacI koji sprečava ekspresiju rekombinantnog proteina pre indukcije IPTG-om.

-rekombinantni proteini fuzionisani sa GST (glutation-S-transferaza) su eksprimirani u soju M15 [pREP4] ili BL21(DE3) pLysS (F⁻, *ompT*, *hsdS_B* (*r_Bm_B*), *dcm*, *gal*, (DE3), pLysS, Cm^r).

III.1.2. Čelije u kulturi

U ovom radu korišćena su dva tipa ćelija u kulturi, humane primarne mišićne ćelije CHQ5B i mišje mišićne ćelije C2C12.

III.2. MEDIJUMI ZA GAJENJE BAKTERIJA

Za rast bakterija *E. coli* korišćeni su:

-LB medijum koji sadrži: 10 g baktotriptonu, 5 g kvašćevog ekstrakta i 5 g NaCl na 1 L medijuma. Za dobijanje čvrste podloge u 1 L medijuma je dodavano 17 g agara

-TB medijum koji sadrži: 12 g baktotriptonu, 24 g kvašćevog ekstrakta i 4 mL glicerola na 1 L medijuma. Pred upotrebu se dodaju KH_2PO_4 do finalne koncentracije 17 mM i K_2HPO_4 do finalne koncentracije 72 mM.

-SOB medijum koji sadrži: 20 g baktotriptonu, 5 g kvašćevog ekstrakta i 0,5 g NaCl na 1 L.

Za propagaciju plazmida u *E. coli* su korišćene sledeće koncentracije antibiotika: ampicilin 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, hloramfenikol 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ i kanamicin 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

III.3. KLONIRANJE cDNK FRAGMENTATA Ankrd2 U EKSPRESIONE VEKTORE

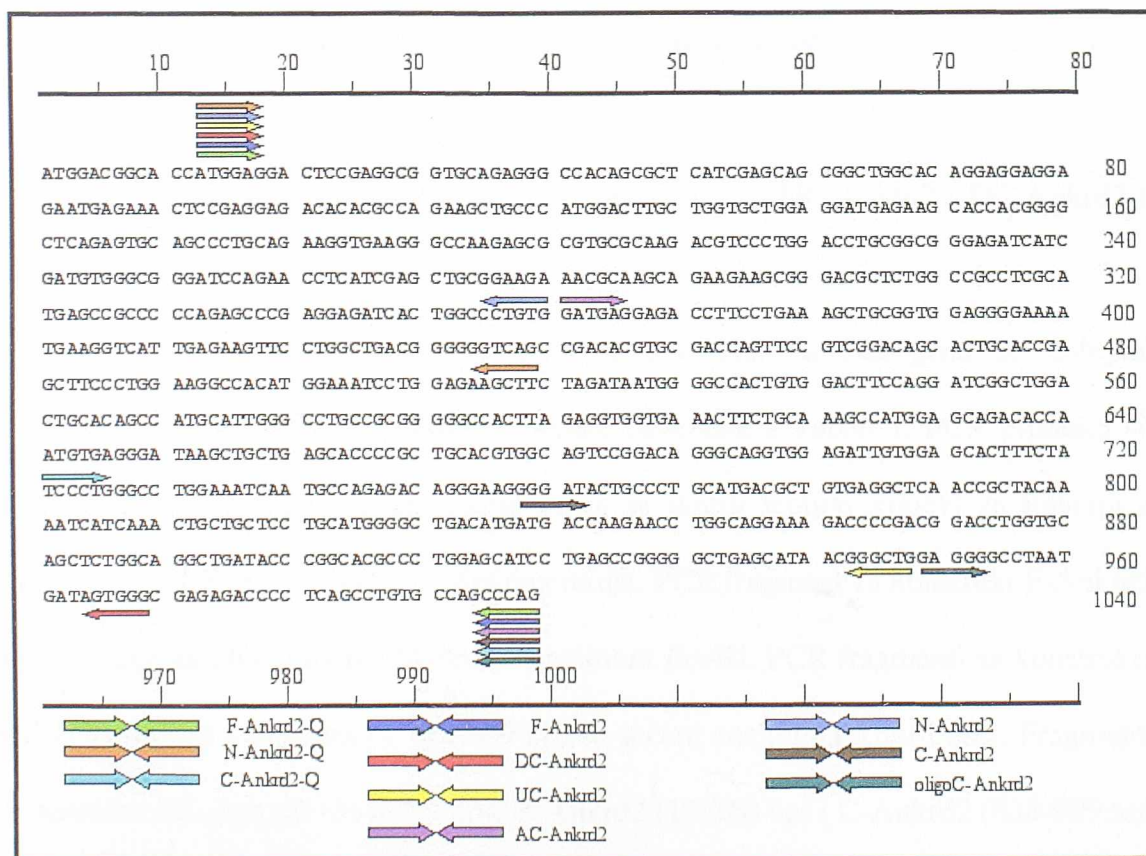
Za produkciju mišjih poliklonalnih antitela na protein Ankrd2, za mapiranje epitopa antitela na protein Ankrd2, kao i u studijama posvećenim proučavanju proteinsko-proteinskih interakcija korišćeni su rekombinantni proteini ekspimirani u bakterijama. Rekombinantni proteini su sintetisani sa odgovarajućih ekspresionih vektora u koje su bili uklonirani različiti fragmenti cDNK Ankrd2 gena. Fragmenti za kloniranje su dobijani reakcijom lančane polimerizacije (PCR) ili renaturacijom dva oligonukleotida. U ovom radu korišćena su dva ekspresiona vektora: pQE30 (QIAGEN) i pGEX-6P-3 (Amersham Pharmacia Biotech). Vektor i odgovarajući insert su ligirani T4 ligazom preko lepljivih krajeva dobijenih sečenjem DNK restrikcionim enzimima. Produktima ligacione reakcije transformisane su kompetentne ćelije *E. coli*, a od dobijenih transformanata odabiran je jedan koji je produkovao željeni protein i koji je korišćen u svim daljim eksperimentima.

U vektor pQE30 klonirana su tri fragmenta cDNK Ankrd2 gena: deo gena koji kodira N-terminalni deo proteina Ankrd2 (13-519 bp), deo gena koji kodira C-terminalni deo proteina Ankrd2 (721-999 bp) i fragment koji obuhvata skoro celokupnu cDNK sekvencu (13-999 bp). Dobijeni rekombinantni proteini korišćeni su kao antigeni za proizvodnju poliklonalnih antitela na protein Ankrd2.

U vektor pGEX-6P-3 su klonirani sledeći fragmenti cDNK Ankrd2 gena: deo gena koji kodira N terminalni deo proteina Ankrd2 (13-360 bp), deo gena koji kodira C terminalni deo proteina Ankrd2 (838-999 bp) i fragment koji obuhvata skoro celokupnu cDNK sekvencu (13-999 bp). Rekombinantni proteini ekspimirani sa dobijenih konstrukata korišćeni su u eksperimentima proučavanja proteinsko-proteinskih interakcija.

Za mapiranje epitopa antitela na protein Ankrd2 napravljena su četiri dodatna konstrukta u vektoru pGEX-6P-3: UC-Ankrd2 (13-948 bp), DC-Ankrd2 (13-969 bp), AC-Ankrd2 (361-999 bp) i oligoC-Ankrd2 (949-999 bp).

Na Slici 6 su šematski prikazani svi fragmenti cDNK Ankrd2 uklonirani u ekspresione vektore pQE30 i pGEX-6P-3.



Slika 6. cDNK sekvenca gena Ankrd2.

Strelicama iste boje označeni su početak i kraj određenog fragmenta cDNK Ankrd2 kloniranog u ekspresioni vektor.

III.3.1. Kloniranje F-Ankrd2 i N-Ankrd2 u vektor pQE30

Prva antitela na protein Ankrd2 dobijena su imunizacijom miševa koristeći rekombinantni protein ekspimiran u *E. coli* sa konstrukta C-Ankrd2-Q koji je obuhvatao deo ankirinskih ponovaka i C-terminalni region proteina Ankrd2 (241-333 ak). Zbog modularne strukture proteina Ankrd2 (ankirinski ponovci u središnjem delu proteina i sekvencno specifični N- i C-terminalni regioni) napravljena su i antitela na ceo i na N-terminalni deo proteina. Konstrukt F-Ankrd2-Q dobijen je kloniranjem PCR fragmenta koji obuhvata skoro celokupni okvir čitanja, od 13-999 bp, u *KpnI* i *Sall* restrikciona mesta ekspresionog vektora pQE30. Konstrukt N-Ankrd2 je napravljen tako što je u *KpnI* i *HindIII* restrikciona mesta vektora pQE30 ukloniran insert dobijen digestijom PCR fragmenta FL-Ankrd2 restrikcionim enzimima *KpnI* i *HindIII* (*KpnI* mesto se nalazi u 5' graničniku PCR fragmenta, a *HindIII* mesto se nalazi u internoj sekvenci cDNK Ankrd2 na poziciji 514-519 bp).

III.3.2. Kloniranje F-Ankrd2, N-Ankrd2, C-Ankrd2, AC-Ankrd2, UC-Ankrd2 i DC-Ankrd2 u vektor pGEX-6P-3

Fragmenti koji su obuhvatali različite regione cDNK Ankrd2 gena su dobijeni reakcijom lančane polimerizacije koristeći graničnike navedene u Tabeli 1. PCR produkti su sečeni odgovarajućim restrikcionim enzimima da bi se dobili lepljivi krajevi za ligaciju u ekspresioni vektor pGEX-6P-3 obradjen istim enzimima. PCR fragment za konstrukt F-Ankrd2 (13-999 bp) je sečen na oba kraja restrikcionim enzimom *EcoRI*. PCR fragmenti za konstrukte UC-Ankrd2 (13-948 bp) i DC-Ankrd2 (13-969 bp) su sečeni enzimima *KpnI* i *Sall*. Fragmenti DNK za konstrukte AC-Ankrd2 (361-999 bp), N-Ankrd2 (13-360 bp) i C-Ankrd2 (838-999 bp) su sečeni enzimima *EcoRI* i *Sall*.

III.3.3. Kloniranje oligoC-Ankrd2 u vektor pGEX-6P-3

U cilju preciznog mapiranja epitopa monoklonskog antitela napravljen je konstrukt u vektoru pGEX-6P-3 koji obuhvata poslednji 51 bazni par cDNK Ankrd2 gena. Inert za ligaciju u vektor dobijen je renaturacijom oligonukleotida: oligoC-FOR (aattccgaggggccaatgatagtgggcgagagaccctcagcctgtgccagcccagtgg) i oligoC-REV (tcgactcac tgggctggcacaggctgaggggtctctgcccactatcattagccccctcgg). Kao rezultat renaturacije dobijen je dvolančani fragment sa lepljivim krajevima koji su omogućili njegovo kloniranje u vektor sečen restrikcionim enzimima *EcoRI* (na 5' kraju) i *Sall* (na 3' kraju). Vektor pGEX-6P-3 je pripremljen za ligaciju digestijom restrikcionim enzimima *EcoRI* i *Sall*, a zatim su vektor i insert ligirani 2 h na sobnoj temperaturi. Ligacionom smešom su transformisane kompetentne ćelije *E. coli* soja M15 [pREP4].

III.3.4. Ekspresioni vektori

U ovom radu korišćena su dva ekspresiona vektora: pQE30 (QIAGEN) i pGEX-6P-3 (Amersham Pharmacia Biotech).

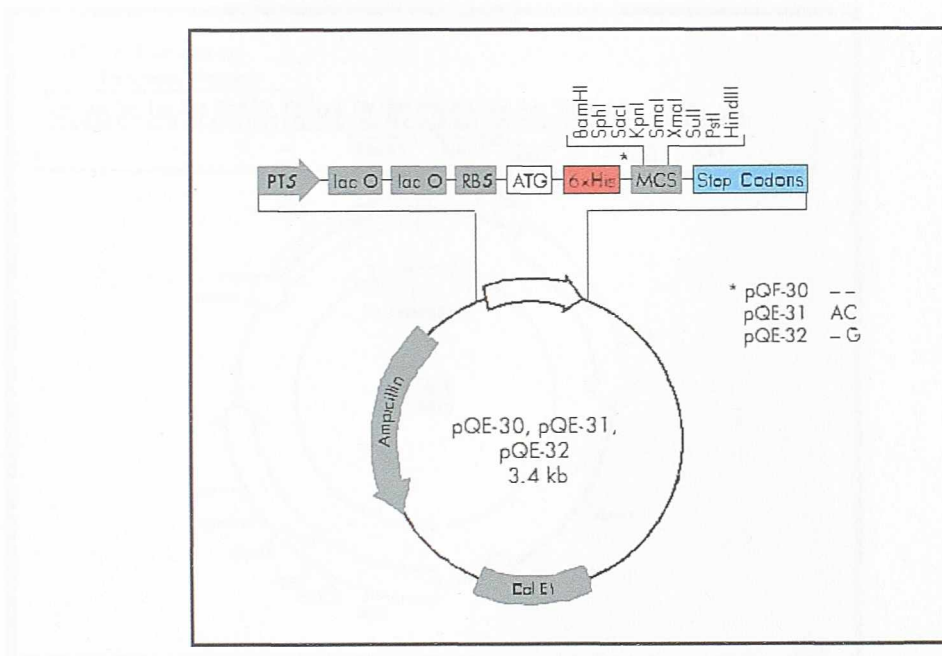
Ekspresioni vektor pQE30, čiji je šematski prikaz dat na Slici 7, korišćen je za dobijanje rekombinantnih proteina koji su služili kao antigeni za produkciju antitela. Ovaj vektor ima sledeće karakteristike:

- fagni T5 promotor i dve lac operator sekvence koje omogućavaju efikasnu represiju jakog T5 promotora,

- kodirajuću sekvencu za šest histidina na 5' kraju regiona za kloniranje koji predstavljaju His marker sa slabim imunogenim karakteristikama,

- polilinker sa velikim brojem mesta za često korišćene restrikcione enzime i translacione stop kodone u sva tri okvira čitanja za što lakše pripremanje ekspresionih konstrukata,

- dva jaka transkripciona terminatora: t_0 iz lambda faga i T1 iz *rrnB* operona *E. coli* koji omogućavaju tačnu i stabilnu ekspresiju konstrukta,
- gen za rezistenciju na ampicilin,
- ColE1 oridžin replikacije.

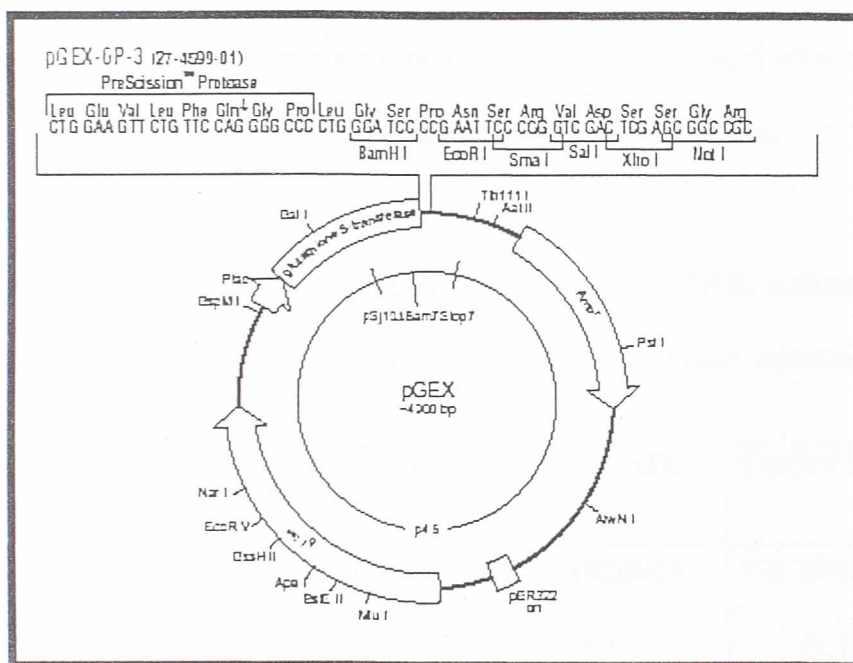


Slika 7. Šematski prikaz ekspresionih vektora pQE30, pQE31 i pQE32 (QIAGEN).

U studijama posvećenim proučavanju proteinsko-proteinskih interakcija korišćeni su rekombinantni proteini fuzionisani sa GST (glutation-S transferaza), proteinom od 26 kDa izolovanim iz parazita *Schistosoma japonicum*. Kao ekspresioni vektor korišćen je plazmid pGEX-6P-3 (Amersham Pharmacia Biotech), čija je šema data na Slici 8, sa sledećim karakteristikama:

- tac* promotor koji obezbeđuje inducibilnu ekspresiju rekombinantnog proteina,
- gen za LacI represor,
- sekvencu za niz aminokiselina koje prepoznaju trombin ili Xa proteaza čime se omogućava oslobađanje eksprimiranog proteina od GST markera,

- polilinker sa šest restrikcionihi mesta (*Bam*HI, *Eco*RI, *Sma*I, *Sal*I, *Xho*I i *Not*I),
- translacioni stop kodoni u sva tri okvira čitanja,
- gen za rezistenciju na ampicilin,
- pBR322 oridžin replikacije.



Slika 8. Šematski prikaz ekspresionog vektora pGEX-6P-3 (Amersham Pharmacia Biotech).

III.4. REAKCIJA LANČANOG UMNOŽAVANJA SEGMENTA DNK (PCR)

Različiti fragmenti cDNK Ankrd2 gena korišćeni za kloniranje u ekspresione vektore umnožavani su reakcijom lančane polimerizacije. Graničnici (naručivani od firme Sigma-Genosys Ltd) su na 5' krajevima sadržavali mesta za digestiju odgovarajućim restrikcionim enzimima koji su obezbeđivali da fragmenti budu klonirani u fazi sa šest histidina iz vektora pQE30 ili sa proteinom GST iz vektora pGEX-6P-3. U Tabeli 1 dat je pregled korišćenih graničnika. Reakcione smeše, zapremine 100 μ L, sadržavale su: 1xPCR pufer (10 mM KCl, 10 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 20 mM Tris-HCl, pH 8,8, 2 mM MgSO_4 , 0,1 % Triton X-100), Vent

polimerazu (2 U, BioLabs), graničnike (1 μ M), dNTP (250 μ M) i DNK kao matricu (10 ng). Uslovi reakcije su bili: početna denaturacija 5 min na 94°C; 30 ciklusa denaturacije (30 sec na 94°C), renaturacije (30 sec na 59°C) i sinteze (1 min na 72°C); završna sinteza 7 min na 72°C. Vent polimeraza je dodavana u reakcionu smešu nakon početne denaturacije. Za amplifikaciju DNK korišćen je Perkin Elmer-ov aparat Gene Amp PCR System 2400. Produkti reakcije lančanog umnožavanja su proveravani elektroforezom na agaroznim gelovima, a fragmenti odgovarajuće veličine iz agaroznog gela su prečišćavani elucijom.

Tabela 1. Pregled graničnika korišćenih za umnožavanje cDNK Ankrd2.

Podvučene sekvence predstavljaju mesta za sečenje DNK restrikcionim enzimima: *ggtacc-KpnI*, *gtcgac-SalI*, *gaattc-EcoRI*.

KONSTRUKT	5'(FORWARD) GRANIČNIK	3'(REVERSE) GRANIČNIK
FL-Ankrd2/pQE30	ac <u>ggtacc</u> atggaggactccgagggcg	acgc <u>gtcgact</u> cactgggctggcacag
FL-Ankrd2/pGEX-6P-3	c <u>ggaattc</u> atggaggactccgagggcg	gc <u>gaattc</u> tactgggctggcacaggc
DC-Ankrd2/pGEX-6P-3	ttag <u>gtacc</u> atggaggactccgagggcg	ttcc <u>gtcgact</u> taccactatcatta
UC-Ankrd2/pGEX-6P-3	ttag <u>gtacc</u> atggaggactccgagggcg	ttcc <u>gtcgact</u> tacagcccgttatgc
AC-Ankrd2/pGEX-6P-3	c <u>ggaattc</u> tatggatgaggagacc	ctt <u>gtcgact</u> cactgggctggcac
C-Ankrd2/pGEX-6P-3	cc <u>gaattc</u> atgaccaagaacctg	ctt <u>gtcgact</u> cactgggctggcac
N-Ankrd2/pGEX-6P-3	cc <u>gaattc</u> atggaggactccgagg	ggt <u>gtcgact</u> tacacagggccagt

III.5. PRIPREMANJE DVOLANČANIH OLIGONUKLEOTIDA

Dvolančani oligonukleotidi su dobijani renaturacijom ekvimolarne količine komplementarnih jednolančanih oligonukleotida u puferu koji sadrži 10 mM Tris-HCl, pH 7,5,

50 mM NaCl, 1 mM EDTA. Reakciona smeša je inkubirana 5 minuta na 95°C, a zatim je ostavljena da se postepeno ohladi do sobne temperature. Uspešnost renaturacije oligonukleotida je proveravana elektroforezom na 20 % akrilamidnom gelu u 1x TBE puferu.

III.6. EKSTRAKCIJA DNK IZ AGAROZNOG GELA

Fragmenti DNK dobijeni digestijom restrikcionim enzimima ili reakcijom lančane polimerizacije razdvajani su na agaroznim gelovima u 1xTAE ili 1xTBE puferu. Za precizno određivanje veličine fragmenata korišćen je marker molekulskih masa (1 kB Ladder, Promega). Fragmenti DNK odgovarajuće veličine su isecane iz agaroznog gela i DNK je eluirana upotrebom QIAEXII kita (QIAGEN) prema uputstvu proizvođača.

III.7. ELEKTROFOREZA DNK

Fragmenti DNK su razdvajani elektroforezom na 0,8-2 % agaroznim gelovima u 1xTBE ili 1xTAE puferu pri konstantnoj voltaži 5-10 V/cm. Vizuelizacija fragmenata DNK u gelu vršena je dodavanjem etidijum bromida (200 ng/mL) u gel i izlaganjem gela UV svetlosti. Uzorci nanošeni na gel su pripremani dodavanjem pufera za uzorak (1xTBE pufer, 5 % glicerol, boja Orange G).

III.8. DIGESTIJA DNK RESTRIKCIJOM ENZIMIMA

Fragmenti DNK dobijeni reakcijom lančane polimerizacije i odgovarajući vektori su pre ligacije sečeni restrikcionim enzimima prema uputstvu proizvođača. Najčešće su korišćeni restrikcioni enzimi od proizvođača BioLabs. Reakcije su radjene u odgovarajućim NEB puferima, a restrikcione digestije su se odvijale na 37°C od 2 sata pa do preko noći (na primer digestija enzimom *Sall*). Uspešnost kloniranja i prisustvo odgovarajućih fragmenata u konstruktima takodje je proveravano digestijama odgovarajućim restrikcionim enzimima.

Sprečavanje samoligacije vektora vršeno je uklanjanjem 5' fosfatnih grupa sa krajeva DNK fragmenata vektora. Nakon završetka digestije vektora u digestionu smešu je dodavano 10 U alkalne fosfataze, CIP (Calf Intestinal Alkaline Phosphatase) i uzorak je dodatno inkubiran 30 min na 37°C. Defosforilacija BioLabs-ovom alkalnom fosfatazom se može vršiti u bilo kojem NEB puferu.

Pre ligacije digestione smeše su deproteinisane fenolom tako što je u digestionu smešu dodavana ista zapremina fenola, uzorci su vorteksovani i faze su razdvajane centrifugiranjem uzorka 10 min na 14000 obrt/min u stonj Eppendorf centrifugi na sobnoj temperaturi. Gornje faze su prebacivane u čiste ependorf epruvete i uzorci su dodatno oslobođani od soli propuštanjem uzoraka kroz kolonicu od Sephacryl SH-400. Ovako pripremljeni uzorci podvrgavani su reakciji ligacije.

III.9. LIGACIJA FRAGMENTA DNK

Ligaciona smeša je sadržavala pripremljene vektor i insert u odnosu 1:3, 1X ligacioni pufer (BioLabs), (50 mM Tris-HCl, pH 7,8, 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 1 mM ATP, 25 µg/mL BSA) i 4 U T4 DNK ligaze (BioLabs). Ligacija je vršena 2 sata na sobnoj temperaturi a zatim su ligacionom smešom transformisane kompetentne ćelije *E. coli*.

III.10. TRANSFORMACIJA BAKTERIJSKIH ĆELIJA

Kompetentne ćelije *E. coli* transformisane su toplotnim šokom. Mešavina kompetentnih ćelija (100 µL) i ligacione smeše ili plazmidne DNK inkubirana je 1 h na ledu. Zatim su ćelije izlagane toplotnom šoku 2 min na 42°C i odmah zatim prebacivane na led i inkubirane 5 min. Nakon toga u transformacionu smešu je dodavano 400 µL LB medijuma i ćelije su inkubirane 30-60 min na 37°C uz intenzivno mućkanje. Transformaciona smeša je utrljavana na LB-agar

čvrstu podlogu sa odgovarajućim antibiotikom i šolje su inkubirane preko noći u termostatu na 37°C.

III.11. PRIPREMANJE KOMPETENTNIH ĆELIJA

Kompetentne ćelije *E. coli* su pripremane po modifikovanoj metodi D. Hanah-a (Hanah, 1985). Sa sveže striklovane petri šolje sterilnom ezom je uzimano desetak bakterijskih kolonija i ćelije su resuspendovane u 1 mL SOB medijuma, a zatim su prebacivane u erlenmajer od 1 L, u 100 mL SOB medijuma i gajene na 37°C uz intenzivno mućkanje do optičke gustine 0,5 (merena je apsorbancija ćelijske kulture na 600 nm). Ćelije su hladjene 15 min na ledu i taložene centrifugiranjem 5 min na 4000 obrt/min (centrifuga 5804R, Eppendorf), na 4°C. Talog ćelija je resuspendovan u 100 mL hladnog 50 mM CaCl₂. Posle 15 min inkubacije na ledu ćelije su ponovo taložene centrifugiranjem pod istim uslovima kao u prethodnom koraku. Talog je resuspendovan u 4 mL hladnog TFB2 pufera (10 mM MOPS, 10 mM RbCl, 75 mM CaCl₂, 15 % glicerol, pH 6,8) i ćelije su ostavljene preko noći u ledu. Alikvoti kompetentnih ćelija su distribuirani u ohladjene eppendorf epruvete i čuvani zamrznuti na -80°C do transformacije.

III.12. ANALIZA TRANSFORMANATA

Ispravnost konstrukata proveravana je na nivou ekspresije proteina i sekvenciranjem DNK. Nakon inkubacije na selektivnim podlogama, po nekoliko kolonija transformanata sa petri šolje je zasejavano u po 2 mL TB medijuma sa odgovarajućim antibiotikom i kulture su gajene preko noći na 37°C uz intenzivno mućkanje. Sledećeg dana, 0,5 mL prekonoćne kulture je dodavano u 1,5 mL svežeg TB medijuma sa antibioticima i kultura je inkubirana 30 min na 37°C, a zatim je indukovana ekspresija proteina dodavanjem IPTG-a (do finalne koncentracije 1 mM). Kultura je inkubirana dodatna 3 h na 37°C, a zatim su bakterije taložene

centrifugiranjem 5 min na 3000 obrt/min. Talog bakterija je resuspendovan u 100 μ L pufera za uzorak (50 mM Tris-HCl, pH 6,8, 4 % SDS, 20 % glicerol, 5 % β -merkaptoetanol, boja bromfenolplavo), i 10 μ L denaturisanog uzorka je analizirano na 12 % ili 15 % SDS poliakrilamidnom gelu. Nakon elektroforeze gel je bojen u puferu bojom komasi plavo (0,4 % comassie blue, 10 % sirćetna kiselina, 40 % metanol) i odbojavan rastvorom koji je sadržavao 7 % sirćetne kiseline i 25 % metanola.

Iz uzoraka kod kojih je detektovan protein odgovarajuće veličine, radjeno je mini prečišćavanje eksprimiranog proteina radi utvrđivanja optimalnih uslova za prečišćavanje i eluciju, a ujedno je proveravano i da li eksprimirani protein sadrži marker (His ili GST) koji mu obezbedjuje specifično vezivanje za odgovarajući matriks (Ni-NTA agarozu u slučaju His markera ili glutation sefaroze u slučaju GST markera).

Ispravnost konstrukata na nivou nukleotidne sekvence proveravana je automatskim sekvenciranjem u Servisu za sekvenciranje DNK CRIBI instituta Univerziteta u Padovi, Italija (<http://bmr.cribi.unipd.it>). DNK za sekvenciranje je izolovana kitom za mini prep izolovanje DNK (Clontech) po uputstvu proizvođača i 400-600 ng DNK zajedno sa 6,4 pmol-a graničnika za sekvenciranje je uparavano do suva u ependorf epruveti od 0,2 mL. Rezultat sekvenciranja je preuziman direktno sa web strane Servisa za sekvenciranje.

III.13. IZOLOVANJE DNK

Za automatsko sekvenciranje DNK je izolovana kitom za izolovanje plazmidne DNK (Clontech) po uputstvu proizvođača.

Velike količine plazmidne DNK (nekoliko mg) su izolovane Mega prep kitom (Qiagen) po uputstvu proizvođača.

Male količine plazmidne DNK (nekoliko μ g) su izolovane korišćenjem različitih kitova za izolovanje plazmidne DNK (Bio Rad, Talent, Qiagen, Rosche itd.) po uputstvu proizvođača

ili metodom J.D. Brown-a (Brown, 1997). Bistar bakterijski lizat je dobijan uobičajenom alkalnom lizom, a plazmidna DNK je specifično vezivana za siliku, sa koje je eluirana vodom. Dobijena DNK je visoke čistoće i može se koristiti za sekvenciranje ili druge enzimske manipulacije.

Talog iz 1,5-3 mL prekonoćne bakterijske kulture je resuspendovan u 200 μ L rastvora za resuspendovanje (50 mM Tris-HCl, pH 8, 10 mM EDTA). Zatim je dodavano 200 μ L rastvora za lizu (200 mM NaOH, 1 % SDS) i ependorf epruveta je invertovana sve dok suspenzija nije postala bistra. Dodato je 200 μ L neutralizacionog rastvora (3 M KOAc, pH 5,5) i ependorf epruveta je invertovana još nekoliko puta. Uzorak je centrifugiran 10 min na 14000 obrt/min u stonjoj ependorf centrifugi. U supernatant je dodavano 200 μ L suspenzije silike i uzorak je mućkan.

Suspenzija silike se priprema na sledeći način: na 2 g silike doda se 15 mL destilovane vode i promućka. Kada se silika istaloži (posle oko 45 min) ukloni se mlečni supernatant koji sadrži veoma sitne čestice silike. Ova procedura se ponovi još dva puta. Preostala silika se resuspenduje u destilovanoj vodi do finalne zapremine od 50 mL i čuva se na sobnoj temperaturi.

Silika, za koju se vezala plazmidna DNK, je obarana kratkim centrifugiranjem i prana sa 500 μ L rastvora za pranje (50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 2,5 mM EDTA, 50 % etanol). Uzorak je mešan na vorteksu i silika je ponovo taložena kratkim centrifugiranjem na sobnoj temperaturi u ependorf centrifugi. Pažljivo je uklanjan sav rastvor za pranje i silika je sušena par minuta da bi ispario sav etanol. Zatim je silika resuspendovana u 35 μ L destilovane vode i uzorak je inkubiran 2 min na 55°C da bi se olakšala elucija DNK sa silike. Uzorak je centrifugiran 30 sec na 14000 obrt/min u ependorf centrifugi na sobnoj temperaturi i pažljivo, izbegavajući siliku, sakupljan je supernatant u kome se nalazila eluirana plazmidna DNK.

III.14. PRODUKCIJA POLIKLONSKIH ANTITELA

Za imunizaciju miševa i produkciju poliklonskih antitela korišćeni su proteini eksprimirani u bakterijama i prečišćeni u denaturišućim uslovima. Za efikasnu ekspresiju i prečišćavanje proteina korišćen je sistem The QIAexpressionist (Qiagen).

III.14.1. Indukcija ekspresije rekombinantnih proteina sa His markerom u *E. coli*

Sa sveže petri šolje ili iz glicerolskog stoka odgovarajućeg bakterijskog klona sterilnom ezom zasejavane su bakterije u 50 mL TB medijuma sa antibioticima (ampicilin 100 µg/mL, kanamicin 30 µg/mL). Kultura je inkubirana preko noći na 37°C uz intenzivno mućkanje. Sutradan, kultura je razblaživana deset puta TB medijumom sa odgovarajućim antibioticima (do 500 mL). Kultura je i dalje inkubirana na 37°C uz povremeno merenje optičke gustine (OD). U logaritamskoj fazi rasta, kada optička gustina dostigne neku vrednost između 0,4-0,9, u kulturu je dodavan IPTG, finalne koncentracije 1 mM i kultura je inkubirana dodatna 3 sata na 37°C. Nakon toga bakterijske ćelije su taložene centrifugiranjem 10 min na 4000 obrt/min u Eppendorf stonoj centrifugi 5084Ri na +4°C. Talози su zamrzavani u suvom ledu i čuvani na -20°C.

III.14.2. Prečišćavanje rekombinantnih proteina sa His markerom u denaturišućim uslovima

Talог bakterija iz 250 mL kulture je resuspendovan u 10-15 mL pufera B (8 M Urea, 0,1 M NaH₂PO₄, 0,01 M Tris-HCl, pH 8) i ćelije su lizirane sonikacijom (sonikator Soniprep 150, Cellai) sa 2 pulsa maksimalne jačine u trajanju od po 20 sec na ledu. Sonikat je zatim centrifugiran 10 min na 5000 obrt/min na +4°C. U ćelijski lizat oslobodjen ćelijskih ostataka dodavano je 500 µL pripremljene Ni-NTA sefaroze za koju se specifično vezuju proteini koji sadrže 6 histidina (His marker). Pre dodavanja, potrebna količina Ni-NTA sefaroze je prana dva puta sa po 500 µL pufera B. Posle jednočasovne inkubacije proteinskog lizata i Ni-NTA

sefaroze na sobnoj temperaturi i uz blago mućkanje, matriks sa vezanim proteinima je obaran centrifugiranjem 2 min na 2500 obrt/min na sobnoj temperaturi. Nespecifično vezani proteini su odstranjivani sa Ni-NTA sefaroze puferom istog sastava ali nižeg pH. Matriks je pran 3 puta po 10 min na sobnoj temperaturi, jednom sa 5 mL pufera B i dva puta sa po 5 mL pufera C (8 M Urea, 0,1 M NaH_2PO_4 , 0,01 M Tris-HCl, pH 6,3). Proteini su efikasno eluirani puferom C koji sadrži 100 mM EDTA jer EDTA kompleksuje Ni^{++} jone, a proteini se oslobadjaju u rastvor. Proteini su eluirani 2 puta po 30 min sa po 1 mL pufera C, 100 mM EDTA.

Za praćenje efikasnosti prečišćavanja posle svakog koraka odvajano je po 10 μL frakcije i uzorci su analizirani elektroforezom na SDS poliakrilamidnim gelovima. Koncentracija eluiranih proteina je određivana proteinskim esejom (BioRad).

III.14.3. Pripremanje proteina za imunizaciju miševa

Od prečišćenih rekombinantnih proteina, čija je čistoća proverena elektroforezom na SDS poliakrilamidnim gelovima, pripremani su uzorci zapremine 100 μL koji su sadržavali 40 μg proteina (zapremina je podešavana PBS puferom (17 mM NaCl, 3,4 mM KCl, 1,8 mM KH_2PO_4 , 10 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)). Ovako pripremljeni uzorci su predstavljali jednu dozu za jednog miša. Najčešće su jednim istim proteinom imunizovana tri miša. Do injeciranja, pripremljeni uzorci su čuvani zamrznuti na -80°C .

III.14.4. Imunizacija miševa

Za produkciju poliklonskih antitela korišćeni su Bulb C miševi ženskog pola. Svake druge sedmice u miševu je intraperitonealno injecirano po 40 μg željenog proteina razblaženog PBS puferom do 100 μL i pomešanog sa nekompletnim adjuvansom (Freund's adjuvant, Sigma F5506). Sedam dana nakon svakog injeciranja miševima je uzimana krv iz karotidne arterije.

Tehničku pomoć pri injeciranju životinja i vadjenju krvi pružila je ekipa ICGEB-a u Trstu zadužena za rad sa životinjama.

Serum je pripreman na sledeći način: krv je inkubirana 30 min na 37°C, a zatim par sati na +4°C. Koagulirana krv je centrifugirana 30 min na 14000 obrt/min u stonj Eppendorf centrifugi na +4°C. Bistri supernatant je prebacivan u čistu eppendorf epruvetu i ponovo centrifugiran 2 min na 14000 obrt/min na sobnoj temperaturi. U serume je dodavan natrijum azid (0,02 %) radi sprečavanja zagadjenja gljivama i bakterijama. Tako pripremljeni serumi čuvani su na -20°C na duži period. Efikasnost imunog odgovora proveravana je Western blot analizom na 10-60 µg proteina izolovanih iz humanih skeletnih mišića (Clontech).

III.15. ELEKTROFOREZA PROTEINA

Uzorci proteina su razdvajani elektroforezom na 10-15 % SDS poliakrilamidnim gelovima u puferu sastava: 25 mM Tris baza, 192 mM glicin i 0,1 % SDS. Uzorcima je dodavana ista zapremina dva puta koncentrovanog pufera za uzorak (50 mM Tris-HCl, pH 6,8, 4 % SDS, 20 % glicerol, 715 mM β-merkaptetanol, bromfenol plava boja) i pred nanošenje na gel proteini su denaturisani kuvanjem dva minuta. Posle elektroforeze gelovi su bojeni na jedan od sledeća dva načina:

-standardnom metodom, bojenjem komasi plavim (0,4 % comassie blue, 10 % sirćetna kiselina, 40 % metanol) i odbojivanjem u rastvoru 7 % sirćetne kiseline i 25 % metanola.

-komercijalnim preparatom firme Pierce (Gel Code Blue Stain Reagent). Pre bojenja gel je pran nekoliko puta vrućom vodom da bi se odstranio SDS iz gela, zatim bojen reagensom 1 h i odbojavan u destilovanoj vodi. Prednost bojenja ovim reagensom je što se u puferu za bojenje ne koriste metanol i sirćetna kiselina i što se boja specifično vezuje samo za proteine te je pozadina kristalno providna.

III.16. PRENOS PROTEINA NA MEMBRANU

Nakon završene elektroforeze proteina gel za prenos je inkubiran 15 min u puferu za prenos (25 mM Tris baza, 192 mM glicin, 20 % metanol). Membrana na koju je vršen prenos proteina iz gela je pripremana na sledeći način: najpre je potapana 20 sec u metanol (jer je hidrofobna), zatim je prana 2 min u destilovanoj vodi i na kraju je inkubirana 5 min u puferu za prenos. Membrana i gel su složeni u sendvič između 2 parčeta 3 MM papira i 2 sundjera natopljena puferom za transfer, a zatim smeštani u kasetu i kadnicu sa hladnim puferom za prenos. Gel je postavljan uz negativnu, a membrana uz pozitivnu elektrodu. Prenos proteina je vršen preko noći na 18 V. Za prenos proteina korišćena su dva tipa membrana: Immobilon-P (Millipore) i Immun-Blot PVDF Membrane (Bio-Rad). Obe membrane su od poliviniliden fluorida (PVDF).

III.17. WESTERN BLOT ANALIZA

Posle završenog prenosa proteina, membrana je inkubirana 1 h na 37°C u PBS puferu koji sadrži 10 % bezmasno mleko i 0,05 % Tween20. Pre inkubacije sa primarnim antitelom membrana je prana rastvorom PBS/0,05 % Tween20. Zatim je membrana inkubirana 1-1,5 h sa primarnim antitelom u PBS puferu koji sadrži 5 % bezmasno mleko i 0,05 % Tween20. Nespecifično vezano primarno antitelo je uklanjano pranjem membrane 3 puta po 10 min rastvorom PBS/0,05 % Tween20. Membrana je zatim inkubirana 1 h sa sekundarnim antitelom koje je konjugovano sa alkalnom fosfatazom i koje je takodje razblaženo u PBS puferu koji sadrži 5 % bezmasno mleko i 0,05 % Tween20. Pre detekcije nespecifično vezano sekundarno antitelo je uklanjano pranjem membrane 3 puta po 10 min rastvorom PBS/0,05 % Tween 20. Signal je detektovan supstratima NBT (nitroblue tetrazolium chloride) finalne koncentracije 330 µg/mL i BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate, 4-toluidine salt) finalne koncentracije 165 µg/mL koji su razblaženi u AP puferu (100 mM Tris-HCl, pH 9,5, 100 mM

NaCl, 5 mM MgCl₂). Za vreme detekcije membrana je bila zaštićena od dejstva svetlosti. Bojena reakcija je prekidana pranjem membrane u destilovanoj vodi i sušenjem.

III.18. PRIPREMANJE REKOMBINANTNIH PROTEINA ZA IZUČAVANJE PROTEINSKO-PROTEINSKIH INTERAKCIJA

U cilju identifikovanja proteina koji se eventualno vezuju za protein Ankrd2 različiti fragmenti proteina Ankrd2 su fuzionisani sa GST. Rekombinantni proteini su prečišćavani u nedenaturišućim uslovima, a zatim korišćeni u GST „pull down” esejima.

III.18.1. Indukcija ekspresije rekombinantnih proteina sa GST u *E. coli*

Sa sveže petri šolje ili iz glicerolskog stoka odgovarajućeg bakterijskog klona sterilnom ezom zasejavane su bakterije u 10 mL TB medijuma sa odgovarajućim antibioticima (ampicilin 100 µg/mL, kanamicin 30 µg/mL, hloramfenikol 25 µg/mL). Kultura je inkubirana preko noći na sobnoj temperaturi (23-27°C), a zatim je razblaživana 10 puta (do 100 mL) TB medijumom sa odgovarajućim antibioticima. Kultura je i dalje inkubirana na sobnoj temperaturi uz povremeno merenje optičke gustine. U logaritamskoj fazi rasta (OD=0,4-0,9) u kulturu je dodavan IPTG, (do finalne koncentracije 0,5 mM) i kultura je dodatno inkubirana 3 sata na sobnoj temperaturi. Bakterijske ćelije su taložene centrifugiranjem 10 min na 4000 obrt/min u Eppendorf stonjoj centrifugi 5084Ri na +4°C. Talozni bakterija su zamrzavani u suvom ledu i čuvani na -20°C.

III.18.2. Prečišćavanje rekombinantnih proteina sa GST u nedenaturišućim uslovima

Talog bakterija dobijen centrifugiranjem 30 mL bakterijske kulture je resuspendovan u 5 mL pufera za lizu (50 mM Tris-HCl, pH 8, 5 % glicerol, 1 % Triton X-100, 2 mM DTT, smeša proteinaznih inhibitora (Complete, Mini, EDTA free, Boehringer; jedna tableta se

rastvori u 10 mL pufera)). Čelije su lizirane sonikacijom sa dva maksimalna pulsa od po desetak sekundi na ledu. Sonikat je zatim centrifugiran 10 min na 5000 obrt/min, +4°C (stona Eppendorf centrifuga 5084Ri). U ćelijski lizat oslobođen nerastvorljivog materijala dodavano je 100 µL pripremljene glutation sefaroze 4B (Amersham Pharmacia Biotech). Za pripremanje 2 mL 50 % suspenzije uzimano je 1,33 mL 75% suspenzije u etanolu i matriks je obaran kratkim centrifugiranjem. Supernatant je odlivan i dodavano je 10 mL hladnog PBS pufera. Matriks je resuspendovan invertovanjem epruvete, zatim taložen kratkim centrifugiranjem i resuspendovan u 1 mL PBS pufera. Dobijena je 50 % suspenzija spremna za upotrebu.

Vezivanje proteina za matriks se odvijalo 1 h na +4°C, uz konstantno mućkanje na rotacionom točku. Nespecifično vezani proteini su uklanjani pranjem matriksa PBS puferom u koji su dodati proteinazni inhibitori (Complete, Boehringer), 3 puta po 5 min, na +4°C. Za dalji rad korišćeni su rekombinantni proteini vezani za matriks, tako da je glutation sefaroza 4B sa vezanim rekombinantnim proteinima resuspendovana u 100 µL PBS pufera sa proteinaznim inhibitorima. Vezani proteini se inače mogu eluirati 10-20 mM rastvorom redukovano glutationa u 50 mM Tris-HCl, pH 8.

III.19. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE PROTEINA

Koncentracija proteina u različitim uzorcima određivana je proteinskim esejom (BioRad) koji se zasniva na različitoj promeni boje reagensa u zavisnosti od koncentracije proteina u uzorku. Uzorak se diluira u 800 µL vode (najčešće 80-400 puta) i doda se 200 µL reagensa. Nakon 10 min (do 1 h) očita se apsorbancija uzorka na 595 nm a sa standardne krive se preračuna koncentracija proteina u merenom uzorku.

III.20. PROTEINAZNI I FOSFATAZNI INHIBITORI

Prilikom pripremanja ćelijskih ekstrakata u pufer su dodavani različiti proteinazni i

fosfatazni inhibitori u cilju sprečavanja degradacije i defosforilacije proteina. Korišćeni su sledeći preparati:

-koktel fosfataznih inhibitora 1 (Sigma P2850), koji inhibiraju aktivnost L-izozima alkalne fosfataze i serin/treonin protein fosfataze,

-koktel fosfataznih inhibitora 2 (Sigma, P5726), koji inhibiraju aktivnost kiselih i alkalnih fosfataza i tirozin protein fosfataze,

-koktel proteinaznih inhibitora (Sigma P8465), koji inhibiraju aktivnost serin, cistein, aspartan i metalo-proteaza, kao i aktivnost aminopeptidaza. Ovaj koktel sadrži AEBSF (4-(2-aminoetil)benzensulfonilfluorid), pepstatin A, E64 (trans-epoksisukcinil-L-leucilamido(4-guanidino)butan), bestatin i EDTA,

-koktel proteinaznih inhibitora u obliku tablete (Boehringer, 1697498 i 1836170), sa ili bez EDTA, koji inhibiraju aktivnost velikog broja serin i cistein proteaza.

III.21. ĆELIJSKA KULTURA

U ovom radu korišćena su dva tipa ćelija u kulturi: primarni humani mioblasti (CHQ5B) i ćelijska linija mišjih mioblasta C2C12. Humanu mioblasti su izolovani iz kvadricepsa novorodjenčeta (5 dana posle rođenja) koje nije imalo indicije za neku od neuromišićnih bolesti. Protokol korišćen za izolovanje ćelija je u potpunoj saglasnosti sa zakonom i etičkim pravilima. Ćelije su dobijene na poklon od Dr V. Mouly (URA, Pariz, Francuska). Ove ćelije mogu dostići 55-60 deoba. Mišji mioblasti C2C12 (Blau *et al.*, 1993) su dobijeni od Dr S. Soddu (CRS, Rim, Italija).

CHQ5B ćelije su gajene u mešavini DMEM i 199 medijuma (Gibco BRL) u odnosu 4:1 koja sadrži 20 % seruma (Fetal Bovine Myoclon Super Plus, Gibco BRL) i 50 µg/mL gentamicina. Ćelije koje su korišćene za pripremanje ekstrakata gajene su u HAM'S F10 medijumu sa 2 mM glutaminom, 50 µg/mL gentamicinom i 20 % serumom (Fetal bovine

Myoclon super plus serum, Gibco BRL). Za diferenciranje mioblasta u miotube korišćen je DMEM medijum sa 50 µg/mL gentamicina i 0,4 % Ultrosera G (Gibco BRL).

C2C12 ćelije su gajene u DMEM medijumu (Gibco BRL) sa 10 % seruma (Seromed) i 50 µg/mL gentamicina, a za diferenciranje korišćen je DMEM medijum sa 50 µg/mL gentamicina i 0,4 % Ultrosera G.

Diferencirane CHQ5B ćelije se mogu koristiti do 7. dana, a C2C12 i do 10. dana.

Ćelije u kulturi su gajene na 37°C u 8 % CO₂.

III.22. PRIPREMANJE ĆELIJSKIH EKSTRAKATA

Za pripremanje ćelijskih ekstrakata, ćelije su gajene u šoljama dijametra 100 mm. Mioblasti su sakupljani po dostizanju 80 % konfluentnosti, a miotube nakon određenog broja dana diferenciranja. Ćelije su najpre prane kompletnim PBS puferom (17 mM NaCl, 3,4 mM KCl, 1,8 mM KH₂PO₄, 10 mM NaH₂PO₄·12H₂O, 0,68 mM CaCl₂·2H₂O i 0,69 mM MgCl₂·6H₂O) da bi se uklonili tragovi seruma, a zatim su mehanički sakupljane sa šolja. Ćelije su dodatno prane dva puta kompletnim PBS puferom a zatim je ćelijski talog zamrzavan u suvom ledu i čuvan na -80°C do upotrebe. Ekstrakti su pripremani u denaturišućem (8 M Urea, 0,1 M NaH₂PO₄, 0,01 M Tris-HCl, pH 8) ili nedenaturišućem (250 mM NaCl, 50 mM Hepes, pH 8, 0,1 % NP40, proteinazni i fosfatazni inhibitori nabavljeni od različitih proizvođača (opisanim u poglavlju Proteinazni i fosfatazni inhibitori)) puferu. Ćelijski talog je resuspendovan u 5 volumena pufera i ćelije su lizirane sonikacijom na ledu (2 pulsa maksimalne jačine od po 10 sec). Sonikat je centrifugiran 10 min na 14000 obrt/min u stonjoj ependorf centrifugi na +4°C. Ekstrakt oslobođen nerastvorljivog materijala je čuvan na -80°C, a koncentracija proteina je određivana proteinskim esejom (BioRad).

III.23. *IN VITRO* OBELEŽAVANJE ĆELIJA RADIOAKTIVNO OBELEŽENIM AMINOKISELINAMA ³⁵S-METIONINOM I ³⁵S-CISTEINOM

Za izučavanje proteinsko-proteinskih interakcija korišćeni su proteinski ekstrakti pripremljeni od ćelija koje su gajene u prisustvu radioaktivno obeleženih aminokiselina metionina i cisteina. Za obeležavanje, ćelije su gajene u šoljama dijametra 100 mm. Pred obeležavanje ćelije su dva puta prane kompletnim PBS puferom a zatim je dodavan odgovarajući medijum bez cisteina i metionina:

-za nediferencirane humane ćelije CHQ5B: DMEM (ili HAMS F10) bez cisteina i metionina, 20 % dijalizovani serum, 2 mM glutamin i 50 µg/mL gentamicin,

-za diferencirane humane ćelije CHQ5B: DMEM bez cisteina i metionina, 2 mM glutamin, 50 µg/mL gentamicin i 0,4 % Ultroser G,

-za nediferencirane mišje ćelije C2C12: DMEM bez cisteina i metionina, 10 % dijalizovani serum, 2 mM glutamin i 50 µg/mL gentamicin,

-za diferencirane mišje ćelije C2C12: DMEM bez cisteina i metionina, 2 mM glutamin, 50 µg/mL gentamicin i 0,4 % Ultroser G.

U ovom medijumu ćelije su inkubirane 3 sata a zatim je taj medijum zamenjen sa 5 mL svežeg medijuma u koji je dodato 20 µl PRO-MIX-a (Amersham Pharmacia Biotech), mešavine koja sadrži oko 70 % L-[³⁵S] metionina i 30 % L-[³⁵S] cisteina. Ćelije su inkubirane 20 h u medijumu sa radioaktivnim aminokiselinama koje su se za to vreme ugradjivale u novosintetisane proteine. Po uklanjanju medijuma sa radioaktivno obeleženim aminokiselinama, ćelije su jednom prane kompletnim PBS puferom. Na ćelije je sipano 3 mL kompletnog PBS pufera sa proteinaznim i fosfataznim inhibitorima i ćelije su mehanički sakupljane sa šolja. Resuspendovane ćelije su obarane centrifugiranjem 7 min na 2000 obrt/min u kliničkoj centrifugi na +4°C, a zatim su prenošene u ependorf epruvetu tako što su resuspendovane u 1 mL kompletnog PBS pufera sa proteinaznim i fosfataznim inhibitorima i

ponovo obarane centrifugiranjem u Eppendorf stonj centrifugi 2 min na 14000 obrt/min na +4°C. Nakon ovog koraka pripreman je ćelijski ekstrakt tako što su ćelije resuspendovane u E1a puferu (250 mM NaCl, 0,1 % NP40, 50 mM HEPES, pH 8) sa proteinaznim i fosfataznim inhibitorima, kratko sonifikovane i lizat je centrifugiran 10 min na 14000 obrt/min u stonj Eppendorf centrifugi na +4°C. Zatim je određivana koncentracija proteina u dobijenom ekstraktu i meren je specifični aktivitet (imp/min/μg proteina). Ovako dobijen ćelijski ekstrakt je do upotrebe čuvan na -80°C.

III.24. GST „PULL DOWN”

U cilju detekcije proteina koji interaguju sa proteinom Ankrd2 i koji bi mogli ukazati na njegovu eventualnu funkciju u mišićnoj ćeliji korišćena je metoda GST „pull down”. Protein od interesa, koji je preko GST markera vezan za glutation-sefarozu, se inkubira sa proteinskim ekstraktom dobijenim iz mišićnih ćelija u kojima se očekuje prisustvo jednog ili više proteina koji sa njim interaguju. Proteini koji interaguju sa proteinom od interesa stvaraju kompleks koji se izoluje kratkim centrifugiranjem. Nespecifično vezani proteini se uklanjaju pranjem matriksa u prisustvu blagog deterdženta i kompleks se analizira elektroforezom na SDS poliakrilamidnom gelu.

U ovom radu korišćeni su rekombinantni proteini: F-Ankrd2-GST, N-Ankrd2-GST, C-Ankrd2-GST i sam protein GST kao negativna kontrola, vezani za glutation sefarozu 4B. Kao izvor proteina koji se vezuju za Ankrd2 korišćeni su ekstrakti *in vitro* radioaktivno obeleženih nediferenciranih i diferenciranih humanih (CHQ5B) kao i nediferenciranih i diferenciranih mišjih (C2C12) mišićnih ćelija. Reakcija vezivanja se odigravala u E1a puferu (250 mM NaCl, 0,1 % NP40, 50 mM Hepes, pH 8) koji je sadržavao proteinazne inhibitore (bez EDTA) u finalnoj zapremini od 200 μL uz blago mešanje na rotacionom točku 1 sat na +4°C. Nakon

vezivanja, kompleks je taložen kratkim centrifugiranjem (10 sec) u stonjoj Eppendorf centrifugi na 14000 obrt/min na +4°C. Nespecifično vezani proteini su uklanjani pranjem matriksa tri puta po 5 min sa po 400 µL Ela pufera sa proteinaznim inhibitorima. Sefaroza sa vezanim proteinima je resuspendovana u 10 µL dva puta koncentrovanog pufera za uzorak, a posle dvominutne denaturacije na 100°C uzorci su analizirani elektroforezom na 15 % SDS poliakrilamidnom gelu. Nakon elektroforeze, gel je fiksiran u rastvoru 50 % metanola i 10 % sirćetne kiseline dva puta po 10 min i sušen 1 sat pod vakumom na 80°C. Posle sušenja gela radioaktivno obeleženi proteini su vizuelizovani na Cyclon-u ili autoradiografijom na Kodak filmu.

III.25. INDIREKTNA IMUNOFLUORESCENCIJA

Unutarćelijska lokalizacija i ekspresija Ankrd2 u toku diferencijacije humanih i mišjih mišićnih ćelija ispitivana je metodom indirektno imunofluorescencije. Primarne humane (CHQ5B) i mišje (C2C12) mišićne ćelije su gajene u šoljama dijametra 35 mm na pokrovnim staklima koja su tretirana kolagenom. Ćelije su najpre prane 2 puta sa po 2 mL PBS pufera, a zatim su inkubirane 20 min sa 3 % paraformaldehidom da bi se fiksirale za podlogu (pokrovna stakla). Paraformaldehid je inaktiviran inkubacijom ćelija 5 minuta sa 0,1 M rastvorom glicina u PBS puferu. Ćelije su ponovo prane PBS puferom i permeabilizovane jednočasovnom inkubacijom u rastvoru 1 % BSA, 0,05 % Tween20, PBS. Nakon pranja sa 0,1 % BSA, 0,05 % Tween20, PBS na ćelije je nakapano razblaženo primarno antitelo. Ćelije su inkubirane sa primarnim antitelom 1,5-2 h, a zatim je višak nespecifično vezanog antitela uklanjano pranjem ćelija rastvorom 0,1 % BSA, 0,05 % Tween20, PBS, 5 puta po 5 minuta. U istom puferu su razblažena i sekundarna antitela konjugovana sa fluoresceinom (FITC), Texas Red, Alexa Fluor 488 ili Alexa Fluor 565. Nakon jednočasovne inkubacije sa sekundarnim antitelom ćelije su prane 5 puta po 5 minuta sa 0,1 % BSA, 0,05 % Tween20, PBS i jedan put destilovanom

vodom da bi se uklonili tragovi soli poreklom iz PBS pufera. Pokrovno staklo sa ćelijama je zatim nameštano na mikroskopsko staklo na kome se nalazila jedna kap VECTASHIELD Mounting Medium-a, (Vector Laboratories) koji usporava gubitak fluorescencije. 3MM papirom je pokupljen višak tečnosti sa ivica pokrovnog stakla, a zatim je po ivicama nanošen lak za nokte koji sprečava sušenje. Preparati su analizirani na konfokalnom mikroskopu Axiovert 100M (Carl Zeiss Microscopy, Jena, Nemačka) na uvećanjima 40 i 100 puta, koristeći kompjuterski program LSM 510.

Specifična razblaženja primarnih i sekundarnih antitela korišćenih u radu su naznačena u konkretnim eksperimentima u poglavlju Rezultati.

U eksperimentima dvostruke imunofluorescencije antitela su nanošena jedno za drugim, a posle inkubacije sa svakim antitelom ćelije su prane 5 puta po 5 minuta puferom za pranje (0,1 % BSA, 0,05 % Tween20, PBS). Vreme inkubacija sa svakim antitelom je bilo po jedan sat.

Jedra mioblasta i miotuba su bojena propidijum jodidom (Sigma) i u tom slučaju ćelije su tretirane sa 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ RNaze za vreme permeabilizacije. Nakon poslednjeg pranja jedra su bojena 5 minuta sa 3,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ propidijum jodida, a zatim su ćelije prane dva puta puferom za pranje i jedan put destilovanom vodom. Propidijum jodid boji jedra crvenom bojom.

III.25.1. Priprema pokrovnih stakala za imunofluorescenciju

Ćelije koje se koriste za imunofluorescenciju gaje se na pokrovnim staklima. Da bi ćelije ostale zalepljene tokom celog postupka, pokrovna stakla se tretiraju rastvorom kolagena koncentracije 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (tip I izolovan iz repa pacova, Becton Dickinson Labware) u 0,02 M sirćetnoj kiseli. Pokrovna stakla se poredjaju u petri šolju i na njih se pažljivo nanese rastvor kolagena. Šolje se zatim ostave u kapeli 2 sata da ispari sirćetna kiselina. Nakon dva sata aspiracijom se ukloni višak tečnosti i pokrovna stakla se čuvaju na $+4^{\circ}\text{C}$ do upotrebe. Kada se

smeste u šoljice u kojima će se gajiti ćelije, pokrovna stakla se operu prvo PBS puferom, a zatim se dodaju ćelije rastvorene u odgovarajućem hranljivom medijumu.

III.26. *IN VITRO* FOSFORILACIJA PROTEINA KAZEIN KINAZOM II

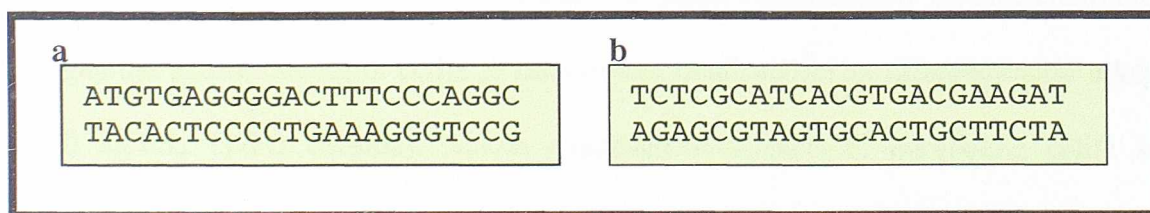
Kompjuterska analiza sekvence proteina Ankrd2 je pokazala da on poseduje četiri potencijalna mesta za fosforilaciju kazein kinazom II (T-4, T-71, T-288 i S-322). Da li neko od ovih mesta zaista može biti fosforilovano i koje, analizirano je inkubacijom različitih fragmenata proteina Ankrd2, fuzionisanih sa GST, koji su sadržavali određena potencijalna mesta za fosforilaciju kazein kinazom II, radioaktivno obeleženog ATP-a i komercijalne kazein kinaze II u kinaznom puferu. Korišćeni su sledeći fragmenti proteina Ankrd2: F-Ankrd2 (5-333 ak), koji sadrži drugo, treće i četvrto mesto, N-Ankrd2 (5-120 ak), koji sadrži samo drugo mesto, UC-Ankrd2 (5-316 ak) sa drugim i trećim mestom, C-Ankrd2 (279-333 ak) sa trećim i četvrtim mestom i oligoC-Ankrd2 (317-333 ak) samo sa poslednjim, četvrtim mestom za fosforilaciju kazein kinazom II. Nijedan od korišćenih konstrukata nije sadržavao prvo mesto za fosforilaciju kazein kinazom II koje je otkriveno naknadno, kada je utvrđeno da je start translacije 12 bp uzvodno od prvobitno detektovanog starta. Kao negativna kontrola korišćen je protein GST eksprimiran sa vektora pGEX-6P-3 zato što su svi konstrukti sadržavali GST kao marker. Svi proteini koji su izolovani i prečišćeni iz *E. coli* po već opisanoj proceduri (poglavlje Prečišćavanje rekombinantnih proteina sa GST u nedenedurirajućim uslovima) bili su vezani za glutation sefarozu. Količine proteina korišćene u reakcijama bile su relativno ujednačene i proverene elektroforezom na 15 % SDS poliakrilamidnim gelovima. Reakcione smeše su sadržavale: rekombinantne proteine vezane za glutation sefarozu i oprane reakcionim puferom, 10 μ M ATP, pufer za kazein kinazu II (20 mM HEPES, pH 7,5, 20 mM $MgCl_2$), inhibitori proteaza (Complete, Boehringer), $\gamma^{32}P$ -ATP i 500 U kazein kinaze II (BioLabs). Smeše su inkubirane 10 minuta na 30°C, a zatim su proteini vezani za matriks oprani dva puta

sa po 500 μ L pufera za kazein kinazu II, resuspendovani u puferu za uzorak i analizirani elektroforezom na 15 % SDS poliakrilamidnim gelovima. Nakon elektroforeze gel je obojen Gel Code reagensom (Pierce), a zatim osušen na 80°C pod vakuumom i eksponiran na Kodakovom filmu za autoradiografije.

III.27. UTVRDJIVANJE PROMENE ELEKTROFORETSKE POKRETLJIVOSTI PRI FORMIRANJU NUKLEOPROTEINA (EMSA-Electrophoretic mobility shift assay)

III.27.1. Obeležavanje oligonukleotidne probe

Kao DNK proba u eksperimentima retardacije DNK u gelu korišćen je komercijalni oligonukleotid firme Santa Cruz koji je sadržavao vezivno mesto za transkripcioni faktor NFkB. Sekvenca oligonukleotida korišćenog u eksperimentima retardacije data je na Slici 9a.



Slika 9. Nukleotidne sekvence dvolančanih oligonukleotida korišćenih u eksperimentima retardacije DNK u gelu.

- a) DNK proba sa vezivnim mestom za transkripcioni faktor NFkB
- b) nespecifični kompetitor sa vezivnim mestom za faktor USF

DNK proba je obeležavana na 5' krajevima oba lanca T4 polinukleotid kinazom. Reakciona smeša je sadržavala: 60 ng DNK probe (Santa Cruz), 70 mM Tris-HCl, pH 7,6, 10 mM MgCl₂, 5 mM DTT, 20 U T4 polinukleotid kinaze (BioLabs) i 1 μ L ³²P- γ ATP (3000 Ci/mmol). Reakcija se odvijala 1 h na 37°C, a zaustavljena je inkubacijom reakcione smeše 10 min na 65°C.

Oslobadjanje od neugradjenih radioaktivnih nukleotida vršeno je metodom

molekulskog sejanja za šta je korišćena G-25 sefadeks kolona (Quick Spin Columns, Boehringer) po uputstvu proizvođača. Količina inkorporiranog aktiviteta u prečišćenoj probi merena je na scintilacionom brojaču.

III.27.2. Pripremanje proteinskih ekstrakata

U reakcijama EMSA kao izvor aktivnog NF κ B koji može da veže DNK korišćeni su proteini izolovani iz humanih mišićnih ćelija CHQ5B koje su bile tretirane nekrotičnim faktorom tunora TNF α . Proteinski ekstrakti su pripremani na dva načina pri čemu su izolovani totalni ili samo jedarni proteini.

III.27.2.1. Tretiranje humanih mišićnih ćelija CHQ5B nekrotičnim faktorom tumora

Humane primarne mišićne ćelije CHQ5B su gajene po već opisanoj proceduri (poglavlje Ćelijska kultura). Kada su ćelije dostigle dovoljnu konfluentnost za diferenciranje, medijum za gajenje nediferenciranih ćelija je zamenjivan medijumom za diferencijaciju u koji je dodato 10 ng/mL TNF α (Sigma). Nakon dvadesetčetvoročasovne inkubacije ćelije su sakupljane i korišćene za pripremanje proteinskih ekstrakata.

III.27.2.2. Pripremanje totalnih ekstrakata

Primarne humane mišićne ćelije CHQ5B tretirane nekrotičnim faktorom tumora su resuspendovane u TOTEX puferu za lizu (20 mM Hepes, pH 7,9, 350 mM NaCl, 20 % glicerol, 1 % Nonidet P-40, 1 mM MgCl₂, 0,5 mM EDTA, 0,1 mM EGTA, 1 mM DTT, 0,1 % PMSF, 0,1 % aprotinin) (Kaliman *et al*, 1999), kratko sonifikovane na ledu a zatim je lizat centrifugiran 15 min na 14000 obrt/min u stonoj Eppendorf centrifugi na +4°C. Bistri supernatant je alikvotiran, zamrznut u suvom ledu i čuvan na -80°C do upotrebe.

III.27.2.3. Pripremanje jedarnih ekstrakata

Jedarni ekstrakti su pripremljeni po modifikovanoj Dignamovoj metodi (Dignam *et al.*, 1983). Modifikacija se sastoji u tome što su ćelije lizirane propuštanjem kroz insulinsku iglu pošto je veoma teško dobiti dovoljne količine ćelija za homogenizaciju, a korišćeni su slični puferi kao u Dignamovoj metodi. Nakon sakupljanja, ćelije su prane hladnim puferom A (10 mM Hepes, pH 7,9, 1,5 mM MgCl₂, 10 mM KCl, 0,5 mM DTT, koktel proteinaznih inhibitora, Boehringer), a zatim resuspendovane u istom puferu. Ćelije su lizirane propuštanjem suspenzije kroz insulinsku iglu 20 puta. Jedra su obarana centrifugiranjem 8 sec na 14000 obrt/min u stonj Eppendorf centrifugi na +4°C, a supernatant uklanjan. Jedra su resuspendovana u puferu C (20 mM Hepes, pH 7,9, 25 % glicerol, 420 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM EDTA, 0,5 mM DTT, 0,5 mM PMSF), tako što je dodavano 50 µL pufera C na 100 µL jedarnog taloga. Jedra su lizirana inkubacijom na ledu najmanje 15 min. Zatim je liziranim jedrima dodavana jednaka zapremina pufera D (20 mM Hepes, pH 7,9, 20 % glicerol, 0,2 mM EDTA, 0,5 mM PMSF, 0,5 mM DTT), uzorak je promešan i centrifugiran 20 min na 14000 obrt/min u stonj Eppendorf centrifugi na +4°C. Dobijeni supernatant je alikvotiran, zamrzavan u suvom ledu i čuvan na -80°C do upotrebe.

III.27.3. *In vitro* sinteza proteina

Za *in vitro* sintezu proteina korišćen je TnT Coupled Reticulocyte Lysate System (Promega) sa kojim je moguće u jednom koraku, a krenuvši od DNK matrice, dobiti sintetisan protein. U ovom radu su korišćena dva proteina dobijena na ovaj način: Ankrd2 i MAD3 (humani IκBα). cDNK Ankrd2 je subklonirana u vektor pCDNA3 (Invitrogen), dok je MAD3 cDNK klonirana u Rc/CMV vektor (Invitrogen). Oba DNK fragmenta su klonirana u orijentaciji koja omogućava transkripciju sa T7 promotora. Reakcione smeše su sadržavale: 1 µg odgovarajuće DNK matrice, 25 µL retikulocitnog lizata, 2 µL reakcionog pufera, 1 µL T7

polimeraze, 0,5 μL mešavine aminokiselina bez metionina, 0,5 μL mešavine aminokiselina bez cisteina, 1 μL RNazina (inhibitor ribonukleaza) i vodu do 50 μL . Uzorci su inkubirani 90 min na 30°C, a zatim zamrzavani u suvom ledu i čuvani na -80°C. Produkti *in vitro* sinteze su proveravani Western blot analizom.

III.27.4. Pripremanje kompetitorske DNK

U reakcijama retardacije DNK u gelu kao specifičan kompetitor korišćen je dvolančani oligonukleotid dužine 22 bp koji je sadržavao mesto za vezivanje transkripcionog faktora NFkB (identičan oligonukleotid je korišćen i kao DNK proba, samo što je bio komercijalan), a oligonukleotid iste dužine sa vezivnim mestom za USF faktor (upstream stimulatory factor), čija je sekvenca data na Slici 9b, je korišćen kao nespecifični kompetitor. Za oba oligonukleotida naručeni su komplementarni lanci od Sigma Genosis, a zatim je dvolančana DNK pripremljena reakcijom renaturacije. Reakcione smeše su sadržavale po 25 μL 100 μM jednolančanih DNK i 50 μL 2x pufera za renaturaciju (20 mM Tris-HCl, pH 7,5, 100 mM NaCl i 2 mM EDTA). Uzorci su inkubirani 5 minuta na 95°C, a zatim su postepeno hladjeni do sobne temperature. Efikasnost renaturacije je analizirana elektroforezom produkata na 20 % poliakrilamidnom gelu u TBE puferu i bojenjem DNK etidijum bromidom.

III.27.5. Izvodjenje testa EMSA

Jedarni (6 μg) ili totalni (35 μg) proteini izolovani iz primarnih humanih mišićnih ćelija CHQ5B koje su bile tretirane 24 h sa 10 ng/mL TNF α su inkubirani sa 2 μg poly dI-dC i 1 μg dvolančanog nespecifičnog kompetitora koji sadrži mesto vezivanja USF faktora u NF puferu (10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 100 mM NaCl, 1 mM DTT, 1 mM EDTA, 4 % glicerol, 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ DNK sperme lososa) (Kaliman *et al.*, 1999). Po potrebi u reakcione smeše su takodje dodavani i proteini: Ankrd2 (sintetisan u sistemu za *in vitro* transkripciju i translaciju ili kao GST

rekombinantni protein prečišćen iz *E. coli*), MAD3 (sintetisan u sistemu za *in vitro* transkripciju i translaciju) i GST (prečišćen iz *E. coli*). Nakon tridesetominutne inkubacije na ledu u reakcione smeše je dodavan 1 ng radioaktivno obeležene probe i smeša je dodatno inkubirana 30 min na 25°C. Reakcije su zaustavljane dodavanjem boje za uzorak. Dobijeni kompleksi su razdvajani na 6 % nativnim poliakrilamidnim gelovima u TBE puferu. Nakon elektroforeze gel je sušen pod vakuumom na 80°C i autoradiografisan. Specifičnost detektovanih kompleksa je verifikovana dodavanjem neobeležene kB oligonukleotida u 120 puta molarnom višku. Prisustvo p65 subjedinice transkripcionog faktora NFkB u pojedinim kompleksima ustanovljeno je supershift esejom, dodavanjem 4 µL monoklonskog antitela na p65 subjedinicu (sc-8008, Santa Cruz) u reakcionu smešu pre dodavanja radioaktivno obeležene probe.

IV. REZULTATI

U ovom radu izloženi su rezultati karakterizacije novog humanog mišićnog proteina Ankrd2 (od ankyrin repeat domain 2). Kemp i koautori (Kemp *et al.*, 2000) su opisali mišji homologni protein Ankrd2, tako da je isto ime usvojeno i za humani protein (Pallavicini *et al.*, 2001).

IV.1. STRUKTURNA ANALIZA PROTEINA Ankrd2

Primarna sekvenca proteina Ankrd2 analizirana je raznim kompjuterskim programima koji predviđaju prisustvo određenih proteinskih motiva. Na ovaj način dobijeni su podaci koji su pomogli u odabiranju pravaca daljeg istraživanja.

Analizom proteina Ankrd2 za prisustvo najčešćih proteinskih motiva korišćenjem programa Pfam i SMART detektovana su 4 ankirinska ponovka i u humanom i u mišjem proteinu na pozicijama: 153.-185. ak, 186.-218. ak, 219.-251. ak i 252.-284. ak. Program SMART predviđa postojanje i petog ankirinskog ponovka na poziciji 121.-149. ak.

Kompjuterska analiza sekvence aminokiselina programom ScanProsite ukazala je na prisustvo nekoliko potencijalnih mesta za fosforilaciju različitim kinazama:

-6 mesta za fosforilaciju c-AMP zavisnom kinazom (T-15, T-35, S-72, T-156, S-162 i T-326),

-4 mesta za fosforilaciju kazein kinazom II (T-4, T-71, T-288 i S-322),

-2 mesta za fosforilaciju kalmodulin zavisnom protein kinazom II (T-35 i S-72),

-jedno mesto za fosforilaciju cGMP-zavisnom kinazom (S-72) i

-jedno mesto za fosforilaciju protein kinazom C (S-322).

PESTfind (EMBnet, Austrija) program predviđa, i u humanom i u mišjem proteinu, postojanje PEST sekvenci koje predstavljaju proteolitički signal za brzu degradaciju proteina.

U humanom proteinu PEST sekvenca se nalazi na poziciji od 107.-127. ak (HEPPPEPEEITGPVDEETFLK), dok mišji Ankrd2 ima dve PEST sekvence, RDALAAAQEPPEPEEITGPVNEETFLK (100.-127. ak) i HPEPESEQNGLER (306.-318. ak). Takodje su prisutne i dve slabije PEST sekvence, KTPTDLVQLWQADTR (287.-301. ak) u oba proteina, i HNGLEGPNDSSGR (313.-324. ak) u humanom, a MEGTMEGPEAVQR (1.-13. ak) u mišjem proteinu. PEST sekvence su takodje prisutne i u već pomenutom proteinu CARP/MARP/C-193.

Protein Ankrd2 poseduje i signal za lokalizaciju u ćelijskom jedru (92-96 ak, RKKRK), ali ga kompjuterski program PSORT svrstava u citoplazmatične proteine. U ovom radu je pokazano da protein Ankrd2 može biti lokalizovan i u jedru i u citoplazmi. Takodje je i protein CARP/MARP/C-193 klasifikovan kao citoplazmatični protein programom PSORT iako poseduje signal za lokalizaciju u jedru. Eksperimentalno je pokazano da protein CARP/MARP/C-193 zaista ima jedarnu lokalizaciju i kao endogena forma (Zou *et al.*, 1997) i kao protein eksprimiran u transfektovanim ćelijama (Chu *et al.*, 1995; Baumeister *et al.*, 1997; Jeyaseelan *et al.*, 1997).

IV.2. PRIPREMANJE POLIKLONSKIH ANTITELA NA PROTEIN Ankrd2

U cilju karakterizacije proteina Ankrd2 korišćena su 4 mišja antitela i to: poliklonska antitela na ceo protein (F-Ankrd2) i na N- i C-terminalni region proteina Ankrd2 (N-Ankrd2 i C-Ankrd2), kao i monoklonsko antitelo na C-terminalni region proteina Ankrd2. Pripremanje monoklonskog antitela na Ankrd2 neće biti opisano u ovom radu.

IV.2.1. Dobijanje antigena

Za imunizaciju miševa korišćeni su rekombinantni proteini sa His markerom, F-Ankrd2, N-Ankrd2 i C-Ankrd2, eksprimirani u bakterijskim ćelijama i prečišćeni u

denaturišućim uslovima, kao što je opisano u Metodama. Rekombinantni protein F-Ankrd2 nije posedovao prve četiri aminokiseline proteina Ankrd2 (5-333 ak) jer prvobitno nije bilo poznato da je početni ATG kodon 12 bp uzvodno. Tek naknadno je dokazano da je taj uzvodni ATG kodon početak translacije. Zato svi fragmenti DNK koji kodiraju N-terminalni region proteina Ankrd2 počinju od 13. baznog para. Rekombinantni protein N-Ankrd2 je sadržavao N-terminalni region proteina Ankrd2 i deo ankirinskih ponovaka (5-173 ak), dok je C-Ankrd2 obuhvatao C-terminalni region ovog proteina i takodje deo ankirinskih ponovaka (241-333 ak).

cDNK koja je kodirala različite fragmente proteina Ankrd2 umnožavana je metodom lančane polimerizacije (PCR) specifičnim graničnicima koji su navedeni u poglavlju Materijal i Metode. Fragmenti DNK su pripremani za ligaciju sa ekspresionim vektorom digestijom odgovarajućim restrikcionim enzimima. Korišćen je ekspresioni vektor pQE30 (QIAGEN) koji je takodje sečen istim restrikcionim enzimima i defosforilisan alkalnom fosfatazom, CIP (calf intestine alkaline phosphatase). Posle ligacije, transformisane su bakterijske ćelije *E. coli*, soj M15 [pREP4]. Analizom većeg broja dobijenih kolonija odabirana je jedna koja je sadržavala ispravan konstrukt. Tačnost primarne sekvence kloniranog fragmenta utvrđivana je sekvenciranjem DNK. Veća količina rekombinantnog proteina potrebna za injeciranje u životinje izolovana je iz bakterijske kulture indukovane IPTG-om. Proteini su prečišćavani u denaturišućim uslovima (u prisustvu 8 M uree).

IV.2.2. Dobijanje antitela

Svake druge nedelje proteini su injecirani miševima intraperitonealno a sedam dana nakon injeciranja uzimana im je krv i pripreman je serum. Pre početka injeciranja, serum svakog miša je proveravan Western blot analizom na prisustvo antitela koja prepoznaju humane proteine. Samo u slučaju negativne reakcije preimunog seruma sa proteinima izolovanim iz humanog mišićnog tkiva, mišu su injecirani proteini na koje su produkovana

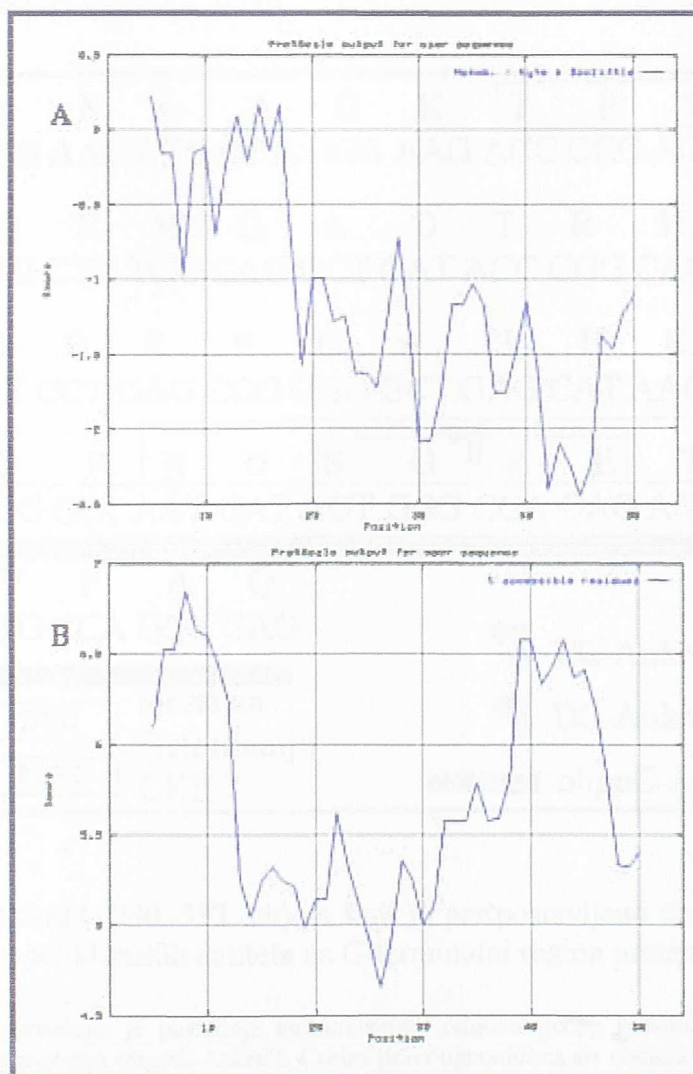
antitela. Prisustvo antitela na protein Ankrd2 u serumu dokazivano je Western blot analizom na uzorku proteina izolovanih iz humanog mišićnog tkiva. Na ovaj način napravljena su tri poliklonska antitela: na ceo protein i na N- i C-terminalni region proteina Ankrd2.

IV.2.3. Mapiranje antigenih epitopa

S obzirom da protein Ankrd2 u svom centralnom delu sadrži ankirinske ponovke koji su prisutni u velikom broju proteina bilo je potrebno precizno mapirati epitope svih antitela jer su proteini korišćeni za imunizaciju obuhvatali i deo proteina Ankrd2 sa ankirinskim ponovcima.

Od kolega iz Padove dobijeni su već pripremljeni proteinski ekstrakti ćelija kvasca koji su sadržavali eksprimirane sledeće fragmente proteina Ankrd2: 5.-67. ak, 5.-116. ak, 5.-146. ak, 5.-185. ak, 5.-220. ak, 5.-251. ak, 5.-297. ak i 5.-333. ak. Na 15 % SDS poliakrilamidnim gelovima razdvajani su proteini iz 30 µg ćelijskog ekstrakta i protein Ankrd2 je detektovan Western blot analizom. Kao primarna antitela korišćena su: monoklonsko antitelo (razblaženje 1:200), poliklonska antitela na N-terminalni region (razblaženje 1:400), poliklonska antitela na C-terminalni region (razblaženje 1:400) i poliklonska antitela na ceo protein Ankrd2 (razblaženje 1:400). Kao sekundarno antitelo korišćeno je antimišje antitelo konjugovano sa alkalnom fosfatazom (razblaženje 1:15000). Sa antitelima na N-terminalni region i ceo protein svi konstrukti su dali pozitivan signal, dok sa antitelima na C-terminalni region i monoklonskim antitelom nijedan konstrukt nije dao pozitivan signal. Negativna kontrola su bili proteini iz ekstrakta netransformisanih kvašćevih ćelija. Na osnovu ovih rezultata je zaključeno da se epitopi za vezivanje monoklonskog i poliklonskih antitela na C-terminalni region proteina Ankrd2 nalaze u regionu proteina od 298.-333. ak, dok za poliklonska antitela na N-terminalni region rezultati nisu bili informativni. Pošto se ankirinski ponovci prostiru do 284. ak zaključeno je takodje da su monoklonsko i poliklonska antitela na C-terminalni region proteina Ankrd2 specifična za taj protein jer ne reaguju sa ankirinskim ponovcima.

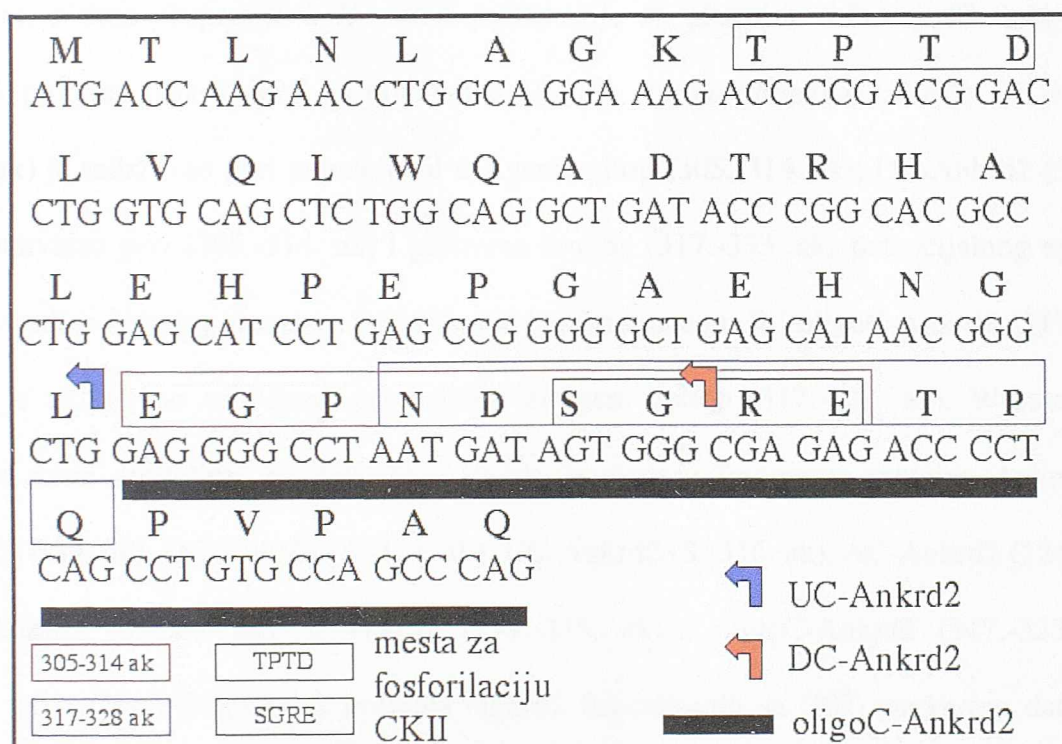
Zatim je aminokiselinska sekvenca regiona proteina Ankrd2 od 298.-333. ak analizirana kompjuterskim programom ProtScale (www.expasy.ch) kojim je izračunata hidrofobnost datog fragmenta prema skali Kyte and Doolittle (Slika 10, A) i % aminokiselinskih ostataka koji su dostupni tj. izloženi spoljašnjoj sredini (Slika 10, B) i samim tim predstavljaju moguće antigene epitope. Analizom dobijenih grafika je zaključeno da u tom regionu postoje dva



Slika 10. Grafici na kojima su predstavljeni: A) hidrofobnost i B) izloženost niza aminokiselina spoljašnjoj sredini fragmenta proteina Ankrd2 od 298.-333. ak.

fragmenta sa najvećom verovatnoćom da predstavljaju antigene epitope za vezivanje monoklonskog i poliklonskih antitela na C-terminalni region proteina Ankrd2. To su fragmenti

od 305.-314. ak i 317.-328. ak (Slika 11, sekvence oivičene crvenim i plavim pravougaonicima). Interesantno je da fragment od 317.-328. ak sadrži četvrto mesto za fosforilaciju kazein kinazom II (S-322). Na Slici 11 prikazan je region proteina Ankrd2 za koji je pretpostavljeno da sadrži epitope za vezivanje monoklonskog i poliklonskih antitela na C-terminalni region proteina Ankrd2.



Slika 11. Deo proteina Ankrd2 (280.-333. ak) za koji je pretpostavljeno da sadrži epitope za vezivanje monoklonskog i poliklonskih antitela na C-terminalni region proteina Ankrd2.

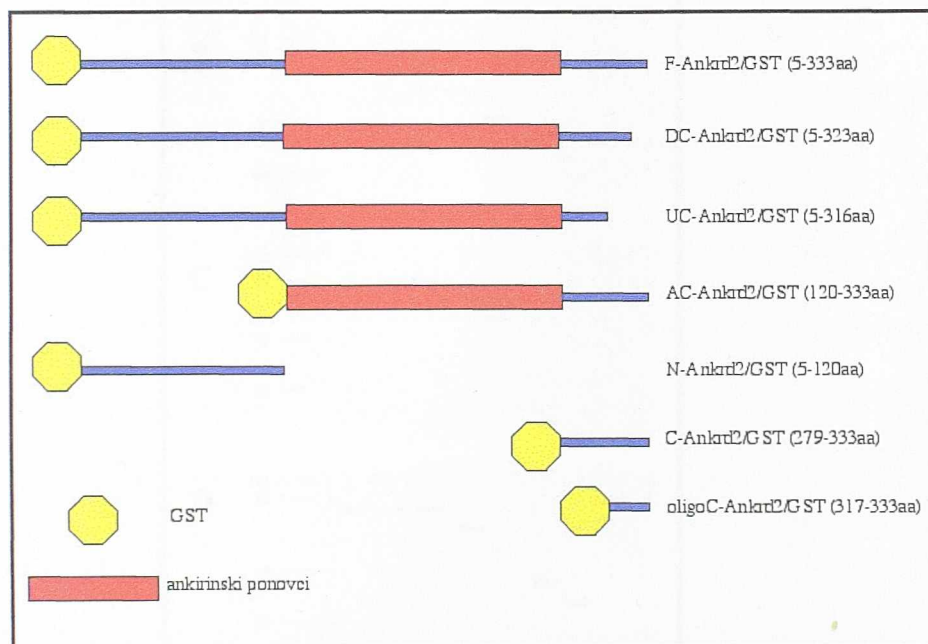
Crvenom i plavom strelicom označena je poslednja aminokiselina odgovarajućeg konstrukta. Debelom crnom linijom je podvučena sekvenca proteina oligoC-Ankrd2. Crnim pravougaonicima su obeležena potencijalna mesta za fosforilaciju kazein kinazom II u tom regionu. Crvenim i plavim pravougaonicima su označeni nizovi od devet aminokiselina za koje je kompjuterski program ProtScale pokazao da predstavljaju najverovatnije antigene epitope.

Na osnovu ovih teorijskih podataka pripremljeni su dodatni konstrukti za precizno mapiranje antigenih epitopa za monoklonsko i poliklonska antitela na C-terminalni region proteina Ankrd2. U ekspresioni vektor pGEX-6P-3 klonirani su fragmenti DNK koji su

obuhvatali sledeće delove cDNK Ankrd2: od 13.-969. bp (DC-Ankrd2), 13.-948. bp (UC-Ankrd2) i 949.-999. bp (oligoC-Ankrd2). Takođe je pripremljen konstrukt AC-Ankrd2 (361.-999. bp) koji je obuhvatao deo proteina Ankrd2 sa svim ankirinskim ponovcima i C-terminalnim regionom proteina (121.-333. ak) radi mapiranja epitopa koje prepoznaju poliklonska antitela na N-terminalni region proteina. U ovom slučaju je jedino bilo bitno da antitela na N-terminalni region proteina Ankrd2 ne prepoznaju deo proteina sa ankirinskim ponovcima. Nakon ekspresije u *E. coli* i purifikacije na glutation sefarozi 4B dobijeni su fragmenti proteina Ankrd2 koji su obuhvatali sledeće regione proteina Ankrd2: UC-Ankrd2 (5.-316. ak) je sadržavao prvi potencijalni antigeni epitop (305.-314. ak), DC-Ankrd2 (5.-323. ak) je obuhvatao prvi (305.-314. ak) i polovinu drugog (317.-333. ak) potencijalnog epitopa, tačno do sredine četvrtog mesta za fosforilaciju kazein kinazom II i oligoC-Ankrd2 (317.-333. ak) koji je uključivao ceo drugi potencijalni antigeni epitop (317.-328. ak). Western blot analiza sa svim antitelima na Ankrd2 uključila je sledeće fragmente proteina Ankrd2: F-Ankrd2 (5.-333. ak), DC-Ankrd2 (5.-323. ak), UC-Ankrd2 (5.-316. ak), AC-Ankrd2 (121.-333. ak), N-Ankrd2 (5.-120. ak), C-Ankrd2 (279.-333. ak) i oligoC-Ankrd2 (317.-333. ak). Šematski prikaz svih fragmenata proteina Ankrd2 fuzionisanih sa GST markerom dat je na Slici 12.

Pošto su svi proteini sadržavali i GST, sam GST protein predstavljao je negativnu kontrolu. Apsolutna koncentracija ovih proteina nije određivana nego su samo njihove relativne količine ujednačene i proverene elektroforezom na 15 % SDS poliakrilamidnim gelovima (Slika 13, A), a za Western blot analizu korišćena je pedeset puta manja količina proteina. Na pet 15 % SDS poliakrilamidnih gelova pušteni su navedeni uzorci istim redosledom i proteini su posle razdvajanja preneti na najlonsku membranu. Membrane su inkubirane u prisustvu primarnih antitela: monoklonskog antitela (razblaženje 1:200) i poliklonskih antitela na N-terminalni region (razblaženje 1:400), C-terminalni region

(razblaženje 1:400) i ceo protein Ankrd2 (razblaženje 1:400). Peta membrana je inkubirana sa serumom neimunizovane životinje (razblaženje 1:400) koji je služio kao negativna kontrola. Korišćeno je anti mišje sekundarno antitelo (Sigma, razblaženje 1:10000) konjugovano sa alkalnom fosfatazom, a proteini su detektovani supstratima NBT i BCIP.

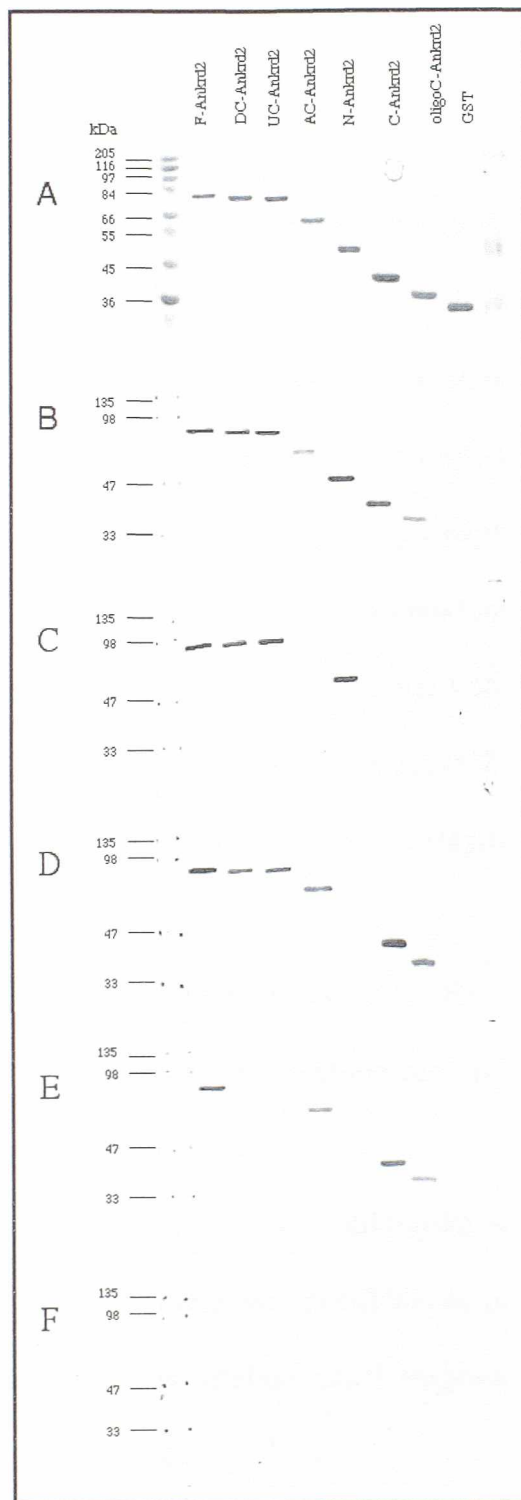


Slika 12. Šematski prikaz različitih fragmenata proteina Ankrd2 fuzionisanih sa GST koji su korišćeni za mapiranje antigenih epitopa antitela na protein Ankrd2.

Žutim osmougonačnicima je predstavljen GST marker, a crvenim pravougaoncima ankirinski ponovci.

Sa antitelom na ceo protein (Slika 13, B) dobijeni su signali sa svim konstruktima, osim sa GST kontrolom što je dokaz da su na membranu preneti svi proteini.

Sa antitelom na N-terminalni region proteina Ankrd2 (Slika 13, C) signal je dobijen sa konstruktima F-Ankrd2, UC-Ankrd2, DC-Ankrd2 i N-Ankrd2 koji su sadržavali N-terminalni region proteina Ankrd2. Sa konstruktima AC-Ankrd2, C-Ankrd2 i oligoC-Ankrd2, kao i sa GST kontrolom nije dobijen signal. Konstrukt AC-Ankrd2 je obuhvatao sve ankirinske ponovke i C-terminalni region tako da se moglo zaključiti da poliklonska antitela na N-



Slika 13. Precizno mapiranje epitopa monoklonskog i poliklonskih antitela na C-terminalni region proteina Ankrd2.

Različiti regioni proteina Ankrd2 fuzionisani sa GST eksprimirani su u *E. coli*. Ujednačene količine rekombinantnih proteina su nanešene na SDS poliakrilamidne gelove i analizirane su Western blot analizom. Korišćena su sledeća primarna antitela: anti F-Ankrd2 (B), anti N-Ankrd2 (C), anti C-Ankrd2 (D) i monoklonsko antitelo (E). Serum neimunizovne životinje (F) je korišćen kao negativna kontrola. Na gel koji je bojen (A) nanešena je pedeset puta veća količina proteina. Brojevima sa leve strane označene su molekulske mase proteina u kDa.

terminalni region ne prepoznaju epitop u okviru ankirinskih ponovaka, što znači da su specifična za protein Ankrd2 i da ne bi trebalo da reaguju sa drugim proteinima koji takodje imaju ankirinske ponovke.

Sa antitelom na C-terminalni region proteina Ankrd2 (Slika 13, D) signal je dobijen sa konstruktima F-Ankrd2, DC-Ankrd2, UC-Ankrd2, AC-Ankrd2, C-Ankrd2 i oligoC-Ankrd2, dok sa konstruktima N-Ankrd2 i samim GST proteinom antitelo nije reagovalo. Na osnovu ovih rezultata moglo se zaključiti da poliklonska antitela na C-terminalni region reaguju sa najmanje dva potencijalna epitopa u tom regionu i ne prepoznaju deo proteina sa ankirinskim ponovcima te su i ona specifična za protein Ankrd2. Monoklonsko antitelo (Slika 13, E) je reagovalo sa konstruktima F-Ankrd2, AC-Ankrd2, C-Ankrd2 i oligoC-Ankrd2, dok signal nije dobijen sa konstruktima DC-Ankrd2, UC-Ankrd2, N-Ankrd2 i samim GST proteinom. Zaključeno je da je epitop monoklonskog antitela u okviru fragmenta od 317-333 ak, čime je potvrđena teorijska pretpostavka.

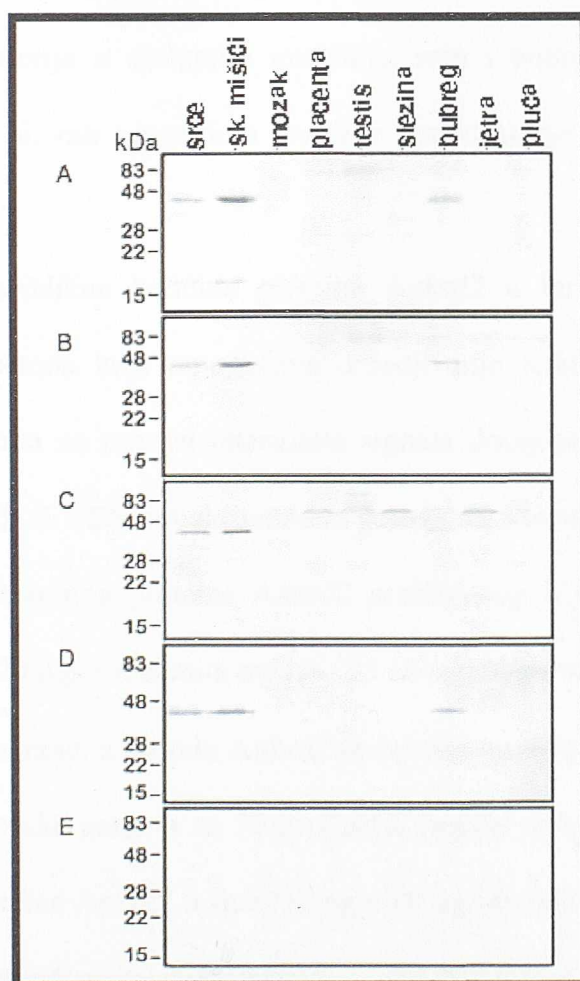
Sa serumom neimunizovane životinje (Slika13, F) nije dobijen signal ni sa jednim konstruktom na osnovu čega je zaključeno da životinje nisu posedovale antitela na protein Ankrd2 ili njemu sličan protein pre imunizacije.

Ovim eksperimentima je potvrđeno da su poliklonska antitela na N- i C-terminalni region proteina Ankrd2 i monoklonsko antitelo specifična za protein Ankrd2 i da dobijeni rezultati predstavljaju realnu sliku, a ne artefakt usled reagovanja ovih antitela sa drugim proteinima koji imaju ankirinske ponovke.

IV.3. EKSPRESIJA PROTEINA Ankrd2 U HUMANIM TKIVIMA

Tkivna specifičnost ekspresije proteina Ankrd2 analizirana je Western blot analizom različitih humanih tkiva. Na ovaj način je potvrđeno da su mišići skeleta glavno mesto ekspresije proteina Ankrd2. Korišćeni su komercijalni proteinski ekstrakti (Clontech) sledećih

humanih tkiva: srca, mišića skeleta, mozga, placente, testisa, ovarijuma, slezine, bubrega, jetre i pluća. Na 15 % SDS poliakrilamidni gel nanošeno je 10 µg proteina izolovanih iz srca i mišića skeleta i 60 µg proteina izolovanih iz ostalih tkiva. Nakon razdvajanja elektroforezom, proteini su preneti na najlonsku membranu (Immobilon P, Millipore), a kao primarna antitela korišćena su sva četiri antitela na protein Ankrd2, poliklonska antitela na ceo protein (Slika 14, A), na N-terminalni (Slika 14, B) i C-terminalni region (Slika 14, C), kao i monoklonsko antitelo (Slika 14, D). Serum neimunizovane životinje je korišćen kao negativna kontrola (Slika 14, E).

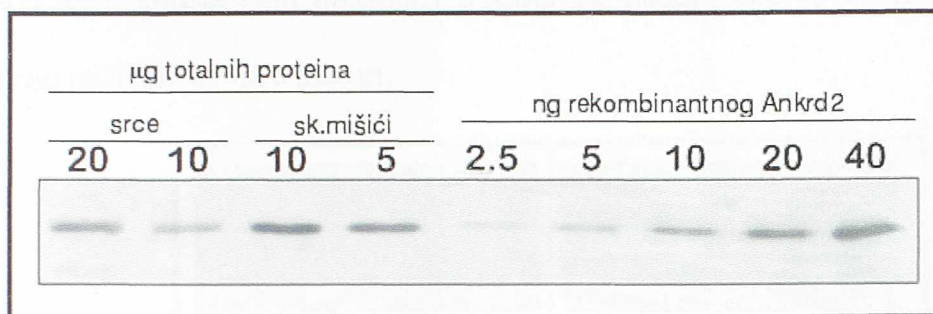


Slika 14. Ekspresija proteina Ankrd2 u humanim tkivima.

Protein Ankrd2 je detektovan u različitim humanim tkivima Western blot analizom. Na 15% SDS poliakrilamidnim gelovima su razdvojeni proteini srca i skeletnih mišića (10µg), kao i mozga, placente, testisa, slezine, bubrega, jetre i pluća (60µg). Proteini su preneti na najlonske membrane (Immobilon P, Millipore), a protein Ankrd2 je detektovan mišjim poliklonskim antitelima na: F-Ankrd2 (A), N-Ankrd2 (B) i C-Ankrd2 (C) kao i monoklonskim antitelom na C-Ankrd2 (D). Kao negativna kontrola korišćen je serum neimunizovane životinje (E). Sva primarna antitela su bila 200 puta razblažena. Kao standard molekulskih masa korišćen je bojeni marker širokog opsega (Sigma). Sa leve strane brojevima su označene molekulske mase proteina u kDa.

Sva primarna antitela su bila razblažena 200 puta. Kao sekundarno antitelo korišćeno je anti-mišje antitelo konjugovano sa alkalnom fosfatazom (Sigma), razblaženo 10000 puta a proteini su vizualizovani supstratima BCIP i NBT. Na gel je takodje nanošen i marker molekularne mase (kolor marker širokog opsega, Sigma). Sa svim antitelima je detektovana traka od 42 kDa koja je najjača u skeletnim mišićima, zatim u srcu, a takodje je detektovana i traka iste veličine u bubregu. Osim toga, poliklonskim antitelima na C-terminalni region proteina Ankrd2, u placenti, testisu, slezini i jetri detektovan je i protein veće molekulske mase, od oko 70 kDa ali identitet tog proteina nije utvrđen. Ovakav ekspresioni profil proteina Ankrd2, tj. njegova ekspresija u skeletnim mišićima, srcu i bubregu potvrdila je rezultate dobijene Northern blot analizom i metodom reverzne amplifikacije (RT-PCR) (Pallavicini *et al.*, 2000).

Za određivanje približne količine proteina Ankrd2 u humanom srcu i skeletnim mišićima korišćena je metoda koja omogućava određivanje relativne količine određenog proteina u ekstraktima tkiva na osnovu intenziteta signala dobijenog Western blot analizom (Valle *et al.*, 1997). Na 15 % SDS poliakrilamidne gelove su nanete poznate količine (2,5, 5, 10, 20 i 40 ng) rekombinantnog proteina Ankrd2 prečišćenog u denaturisanim uslovima i totalni proteini srca (10 i 20 μ g) i skeletnih mišića (5 i 10 μ g). Nakon elektroforeze, proteini su preneti na najlonsku membranu, a protein Ankrd2 je detektovan Western blot analizom (Slika 15). Korišćena su poliklonska antitela na N-terminalni region proteina razblažena 400 puta. Detektovano je manje proteina Ankrd2 u srcu (10 ng u 10 μ g totalnih proteina ili 0,1 %) nego u skeletnim mišićima (20 ng u 5 μ g totalnih proteina ili 0,4 %). Kao pozitivna kontrola korišćen je humani α -aktin koga ima oko 20 % u srcu i skeletnim mišićima što je u saglasnosti sa drugim rezultatom od 19 % u mišićima zeca (Pollard, 1981). Ova metoda samo daje približnu količinu nekog proteina u mišićnom tkivu i bazirana je na dve pretpostavke: proteini iste veličine se istom efikasnošću prenose sa gela na membranu i antitela imaju isti afinitet prema



Slika 15. Western blot analiza poznatih količina rekombinantnog proteina Ankrd2 (desno) i poznatih količina ukupnih proteina (levo) humanog srca (10 µg i 20 µg) i skeletnih mišića (5 µg i 10 µg).

Rekombinantni protein poseduje dodatne aminokiseline usled prisustva His markera pa je malo veći od nativnog proteina i putuje sporije od njega.

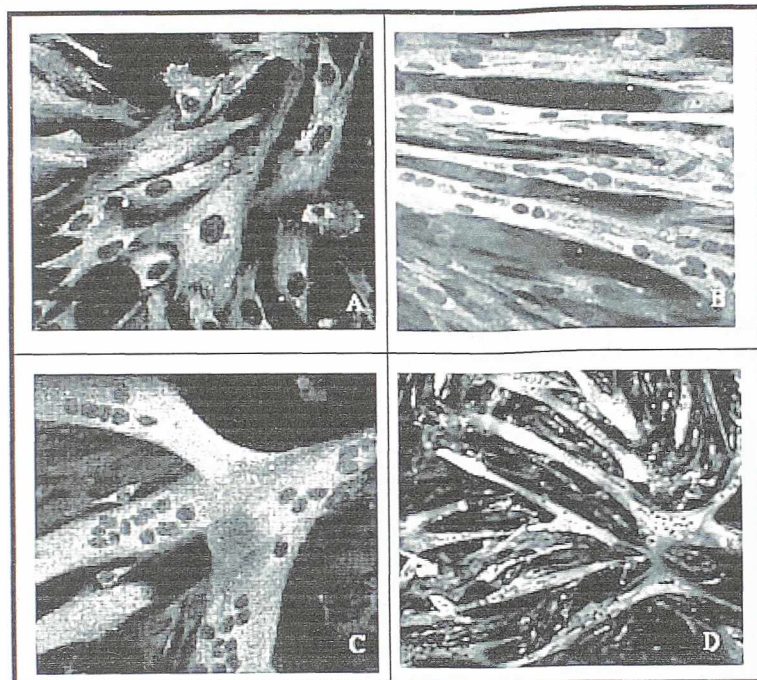
prema nativnom i rekobinantnom proteinu. Unutar ovih ograničenja ova metoda daje razumnu aproksimaciju količine nekog proteina u ispitivanom uzorku.

IV.4. LOKALIZACIJA PROTEINA Ankrd2 U MIŠIĆNIM ĆELIJAMA TOKOM NJIHOVE DIFERENCIJACIJE

Za lokalizovanje proteina Ankrd2 unutar ćelije i praćenje njegove ekspresije tokom diferencijacije mišićnih ćelija korišćene su humane primarne mišićne ćelije CHQ5B i mišje mišićne ćelije C2C12. Gajene u medijumu koji sadrži serum, nediferencirane mišićne ćelije, mioblasti, prolaze kroz normalan ćelijski ciklus i dele se (Slika 16, A). Postizanjem konfluentnosti od oko 80% i zamenom medijuma, mioblasti prestaju da se dele, izdužuju se, rastu (Slika 16, B) i počinju da se fuzionišu. Stvaraju se velike višejedarne mišićne ćelije, mioblasti (Slika 16, C i D).

Mišićne ćelije u kulturi su gajene u medijumu sa 20 % serumom, a zatim su diferencirane u medijumu bez seruma, a u prisustvu zamene za serum, UltroserG (GibcoBRL). Upotrebom ovog preparata postiže se znatno efikasnija diferencijacija mišićnih ćelija (Benders

et al., 1991) nego korišćenjem insulina i transferina, faktora koji se uobičajeno koriste za diferencijaciju mišićnih ćelija u kulturi.

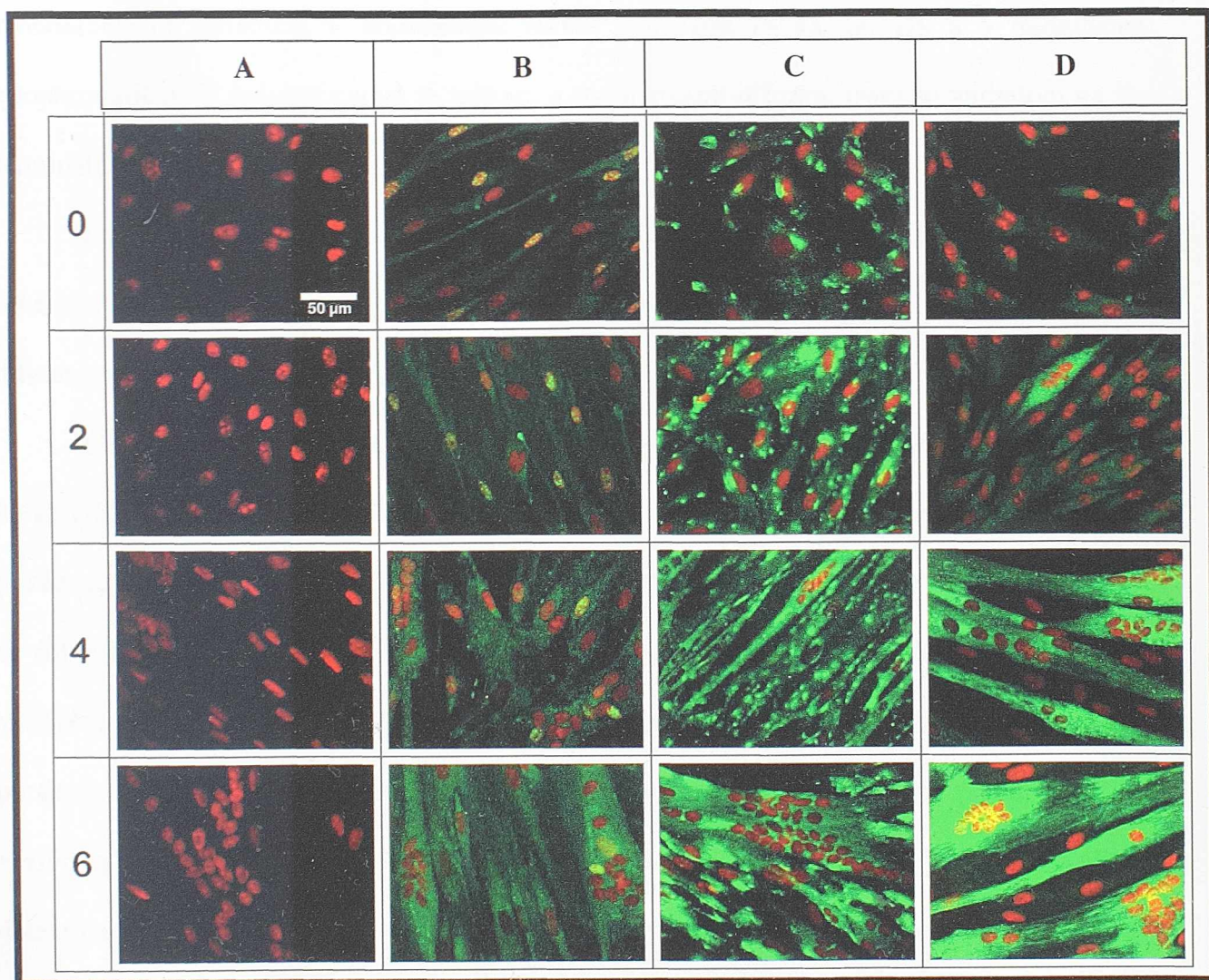


Slika 16. Faze u rastu i diferencijaciji mišićnih ćelija na primeru humanih primarnih mišićnih ćelija CHQ5B.

A) mioblasti, nediferencirane mišićne ćelije, (uvećanje 40x), B) miotube, mišićne ćelije u ranoj fazi diferencijacije, (uvećanje 40x), C) miotuba u kasnoj fazi diferencijacije sa velikim brojem jedara, (uvećanje 40x), D) diferencirane mišićne ćelije, (uvećanje 10x).

Pre početka diferencijacije i svaki dan nakon diferencijacije, metodom indirektno imunofluorescencije praćena je ekspresija proteina Ankrd2 u nediferenciranim (Slika 17, 0 dana) i diferenciranim (Slika 17, 2, 4 i 6 dana) mišićnim ćelijama. Kao primarna antitela korišćena su sva antitela na protein Ankrd2, a na Slici 17 su prikazani rezultati dobijeni sa monoklonskim antitelom (Slika 17, B) razblaženim 30 puta i poliklonskim antitelima na N-terminalni region proteina Ankrd2 (Slika 17, C) razblaženim 40 puta. Antitelom na miozin, razblaženim 50 puta, detektovan je ovaj protein u miotubama jer se miozin eksprimira samo u diferenciranim ćelijama (Slika 17, D). Miozin je korišćen kao kontrola diferencijacije mišićnih ćelija, dok je serum neimunizovane životinje korišćen kao negativna kontrola (Slika 17, A).

Kao sekundarno antitelo korišćeno je anti mišje antitelo konjugovano sa fluoresceinom (FITC) razblaženo 200 puta. Preparati su analizirani na konfokalnom mikroskopu Axiovert 100M (Zeiss), koristeći kompjuterski program LSM510. Može se primetiti da intenzitet dobijenog signala u toku diferencijacije raste, tj. da se količina proteina Ankrd2 povećava tokom diferencijacije mišićnih ćelija. Proteina najmanje ima u mioblastima, a najviše u miotubama.



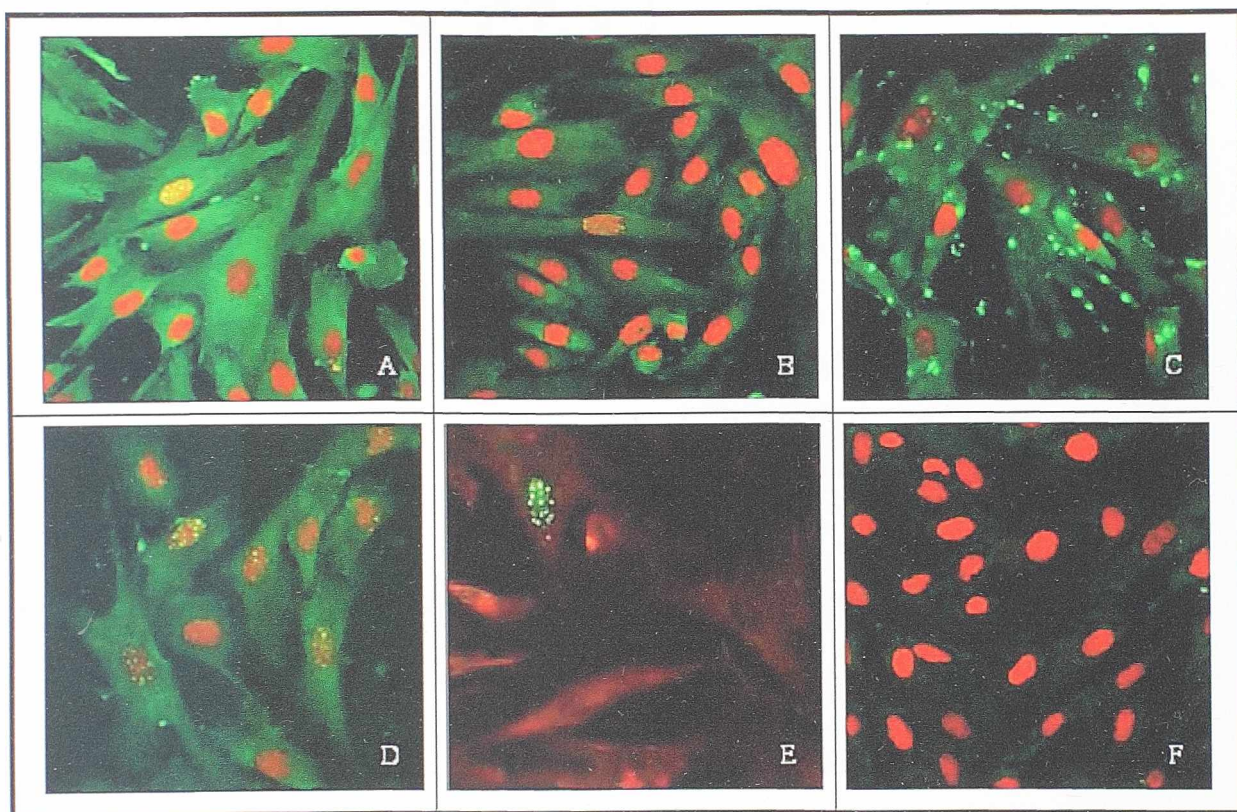
Slika 17. Ekspresija proteina Ankrd2 u humanim primarnim mišićnim ćelijama CHQ5B u toku diferencijacije.

Protein Ankrd2 je detektovan monoklonskim antitelom (B) i poliklonskim antitelima na N-terminalni region proteina (C) Kao dokaz da su se ćelije diferencirale, antitelom na miozin detektovan je ovaj protein (D) koji se eksprimira samo u diferenciranim ćelijama (2, 4 i 6). Kao negativna kontrola korišćen je serum neimunizovane životinje (A). Jedra su bojena propidijum jodidom (crveno), a preparati su analizirani na konfokalnom mikroskopu, uvećanje 40x. Brojevima sa leve strane je označeno koliko dana su ćelije diferencirane.

Medjutim sa različitim antitelima na protein Ankrd2 dobijen je različit oblik i lokalizacija fluorescentnog signala. U humanim primarnim mišićnim ćelijama CHQ5B sa poliklonskim antitelima na N-terminalni region signal je samo citoplazmatični, i u mioblastima (lokalizovan u pojedinim delovima ćelije) (Slika 18, C) i u miotubama. Sa drugim poliklonskim antitelima, na ceo protein i C-terminalni region, detektovan je signal i u citoplazmi i u jedru u mioblastima (Slika 18, A i B) a samo u citoplazmi u miotubama. Sa monoklonskim antitelom, u mioblastima signal je jedarni (Slika 18, D), a u miotubama citoplazmatični. U jedrima signal je tačkast, a u citoplazmi difuzan, osim sa antitelom na N-terminalni region proteina.

Dakle, na osnovu rezultata imunofluorescencije može se zaključiti da je protein Ankrd2 lokalizovan i u citoplazmi i u jedru u nediferenciranim humanim mišićnim ćelijama, dok se u diferenciranim ćelijama nalazi isključivo u citoplazmi.

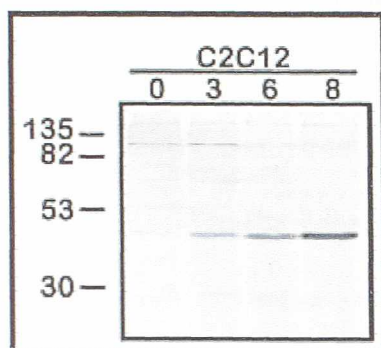
Osim u citoplazmi, protein Ankrd2 je lokalizovan i u jedrima mioblasta u obliku karakterističnih tačaka. Broj ćelija sa jedarnim signalom varirao je u raznim eksperimentima i pokazano je da je uzrok tog fenomena serum koji je korišćen za pripremanje medijuma u kome su ćelije rasle. Kada je korišćen Seromed serum procenat ćelija sa jedarnim signalom je bio veoma nizak, od 1-10 %. Medjutim, upotrebom Mioclone seruma, taj procenat je značajno porastao, na 50-90 %. Pošto su u kulturi humanih primarnih mišićnih ćelija prisutne i ćelije vezivnog tkiva, antitelom na dezmin je pokazano da su ćelije u kojima je protein Ankrd2 detektovan u jedru zaista mišićne, jer se dezmin eksprimira samo u mišićnim ćelijama (Slika 18, E). U mišjim mišićnim ćelijama C2C12 protein Ankrd2 nije detektovan monoklonskim antitelom, dok je sa ostalim antitelima dobijen citoplazmatični signal. Za razliku od humanih mišićnih ćelija, protein Ankrd2 se može detektovati samo u citoplazmi mišjih mioblasta i miotuba.



Slika 18. Unutarćelijska lokalizacija proteina Ankrd2 u nediferenciranim primarnim mišićnim ćelijama CHQ5B.

Protein Ankrd2 je detektovan indirektnom imunofluorescencijom poliklonskim antitelima na ceo protein (A), poliklonskim antitelima na C-terminalni region (B), poliklonskim antitelima na N-terminalni region (C) i monoklonskim antitelom (D). Antitelom na dezmin dokazano je prisustvo ovog proteina koji se eksprimira samo u mišićnim ćelijama (E). Serum neimunizovane životinje je korišćen kao negativna kontrola (F). Jedra su bojena propidijum jodidom (crveno). Preparati su analizirani na konfokalnom mikroskopu, uvećanje 40x.

Takodje je i Western blot analizom pokazano da u humanim i mišjim (Slika 19) mišićnim ćelijama dolazi do povećanja količine proteina Ankrd2 u toku diferencijacije. Po 60 µg proteina ekstrakta humanih i mišjih mioblasti i miofibrila diferenciranih različit broj dana pušteno je na 15 % SDS poliakrilamidne gelove, a posle elektroforeze proteini su preneti na najlonsku membranu. Protein Ankrd2 je detektovan poliklonskim antitelima na N-terminalni region proteina razblaženim 200 puta.



Slika 19. Western blot analiza proteina ćelijskih ekstrakata mišjih mišićnih ćelija C2C12.

Na 15 % SDS poliakrilamidnim gelovima razdvajano je po 60 µg proteina izolovanih iz nediferenciranih (0) i diferenciranih (3, 6 i 8) ćelija. Protein Ankrd2 je detektovan poliklonskim antitelima na N-terminalni region proteina. Sa leve strane brojevima su označene molekulske mase proteina u kDa.

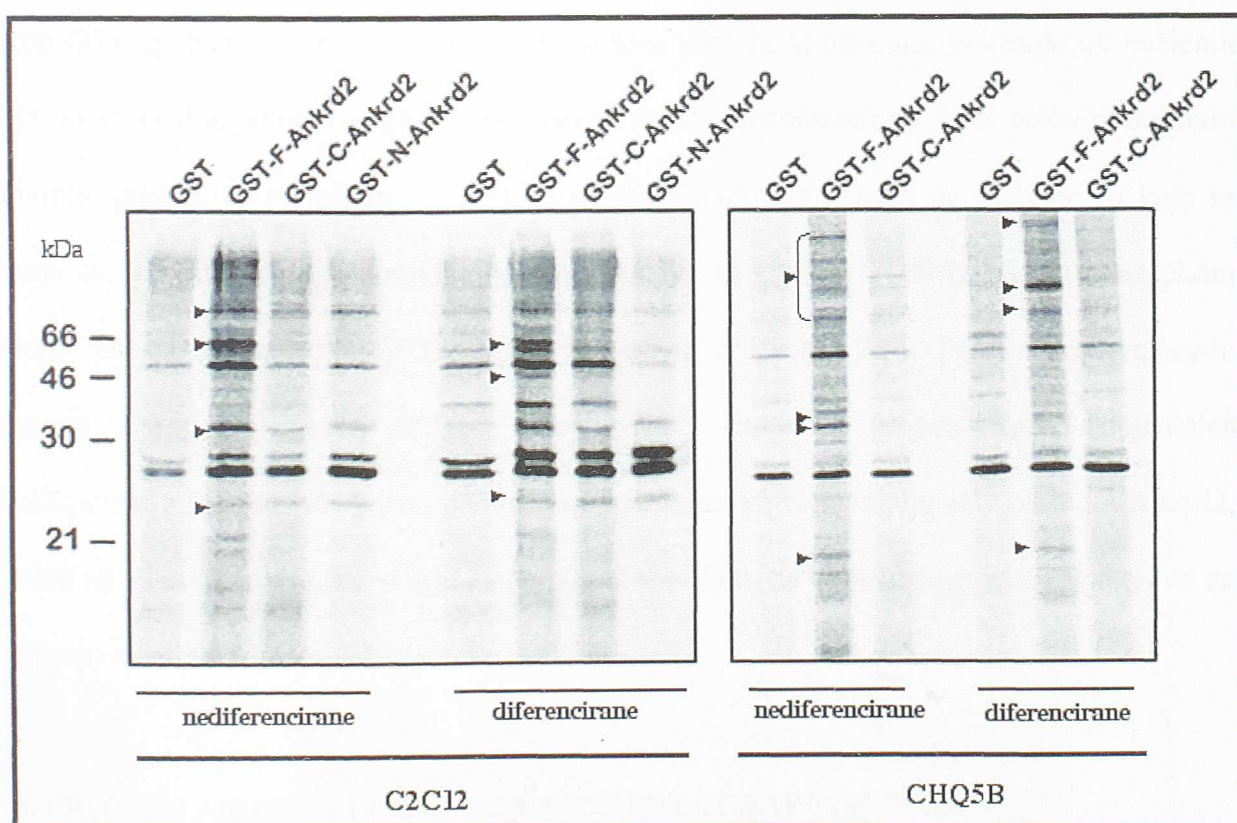
IV.5. INTERAKCIJA PROTEINA Ankrd2 SA DRUGIM MIŠIĆNIM PROTEINIMA

U cilju identifikacije proteina koji interaguju sa proteinom Ankrd2 i koji bi mogli da ukažu na njegovu potencijalnu funkciju radjeni su tzv. GST „pull down” eseji. Metoda se sastoji u inkubaciji radioaktivno obeleženih proteina ćelijskog ekstrakta i rekombinantnog proteina od interesa fuzionisanog sa GST markerom preko koga je vezan za glutation sefarozu pri čemu se stvaraju imobilisani kompleksi koje je lako prečistiti od ostatka reakcione smeše. Nakon inkubacije, proteini dobijenog kompleksa se razdvajaju elektroforezom na SDS poliakrilamidnim gelovima i vizualizuju autoradiografijom.

U ovom radu korišćena su tri rekombinantna proteina sa GST markerom: skoro ceo protein Ankrd2, F-Ankrd2-GST (5-333 ak), N-terminalni region proteina Ankrd2, N-Ankrd2-GST (5-120 ak) i C-terminalni region proteina Ankrd2, C-Ankrd2-GST (279-333 ak). N-Ankrd2-GST i C-Ankrd2-GST nisu sadržavali ankirinske ponovke da ne bi došlo do stvaranja nespecifičnih kompleksa. Prečišćeni rekombinantni proteini su bili vezani za glutation sefarozu preko GST markera. Kao izvor radioaktivno obeleženih proteina korišćeni su ekstrakti humanih (CHQ5B) i mišjih (C2C12) mioblasta i miotuba čiji su proteini bili radioaktivno obeleženi gajenjem ćelija u medijumu koji je sadržavao aminokiseline metionin i cistein u koje

je bio ugradjen radioaktivni sumpor [³⁵S]. Posle inkubacije i uklanjanja nespecifično vezanih proteina, kompleksi su razdvajani elektroforezom na 15 % SDS poliakrilamidnim gelovima. Posle elektroforeze gelovi su sušeni i analizirani na aparatu Cyclon koji je povezan sa kompjuterom u cilju dobijanja autoradiografije i analize podataka sa radioaktivnih gelova. Gel se najpre eksponira na specijalnoj podlozi koja se ekscitira emisijom radioaktivnog zračenja, a zatim se podloga smesti u specijalno kućište aparata koji je povezan sa kompjuterom. Podloga je nekoliko puta osetljivija od tradicionalno korišćenog filma za autoradiografije.

Na Slici 20 su prikazani rezultati GST „pull down” eseja dobijeni sa ekstraktima humanih (CHQ5B) i mišjih (C2C12) mioblasta i miotuba nakon inkubacije sa različitim fragmentima proteina Ankrd2.



Slika 20. GST „pull down”eseji.

Rekombinantni proteini sa GST markerom, koji su sadržavali različite fragmente proteina Ankrd2, inkubirani su sa radioaktivno obeleženim proteinima nediferenciranih i diferenciranih mišjih C2C12 i humanih CHQ5B mišićnih ćelija. Proteini dobijenih kompleksa su razdvajani elektroforezom na SDS poliakrilamidnim gelovima i vizualizovani autoradiografijom. Sa leve strane brojevima su označene molekulske mase proteina u kDa.

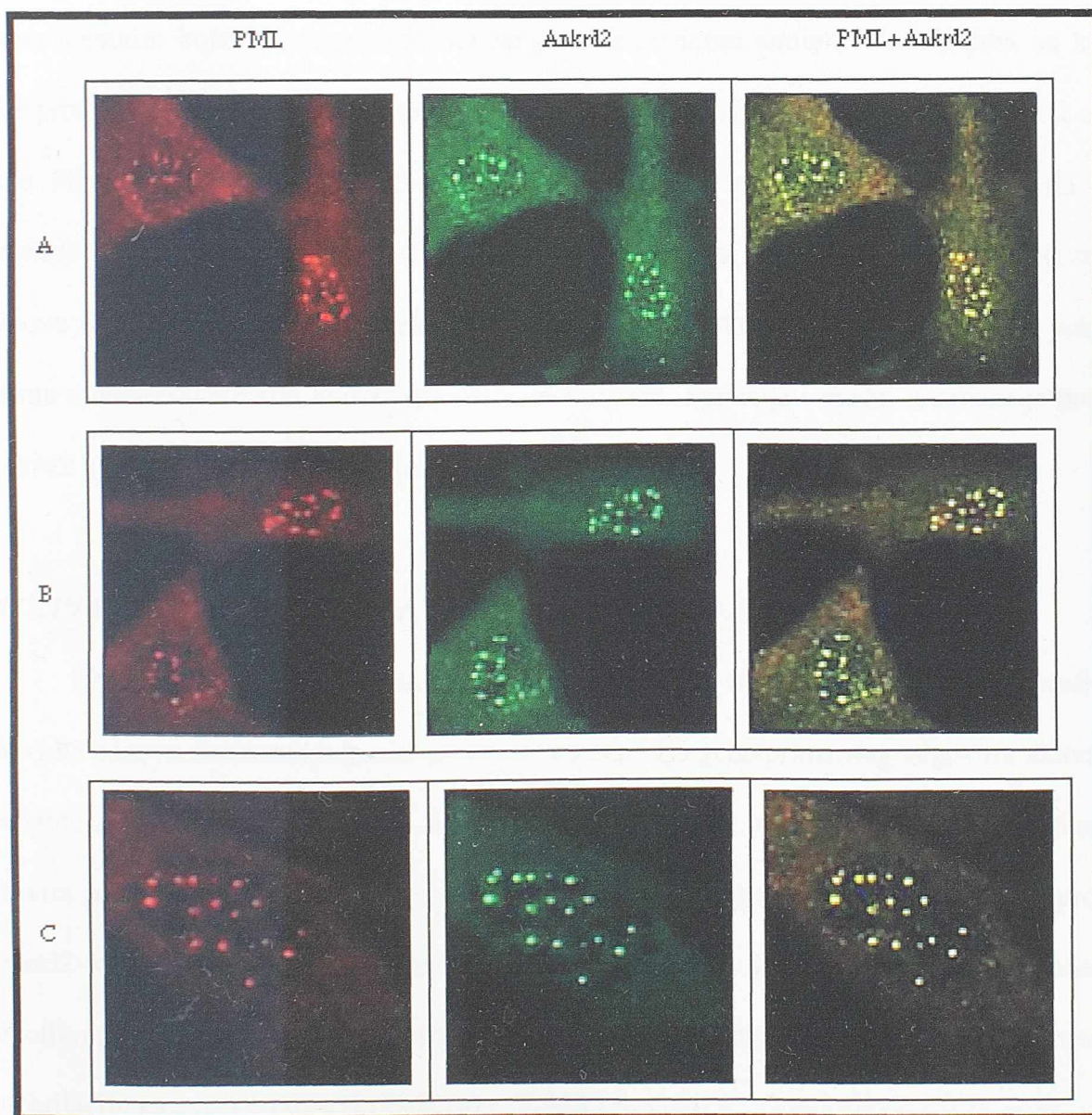
Dobijeni rezultati pokazuju da se za Ankrd2 vezalo nekoliko proteina koji su na Slici 20 obeleženi strelicama. GST protein, korišćen kao negativna kontrola, je takodje vezao neke proteine iz ekstrakata, ali je poznato da mišićne ćelije imaju dosta "lepljivih proteina", kao što je aktin, koji se nespecifično vezuju za druge proteine. Takodje se može uočiti da se proteini koji se vezuju za Ankrd2 u nediferenciranim i diferenciranim mišićnim ćelijama (i humanim i mišjim) razlikuju po molekulskim masama.

Na ovaj način je utvrđeno da postoje proteini koji se vezuju za protein Ankrd2, a jedina informacija o njima je njihova molekulska masa. Za identifikaciju vezanih proteina moraju se primeniti druge metode, kao što su Western blot analiza i masena spektrometrija. U ovom radu je pokušano identifikovanje nekih od proteina koji se vezuju za Ankrd2 Western blot analizom. Nakon GST „pull down” eseja u kojima je korišćen proteinski ekstrakt neobeležanih mišićnih ćelija, proteini dobijenog kompleksa razdvojeni su elektroforezom na SDS poliakrilamidnim gelovima, preneti na membranu i detektovani specifičnim antitelima na proteine za koje se sumnja da su potencijalni kandidati koji se vezuju za protein Ankrd2. Ovim postupkom testirani su cdc2 kinaza, MEF2A (myocyte enhancer factor 2A), PLZF (promyelocytic leukemia Z finger protein), PML (promyelocytic leukemia protein), p65 subjednica transkripcionog faktora NFkB kao potencijalni kandidati koji interaguju sa proteinom Ankrd2. Nijedan od analiziranih proteina nije dao pozitivan rezultat, na osnovu čega je zaključeno da ne interaguju sa proteinom Ankrd2.

IV.6. PROTEIN Ankrd2 JE LOKALIZOVAN U PML JEDARNIM TELIMA

Poznato je da je veliki broj faktora koji učestvuju u transkripciji i obradi RNK lokalizovan u naročitim jedarnim odeljcima koji, kad se analiziraju indirektnom imunofluorescencijom, daju signal u obliku tački. Jedan od takvih odeljaka su i takozvana PML tela koja su najverovatnije uključena u regulaciju transkripcije.

Koristeći monoklonsko antitelo na protein Ankrd2 pokazano je da se on nalazi u jedrima humanih mišićnih ćelija, u tačkastim strukturama koje variraju po broju i veličini (Slika 21, Ankrd2). Da bi utvrdili da li se protein Ankrd2 nalazi u PML jedarnim telima uradjeni su eksperimenti dvostruke imunofluorescencije. Protein PML, kao glavna komponenta PML jedarnih tela, detektovan je kozjim poliklonskim antitelima (SantaCruz) razblaženim 100 puta i sekundarnim antitelom na kozji imunoglobulin konjugovan sa fluorescentnom bojom



Slika 21. Kolokalizacija proteina Ankrd2 i PML u jedarnim telima.

Proteini PML i Ankrd2 su detektovani indirektnom imunofluorescijom, a preparati su analizirani na konfokalnom mikroskopu. A) i B) uvećanje 40x, C) uvećanje 100x.

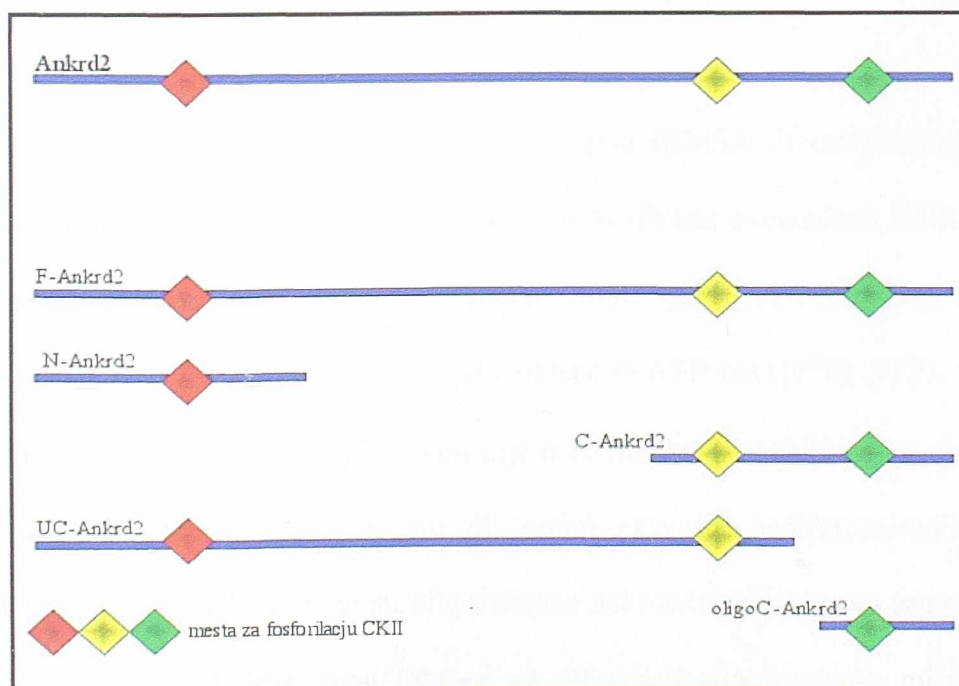
Alexa Fluor 546 (Molecular Probes) razblaženim takodje 200 puta. PML detektovan na ovaj način, vidi se u obliku crvenih tačaka (Slika 21, PML). Ankrd2 je detektovan monoklonskim antitelom razblaženim 30 puta i sekundarnim antitelom na mišji imunoglobulin konjugovan sa fluoresceinom (Sigma) razblaženim 200 puta, tako da signali zelene boje predstavljaju Ankrd2 (Slika 21, Ankrd2). Preparati su pregledani na konfokalnom mikroskopu koji omogućava kompjutersko preklapanje pojedinačnih slika dobijenih detekcijom dva proteina različitim fluorescentnim bojama vezanim za odovarajuća sekundarna antitela. Na mestima na kojima dva proteina kolokalizuju dobija se signal žute boje usled preklapanja signala crvene i zelene boje. Na Slici 21 (PML+Ankrd2) se vidi da su skoro svi signali žute boje, što znači da su proteini PML i Ankrd2 lokalizovani na istim mestima u jedrima humanih mioblasta. Na osnovu ovih rezultata može se zaključiti da je protein Ankrd2 lokalizovan u PML jedarnim telima u nediferenciranim humanim mišićnim ćelijama. Funkcija i značaj lokalizacije proteina Ankrd2 u PML telima za sada su još uvek nepoznati.

IV.7. *IN VITRO* FOSFORILACIJA PROTEINA Ankrd2 KAZEIN KINAZOM II

Ekspresija mišjeg proteina Ankrd2 je indukovana mehaničkim istežanjem mišića *in vivo* i na osnovu ove osobine može se uključiti u familiju gena primarnog odgovora aktiviranih mehaničkim stimulansom (Kemp *et al.*, 2000). Jedan od načina da mehanički stimulans aktivira protein Ankrd2 može biti i putem fosforilacije. Analizom primarne strukture proteina Ankrd2 kompjuterskim programom ScanProsite otkriveno je da protein Ankrd2 poseduje nekoliko potencijalnih mesta za fosforilaciju različitim kinazama, medju kojima su i 4 mesta za fosforilaciju kazein kinazom II (T-4, T-71, T-288 i S-322).

Da bismo potvrdili da su ova potencijalna mesta za fosforilaciju kazein kinazom II zaista funkcionalna, uradjeni su eksperimenti *in vitro* fosforilacije. Fragmenti proteina Ankrd2, fuzionisani sa GST i vezani za glutation sefarozu, koji su sadržavali različita mesta za

fosforilaciju kazein kinazom II (šematski pregled korišćenih fragmenata dat je na Slici 22) inkubirani su sa radioaktivno obeleženim ATP-om ($\gamma^{32}\text{P-ATP}$) i kazein kinazom II (Gibco BRL). Posle desetominutne inkubacije na 30°C produkti reakcije su razdvajani elektroforezom na 15 % SDS poliakrilamidnim gelovima. Posle elektroforeze gel je najpre obojen pa osušen, a zatim eksponiran na Kodakovom filmu za autoradiografije. Preklapanjem obojenog i osušenog gela sa autoradiografijom detektovana je ugradnja radioaktivno obeleženog ATP-a u proteinske fragmente F-Ankrd2-GST, C-Ankrd2-GST i oligoC-Ankrd2-GST. Na osnovu dobijenih rezultata zaključeno je da se samo četvrto mesto za fosforilaciju kazein kinazom II (S-322) može *in vitro* fosforilisati ovom kinazom. Ovaj rezultat ukazuje da modifikacija proteina Ankrd2 fosforilacijom može modulirati njegovu funkciju.



Slika 22. Šematski prikaz fragmenata proteina Ankrd2 koji sadrže različita potencijalna mesta za fosforilaciju kazein kinazom II, označena rombovima različite boje.

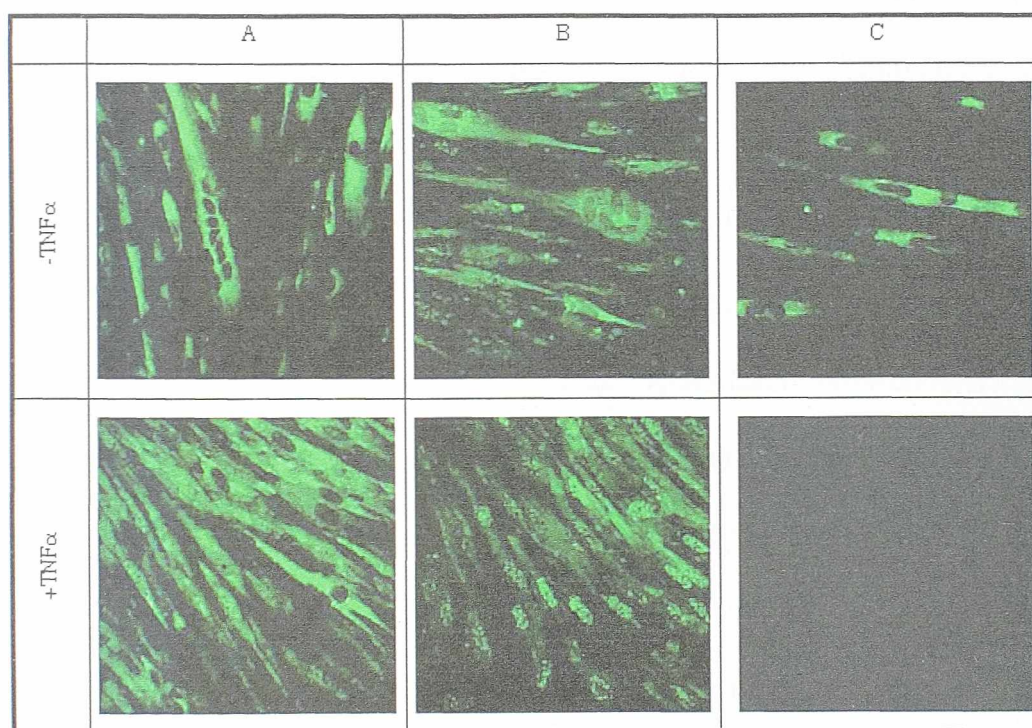
IV.8. PROTEIN Ankrd2 NE SPREČAVA FORMIRANJE KOMPLEKSA IZMEDJU TRANSKRIPCIONOG FAKTORA NFkB I DNK

Protein Ankrd2 je po svojoj strukturi i profilu ekspresije veoma sličan proteinu Ikb koji ima funkciju inhibitora transkripcionog faktora NFkB. Pretpostavljeno je da Ankrd2 ima funkciju mišićno specifičnog inhibitora transkripcionog faktora NFkB koji ima značajnu ulogu u toku diferencijacije mišićne ćelije. Da bi se utvrdilo da li neki protein ima funkciju proteina Ikb, tj. da li se vezuje za transkripcioni faktor NFkB i sprečava njegovu migraciju u jedro i vezivanje za DNK (što dovodi do aktivacije transkripcije ciljnih gena) koristi se sledeća strategija: kada se proteinu NFkB ponudi DNK koja sadrži kB vezivno mesto dolazi do formiranja kompleksa izmedju DNK i NFkB, što se ogleda u retardaciji DNK na gelu usled formiranja kompleksa. Ako se u reakcionu smešu uključi i protein koji ima Ikb aktivnost on će se vezati za NFkB i dobijeni kompleks se neće vezati za DNK, tako da neće doći do retardacije DNK na gelu.

U ovom radu za eksperimente retardacije na gelu (EMSA-Electrophoretic Mobility Shift Assay) kao proba koja sadrži kB vezivno mesto je korišćena dvolančana DNK dužine 22 bp čija je sekvenca data na Slici 9a u poglavlju Materijal i metode. Ovaj dvolančani oligonukleotid je na oba 5' kraja bio obeležen radioaktivnim ATP-om ($[\gamma^{32}\text{P}] \text{ATP}$).

Kao izvor aktivnog proteina NFkB, koji nije u kompleksu sa inhibitorom, tj. koji može da se veže za DNK, korišćeni su jedarni ili totalni ekstrakti nediferenciranih humanih primarnih mišićnih ćelija CHQ5B koje su bile tretirane nekrotičnim faktorom tumora (TNF α -tumor necrosis factor α). Uticaj ovog faktora na diferencijaciju humanih mišićnih ćelija CHQ5B i na unutarćelijsku lokalizaciju NFkB prikazan je na Slici 23. Proteini NFkB, Ankrd2 i miozin su detektovani indirektnom imunofluorescencijom u humanim primarnim mišićnim ćelijama CHQ5B tretiranim i netretiranim nekrotičnim faktorom tumora α . Protein Ankrd2 (Slika 23, B) je detektovan monoklonskim antitelom razblaženim 100 puta, NFkB (Slika 23,

A) je detektovan monoklonskim antitelom na humani p65 (Santa Cruz) razblaženim 100 puta, a miozin (Slika 23, C) monoklonskim antitelom MF20 razblaženim 50 puta. Kao sekundarno antitelo korišćeno je anti mišje antitelo konjugovano sa fluoresceinom (FITC) razblaženo 200 puta. Preparati su pregledani na konfokalnom mikroskopu.



Slika 23. Aktivacija transkripcionog faktora NF κ B nekrotičnim faktorom tumora α (TNF α).

Indirektnom imunofluorescencijom detektovani su NF κ B (A), Ankrd2 (B) i miozin (C) u primarnim humanim mišićnim ćelijama CHQ5B netretiranim (-TNF α) i tretiranim (+TNF α) 24 h sa 10 ng/ml TNF α ..

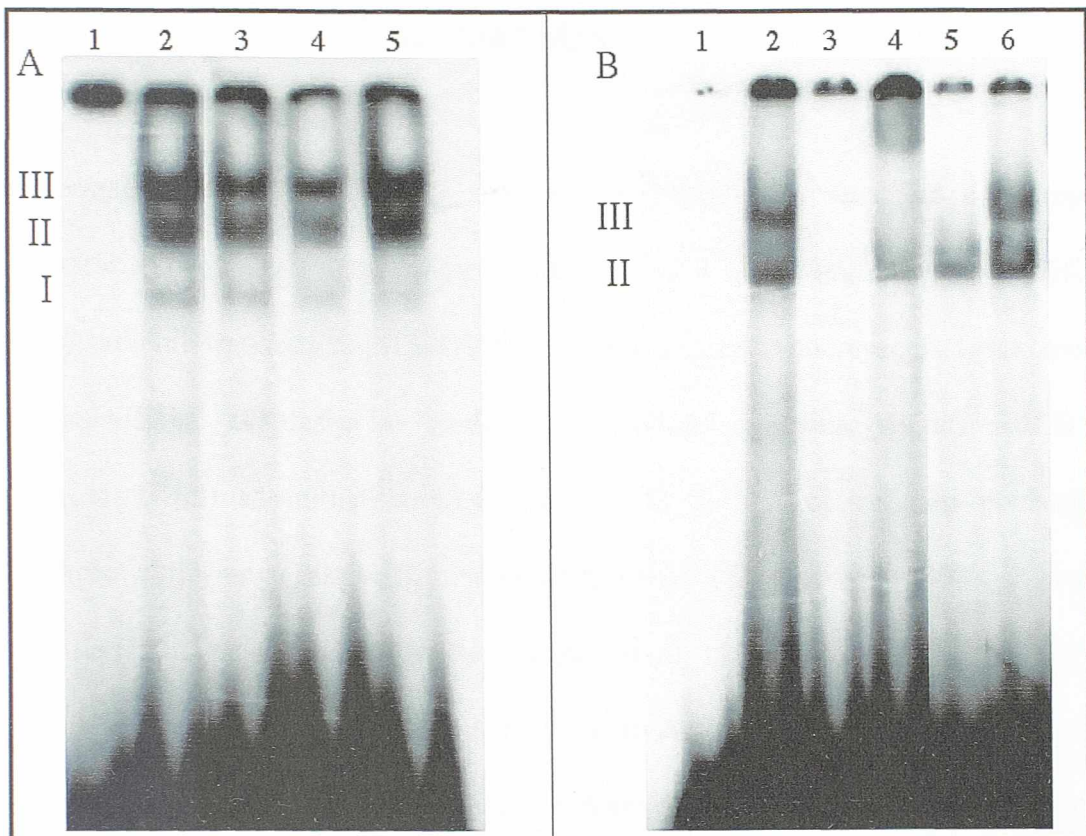
Nekrotični faktor tumora sprečava diferencijaciju humanih mišićnih ćelija što je potvrđeno nedostatkom ekspresije miozina u tim ćelijama (Slika 23, C), ali ne utiče na lokalizaciju proteina Ankrd2 (Slika 23, B). Western blot analizom je pokazano da je nivo ekspresije proteina Ankrd2 u ćelijama koje su bile tretirane nekrotičnim faktorom tumora isti kao i u ćelijama koje nisu bile tretirane tim faktorom što znači da nekrotični faktor tumora ne utiče na nivo ekspresije proteina Ankrd2 u humanim mišićnim ćelijama. Takodje se može

uočiti, osim citoplazmatične, i jedarna lokalizacija proteina NF κ B (Slika 23, A), što znači da je došlo do njegovog aktiviranja, tj. izdvajanja iz citoplazmatičnog kompleksa sa inhibitornim proteinom I κ B i lokalizacije u jedru.

U reakcione smeše, kao kompetitorska DNK koja sprečava formiranje nespecifičnih kompleksa, dodavani su poly [dI-dC] u 2000 puta težinskom višku i dvolančani oligonukleotid sa vezivnim mestom za USF faktor, (čija je sekvenca data na Slici 9b u poglavlju Materijal i metode), u 1000 puta molarnom višku.

Inkubacijom proteina jedarnog ekstrakta sa radioaktivno obeleženom probom dobijana su tri specifična kompleksa (Slika 24, A2), dok su inkubacijom DNK i proteina totalnog ekstrakta dobijana dva kompleksa (Slika 24, B2). Kompleksi predstavljaju različite kombinacije subjedinica p50 i p65 koje ulaze u sastav transkripcionog faktora NF κ B. „Supershift” eksperimentima je pokazano da je subjedinica p65 sastavni deo kompleksa II (Slika 24, B4) i III, a specifičnost sva tri kompleksa je potvrđena prethodnim inkubiranjem neobeležene kB probe sa proteinskim ekstraktom, pri čemu je došlo do konkurencije u formiranju kompleksa između obeležene i neobeležene DNK probe i proteina NF κ B (Slika 24, B3).

Dodavanje proteina Ankrd2 u reakcionu smešu, dobijenog u reakciji *in vitro* transkripcije i translacije (Slika 24, B6) ili izolovanog iz *E. coli* (Slika 24, A4 i A5) nije omelo formiranje kompleksa između DNK i proteina NF κ B. Međutim, prethodno inkubiranje proteina MAD3 (humani I κ B α), dobijenog u reakciji *in vitro* transkripcije i translacije, sa totalnim proteinskim ekstraktom humanih primarnih mišićnih ćelija CHQ5B tretiranih tumor nekrotičnim faktorom α je sprečilo formiranje kompleksa III između DNK i proteina NF κ B (Slika 24, B5).



Slika 24. Formiranje kompleksa između NFκB i DNK u prisustvu proteina Ankrd2.

Radioaktivno obeležena DNK proba koja sadrži vezivno mesto za transkripcioni faktor NFκB je inkubirana sa jedarnim (A) i ukupnim (B) proteinima izolovanim iz humanih primarnih mišićnih ćelija CHQ5B koje su bile tretirane nekrotičnim faktorom tumora α . Reakcione smeše su, osim radioaktivno obeležene probe (A1 i B1), sadržavale: jedarni ekstrakt (A2-5), totalni ekstrakt (B2-6), GST (A3), dva različita izolata F-Ankrd2-GST, (A4 i A5), neobeleženu probu u 1000x molarnom višku (B3), anti p65 antitelo (B4), MAD3 sintetisan u sistemu za *in vitro* transkripciju i translaciju (B5) i Ankrd2 sintetisan u sistemu za *in vitro* transkripciju i translaciju (B6). Rimskim brojevima su označeni kompleksi u čiji sastav ulaze različite subjedinice transkripcionog faktora NF-κB.

Dakle, na osnovu dobijenih rezultata, može se zaključiti da protein Ankrd2 ne interaguje sa transkripcionim faktorom NFκB i ne sprečava njegovo vezivanje sa DNK, za razliku od proteina MAD3. Protein Ankrd2 nema ulogu IκB regulatornog faktora i nije uključen u signalni put u kome učestvuje transkripcioni faktor NFκB za koji se zna da ima važnu ulogu u procesima diferencijacije mišićnih ćelija.

V. DISKUSIJA

Karakterizacija proteina Ankrd2 je otpočela pre nekoliko godina kao deo projekta sistematskog identifikovanja gena specifično eksprimiranih u humanim skeletnim mišićima. Jedan od novootkrivenih transkripata, HSPD02860, je pokazao neke interesantne karakteristike kao što su specifična ekspresija u skeletnim mišićima i velika sličnost (43% na aminokiselinskom nivou) sa humanim proteinom C-193 koji je opisan kao potencijalni regulatorni faktor uključen u aktivaciju endotelnih ćelija (Chu *et al.*, 1995). Nekoliko nezavisnih studija (Baumeister *et al.*, 1997; Jeyasseelan *et al.*, 1997; Zou *et al.*, 1997) je dovelo do otkrića još jednog proteina nazvanog CARP (Cardiac Ankyrin Repeat Protein ili Cardiac Adriamycin-Responsive Protein) i MARP (Muscle Ankyrin Repeat Protein), veoma sličnog proteinu C-193 (90% identičnosti na aminokiselinskom nivou). Protein CARP/MARP je detektovan u mišu, pacovu i zecu i specifično se eksprimira u srčanom mišiću. Na osnovu velike sličnosti primarnih sekvenci ova tri proteina pretpostavljeno je da su C-193, CARP i MARP ortologne forme istog proteina. Takodje je identifikovan (Ievolella *et al.*, 1998) i okarakterisan (Kemp *et al.*, 2000) mišji protein Ankrd2 koji pokazuje 90% identičnosti na aminokiselinskom nivou sa humanim proteinom. Na osnovu velike sličnosti između proteina Ankrd2 i CARP/MARP/C-193 može se pretpostaviti da su oni i funkcionalno povezani, a ovu pretpostavku potkrepljuje striktna očuvanost strukturnih i funkcionalnih domena. Oba proteina poseduju ankirinske ponovke u centralnom regionu koji omogućuju medjuproteinske interakcije, mesta za fosforilaciju, signal za lokalizaciju u jedru (KKRKK) uzvodno od ankirinskih ponovaka i PEST sekvence odgovorne za brzu degradaciju proteina. Protein CARP/MARP/C-193 poseduje jednu protein-destabilišuću sekvencu bliže N-terminusu proteina dok protein Ankrd2, osim ove, poseduje još jednu dužu PEST sekvencu bliže C-terminusu proteina. Takodje proteini poput IκB sadrže slično pozicionirane PEST sekvence

koje su odgovorne za njihovu brzu degradaciju koja omogućava aktivaciju transkripcionog faktora NFkB i njegov transport u jedro (McKinsey *et al.*, 1997). Ovaj nalaz ukazuje na mogućnost da proteini Ankrd2 i CARP/MARP/C-193 imaju sličan metabolizam. Sličnost između proteina CARP/MARP/C-193 i Ankrd2 se ogleda i u strukturi gena koji kodira ove proteine. Gen koji kodira protein CARP/MARP/C-193 sadrži devet egzona (Kuo *et al.*, 1999) kao i gen za Ankrd2 (Pallavicini *et al.*, 2001). Egzoni 5, 6, 7 i 8 oba gena, koji kodiraju pojedinačne ankirinske ponovke, su iste dužine.

Za detekciju proteina Ankrd2 u humanim tkivima i mišićnim ćelijama pripremljena su četiri antitela dobijena imunizacijom miševa: tri antitela su bila poliklonska (na ceo protein i na N- i C- terminalne regione) i monoklonsko antitelo čiji se antigeni epitop nalazio na C-terminalnom regionu proteina Ankrd2. Usled postojanja ankirinskih ponovaka u proteinu Ankrd2, koji su prisutni i u velikom broju drugih proteina, testirana je specifičnost antitela na protein Ankrd2. Korišćenjem velikog broja deletanata koji su kodirali različite regione proteina Ankrd2 utvrđeno je da nijedno od navedenih antitela ne reaguje sa ankirinskim ponovcima, pa se može reći da su specifična za protein Ankrd2. Western blot analizom različitih tkiva humanog porekla, korišćenjem poliklonskih antitela na ceo protein, dobijen je identičan profil proteina koji sa njima interaguju kao i sa antitelima na delove proteina, pa se indirektno može zaključiti da i poliklonska antitela na ceo protein specifično prepoznaju samo protein Ankrd2.

Za razliku od proteina CARP/MARP/C-193 koji se eksprimira pretežno u srcu, protein Ankrd2 se u najvećoj meri eksprimira u skeletnim mišićima, a detektovano je njegovo prisustvo i u srcu i bubregu. S obzirom na diferencijalnu ekspresiju ova dva proteina može se pretpostaviti da oni imaju paralelne funkcije u tkivima u kojima se ekspimiraju.

U ovom radu posebna pažnja je obraćena na intraćelijsku lokalizaciju proteina Ankrd2. I pored postojanja signala za lokalizaciju u jedru i u humanom i u mišjem proteinu, programi za predviđanje intraćelijske lokalizacije, kao što je PSORT, su ga svrstali u citoplazmatične

proteine. Za detekciju proteina Ankrd2 u humanim i mišjim mišićnim ćelijama korišćena su sva četiri dobijena antitela. Utvrđeno je da za vreme diferencijacije humanih mišićnih ćelija količina proteina Ankrd2 raste, ali je njegova lokalizacija, dobijena sa različitim antitelima, bila različita. Poliklonskim antitelima na N-terminalni region protein Ankrd2 je detektovan samo u citoplazmi mioblasta i u miotuba. Sa ostala dva poliklonska antitela protein Ankrd2 je detektovan i u citoplazmi i u jedru mioblasta, a u miotubama je detektovan samo u citoplazmi. Sa monoklonskim antitelom, u mioblastima signal je bio specifično lokalizovan samo u jedru a u miotubama u citoplazmi. Razlog zbog čega su neka antitela detektovala jedarnu a druga citoplazmatsku formu ovog proteina može biti u dostupnosti epitopa u pojedinim ćelijskim odeljcima. Epitopi koje prepoznaju poliklonska antitela na N-terminalni region mogu biti nedostupni u jedru usled specifične konformacije proteina Ankrd2 koju on ima u jedru, a koja se razlikuje od konformacije u kojoj se on nalazi u citoplazmi gde je epitop koga prepoznaje monoklonsko antitelo nedostupan. Imajući u vidu da protein Ankrd2 može biti fosforilisan, što bi dovelo do promene njegove konformacije i da mesto za fosforilaciju proteina Ankrd2 kazein kinazom II leži u sredini epitopa koje prepoznaje monoklonsko antitelo ova teza ima još više osnova. Generalno, protein Ankrd2 je lokalizovan i u jedru i u citoplazmi mišićnih ćelija nalik proteinima koji učestvuju u signalnim putevima. Specifična ekspresija proteina Ankrd2 u mišićnim ćelijama je takodje potvrđena korišćenjem trodimenzionalnih organoida sastavljenih od mišićnih ćelija C2C12 gajenih u kulturi (Kemp *et al.*, 2000). Protein se može detektovati u nediferenciranim mioblastima u fazi proliferacije, a najveći nivo ekspresije je u periodu fuzije mioblasta i ranog sazrevanja miotuba (2-7 dana nakon uklanjanja seruma iz medijuma u kome se gaje ćelije).

U adultnim skeletnim mišićima protein Ankrd2 je isključivo lokalizovan u citoplazmi i ulazi u sastav I trake sarkomere. Najnoviji rezultati (Ishiguro *et al.*, 2002) pokazuju da se on može imunohistohemijski detektovati i u jedrima mišićnih vlakana. Interesantna je činjenica da

se i protein CARP može detektovati i u jedrima i u citoplazmi miocita, i to, takodje, u I traci sarkomere. Prisustvo proteina CARP u oba ćelijska odeljka ukazuje na njegovu dinamičnu redistribuciju izmedju jedra i sarkomere. Pretpostavljeno je da se slobodna forma proteina CARP brzo degraduje proteazama koje prepoznaju PEST sekvence, dok je sarkomerna forma stabilnija.

Procenat mioblasta koji su pokazivali jedarnu fluorescenciju kretao se od manje od 10% pa čak i do 90%, u zavisnosti od seruma koji je korišćen za gajenje ćelija. Sličan fenomen je primećen i u slučaju proteina CARP (Zou *et al.*, 1997). Endogeni protein CARP nije detektovan u jedrima srčanih miocita koje su rasle u medijumu bez seruma, ali je jak jedarni signal dobijan u onim ćelijama koje su gajene u medijumu sa serumom. Western blot analizom istih količina ukupnih proteina izolovanih iz ćelija koje su rasle bez i u prisustvu seruma pokazano je da je nivo proteina CARP u oba slučaja skoro identičan. Na osnovu ovih rezultata autori su pretpostavili da protein CARP može biti aktivno transportovan u jedro miocita i da je taj transport potpomognut nekom ili nekim komponentama prisutnim u serumu. U odsustvu tog ili tih faktora protein pasivno difunduje kroz ćeliju pa se tako može naći i u jedru. Za sada, faktori koji obezbeđuju aktivni transport proteina CARP u jedro još uvek su nepoznati. Takodje, slično objašnjenje može važiti i za protein Ankrd2. Neka ili neke komponente prisutne u serumu Myoclon kojih nema u serumu Seromed mogu uticati na njegov aktivni transport u jedro. Western blot analizom proteina izolovanih iz humanih primarnih mišićnih ćelija CHQ5B gajenih u medijumu sa Seromed ili Myoclon serumom pokazano je da razlika u količini proteina Ankrd2 nije značajna što ukazuje da, i u ovom slučaju, komponente iz seruma utiču samo na transport (jedarna lokalizacija), ali ne i na sintezu proteina Ankrd2.

Već je pomenuto da se protein Ankrd2 može detektovati u jedrima mioblasta, dok je u miotubama lokalizovan pretežno u citoplazmi. Jedarni signal je veoma specifičan, u obliku tački (tufni) različitog broja i oblika. Indirektnom imunofluorescencijom je pokazano da je

protein Ankrd2 kolokalizovan sa proteinom PML u PML jedarnim telima. Tačna funkcija PML jedarnih tela je nepoznata ali se pretpostavlja da ona imaju ulogu u regulaciji transkripcije tako što predstavljaju depoe za čuvanje i titraciju jedarnih faktora. Svrha lokalizacije proteina Ankrd2 u PML jedarnim telima mioblasta nije utvrđena. Protein PML je unutar jedarnih tela modifikovan sumolacijom, tj. kovalentnim vezivanjem proteina SUMO-1. Western blot analizom proteina izolovanih iz primarnih mišićnih ćelija CHQ5B, osim trake od 42kDa, detektovane su i trake većih molekulskih masa za koje je pretpostavljeno da predstavljaju modifikovanu formu proteina Ankrd2 ali je pokazano da se ovde ipak ne radi o sumolaciji, već o nekom drugom fenomenu.

S obzirom da identifikacija proteina koji interaguju sa izučavanim proteinom može ukazati na njegovu potencijalnu funkciju u tom smislu najpre su uradjeni "yeast two hybrid" eksperimenti koji nisu dali pozitivne rezultate, tj. ovim pristupom nije identifikovan nijedan protein koji se vezuje za protein Ankrd2. Metodom GST „pull down” je pokazano da postoji nekoliko proteina koji se vezuju za protein Ankrd2. Naime, utvrđeno je da protein Ankrd2 interaguje sa nekim proteinima humanih i mišjih mišićnih ćelija, ali, za sada, nije poznato o kojim proteinima se radi. Pokušaj njihove identifikacije je vršen Western blot analizom. Identifikaciju je moguće izvesti i na drugi način, metodom masene spektrometrije. Nakon uradjenog GST „pull down” eksperimenta (proteini ekstrakta ne moraju biti radioaktivno obeleženi) gel je neophodno obojiti srebrom. U slučaju da se detektuje neka specifična traka nju je potrebno iseći iz gela i protein koji se nalazi u njoj identifikovati masenom spektrometrijom.

Ekspresija mišjeg proteina Ankrd2 je indukovana mehaničkim istezanjem mišića *in vivo* (Kemp *et al.*, 2000). Na osnovu ove osobine gen koji kodira protein Ankrd2 se može svrstati u familiju gena primarnog odgovora koji se aktiviraju mehaničkim stimulusom. Protein Ankrd2 poseduje nekoliko potencijalnih mesta za fosforilaciju različitim kinazama, a medju njima su

četiri mesta za fosforilaciju kazein kinazom II (CKII). Prisustvo potencijalnih mesta za fosforilaciju i u humanom i u mišjem proteinu je zanimljivo u smislu da bi aktivacija proteina Ankrd2 mogla biti regulisana mehanički indukovanom fosforilacijom. Takođe, fosforilacija može modulirati sposobnost proteina Ankrd2 da se veže za druge proteine. Moriyama i koautori (Moriyama *et al.*, 2001) su pokazali da je protein Ankrd2 (Arpp) konstitutivno fosforilisan u TE1 ćelijama i da može biti *in vitro* fosforilisan CKII (casein kinase II) i ERK2 (extracellular signal-regulated kinase 2). U ovom radu je pokazano da kazein kinaza II može da fosforiliše ovaj protein *in vitro*, ali je potrebno uraditi dodatne eksperimente koji bi pokazali da li se fosforilacija proteina Ankrd2 odigrava *in vivo* i da li ima funkcionalni značaj u navedenom smislu.

Po svojoj strukturi, protein Ankrd2 je veoma sličan proteinu I κ B. Oba proteina poseduju ankirinske ponovke, više mesta za fosforilaciju, signal za lokalizaciju u jedru i PEST sekvence. Takođe je i njihov profil ekspresije u mišićnim ćelijama veoma sličan, tj. u toku diferencijacije mišićnih ćelija dolazi do povećanja njihove ekspresije. Pretpostavljeno je da bi protein Ankrd2 mogao da ima specijalizovanu funkciju u mišićnim ćelijama sličnu regulatornom faktoru I κ B i da učestvuje u procesu diferencijacije mišićnih ćelija tako što reguliše aktivnost transkripcionog faktora NF κ B. Poznato je iz literature da aktivacija transkripcionog faktora NF κ B sprečava diferencijaciju mišićnih ćelija (Langen *et al.*, 2001). U slučaju da se protein Ankrd2 vezuje za transkripcioni faktor NF κ B, formirani kompleks bi sprečio vezivanje NF κ B za DNK. Eksperimentima retardacije DNK na gelu je pokazano da protein Ankrd2 ne sprečava obrazovanje kompleksa između NF κ B i DNK. Takođe je pokazano da se protein Ankrd2 ne ubikvitinuje i ne degraduje u proteozomima za razliku od faktora I κ B. Iz navedenih rezultata proizlazi da, i pored strukturne sličnosti i sličnog ekspresionog profila, protein Ankrd2 ne funkcioniše na isti način kao faktor I κ B i da nije uključen u signalni put transkripcionog faktora NF κ B. Međutim, neka povezanost proteina

Ankrd2 i transkripcionog faktora NFkB se ne može u potpunosti isključiti jer u promotorskom regionu gena koji kodira protein Ankrd2 postoji mesto za vezivanje ovog transkripcionog faktora.

U ovom radu nije utvrđena definitivna funkcija proteina Ankrd2, ali postoji više elemenata na osnovu kojih se može indirektno zaključiti da protein Ankrd2 ima važnu ulogu u kontroli ekspresije gena specifično eksprimiranih u mišićnom tkivu kao tkivno specifični kofaktor. Osnova ove hipoteze je u činjenici da je Ankrd2 veoma sličan drugom proteinu identifikovanom kod glodara (MARF/CARF) i čoveka (C-193). Oba proteina, i Ankrd2 i CARF/MARF/C-193, imaju tkivno specifičnu ekspresiju, lokalizovani su u jedru mišićnih ćelija, imaju ankirinske ponovke koji omogućuju medjuproteinske interakcije, mesta za fosforilaciju i PEST sekvence koje omogućuju brzu degradaciju proteina. Protein CARF/MARF/C-193 deluje kao jedarni kofaktor transkripcionog faktora YB-1 i negativno reguliše ekspresiju gena koji se specifično eksprimiraju u ćelijama srca, kao što je gen za laki lanac miozina koji se eksprimira u kardiocitama srčanih komora (Zou *et al.*, 1997). Medjutim, uloga proteina CARF /MARF/C-193 u ćelijama skeletnih mišića je nepoznata. Može se pretpostaviti da bi se protein Ankrd2 mogao vezivati za neki generalni transkripcioni faktor kao što je YB-1 i modulirati njegovu funkciju specifično u ćelijama skeletnih mišića. U prilog ovoj pretpostavci ide činjenica da se protein Ankrd2 može detektovati i u jedru humanih mišićnih ćelija gde bi mogao igrati ulogu regulatora transkripcije pojedinih gena.

Pretpostavka je da su proteini Ankrd2 i CARF/MARF/C-193 uključeni u kontrolu i održavanje adekvatne mišićne mase u skeletnim mišićima, odnosno srcu. Ova pretpostavka je potkrepljena sledećim rezultatima. U srcu pacova, protein CARF je regulisan preopterećenjem ovog organa koje izaziva hipertrofični odgovor (Aihara *et al.*, 2000). Slično, i u mišjim skeletnim mišićima dolazi do povećane ekspresije proteina Ankrd2 nakon istezanja mišića (Kemp *et al.*, 2000), pa se može pretpostaviti da je ovaj protein uključen u signalni put koji

vodi do mišićne hipertrofije izazvane istezanjem i preopterećenjem. Oba proteina bi mogla da imaju sličnu ulogu u signalnoj kaskadi koja vodi do hipertrofije prouzrokovane različitim mehanizmima: preopterećenje usled povećanog pritiska u srcu i istezanje u mišićima.

VI. ZAKLJUČCI

Na osnovu dobijenih rezultata mogu se izvesti sledeći zaključci:

1. Ankrd2 je protein od 333 aminokiseline, molekulske mase 37 kDa. U njegovom centralnom regionu nalazi se pet ankirinskih ponovaka, a poseduje i signal za lokalizaciju u jedru, PEST sekvence i mesta za fosforilaciju različitim protein kinazama.
2. Po svojoj modularnoj strukturi i primarnoj sekvenci protein Ankrd2 je najbliži proteinu CARP/MARP/C-193. Ovaj protein ima funkciju negativnog regulatora transkripcije i njegova ekspresija je indukovana tokom hipertrofije srca.
3. Specifično se eksprimira u humanim adultnim skeletnim mišićima, a takodje i u humanom adultnom srcu i bubregu, ali u manjoj meri. U skeletnim mišićima zastupljen je sa aproksimativno 0,4% od ukupnih proteina, dok u srcu taj procenat iznosi 0.1.
4. Njegova količina raste tokom diferencijacije humanih i mišjih mišićnih ćelija u kulturi.
5. Lokalizovan je i u jedru i u citoplazmi mioblasta i samo u citoplazmi miotuba.
6. Kolokalizuje sa proteinom PML u subjedarnim strukturama koje se nazivaju PML jedarna tela.
7. Protein Ankrd2 interaguje sa drugim proteinima mišićnih ćelija.
8. Može biti *in vitro* fosforilisan kazein kinazom II.
9. Iako je veoma sličan proteinima iz familije I κ B, nema funkciju inhibitora transkripcionog faktora NF κ B, tj. ne sprečava vezivanje transkripcionog faktora NF κ B za DNK.

VII. LITERATURA

Aihara, Y., Kurabayashi, M., Saito, Y., Ohyama, Y., Tanaka, T., Takeda, S., Tomaru, K., Sekiguchi, K., Arai, M., Nakamura, T. and Nagai, R. (2000). Cardiac Ankyrin Repeat Protein is a Novel Marker of Cardiac Hypertrophy: Role of M-CAT Element Within the Promoter. *Hypertension*, **36**, 48-53.

Ahn, M.J., Langenfeld, J., Moasser, M.M., Rusch, V. and Dmitrovsky, E. (1995). Growth Suppression of Transformed Human Bronchial Epithelial Cells by All-trans-retinoic acid Occurs Through Specific Retinoid Receptors. *Oncogene*, **11**, 2357-2364.

Alcalay, M., Tomassoni, L., Colombo, E., Stoldt, S., Grignani, F., Fagioli, M., Szekely, L., Helin, K., Pelicci, P.G. (1998). The Promyelocytic Leukemia Gene Product (PML) Forms Stable Complexes with the Retinoblastoma Protein. *Mol Cell Biol.*, **18**, 1084-1093.

Ascoli, C.A. and Maul, G.G. (1991). Identification of a Novel Nuclear Domain. *J. Cell Biol.*, **112**, 785-795.

Bang, M., Mudry, R.E., McElhinny, A.S. Trombitas, K., Geach, A.J., Yamasaki, R., Sorimachi, H., Granzier, H., Gregorio, C.C. and Labeit, S. (2001). Myopalladin, a Novel 145-Kilodalton Sarcomeric Protein with Multiple Roles in Z-Disc and I-Band Protein Assemblies. *J. Cell Biol.*, **153**, 413-427.

Baumeister, A., Arber, S. and Caroni, P. (1997). Accumulation of Muscle Ankyrin Repeat Protein Transcript Reveals Local Activation of Primary Myotube Endcompartments During Muscle Morphogenesis. *J Cell Biol.*, **139**, 1231-1242.

Benders, A.A.G.M., van Kuppevelt, T.H.M.S.M., Oosterhof, A. And Veerkamp, J.H. (1991). The Biochemical and Structural Maturation of Human Skeletal Muscle Cells in Culture: The Effect of the Serum Substitute Ultrosor G. *Experimental Cell Research*, **195**, 284-289.

Bennett, V. (1992). Ankyrins. *J. Biol. Chem.*, **267**, 8703-8706.

Biesiada, E., Hamamori, Y., Kedes, L. and Sartorelli, V. (1999). Myogenic Basic Helix-loop-helix Proteins and Sp1 Interact as Components of a Multiprotein Transcriptional Complex Required for Activity of the Human Cardiac Alpha-actin Promoter. *Mol. Cell Biol.*, **19**, 2577-2584.

Blau, H.M., Chiu, C.P. and Webster, C. (1983). Cytoplasmic Activation of Human Nuclear Genes in Stable Heterokaryons. *Cell*, **32**, 1171-1180.

Boddy, M.N., Howe, K., Etkin, L.D., Solomon, E. and Freemont, P.S. (1996). PIC1, a Novel Ubiquitin-like Protein Which Interacts With the PML Component of a Multiprotein Complex That is Disrupted in Acute Promyelocytic Leukemia. *Oncogene*, **13**, 971-982.

Borden, K.L., Campbell Dwyer, E.J. and Salvato, M.S. (1997). The Promyelocytic Leukemia Protein PML Has a Pro-apoptotic Activity Mediated Through its RING Domain. *FEBS Lett.*, **418**, 30-34.

Bork, P. (1993). Hundreds of Ankyrin-like Repeats in Functionally Diverse Proteins: Mobile Modules That Cross Phyla Horizontally? *Proteins: Struct. Funct. Genet.*, **17**, 363-374.

Brasch, K. and Ochs, R.L. (1992). Nuclear Bodies (NBs): A Newly "Rediscovered" Organelle. *Experimental Cell Research*, **202**, 211-223.

Breedon, L. and Nasmyth, K. (1987). Similarity Between Cell-cycle Genes of Budding Yeast and Fission Yeast and the Notch Gene of *Drosophila*. *Nature*, **329**, 651-654.

Brown, J.D. (1997). A Rapid, Non-toxic Protocol for Sequence-ready Plasmid DNA. *Elsevier Trends Journal, Technical Tips Online*, **1**, 29, TO1281 (<http://tto.biomednet.com>).

Chu, W., Burns, D.K., Swerlick, R.A. and Presky, D.H. (1995). Identification and Characterization of a Novel Cytokine-inducible Nuclear Protein from Human Endothelial Cells. *J Biol Chem.*, **270**, 10236-10245.

Devarajan, P., Stabach, P.R., Mann, A.S., Ardito, T., Kashgarian, M. and Morrow, J.S. (1996). Identification of a Small Cytoplasmatic ankyrin (ANK G₁₁₉) in the Kidney and Muscle That Binds β I Σ Spectrin and Associates with the Golgi Apparatus. *J. Cell Biol.*, **133**, 819-830.

Dignam, J.D., Lebovitz, R.M. and Roeder, R.G. (1983). Accurate Transcription Initiation by RNA Polymerase II in a Soluble Extract from Isolated Mammalian Nuclei. *Nucl. Ac. Res.*, **11**, 1475-1489.

Ding, L., Bunting, M., Topham, M.K., McIntyre, T.M., Zimmerman, G.A. and Prescott, S.M. (1997). Alternative Splicing of the Human Diacylglycerol Kinase Zeta Gene in Muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 5519-5524.

Doucas, V., Tini, M., Egan, D.A. and Evans, R.M. (1999). Modulation of CREB Binding Protein Function by the Promyelocytic (PML) Oncoprotein Suggests a Role for Nuclear Bodies in Hormone Signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 2627-2632.

Everett, R.D., Meredith, M., Orr, A., Cross, A., Kathoria, M. and Parkinson, J. (1997). A Novel Ubiquitin-specific Protease is Dynamically associated with the PML Nuclear Domain and Binds to a Herpesvirus Regulatory Protein. *EMBO J.*, **16**, 1519-1530.

Fagioli, M., Alcalay, M., Tomassoni, L., Ferrucci, P.F., Mencarelli, A., Riganelli, D., Grignani, F., Pozzan, T., Nicoletti, I. and Pelicci, P.G. (1998). Cooperation Between the RING+B1-B2 and Coiled-coil Domains of PML is Necessary for its Effect on Cell Survival. *Oncogene*, **16**, 2905-2913.

Faulkner, G., Pallavicini, A., Comelli, A., Salamon, M., Bortoletto, G., Ievolella, C., Trevisan, S., Kojic, S., Dalla Vecchia, F., Laveder, P., Valle, G. and Lanfranchi, G. (2000). FATZ, a Filamin-, Actinin- and Telethonin-binding Protein of the Z-disc of Skeletal Muscle. *J. Biol. Chem.*, **275**, 41234-41242.

Faulkner, G., Pallavicini, A., Formentin, E., Comelli, A., Ievolella, C., Trevisan, S., Bortoletto, G., Scannapieco, P., Salamon, M., Moulay, V., Valle, G. and Lanfranchi, G. (1999). ZASP: a New Z-band Alternatively Spliced PDZ-motif Protein. *J. Cell Biol.*, **146**, 465-475.

Gongora, C., David, G., Pintard, L., Tissot, C., Hua, T.D., Dejaan, A. and Mechti N. (1997). Molecular Cloning of a New Interferon-induced PML Nuclear Body-associated Protein. *J. Biol. Chem.*, **272**, 19457-19463.

Grande, M.A., van der Kraan, I., van Steensel, B., Schul, W., de The, H., van der Voort, H.T., de Jong, L. and van Driel, R. (1996). PML-containing Nuclear Bodies: Their Spatial Distribution in Relation to Other Nuclear Components. *J Cell Biochem.*, **63**, 280-291.

Grimwade, D. and Solomon, E. (1997). Characterisation of the PML/RAR α Rearrangement Associated With t(15;17) Acute Promyelocytic Leukemia. *Curr. Top Microbiol. Immunol.*, **220**, 81-112.

Hanah, D. (1995). DNA Cloning (Glover, D.M., ed) IRL Press, Oxford, 1, 109.

Hodges, M., Tissot, C., Howe, K., Grimwade, D. and Freemont P.S. (1998). Structure, Organization and Dynamics of Promyelocytic Leukemia Protein Nuclear Bodies. *Am. J. Hum. Genet.*, **63**, 297-304.

Ievolella, C., Formentin, E. and Lanfranchi, G. (1998). AJ011118 skeletal muscle and cardiac protein (*Mus musculus*). Direct Submission to *Gen Bank database* (30-SEP-1998).

Ishiguro, N., Baba, T., Ishida, T., Takeuchi, K., Osaki, M., Araki, N., Okada, E., Takahashi, S., Saito, M., Watanabe, M., Nakada, C., Tsukamoto, Y., Sato, K., Ito, K., Fukayama, M., Mori, S., Ito, H. and Moriyama, M. (2002). Carp, a Cardiac Ankyrin-Repeated Protein, and Its New Homologue, Arpp, Are Differentially Expressed in Heart, Skeletal Muscle and Rhabdomyosarcomas. *Am. J. Pathol.*, **160**, 1767-1778.

Ishov, A.M., Sternberg, R.M. and Maul, G.G. (1997). Human Cytomegalovirus Immediate Early Interaction with Host Nuclear Structures: Definition of an Immediate Transcript Environment. *J. Cell Biol.*, **138**, 5-6.

Jacobs, M.D. and Harrison, S.C. (1998). Structure of an I κ B α /NF- κ B Complex. *Cell*, **95**, 749-758.

Jeyaseelan, R., Poizat, C., Baker, R.K., Abdishoo, S., Isterabadi, L.B., Lyons, G.E. and Kedes, L. (1997). A Novel Cardiac-restricted Target for Doxorubicin. CARP, a Nuclear Modulator of Gene Expression in Cardiac Progenitor Cells and Cardiomyocytes. *J Biol Chem.*, **272**, 22800-22808.

Kaliman, P., Canicio, J., Testar, X., Palacin, M. and Zorzano. A. (1999). Insulin-like Growth Factor-II, Phosphatidylinositol 3-Kinase, Nuclear Factor- κ B and Inducible Nitric-oxide Synthase Define a Common Myogenic Signaling Pathway. *J. Biol. Chem.*, **274**, 17437-17444.

Kemp, T. J., Sadusky, T. J., Saltisi, F., Carey, N., Moss, J., Yang, S.Y., Sasson, D. A., Goldspink, G. and Coulton, G. R. (2000). Identification of Ankrd2, a Novel Skeletal Muscle Gene Coding for a Stretch-responsive Ankyrin-repeat Protein. *Genomics*, **66**, 229-241.

Koken, M.H., Linares-Cruz, G., Quignon, F., Viron, A., Chelbi-Alix, M.K., Sobczak-Thepot, J., Juhlin, L., Degos, L., Calvo, F. and de The, H. (1995). The PML Growth-suppressor Has an Altered Expression in Human Oncogenesis. *Oncogene*, **10**, 1315-1324.

Kraner, S.D., Rich, M.M., Kallen, R.G. and Barchi, R.L. (1998). Two E-boxes are the Focal Point of Muscle-specific Skeletal Muscle Type 1 Na⁺ Channel Gene Expression. *J. Biol. Chem.*, **273**, 11327-11334.

Kuo, H.C., Chen, J., Ruiz-Lozano, P., Zou, Y., Nemer, M. and Chien, K. R. (1999). Control of Segmental Expression of the Cardiac-restricted Ankyrin Repeat Protein Gene by Distinct Regulatory Pathways in Murine Cardiogenesis. *Development*, **126**, 4223-4234.

LaMorte, V.J., Dyck, J.A., Ochs, R.L. and Evans, R.M. (1998). Localization of Nascent RNA and CREB Binding Protein with the PML-containing Nuclear Body. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 4991-4996.

Lanfranchi, G., Muraro, T., Caldara, F., Pacchioni, B., Pallavicini, A., Pandolfo, D., Toppo, S., Trevisan, S., Scarso, S. And Valle, G. (1996). Identification of 4370 Expressed

Sequence Tags from a 3'-end-specific cDNA Library of Human Skeletal Muscle by DNA Sequencing and Filter Hybridization. *Genome Res.*, **6**, 35-42.

Langen, R.C.J., Schols, A.M.W.J., Kelders, M.C.J.M., Wouters, E.F.M. and Janssen-Heininger, Y.M.W. (2001). Inflammatory Cytokines Inhibit Myogenic Differentiation Through Activation of Nuclear Factor-kB. *FASEB J.*, **15**, 1169-1180.

Le, X.F., Yang, P. And Chang, K.S. (1996). Analysis of the Growth and Transformation Suppressor Domains of Promyelocytic Leukemia Gene PML. *J. Biol. Chem.*, **271**, 130-135.

Lee, K.H., Kim, D.G., Shin, N.Y., Song, W.K., Kwon, H., Chung, C.H. and Kang, M. (1997). NF-kB-dependent Expression of Nitric Oxide Synthase is Required for Membrane Fusion of Chick Embryonic Myoblasts. *Biochem. J.*, **324**, 237-242.

Lehtinen, S.K., Rahkila, P., Helenius, M., Korhonen, P. And Salminen, A. (1996). Down-Regulation of Transcription Factors AP-1, Sp-1 and NF-kB Precedes Myocyte Differentiation. *Bioch. Biophys. Res. Comm.*, **229**, 36-43.

McKinsey, T.A., Chu, Z.L. and Ballard, D.W. (1997). Phosphorylation of the PEST Domain of Ikb Regulates the Function of NF-kB/Ikb β Complexes. *J. Biol. Chem.*, **272**, 22377-22380.

Michaely, P. and Bennett, V. (1992). The Ank Repeat: an Ubiquitous Motif Involved in Macromolecular Recognition. *Trends in Cell Biology*, **2**, 127-129.

Moriyama, M., Tsukamoto, Y., Fujiwara, M., Kondo, G., Nakada, C., Baba, T., Ishiguro, N., Miyazaki, A., Nakamura, K., Hori, N., Sato, K., Shomori, K., Takeuchi, K., Satoh, H., Mori, S. and Ito, H. (2001). Identification of a Novel Human Ankyrin-Repeated Protein Homologous to CARP. *Bioch. Biophys. Res. Comm.*, **285**, 715-723.

Mu, Z.M., Chin, K.V., Liu, J.H., Lozano, G. and Chang, K.S. (1994). PML, a Growth Suppressor Disrupted in Acute Promyelocytic Leukemia. *Mol. Cell Biol.*, **14**, 6858-6867.

Muller, S., Matunis, M.J. and Dejean, A. (1998). Conjugation with the Ubiquitin-related Modifier SUMO-1 Regulates the Partitioning of PML Within the Nucleus. *EMBO J.*, **17**, 61-70.

Pallavicini A., Kojic S., Bean C., Vainzof M., Salamon M., Ievolella C., Bortoletto G., Pacchioni B., Zatz M., Lanfranchi G., Faulkner G. and Valle G. (2001). Characterization of Human Skeletal Muscle Ankrd2. *Bioch. Biophys. Res. Comm.*, **285**, 378-386.

Pollard, T. (1981). Cytoplasmic Contractile Proteins. *J. Cell Biol.*, **91**, 156s-165s.

Quignon, F., De Bels, F., Koken, M., Feunteun, J., Ameisen, J.C. and de The H. (1998). PML Induces a Novel Caspase-independent Death Process. *Nature Gen.*, **20**, 259-265.

Rechsteiner, M. and Rogers, S. W. (1996). PEST Sequences and Regulation by Proteolysis. *TIBS*, **21**, 267-271.

Rogers, S., Wells, R. and Rechsteiner, M. (1986). Amino Acid Sequences Common to Rapidly Degraded Proteins: the PEST Hypothesis. *Science*, **234**, 364-368.

Shield, M.A., Haugen, H.S., Clegg, C.H. and Hauschka, S.D. (1996). E-box Sites and a Proximal Regulatory Region of the Muscle Creatine Kinase Gene Differentially Regulate Expression in Diverse Skeletal Muscles and Cardiac Muscle of Transgenic Mice. *Mol. Cell Biol.*, **16**, 5058-5068.

Shikama, N., Lyon, J. and La Thangue, N.B. (1997). The p-300/CBP Family: Integrating Signals with Transcription Factors and Chromatin. *Trends Cell Biol.*, **7**, 230-236.

Shimizu, H., Ito, M., Miyahara, M., Ichikawa, K., Okubo, S., Konishi, T., Naka, M., Tanaka, T., Hirano, K. and Hartshorne, D.J. (1994). Characterization of the Myosin-binding Subunit of Smooth Muscle Myosin Phosphatase. *J. Biol. Chem.*, **269**, 30407-30411.

Sternsdorf, T., Grotzinger, T., Jensen, K. and Will, H. (1997). Nuclear Dots:Actors on Many Stages. *Immunobiology*, **198**, 307-331.

Tsukamoto, Y., Senda, T., Nakano, T., Nakada, C., Hida, T., Ishiguro, N., Kondo, G., Baba, T., Sato, K., Osaki, M., Mori, S., Ito, H. and Moriyama, M. (2002). Arpp, a New Homolog of Carp, Is Preferentially Expressed in Type 1 Skeletal Muscle Fibers and Is Markedly Induced by Denervation. *Labaratory Investigation*, **82**, 645-654.

Valle, G., Faulkner, G., De Antoni, A., Pacchioni, B., Pallavicini, A., Pandolfo, D., Tiso, N., Toppo, S., Trevisan, S. and Lanfranchi, G. (1997). Telethonin, a Novel Sarcomeric Protein of Heart and Skeletal Muscle. *FEBS Letters*, **415**, 163-168.

Verma, I.M., Stevenson, J.K., Schwarz, E.M., Van Antwerp, D. and Miyamoto, S. (1995). Rel/NF- κ B/I κ B Family: Intimate Tales of Association and Dissociation. *Genes and Development*, **9**, 2723-2735.

Wang, Z.G., Delva, L., Gaboli, M., Rivi, R., Giorgio, M., Cordon-Cardo, C., Grosveld, F. and Pandolfi, P.P. (1998a). Role of PML in Cell Growth and the Retinoic Acid Pathway. *Science*, **279**, 1547-1551.

Wang, Z.G., Ruggero, D., Ronchetti, S., Zhong, S., Gaboli, M., Rivi, R. and Pandolfi, P.P. (1998b). Pml is Essential for Multiple Apoptotic Pathways. *Nature Gen.*, **20**, 266-271.

Zhong, S., Delva, L., Rachez, C., Cenciarelli, C., Gandini, D., Zhang, H., Kalantry, S., Freedman, L.P. and Pandolfi, P.P. (1999). A Retinoic acid-dependent Tumor-growth Suppressive Transcription Complex is the Target of the PML-RAR α and T18 oncoproteins. *Nature Gen.*, **23**, 287-295.

Zhong, S., Salomoni, P. and Pandolfi P.P. (2000). The Transcriptional Role of PML and the Nuclear Body. *Nature Cell Biol.*, **2**, 85-90.

Zhou, D., Birkenmeier, C.S., Williams, M.W., Sharp, J.J., Barker, J.E. and Bloch, R.J. (1997). Small Membrane-bound, Alternatively Spliced Forms of Ankyrin 1 Associated with the Sarcoplasmic Reticulum of Mammalian Skeletal Muscle. *J. Cell Biol.*, **136**, 621-631.

Zou, Y., Evans, S., Chen, J., Kuo, H.C., Harvey, R.P. and Chien, K.R. (1997). CARP, a Cardiac Ankyrin Repeat Protein, is Downstream in the Nkx2-5 Homeobox Gene Pathway. *Development*, **124**, 793-804.



