

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Danijela D. Stanisavljević

**Analiza ekspresije i uloge humanog gena  
*SOX14* u neuralnoj diferencijaciji *in vitro* i  
regulaciji malignog fenotipa**

Doktorska disertacija

Beograd, 2018

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Danijela D. Stanisavljević

**Analysis of the expression and role of the  
human gene *SOX14* in neural differentiation *in  
vitro* and in the regulation of malignant  
phenotype**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2018

MENTORI:

**dr Jelena Popović**, naučni saradnik

Univerzitet u Beogradu,

Institut za molekularnu genetiku i genetičko  
inženjerstvo

**akademik Milena Stevanović**, naučni savetnik

Univerzitet u Beogradu,

Institut za molekularnu genetiku i genetičko  
inženjerstvo

redovni profesor

Univerzitet u Beogradu - Biološki fakultet

KOMISIJA:

**dr Jelena Popović**, naučni saradnik

Univerzitet u Beogradu,

Institut za molekularnu genetiku i genetičko  
inženjerstvo

**akademik Milena Stevanović**, naučni savetnik

Univerzitet u Beogradu,

Institut za molekularnu genetiku i genetičko  
inženjerstvo

redovni profesor

Univerzitet u Beogradu - Biološki fakultet

**dr Dušanka Savić Pavićević**, vanredni profesor

Univerzitet u Beogradu,

Biološki fakultet

Datum odbrane \_\_\_\_\_

## **Zahvalnica**

*Ova doktorska disertacija je urađena u Laboratoriji za humanu molekularnu genetiku na Institutu za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, pod rukovodstvom akademika Milene Stevanović.*

*Ovom prilikom se zahvaljujem svom mentoru Dr Jeleni Popović na razumevanju koje je uvek imala za mene, svim savetima i sugestijama, kao i beskrajnoj pomoći prilikom izrade ove disertacije. Ćuro, posebno ti hvala i na svim prijateljskim razgovorima.*

*Zahvaljujem se akademiku Mileni Stevanović na ukazanom poverenju i prilici da svoju doktorsku disertaciju realizujem u Laboratoriji za humanu molekularnu genetiku pod njenim mentorstvom. Zahvaljujem se i na spremnosti da svoje znanje i iskustvo podeli sa mnom.*

*Dr Dušanki Savić Pavićević se zahvaljujem što je prihvatila da bude član komisije i pomogne u kritičkoj analizi i oceni ove disertacije i na bezizmernom strpljenju.*

*Veliku zahvalnost dugujem svim kolegama iz Laboratorije koji su mi izradu ove doktorske disertacije učinili mnogo prijatnijim i još zanimljivijim. Zahvaljujem se svakom ponaosob, jer je svako od njih bio tu kad mi je trebalo, što za druženje uz osmeh, što za rešavanje eksperimentalnih problema.*

*Veliko hvala i svim kolegama Instituta na iskustvu koje su mi preneli, na savetima i druženju.*

*Posebno se zahvaljujem svojoj sestri, majci i ocu koji su uvek uz mene. Uz njih je sve moguće.*

## **Analiza ekspresije i uloge humanog gena *SOX14* u neuralnoj diferencijaciji *in vitro* i regulaciji malignog fenotipa**

### REZIME

Visok stepen očuvanosti tokom evolucije i činjenica da do danas nije opisan nijedan klinički sindrom povezan sa mutacijama u genu *SOX14*, ukazuju na značajnu ulogu ovog gena tokom embrionalnog razvića. Iako je prošlo dvadeset godina od otkrića gena *SOX14*, funkcija ovog gena još uvek nije dovoljno istražena. U ovoj doktorskoj disertaciji analizirana je ekspresija i uloga gena *SOX14* u procesu neuralne diferencijacije *in vitro* i regulaciji malignog fenotipa ćelija poreklom od karcinoma grlića materice.

Tokom neuralnog razvića kod miša i pileta, gen *Sox14* je eksprimiran u određenom setu neuralnih progenitorskih ćelija i u određenim tipovima zrelih neurona u mozgu. Za članove SOXB1 podgrupe, kojoj pripadaju geni *SOX1*, *SOX2* i *SOX3*, poznato je da doprinose održavanju neuralnih progenitorskih ćelija u stanju proliferacije, sprečavajući proces neuralne diferencijacije, dok se za članove SOXB2 podgrupe, koja obuhvata gene *SOX14* i *SOX21*, pretpostavlja da imaju ulogu u određivanju sudbine neuralnih progenitora, indukujući proces neurogeneze. Smatra se da nivo ekspresije *SOX14* i *SOX21* proteina tokom neuralnog razvića određuje da li će ćelija ostati neuralni progenitor ili će započeti proces neurogeneze. Iako je okarakterisan kao marker neurona, u ovoj tezi je pokazano da se gen *SOX14* eksprimira u pluripotentnim ćelijama, neuronima, kao i u drugim tipovima ćelija koje se dobijaju nakon neuralne diferencijacije pluripotentnih NT2/D1 i P19 ćelija *in vitro*. Takođe, u ovoj tezi je pokazano da je profil ekspresije *SOX14* proteina tokom neuralne diferencijacije sličan profilu ekspresije markera postmitotičkih neurona  $\beta$ -III-Tubulina kod NT2/D1 i P19 ćelija. Rezultati prikazani u ovoj doktorskoj disertaciji su pokazali da izlaskom ćelija iz stanja pluripotentnosti i ulaskom u proces neuralne diferencijacije dolazi do povećanja nivoa ekspresije *SOX14* proteina. Pokazano je da *SOX14* protein ima preklapajući profil ekspresije sa SOXB1 proteinima tokom procesa neuralne diferencijacije *in vitro*, a dobijeni rezultati su ukazali na specifičnu regulaciju ekspresije gena *SOX14* na post-transkripcionom nivou u pluripotentnim ćelijama.

Novija istraživanja ukazuju da je ekspresija gena *SOX14* izmenjena u maligno transformisanim ćelijama. Naime, istraživanja su pokazala da je gen *SOX14* metilovan u tkivima poreklom od tumora, i to naročito u tkivima poreklom od karcinoma grlića materice. Dok studije metilacionog statusa na uzorcima tkiva pacijentkinja obolelih od ovog karcinoma ukazuju na odsustvo ekspresije gena *SOX14* i njegovu potencijalnu ulogu tumor supresora, *in vitro* studije na ćelijama poreklom od karcinoma grlića materice ukazuju na onkogeni potencijal ovog gena. Upravo je kontradiktornost ovih podataka otvorila nove pravce istraživanja usmerene na detaljnu analizu ekspresije i uloge gena *SOX14* u regulaciji malignog fenotipa ćelija poreklom od karcinoma grlića materice. Rezultati prikazani u ovoj doktorskoj disertaciji su pokazali da *SOX14* ostvaruje funkciju tumor supresora u HeLa ćelijama aktivacijom p53 signalnog puta koji se smatra jednim od najvažnijih signalnih puteva u ćeliji. Povećana ekspresija *SOX14* proteina dovodi do stabilizacije p53 proteina

povećanjem nivoa njegove fosforilisane forme, koja se vezuje za promotorske sekvence ciljnih gena i reguliše njihovu ekspresiju. U ovoj disertaciji pokazano je da usled povećanja nivoa SOX14 proteina i stabilizacije p53, dolazi do indukcije ekspresije p53 ciljnih gena uključenih u regulaciju apoptoze i ćelijskog ciklusa, kao što su pro-apoptotski gen *BAX* i ciklin zavisna kinaza *CDKN1A/p21<sup>Waf1/Cip1</sup>*. Pokazano je da usled aktivacije p53 signalnog puta u uslovima povećane ekspresije SOX14 proteina dolazi do smanjenja proliferacije, zastoja u ćelijskom ciklusu i programirane ćelijske smrti. Imajući u vidu da je p53 signalni put kompromitovan prisustvom HPV virusa i da povećana ekspresija SOX14 aktivira ovaj važan signalni put, indukcija ekspresije SOX14 proteina u ćelijama poreklom od grlića materice može imati terapijski značaj.

Rezultati ove doktorske disertacije doprinose boljem razumevanju uloge jednog od evolutivno najočuvanijih SOX proteina tokom neuralne diferencijacije *in vitro* i u regulaciji malignog fenotipa. Prikazani rezultati pokazali su da je još jedan član familije gena *SOX* uključen, kako u regulaciju procesa razvića i diferencijacije ćelija, tako i u regulaciju procesa koji su povezani sa malignim svojstvima ćelija.

**Ključne reči:** SOX14, neuralna diferencijacija, SOXB, karcinom grlića materice, tumor supresor, p53, fosfo-p53, apoptoza, p53 signalni put, *CDKN1A/p21<sup>Waf1/Cip1</sup>*

**Naučna oblast:** Biologija

**Uža naučna oblast:** Molekularna biologija

**UDK BROJ:**577.113: [[611.018+611.01.83] + 576.385.5]

# **Analysis of the expression and role of the human SOX14 gene in neural differentiation *in vitro* and in the regulation of malignant phenotype**

## **ABSTRACT**

*SOX14* might have an essential role during development due to the high evolutionary conservation and lack of any known mutated phenotype associated with this gene. Although the first *SOX14* gene in vertebrates was cloned and characterized two decades ago, the function of this gene is largely unknown. This doctoral dissertation provides an insight into *SOX14* expression and its roles during neural differentiation *in vitro* and in regulation of malignant phenotype of cervical carcinoma cells.

During the neural development, the expression of *Sox14* gene is restricted to a defined set of neural progenitors and the precise subset of neurons in the brain. Because of its specific expression in the brain, SOX14 is recognised as a marker of neurons. While SOXB1 subgroup of genes, including SOX1, SOX2 and SOX3 genes, maintains neural progenitors' identity, it is proposed that SOXB2 subgroup, comprising SOX14 and SOX21 genes, are important for induction of neurogenesis. It is suggested that the fine balance between expressions of these proteins during early stages of neural development determines neural progenitor identity. Results presented in this thesis show that SOX14 is expressed in pluripotent cells, as well as in neurons and non-neuronal differentiated cells. Also, it is shown that the expression profile of SOX14 correlates to the expression profile of neuronal marker  $\beta$ -III-Tubulin and that the exit of cells from the pluripotent state toward neural differentiation is accompanied with the increased expression of SOX14. It is also shown that the expression of SOX14 overlaps with the expression of SOXB1 proteins during neural differentiation *in vitro*. The presented results also imply the specific post-transcriptional mechanism of regulation of SOX14 expression in pluripotent cells.

Recently it became evident that SOX14 has a role during malignant transformation of the cells. Previous studies showed that *SOX14* is methylated in tissues originating from several tumors, including cervical carcinoma. Results obtained by the analysis of the methylation status of *SOX14* gene in tissues from cervical carcinoma suggested its potential role as a tumor suppressor, while, on the other hand, *in vitro* studies suggested that SOX14 exerts oncogenic potential in cervical carcinoma cells. These contradictory data opened up the possibility for further study of the role of *SOX14* gene in cervical carcinoma. Results presented in this thesis show that SOX14 exerts tumor suppressor activity in HeLa cells through activation of p53 signaling pathway, one of the most important signaling pathways in cell. In particular, increased expression of SOX14 leads to stabilization of p53 protein by increasing the level of phosphorylated form of p53 protein in HeLa cells. Phosphorylated p53 acts as a transcriptional regulator of target genes that have an important role in tumor growth prevention. The increased expression level of SOX14 and stabilization of p53 are followed by induction of the expression of p53 target genes, mainly involved in apoptosis and cell cycle regulation, such as pro-apoptotic *BAX* gene and cyclin-dependent kinase inhibitor *CDKN1A/p21<sup>Waf1/Cip1</sup>*. Increased expression of SOX14, through activation of a p53 signaling

pathway, leads to decreased proliferation, cell cycle arrest and induction of apoptosis. Obtained results imply that SOX14 induces proper function of p53 tumor suppressor in cervical carcinoma cells and prevents the malignant phenotype of HeLa cells. Presented results indicate that SOX14 has an important role in suppression of cervical carcinoma. Its ability to activate p53 signaling pathway, which is commonly inactivated with by HPV in cervical carcinoma, could have potential therapeutic application.

Obtained results contribute to a better understanding of the roles of one of the most conserved SOX proteins and show that one more member of SOX gene family is implicated in the regulation of processes of development and differentiation, as well as in regulation of malignant phenotype.

**Key words:** SOX14, neural differentiation, SOXB, cervical carcinoma, tumor suppressor, p53, phosho-p53, apoptosis, p53 signaling pathway, *CDKN1A/p21<sup>Waf1/Cip1</sup>*

**Scientific field:** Biology

**Scientific subfields:** Molecular biology

**UDC NUMBER:**577.113: [[611.018+611.01.83] + 576.385.5]



## Skraćenice:

bp – bazni parovi

BSA – albumin iz seruma govečeta, eng. Bovine Serum Albumin

cDNK – komplementarni lanac molekula DNK, eng. *complementary DNA*

CNS – centralni nervni sistem

DMEM – Dulbeko modifikovani medijum, eng. Dulbecco's Modified Eagle Medium

DN – dominantno-negativan

DNK – Dezoksiribonukleinska kiselina

ECL – pojačana hemiluminescencija, eng. Enhanced ChemiLuminescence

EK – embrionalne karcinomske

HRP – peroksidaza rena, eng. HorseRadish Peroxidase

FBS – serum fetusa govečeta, eng. Fetal Bovine Serum

iRNK – informaciona RNK

kb – kilobaza

kDa – kilo dalton

miRNK – mikro RNK

MSP – Metilacija-specifičan PCR , eng. Methylation-Specific PCR

NADPH – Nicotinamid adenin dinukleotid fosfat

ORF – otvoreni okvir čitanja, eng. Open Reading Frame

PBS – fosfatni pufer, eng. Phosphate-Buffered Saline

PCR – lančana reakcija polimeraze , eng. Polymerase Chain Reaction

PFA – paraformaldehid

PI – propidijum jodid

PVDF – polivinil difluorid

RBP<sub>s</sub> – RNK-vezivni proteini, eng. RNA Binding Proteins

RNK – Ribonukleinska kiselina

RT-PCR – PCR kome prethodi reverzna transkripcija

SDS – sodijum dodecil sulfat

SDS-PAGE – elektroforeza u gelu od poliakrilamidnom sa natrijum dodecil sulfatom, eng. Sodium Dodecil Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis

SEM – srednja vrednost standradne greške, eng. Standard Error Mean

siRNK – male interfirajuće RNK, eng. Small interfering RNA

SVZ – subventrikularna zona

TAE – Tris-acetat-EDTA

TBST – eng. Tris-Buffered Saline, 0.1% Tween 20

UTR – nekodirajući region, eng. UnTranslated Region

wt – neizmenjeni „divlji“ tip, eng. Wild-Type

## SADRŽAJ:

### 1. Uvod

	1
1.1. Geni <i>SOX/Sox</i> familije	2
1.1.1. Funkcije gena <i>SOX/Sox</i> familije	3
1.1.2. Geni <i>SOXB/SoxB</i> grupe	9
1.1.3. Gen <i>SOX14/Sox14</i>	10
1.2. Razviće nervnog sistema	12
1.2.1. Migracija i diferencijacija neurona tokom embrionalnog razvića	15
1.2.2. Uloga gena <i>SOXB/SoxB</i> u neuralnoj diferencijaciji	19
1.2.2.1. Uloga gena <i>SOX14/Sox14</i> u neuralnoj diferencijaciji	23
1.2.3. Embrionalne karcinomske ćelije kao model sistem za izučavanje neuralne diferencijacije <i>in vitro</i>	

	24
1.2.3.1. Pluripotentne matične ćelije kao model sistem za izučavanje neuralne diferencijacije <i>in vitro</i>	25
1.2.3.2. Humana embrionalna karcinomska NT2/D1 ćelijska linija	27
1.2.3.3. Mišija embrionalna karcinomska ćelijska linija P19	30
1.3. Maligna transformacija ćelije	32
1.3.1. Uloga gena <i>SOXB/SoxB</i> u malignoj transformaciji ćelije	33
1.3.1.1. Uloga gena <i>SOX14</i> u malignoj transformaciji ćelije	36
1.3.2. Uloga p53 signalnog puta u malignoj transformaciji	38
1.3.2.1. Ciljni geni p53 transkripcionog regulatora	40
1.3.2.2. Regulacija ekspresije gena <i>TP53</i>	41
1.3.2.3. Uloga p53 tumor supresora u regulaciji ćelijskog ciklusa i apoptoze	44
1.3.2.4. Uloga gena <i>SOX</i> familije u regulaciji p53 signalnog puta	46
1.3.3. Karcinom grlića materice	47
1.3.3.1. Uloga p53 signalnog puta u nastanku karcinoma grlića materice	48
1.3.3.2. Uloga gena <i>SOX</i> u karcinomu grlića materice	49
<b>2. Ciljevi rada</b>	

	50
<b>3. Materijal i metode</b>	
	52
3.1. Eksperimentlni materijal	
	52
3.1.1. Bakterijski soj korišćen u radu	52
3.1.2. Vektori i plazmidni konstrukti korišćeni u radu	52
3.1.3. Čelijske linije korišćene u radu	55
3.1.4. Antitela korišćena u radu	56
3.1.5. Oligonukleotidi korišćeni u radu	57
3.1.6. Komercijalni kitovi i reagensi	58
3.1.7. Kompjuterski programi	59
3.2. Eksperimentalne metode	59
3.2.1. Kloniranje humanog gena <i>SOX14</i> u pJet1.2 vektor	59
3.2.2. Sekvenciranje	60
3.2.3. Enzimska reakcija isecanja vektora pcDNA3.1 i plazmidnog konstrukta pJet1.2SOX14 restrikcionim enzimima	60
3.2.4. Kloniranje humanog gena <i>SOX14</i> u pcDNA3.1 vektor	61
3.2.5. Precipitacija DNK etanolom	61

3.2.6. Proveraja SOX14wt konstrukta restrikcionim enzimima	61
3.2.6. Elektroforeza u gelu od agaroze i oslobađanje fragmenata DNK iz gela od agaroze	62
3.2.7. Kultivacija bakterija i priprema kompetentnih bakterija za transformaciju toplotnim šokom	62
3.2.8. Transformacija bakterija toplotnim šokom	63
3.2.9. Izolacija plazmidne DNK	63
3.2.10.1. Izolacija plazmidne DNK na maloj skali	63
3.2.10.2. Izolacija plazmidne DNK na srednjoj skali	64
3.2.10. Protokol za diferencijaciju NT2/D1 ćelija	64
3.2.11. Protokol za diferencijaciju P19 ćelija	65
3.2.12. Tranzijentna transfekcija ćelija LIPOFECTAMINE reagensom	67
3.2.13. Tranzijentna transfekcija HeLa ćelija PEI reagensom	68
3.2.15. Transfekcija HeLa ćelija u cilju praćenja luciferazne aktivnosti promotora	68
3.2.16. Kvantifikacija luminiscentnih signala primenom Dual-Luciferase® Reporter Assay sistema	69
3.2.17. Izolacija ukupnih ćelijskih proteina	69
3.2.18. Merenje koncentracije proteina po Bradfordu	

3.2.19. Imunološka detekcija proteina (Western blot)	70
3.2.20. Imunofluorescentna citohemijska analiza	70
3.2.21. Izolacija RNK	71
3.2.22. Oslobađanje totalne RNK od ostataka genomske DNK	72
3.2.23. Sinteza komplementarne DNK i PCR kome prethodi reverzna transkripcija (RT-PCR)	72
3.2.24. Kvantitativni PCR u realnom vremenu (qRT-PCR)	73
3.2.25. <i>In silico</i> analiza promotora humanog gena <i>SOX14</i>	74
3.2.26. Metilacija-specifičan PCR (eng. <i>methylation-specific</i> PCR-MSP)	74
3.2.27. Test proliferacije	75
3.2.28. Test zarastanja povrede (eng. <i>Wound scratch</i> )	77
3.2.29. Test invazivnosti i migratornog potencijala (eng. <i>Transwell test</i> )	77
3.2.30. Analiza faza ćelijskog ciklusa fluorescentnom protočnom citometrijom	77
3.2.31. Analiza ćelija u apoptozi metodom fluorescentne protočne citometrije	79
3.2.32. Statistička analiza rezultata	79
<b>4. Rezultati</b>	80
	81

4.1. Analiza ekspresije i uloge gena <i>SOX14/Sox14</i> tokom neuralne diferencijacije <i>in vitro</i>	81
4.1.1. Analiza procesa neuralne diferencijacija NT2/D1 i P19 ćelijskihlinija <i>in vitro</i>	81
4.1.2. Analiza ekspresije SOX14 proteina tokom neuralne diferencijacije NT2/D1 i P19 ćelija <i>in vitro</i>	86
4.1.3. Uporedna analiza ekspresije gena <i>SOXB/SoxB</i> tokom neuralne diferencijacije NT2/D1 i P19 ćelija <i>in vitro</i>	87
4.1.4. Uporedna analiza ekspresije SOX14, OCT4 i $\beta$ -III-Tubulin proteina tokom neuralne diferencijacije NT2/D1 i P19 ćelija <i>in vitro</i>	90
4.1.5. Analiza ekspresije proteina SOX14 metodom imunocitohemije u različitim tipovima diferenciranih NT2/D1 i P19 ćelija	91
4.1.6. Generisanje SOX14wt ekspresionog konstrukta	94
4.1.7. Provera generisanog SOX14wt konstrukta u eksperimentima tranzijentne transfekcije	97
4.2. Analiza ekspresije i uloge humanog gena <i>SOX14</i> u regulaciji malignog fenotipa ćelija poreklom od karcinoma grlića materice	99
4.2.1. Analiza nivoa ekspresije gena <i>SOX14</i> u ćelijama poreklom od karcinoma grlića materice	99
4.2.2. Analiza metilacionog statusa promotora gena <i>SOX14</i> u ćelijama poreklom od karcinoma grlića materice	100
4.2.3. Analiza ektopične ekspresije SOX14 u ćelijama poreklom od karcinoma grlića materice	



	103
4.2.4. Analiza aktivatorske/represorske funkcije humanog gena <i>SOX14</i> u HeLa ćelijama	
	105
4.2.5. Generisanje dominant negativnih mutanata za <i>SOX14</i> protein i analiza njihove aktivatorske/represorske funkcije u HeLa ćelijama	
	107
4.2.6. Uticaj povećane ekspresije <i>SOX14</i> proteina na migratorni potencijal HeLa ćelija	
	109
4.2.7. Uticaj povećane ekspresije <i>SOX14</i> proteina na invazivnost HeLa ćelija	
	111
4.2.8. Uticaj povećane ekspresije <i>SOX14</i> proteina na proliferaciju HeLa ćelija	
	112
4.2.9. Uticaj povećane ekspresije <i>SOX14</i> proteina na ćelijski ciklus HeLa ćelija	
	113
4.2.10. Uticaj povećane ekspresije <i>SOX14</i> proteina na apoptozu	
	115
4.2.11. <i>In silico</i> analiza promotora humanog gena <i>TP53</i>	
	119
4.2.12. Uticaj povećane ekspresije <i>SOX14</i> proteina na aktivnost promotora gena <i>TP53</i> u HeLa ćelijama	
	120
4.2.13. Uticaj povećane ekspresije <i>SOX14</i> na ekspresiju p53 proteina u HeLa ćelijama	
	123
4.2.14. Uticaj povećane ekspresije <i>SOX14</i> na nivo fosforilisanе forme p53 proteina u HeLa ćelijama	
	126
4.2.15. Uticaj povećane ekspresije <i>SOX14</i> proteina na transkripciju gena <i>CDKN1A</i> u HeLa ćelijama.	

	128
4.2.16. Uticaj povećane ekspresije SOX14 proteina na ekspresiju p21 <sup>Waf1/Cip1</sup> proteina u HeLa ćelijama	129
<b>5. Diskusija</b>	
	132
5.1. Analiza ekspresije i uloge gena <i>SOX14/Sox14</i> tokom neuralne diferencijacije <i>in vitro</i>	132
5.1.1. NT2/D1 i P19 ćelijske linije kao model sistemi za proučavanje neuralne diferencijacije <i>in vitro</i>	132
5.1.2. Ekspresija gena <i>SOX14/Sox14</i> raste tokom neuralne diferencijacije NT2/D1 i P19 ćelija <i>in vitro</i>	134
5.1.3. Uporedna analiza ekspresije gena <i>SOXB/SoxB</i> tokom neuralne diferencijacije <i>in vitro</i>	135
5.1.4. Uporedna analiza ekspresije SOX14, OCT4 i $\beta$ -III-Tubulin proteina tokom ranih faza neuralne diferencijacije NT2/D1 i P19 ćelija <i>in vitro</i>	137
5.1.5. Analiza ekspresije SOX14 proteina u pojedinačnim ćelijama nakon neuralne diferencijacije <i>in vitro</i>	138
5.1.6. Odsustvo ektopične ekspresije SOX14 proteina u NT2/D1 i P19 ćelijama nakon tranzijentne transfekcije sa SOX14wt ekspresionim konstruktom	139
5.2. Analiza ekspresije i uloge humanog gena <i>SOX14</i> tokom procesa maligne transformacije ćelija poreklom od karcinoma grlića materice	143

5.2.1. Ekspresija i metilacioni status gena <i>SOX14</i> u ćelijama poreklom od karcinoma grlića materice	143
5.2.2. SOX14 ima aktivatorsku ulogu na reporter gen u HeLa ćelijama	144
5.2.3. Analiza SOX14DN1 - dominantno-negativnog mutanta za SOX14	145
5.2.4. Povećana ekspresija SOX14 proteina smanjuje proliferaciju, dovodi do zastoja ćelijskog ciklusa i indukuje apoptozu u HeLa ćelijama	146
5.2.5. SOX14 stabilizuje p53 protein	148
5.2.6. SOX14 aktivira p53 signalni put	150
<b>6. Zaključci</b>	153
<b>Literatura</b>	155

# 1. UVOD

Ćelija je kompleksna strukturna jedinica organizma. Telo čoveka čini nekoliko stotina miliona ćelija, a u svakoj sekundi nastane oko 50 miliona novih ćelija. Pravilna kontrola broja ćelija u organizmu i njihove uloge predstavlja osnov za održavanje homeostaze.

Tokom embrionalnog razvića matične ćelije se diferenciraju u jedan od 200 tipova ćelija koji postoje u organizmu. Tokom treće gestacione nedelje diferencijacijom neuralnih progenitorskih ćelija započinje proces neurogeneze i razvića mozga kod čoveka, a neurogeneza se nastavlja u specifičnim regionima mozga i tokom adultnog perioda. Odabrani set gena, odnosno njihova ekspresija i funkcionisanje, određuje da li će neuralni progenitor nastaviti da proliferiše ili će postati neuron.

Sa druge strane, neke ćelije se usled mutacija maligno transformišu i dovode do nastanka tumora koji se u mnogim slučajevima završava smrtnim ishodom. U ovom procesu bitnu ulogu imaju različiti geni, odnosno transkripcioni regulatori, komponente signalnih puteva i drugi faktori koji čine kompleksnu mrežu aktivnu u ćelijama. Od funkcionisanja ove mreže zavisi da li će maligno transformisana ćelija nastaviti da se deli i dovesti do širenja tumora ili će takva ćelija biti prepoznata kao izmenjena i podleći procesu eliminacije, čime se sprečava širenje tumora.

Otkriće gena uključenih u određivanje sudbine ćelije važno je za razumevanje funkcionisanja organizma, ali i za razvoj potencijalnih terapeutika. Geni *SOX/Sox* familije su uključeni u regulaciju različitih ćelijskih procesa, tokom embrionalnog razvića i u adultnom periodu. Poznato je da je ekspresija gena koji obavljaju važne uloge tokom razvića često izmenjena u različitim tipovima kancera i da jedan transkripcioni regulator može imati važnu ulogu i tokom diferencijacije ćelija i tokom maligne transformacije ćelija.

Jedan od najmanje proučavanih gena *SOX* familije kod čoveka je gen *SOX14*. Do istraživanja prikazanih u ovoj tezi uloga *SOX14* transkripcionog regulatora u regulaciji sudbine jedne ćelije nije bila poznata. Prikazani rezultati su deo istraživanja koja su imala za cilj da doprinesu boljem razumevanju uloge jednog od evolutivno najočuvanijih *SOX* proteina tokom procesa neuralne diferencijacije i maligne transformacije

## 1.1. Geni *SOX/Sox* familije

Geni *SOX/Sox* kodiraju SOX proteine koji pripadaju HMG (*high-mobility group*) superfamiliji DNK vezujućih proteina (Pevny and Lovell-Badge 1997; Wegner 1999). Na osnovu poređenja aminokiselinskog sastava podeljeni su u 10 grupa označenih od A do J, pri čemu je B grupa podeljena na podgrupe B1 i B2, dok grupe I i J imaju po jednog člana bez ortologa među *Sox* genima kičmenjaka (I- *Xenopus laevis Sox31*; J- *Caenorhabditis elegans SoxJ*) (Bowles et al. 2000). Gen *Sry/SRY* je prvi član familije gena *SOX/Sox* (*SRY related HMG box- SOX*) identifikovan 1990. godine (Gubbay et al. 1990; Sinclair et al. 1990), a od tada je otkriveno 20 članova ove familije kod miša i čoveka (Schepers et al. 2002). Za SOX proteine je karakteristično prisustvo HMG boks domena, dužine 79 aminokiselina, koji predstavlja DNK vezujući domen (Laudet et al. 1993) zahvaljujući kojem se SOX proteini vezuju za DNK i obavljaju funkcije transkripcionih regulatora. SOX proteini imaju i ulogu arhitektonskih komponenti hromatina koji stupaju u interakciju sa malim žljebom DNK zavojnice, što za posledicu ima savijanje DNK pod uglom koji varira između 30° i 110° (Pevny and Lovell-Badge 1997; Wegner 1999; Weiss 2001). Navedeno savijanje DNK obezbeđuje vezivanje drugih transkripcionih regulatora koji zajedno sa SOX proteinima obezbeđuju pravilnu transkripciju ciljnih gena (Kamachi et al. 2000). Svi SOX proteini prepoznaju jedan konsenzusni motiv za vezivanje koji je heptamerna sekvenca DNK: 5`-(A/T)(A/T)CAA(A/T)G-3` (Harley et al. 1994).

SOX proteini se odlikuju visokim stepenom međusobne sličnosti na proteinskom nivou, kako u HMG boks, tako i van njega, pri čemu ova sličnost iznosi od 70-95% kod članova u okviru iste grupe, odnosno  $\geq 46\%$  kod članova različitih grupa (Lefebvre et al. 2007). Proteinske sekvence izvan HMG boks domena su visoko evolutivno očuvane kod ortologa i članova iste grupe SOX proteina (Lefebvre et al. 2007). Osim HMG boks domena, u okviru SOX proteina nalaze se još transaktivacioni ili transrepresorski domeni kao i domen odgovoran za dimerizaciju proteina (Lefebvre et al. 2007). Najveći broj SOX proteina (pripadnici SOXB1, SOXC, SOXE, SOXF grupe) na C-terminalnom kraju ima transaktivacione domene. U literaturi je uvaženo mišljenje da je na C-terminalnom domenu protina iz SOXB2 grupe lociran represorski domen (Bernard and Harley 2010; Uchikawa et al. 1999), dok proteini iz SOXD grupe

poseduju HMG domen ali nemaju transaktivacione domene (Chew and Gallo 2009). Najnoviji podaci iz literature ukazuju da aktivnost SOX transkripcionih regulatora zavisi od ćelijskog tipa, te da jedan SOX protein može imati ulogu i transkripcionog aktivatora i represora zavisno od ćelijskog konteksta (Kopp et al. 2008).

Članovi iste grupe SOX proteina imaju veoma slične biohemijske osobine i često su eksprimirani u istoj ćeliji (Wegner 2010). Zbog ovih karakteristika, među članovima familije gena *SOX* česta je pojava funkcionalne redundantnosti, naročito u okviru SOXB, SOXD, SOXF i SOXE grupa. Funkcionalna redundantnost podrazumeva da član iste grupe gena *SOX* može preuzeti funkciju drugog gena *SOX*, u uslovima njegovog odsustva usled delecije ili usled prisustva mutacije koja ga čini neaktivnim (Cermenati et al. 2008; Wegner 2010). Ovaj fenomen otežava izučavanje funkcije gena *SOX* klasičnim metodama utišavanja ekspresije kao što je korišćenje siRNK. Zbog toga se smatra da je poželjniji pristup u izučavanju funkcije ove grupe transkripcionih regulatora konstruisanje dominantno-negativnih (DN) mutanata. Dominantno negativni mutanti SOX proteina imaju očuvan HMG boks domen kojim se vezuju za svoje konsenzusno mesto u okviru promotora ali ne i deo proteina kojim ostvaruju svoju funkciju aktivacije ili represije, kao i interakciju sa drugim proteinima. SOX DN mutanti okupiraju vezivna mesta na molekulu DNK i tako onemogućavaju da se za istu regulatornu sekvencu veže neki drugi član SOX familije proteina koji može ostvariti funkciju i zamaskirati odsustvo proteina od interesa (Li et al. 2007; Milivojevic et al. 2013; Shih et al. 2010).

### **1.1.1. Funkcije gena *SOX/Sox* familije**

Geni *SOX/Sox* familije su uključeni u regulaciju različitih ćelijskih procesa tokom embrionalnog razvića i u adultnom periodu života. Imajući u vidu da ova familija obuhvata 20 članova kod miša i čoveka, ne iznenađuje činjenica da većina tkiva eksprimira bar jedan SOX protein u nekom stadijumu tokom razvića (Wegner 1999).

Gen *Sry*, po kojem je i čitava grupa dobila ime (*SRY* related HMG box- **SOX**), je lociran na Y hromozomu i presudan je faktor za determinaciju muškog pola kod sisara (Gubbay et al. 1990; Sinclair et al. 1990). Gen *Sry* je ekspimiran rano tokom razvića u somatskim ćelijama genitalnog grebena, i utiče na njihovu diferencijaciju u Sertolijeve

ćelije (Hacker et al. 1995; Jeske et al. 1995; Koopman et al. 1990). S obzirom da mutacije u genu *SRY* dovode do XY reverzije pola kod ljudi, kao i da su funkcionalne studije pokazale da se XX miševi koji sadrže *Sry* transgen razvijaju u mužjake, može se zaključiti da je ovaj gen ključan za nastanak muškog fenotipa i diferencijaciju gonada u testise (Koopman et al. 1990; Sinclair et al. 1990). Pored toga, novija istraživanja su pokazala da su *Sox8* i *Sox9* bitni za održavanje funkcije testisa kod odraslih miševa (Barrionuevo et al. 2016).

Jedan od najranije eksprimiranih, ujedno i najviše proučavanih gena *SOX* tokom razvića je *SOX2/Sox2*. Ovaj gen se eksprimira u unutarćelijskoj masi i epiblastu blastocita miša gde zajedno sa *Oct3/4* čini specifičnu grupu gena koji imaju ključnu ulogu u formiranju i održavanju ćelija unutarćelijske mase embriona u pluripotentnom stanju tokom ranog embrionalnog razvića (Rizzino 2009). Funkcionalne studije na mišu su pokazale da je delecija gena *SOX2* u zigotu letalna (Zhang and Cui 2014). Tokom razvića centralnog i perifernog nervnog sistema geni iz podgrupe *SOXB1* imaju preklapajuću ekspresiju i važnu ulogu u održavanju populacije proliferišućih neuralnih progenitora, dok su geni iz *SOXB2* podgrupe bitni za indukciju neurogeneze (Karnavas et al. 2013). Tačnije, u literaturi je poznato da su geni *SoxB1* podgrupe važni za supresiju neurogeneze održavanjem populacije neuralnih progenitora u proliferišućem stanju, dok *Sox21* ima bitnu ulogu za izlazak neuralnih progenitora iz proliferišućeg stanja i njihovu diferencijaciju u neurone (Sandberg et al. 2005). Pored neuralnog razvića, geni *SoxB1* podgrupe su bitni i za razviće sočiva kod pileta i miša (Wegner 1999), dok su kod čoveka heterozigotne mutacije gena *SOX2* povezane sa bilateralnom anoftalmijom ili mikroftalmijom (Ragge et al. 2005; Reis et al. 2010). Pored *SOXB1* podgrupe, preklapajuću ekspresiju tokom embrionalnog razvića centralnog i perifernog nervnog sistema imaju i geni *Sox* iz grupe C (*Sox4*, *Sox11* i *Sox12*). Geni iz *SoxC* grupe odgovorni su za kasnije stupnjeve diferencijacije neuaralnih prekursora u neurone (Wegner 2011). Istraživanja su pokazala da povećana ekspresija gena *Sox4* i *Sox11* kod pileta dovodi do rane indukcije ekspresije neuralnih markera (Bergsland et al. 2006). Pokazano je da *Sox11* gen ima važnu ulogu ne samo tokom razvića neuralnih progenitora, već i tokom diferencijacije različitih neuronalnih subpopulacija (Kuhlbrodt et al. 1998). Pored funkcije u regulaciji procesa neurogeneze, gen *Sox4* ima bitnu ulogu i u razviću B limfocita i, u manjoj meri, razviću T limfocita (Wegner 1999). Takođe,

studije su pokazale da su geni iz *SoxC* grupe ključni za kontrolu neuronalne diferencijacije tokom adultne neurogeneze (Mu et al. 2012). Što se tiče članova grupe *SoxE*, poznato je da je *Sox10* zadužen za formiranje različitih glijalnih tipova ćelija perifernog sistema, dok drugi član ove grupe, gen *Sox9*, ima ključnu ulogu u razviću hondrocita, kako tokom embrionalnog razvića tako i kod adulta (Haag et al. 2008; Wegner 1999). Literaturni podaci pokazuju da su članovi grupe *SOXF* (*Sox7*, *Sox17* i *Sox18*) bitni za razviće endoderma, proces angiogeneze, razviće srca i dlake (Lefebvre et al. 2007). Kod žabe (*Xenopus sp.*) geni *Xsox17a* i *Xsox17b* su homolozi gena *Sox17* miša i imaju ključnu ulogu u regulaciji i razviću endoderma (Wegner 1999).

U Tabeli 1. dat je sažet pregled funkcija gena *Sox* familije.

**Tabela 1: Pregled funkcija gena *Sox* familije.** Tabela je preuzeta i modifikovana iz (Lefebvre et al. 2007).

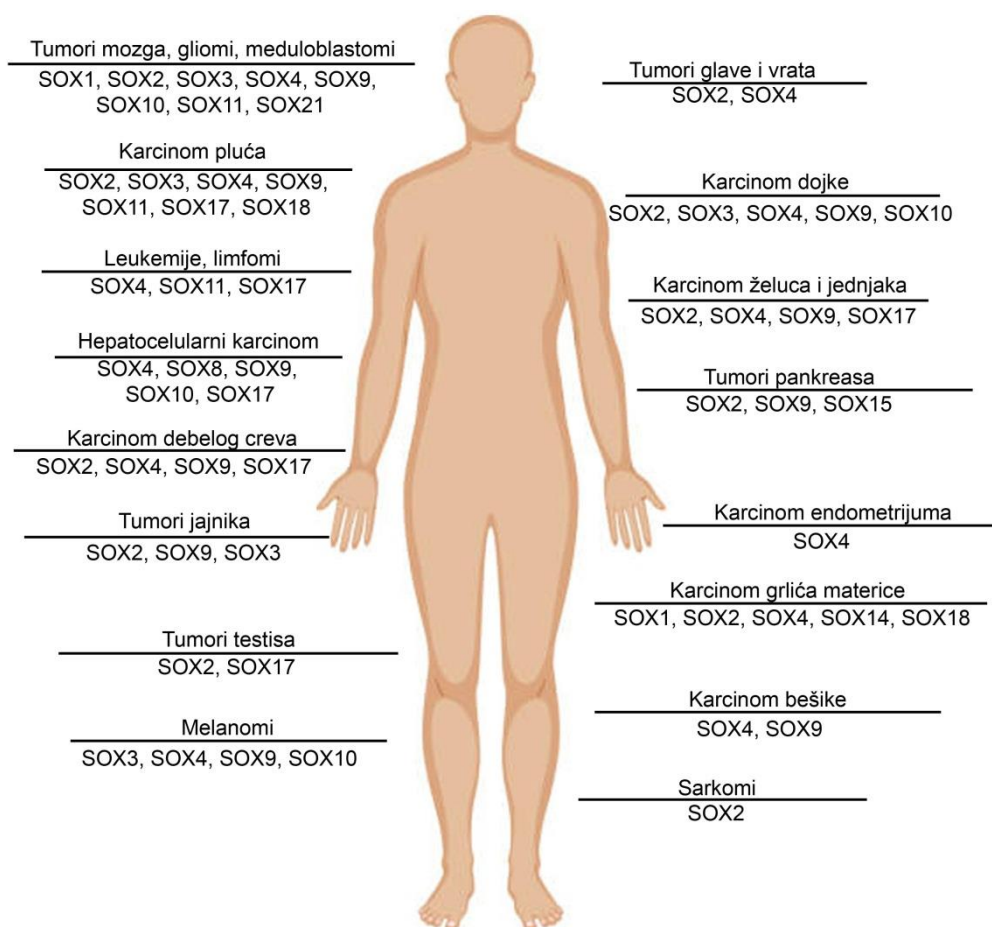
<b>Grupa</b>	<b>Gen</b>	<b>Funkcija</b>
<b>A</b>	<i>Sry</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Determinacija pola</li> <li>• Regulacija dopaminergičnih neurona nigrostriatalnog sistema</li> </ul>
<b>B1</b>	<i>Sox1</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Razviće oka</li> <li>• Neurogeneza</li> </ul>
	<i>Sox2</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Održavanje pluripotentnosti embrionalnih matičnih ćelija</li> <li>• Neurogeneza</li> <li>• Razviće oka</li> <li>• Razviće hipofize</li> </ul>
	<i>Sox3</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Neurogeneza</li> <li>• Razviće oka</li> <li>• Razviće hipofize</li> <li>• Razviće gonada</li> </ul>
<b>B2</b>	<i>Sox14</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Neurogeneza</li> </ul>
	<i>Sox21</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Neurogeneza</li> </ul>
<b>C</b>	<i>Sox4</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Kardiogeneza</li> <li>• Limfopoeza</li> <li>• Razviće pankreasa</li> <li>• Neurogeneza</li> </ul>
	<i>Sox11</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Kardiogeneza</li> <li>• Razviće oka, pluća, pankreasa, skeleta i slezine</li> <li>• Neurogeneza</li> </ul>
	<i>Sox12</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Nepoznata</li> </ul>
<b>D</b>	<i>Sox5</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Razviće skeleta</li> <li>• Razviće nervne kreste</li> <li>• Gliogeneza</li> </ul>



	<i>Sox6</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Provodljivost srčanog mišića</li> <li>• Razviće skeleta</li> <li>• Gliogeneza</li> </ul>
	<i>Sox13</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Limfopoeza</li> </ul>
<b>E</b>	<i>Sox8</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Gliogeneza</li> <li>• Razviće testisa</li> <li>• Osteogeneza</li> <li>• Formiranje nervne kreste</li> </ul>
	<i>Sox9</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Determinacija pola</li> <li>• Hondrogeneza</li> <li>• Razviće nervne kreste</li> <li>• Gliogeneza</li> <li>• Održavanje ćelija notohorda</li> <li>• Kardiogeneza</li> <li>• Formiranje unutrašnjeg uha</li> <li>• Formiranje folikula dlake</li> <li>• Razviće pankreasa</li> <li>• Razviće epitela creva</li> </ul>
	<i>Sox10</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Razviće nervne kreste</li> <li>• Formiranje unutrašnjeg uha</li> </ul>
<b>F</b>	<i>Sox7</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Kardiogeneza</li> </ul>
	<i>Sox17</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Formiranje endoderma</li> <li>• Angiogeneza</li> </ul>
	<i>Sox18</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Kardiogeneza</li> <li>• Angiogeneza</li> <li>• Razviće folikula dlake</li> </ul>
<b>G</b>	<i>Sox15</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Regeneracija skeletne muskulature</li> </ul>
<b>H</b>	<i>Sox30</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Spermatogeneza</li> </ul>

Iako su prvobitne studije o funkcijama gena *SOX* bile povezane sa njihovom ulogom u brojnim procesima tokom razvića, poslednjih godina je sve više rezultata koji ove gene povezuju i sa malignom transformacijom ćelije. Poznato je da su geni, kao i signalni putevi sa ključnom ulogom tokom razvića, često promenjeni u različitim tipovima kancera (Castillo and Sanchez-Cespedes 2012). Brojne *in vitro* studije su pokazale da je izmenjena ekspresija bar jedog gena *SOX* dovoljna za malignu transformaciju ćelije (Dong et al. 2004). Takođe, *in vivo* studije su pokazale da je kod različitih tipova tumora prisutna izmenjena ekspresija ili amplifikacija regiona u kojem se nalazi gen *SOX* (Dong et al. 2004). Geni *SOX* familije najčešće imaju funkciju onkogeni, ali je poznato da mogu imati i ulogu tumor supresora. Tako je za *SOX1* pokazano da može imati ulogu i onkogeni i tumor supresora u zavisnosti od tipa tumora (Garcia et al. 2017; Song et al. 2016). Iako je *SOX2* prvobitno okarakterisan kao

onkogen, novije studije su pokazale da ovaj transkripcijski regulator može imati i ulogu tumor supresora u pojedinim tipovima tumora, kao što su karcinom želuca i dojke (Otsubo et al. 2008; Sarkar and Hochedlinger 2013; Wu et al. 2013). *SOX4* je okarakterisan u većini tumora kao okogen, međutim nekoliko studija je pokazalo da ovaj gen može imati i potencijalnu tumor supresorsku ulogu u hepatocelularnom tumoru i tumoru bešike (Pan et al. 2009). Brojne funkcionalne studije su pokazale tumor supresorsku ulogu gena *SOX7* u tumoru prostate, creva, pluća, dojki i glioblastomu (Stovall et al. 2014; Xiuju et al. 2016). Uloga gena *SOX9* u procesu kancerogeneze je možda i najkontraverznija, s obzirom da ovaj gen može da deluje kao onkogen ili tumor supresor i u istom tipu tumora (Castillo and Sanchez-Céspedes 2012). *SOX15* je okarakterisan kao tumor supresor u tumoru pankreasa (Thu et al. 2014b), dok *SOX30* ima ulogu tumor supresora u karcinomu pluća (Han et al. 2015). Na Slici 1 shematski su prikazani *SOX* proteini za koje je do sada poznato da su uključeni u nastanak navedenih tipova tumora.

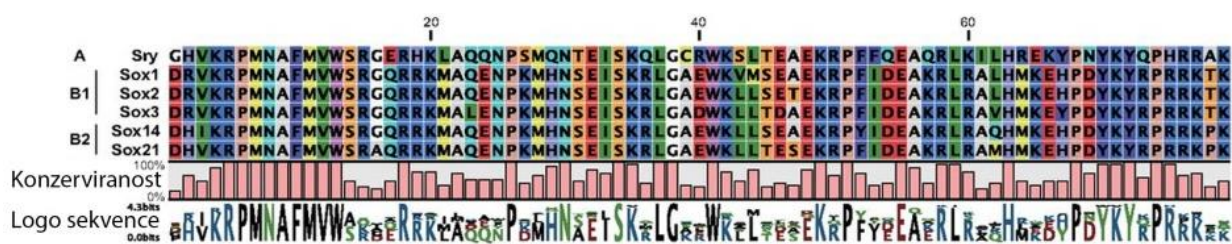


**Slika 1:** Shematski prikaz uloge SOX proteina u različitim malignim oboljenjima. Slika je preuzeta i modifikovana iz (Castillo and Sanchez-Cespedes 2012).

Svoju ulogu tokom maligne transformacije *SOX* geni najčešće ostvaruju regulacijom gena odgovornih za osnovne ćelijske procese, kao što su proliferacija, ćelijska smrt i ćelijski ciklus (Thu et al. 2014a). Precizna uloga gena *SOX* u različitim tipovima kancera još uvek nije u potpunosti poznata i može se očekivati da se u ovom polju istraživanja otkriju nove činjenice koje će upotpuniti saznanja o ulozi gena *SOX* u malignoj transformaciji ćelije.

### 1.1.2. Geni *SOXB/SoxB* grupe

Pre više od 20 godina, prvu klasifikaciju *SOX* gena uradio je Wright na osnovu parcijalnih sekvenci ovih gena izolovanih iz embriona miša (Wright et al. 1993). Poređenjem sekvenci *Sox* gena sa *Sry* genom, identifikovano je pet *Sox* gena sa visokim stepenom sličnosti u okviru HMG boksa koji su označeni kao *Sox1*, *Sox2*, *Sox3*, *Sox14* i *Sox21* (Wright et al. 1993). Dalje analize su pokazale da geni *Sox14* i *Sox21* pokazuju visoki stepen homologije sa genima *Sox1*, *Sox2* i *Sox3* u okviru HMG boks domena, dok je izvan ovog domena visoka homologija očuvana samo između ova dva gena (Slika2) (Uchikawa et al. 1999).



**Slika 2:** Poređenje HMG domena SRY proteina sa sekvencom HMG domena članova SOXB podgrupe kod miša. Nivo očuvanosti amino kiselinskih sekvenci je prikazan na liniji ispod sekvenci za svaku amino kiselinu i iznosi od 0 do 100%. Slika je preuzeta i modifikovana iz (Kamachi and Kondoh 2013).

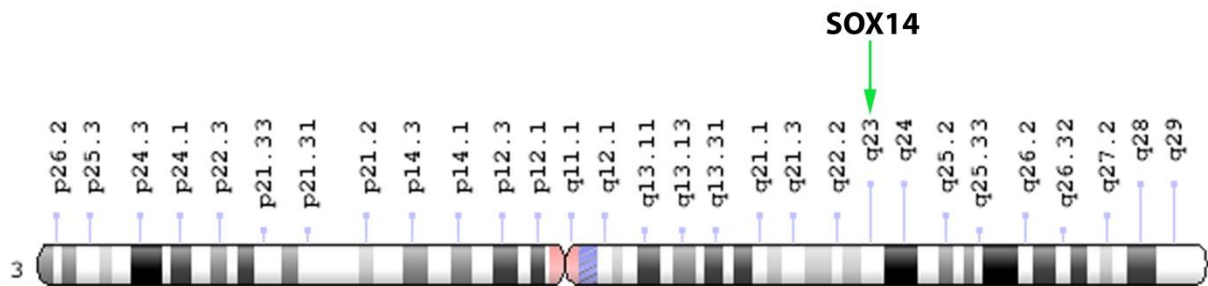
Upravo na osnovu prikazane homologije, *SOXB* grupa je dalje podeljena na dve podgrupe: *SOXB1* podgrupu, koju čine *SOX1*, *SOX2* i *SOX3* i na *SOXB2* podgrupu koja obuhvata gene *SOX14* i *SOX21* (Slika 2). Eksperimenti rađeni na DC5 minimalnom enhenseru  $\delta 1$  gena za kristalin (eng. *crystallin*) pileta pokazali su da *SOX14* i *SOX21* poseduju osobine transkripcionih represora (Uchikawa et al. 1999), za razliku od *SOX1*, *SOX2* i *SOX3* proteina koji pokazuju svojstva transkripcionih aktivatora (Kamachi et al. 1995; Kamachi et al. 1998).

Funkcije ovih gena su brojne. Između ostalog, ovi geni odgovorni su za održavanje pluripotentnosti matičnih ćelija, bitni su za regulaciju procesa gastrulacije i neuralne indukcije, kao i formiranje tkiva i organa tokom embrionalnog razvića (Guth and Wegner 2008). Najveći broj literaturnih podataka odnosi se na razumevanje njihove uloge tokom neuralnog razvića, a poslednjih godina pažnja je usmerena na istraživanje uloge ovih gena u procesu maligne transformacije ćelija (Castillo and Sanchez-Céspedes 2012).

### 1.1.3. Gen *SOX14/Sox14*

Pre dve decenije identifikovan je humani gen *SOX14* koji se sastoji od jednog egzona i kodira protein dužine 240 aminokiselina (Arsic et al. 1998). *SOX14* protein je bogat prolinom i sadrži jedno potencijalno mesto N-glikozilacije, kao i nekoliko aminokiselinskih ostataka koji mogu biti fosforilisani (Arsic et al. 1998). Komparativna analiza sekvenci gena *Sox14* koze (*Capra hircus*), krave (*Bos taurus*), pacova (*Rattus norvegicus*) i drugih kičmenjaka pokazala je da je ovaj gen evolutivno visoko očuvan i ukazala na postojanje konzerviranih domena koji mogu biti važni za funkcionisanje *SOX14* proteina (Popovic and Stevanovic 2009).

*SOX14* gen je lociran na hromozomu 3 u regionu q23 (Slika 3) (Arsic et al. 1998). Mutacije mapirane u ovom regionu povezane su sa BPE sindromom (eng. *Blepharophimosis Ptosis Epicanthus inversus*) i Mobijusovim sindromom, zbog čega je dugo *SOX14* smatran jednim od ključnih gena kandidata koji mogu biti povezani sa pomenutim oboljenjima (Wilmore et al. 2000). Odsustvo mutacija u okviru gena *SOX14* kod pacijenata sa ovim oboljenjem pokazala je da gen *SOX14* nije odgovoran za nastanak pomenutih sindroma (Hargrave et al. 2000a).



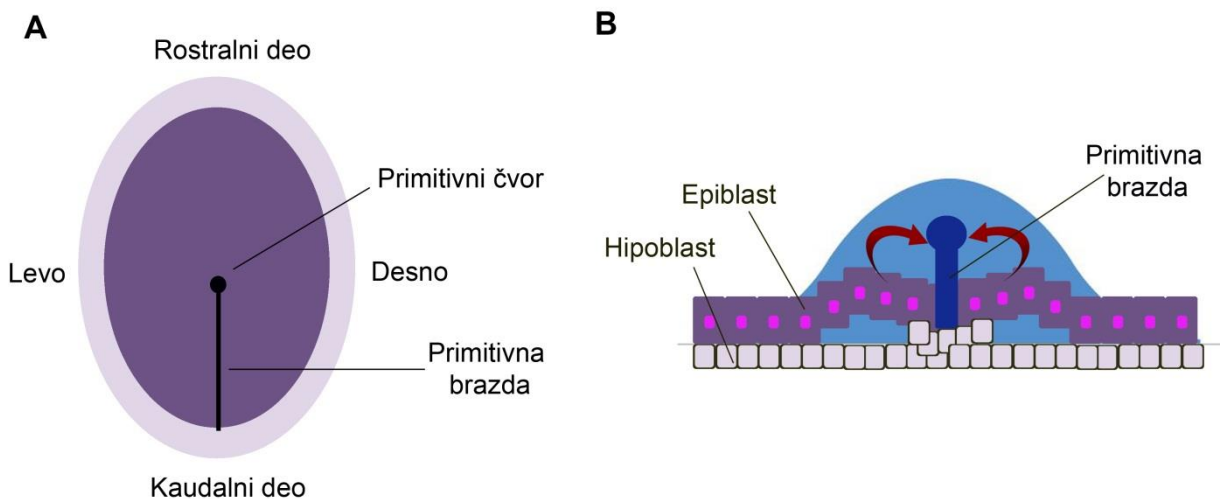
**Slika 3: Shematski prikaz hromozoma 3 i lokalizacije gena *SOX14* u regionu q23.**

Unutar i izvan HMG boks domena, SOX14 protein pokazuje najveći stepen sličnosti aminokiselinske sekvence sa genom SOX21, drugim članom SOXB2 podgrupe (Uchikawa et al. 1999). Početna istraživanja pokazala su da C-terminalni domen SOX14 proteina ima represorska svojstva (Uchikawa et al. 1999).

Visoki stepen očuvanosti tokom evolucije (Popovic and Stevanovic 2009) i činjenica da do danas nije opisan nijedan klinički sindrom povezan sa mutacijama u genu *SOX14*, govore u prilog da je njegova uloga tokom embrionalnog razvića važna, i da su mutacije koje dovode do gubitka funkcije proteina SOX14 potencijalno letalne. Iako je prošlo dosta vremena od njegovog otkrića, gen *SOX14* je najmanje izučavan gen u okviru gena *SOXB* grupe, tako da se o njegovoj funkciji malo zna.

## 1.2. Razviće nervnog sistema

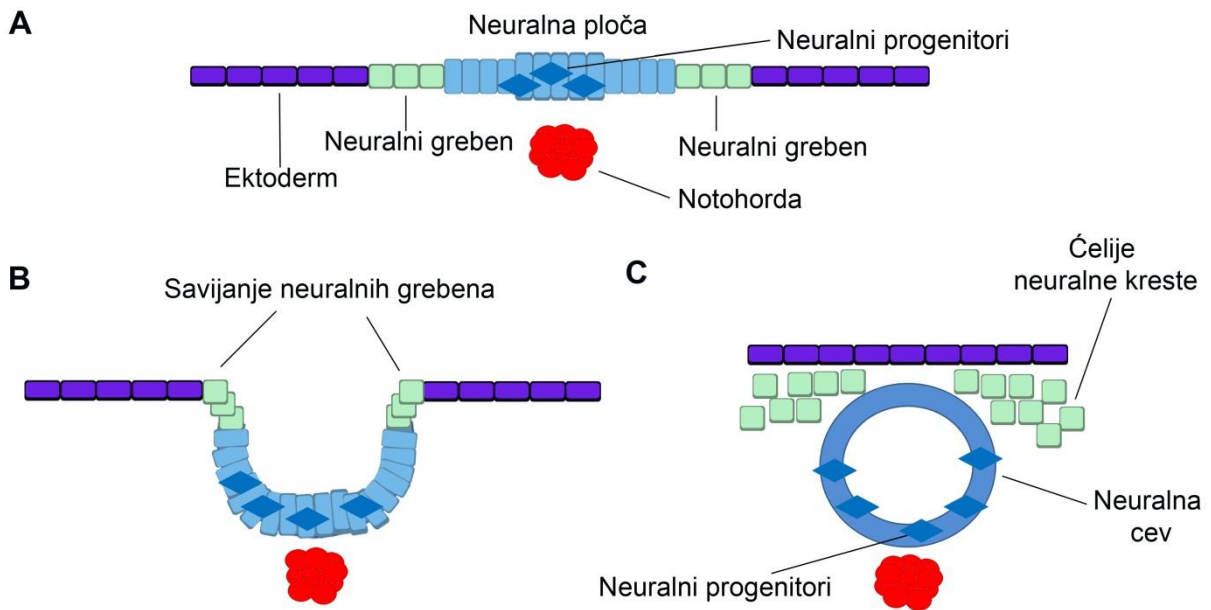
Neurogeneza i razviće nervnog sistema kod čoveka je dugotrajni proces koji započinje tokom treće gestacione nedelje diferencijacijom neuralnih progenitornih ćelija, a neurogeneza se nastavlja u specifičnim regionima mozga tokom adultnog perioda. Do kraja druge gestacione nedelje, embrion ima ovalni oblik i sastoji se iz dva sloja, gornjeg koga čine ćelije epiblasta i donjeg sloja koji je sačinjen od ćelija hipoblasta (Slika 4, površinski izgled embriona prikazan je na slici 4A, dok je poprečni presek embriona prikazan na slici 4B). Tokom treće gestacione nedelje embrion se transformiše u troslojnu strukturu tokom procesa gastrulacije (Stiles and Jernigan 2010). Tokom ovog procesa ćelije epiblasta se diferenciraju u tri tipa matičnih ćelija od kojih će tokom razvića nastati sve strukture embriona, dok će ćelije hipoblasta dati ekstraembrionalna tkiva. Jedan tip matičnih ćelija, koje nastaju tokom gastrulacije, su neuralne matične ćelije od kojih nastaju neuralne progenitorske ćelije koje će se diferencirati u sve ćelije centralnog nervnog sistema (Stiles and Jernigan 2010).



**Slika 4: Shematski prikaz formiranja primitivne brazde tokom embrionalnog razvića.** A – Shematski prikaz površinskog izgleda primitivne brazde i embriona tokom prve dve nedelje embrionalnog razvića. B – Shematski prikaz poprečnog preseka embriona koji se sastoji iz dva sloja ćelija, ćelija epiblasta i ćelija hipoblasta. Tokom treće nedelje embrionalnog razvića ćelije epiblasta započinju migraciju kroz primitivnu brazdu.

Prvi korak tokom procesa gastrulacije je formiranje takozvanog otvora u gornjem sloju embriona koji predstavlja primitivnu brazdu (Slika 4) (Chuai and Weijer 2008). Nakon toga, ćelije epiblasta započinju migraciju prema primitivnoj brazdi, prolaze kroz nju i dalje migriraju ka rostralnom delu embriona (Slika 4B). Tokom migracije ćelija nastaju tri sloja embriona: endoderm, mezoderm i ektoderm (Kiecker et al. 2016). Od endodermalnih matičnih ćelija tokom daljeg embrionalnog razvića nastaju digestivni i respiratorni sistem, dok će ćelije mezoderma dati mišiće, kosti, hrskavicu i kardiovaskularni sistem. Ektoderm čine epidermalne ćelije koje će se razviti u kožu, nokte i znojne žlezde, dok drugi deo ektoderma čine neuroektodermalne ćelije (neuralne progenitorske ćelije) od kojih će dalje nastati nervni sistem. Na početku gastrulacije, ćelije epiblasta, od kojih će se kasnije diferencirati neuralne progenitorske ćelije, su locirane u rostralno-kaudalnom delu dvoslojnog embriona. Diferencijacija ovih ćelija u neuralne progenitorske ćelije se dešava pod kontrolom kompleksnih signalnih puteva koji precizno regulišu ekspresiju brojnih gena. Nakon migracije ćelije epiblasta kroz primitivnu brazdu, ove ćelije nastavljaju kretanje ka strukturi koja se zove primitivni čvor. Ovo pokreće aktivaciju brojnih proteina u migratornim ćelijama koji imaju ulogu u nastanku neuralnih progenitora od ćelija epiblasta (Stiles and Jernigan 2010). Između 7. i 8. dana embrionalnog razvića dolazi do ekspresije neuralno specifičnih gena *Nestin* i *Sox1*, čija ekspresija karakteriše neuralne progenitore (Kawaguchi et al. 2001; Wood and Episkopou 1999).

Tokom gastrulacije, migracijom ćelija epiblasta nastaje notohorda koja do 16. dana embrionalnog razvića inicira nastanak embrionalne strukture koja se sastoji iz neuralnih progenitorskih ćelija i naziva se neuralna ploča (Slika 5A). Na krajevima neuralne ploče nalaze se ćelije epiblasta koje nisu migrirale kroz primitivnu brazdu i koje formiraju ektoderm (Slika 5A) od kojeg će kasnije nastati epidermis, dlaka i nokti (Sadler 2005). Neuralni progenitori se nalaze između neuralnih grebena koji se pružaju sa strane nervne ploče (Slika 5A) i od kojih se do 21. dana gestacije zatvaranjem neuralne ploče formira neuralna cev (Slika 5B) (Stiles and Jernigan 2010). Od neuralnih grebena tokom razvića nastaje neuralna kresta (Slika 5C) koja se dalje razvija u periferni nervni system (Bronner 2012). Kada je neuralna cev kompletno formirana, neuralni progenitori formiraju jedan sloj ćelija koji se nalazi u samom centru neuralne cevi.

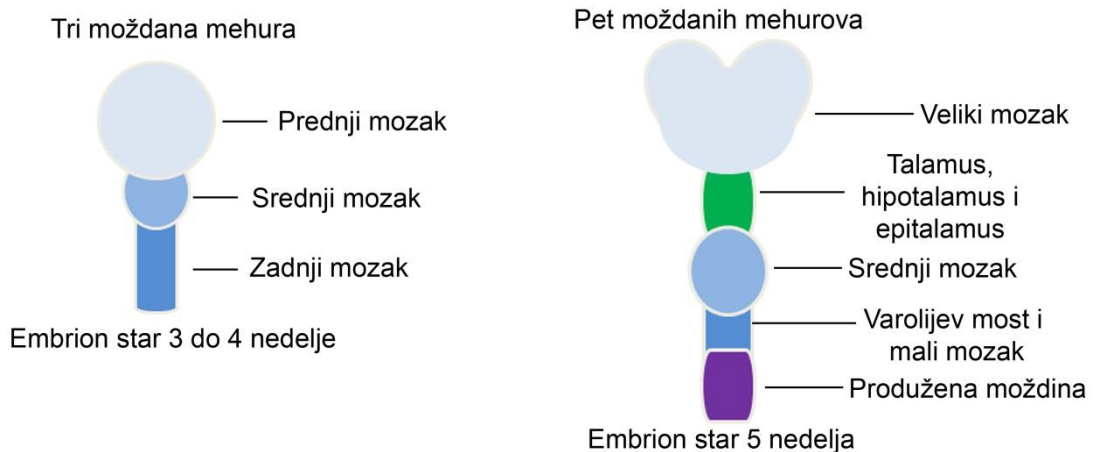


**Slika 5: Shematski prikaz formiranja neuralne cevi.** **A** –Tokom gastrulacije, migracijom ćelija epiblasta nastaje notohorda koja inicira nastanak neuralne ploče. Na krajevima neuralne ploče nalaze se ćelije epiblasta koje nisu migrirale kroz primitivnu brazdu i koje formiraju ektoderm. Neuralni progenitori se nalaze između neuralnih grebena koji se pružaju sa strane nervne ploče. **B** – Podizanjem i savijanjem neuralnih grebena dolazi do zatvaranja neuralne ploče i formiranja neuralne cevi. **C**– Od neuralnih grebena tokom razvića nastaje neuralna kresta. Slika je preuzeta i modifikovana iz (Shyamala et al. 2015).

Po završetku formiranja neuralne cevi, dolazi do dramatičnih promena u okviru ove strukture, pri čemu se prednji deo cevi širi formirajući tri moždana mehura (Slika 6). Prednji mehur se razvija u prednji mozak (proencefalon), srednji mehur se razvija u srednji mozak (mezecefalon), dok se od krajnjeg mehura razvija zadnji mozak (rombencefalon). Formirane moždane strukture se dalje razvijaju i do 5. nedelje embrionalnog razvića formira se pet moždanih mehurova koji obuhvataju ostale delove mozga. Na taj način se tokom embrionalnog razvića formiraju veliki mozak (cerebrum), talamus, hipotalamus, epitalamus, Varolijev most, mali mozak (cerebellum) i produžena moždina (Slika 6) (Stiles and Jernigan 2010).

Ovako formirane moždane strukture predstavljaju primarnu organizaciju centralnog nervnog sistema (Stiles and Jernigan 2010).



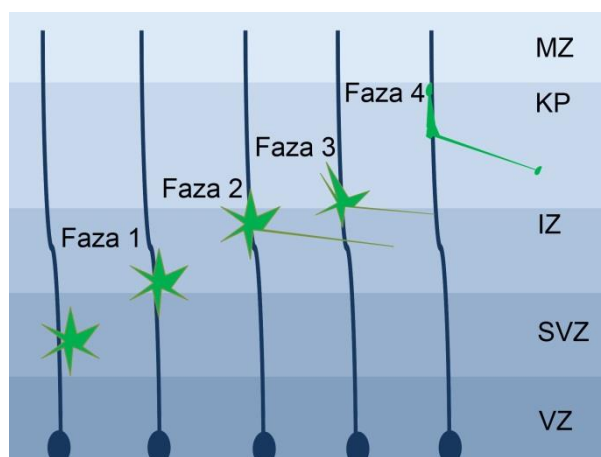


**Slika 6: Shematski prikaz primarne organizacija centralnog nervnog sistema tokom ranih faza embrionalnog razvića kod sisara.** Slika je modifikovana sa sajta <https://cnx.org/contents/FPtK1znh@8.119:sDe94uo3@3/The-Embryologic-Perspective>.

### 1.2.1. Migracija i diferencijacija neurona tokom embrionalnog razvića

Od devete gestacione nedelje pa sve do kraja gestacije dolazi do značajnih morfoloških promena u razviću mozga, pri čemu se formira karakterističan naboran izgled mozga, sačinjen od velikog broja vijugi i brazdi. Morfološkoj promeni mozga u ovom periodu značajno doprinosi i formiranje neurona koje počinje 42.dana embrionalnog razvića, pri čemu delovi mozga koji sadrže tela neurona formiraju sivu masu. Humani mozak je sačinjen od biliona neurona koji se formiraju sredinom gestacije (Bayer et al. 1993). Populacija neuralnih progenitorskih ćelija na kraju gastrulacije je mala da bi nastao toliko veliki broj neurona, tako da je prvi korak u daljem formiranju neurona povećanje populacije neuralnih progenitorskih ćelija. Neuralni progenitori su mitotičke ćelije, odnosno ćelije sposobne da se dele, dok zreli neuroni nemaju sposobnost deobe i predstavljaju postmitotičke ćelije. Od kraja gastrulacije do 42. dana embrionalnog razvića neuralni progenitori se simetrično dele. Na taj način od jednog neuralnog progenitora nastaju dva identična neuralna progenitora, pri čemu se nakon više ovakvih deoba u periodu između 25. i 42. dana embrionalnog razvića značajno povećava populacija neuralnih progenitora. Nakon 42.dana embrionalnog razvića neuralni progenitori prestaju da se dele simetrično i

započinju asimetričnu deobu, tokom koje nastaju dva tipa ćelija, odnosno od neuralnog progenitora nastaje jedan neuralni progenitor i jedan neuron (Stiles and Jernigan 2010). Novonastali neuralni progenitor ostaje u proliferišućoj zoni i nastavlja da se deli. Broj neuralnih progenitora koji se asimetrično dele se povećava postepeno i do 108. dana embrionalnog razvića završava se nastanak neurona (Clancy et al. 2001). Postmitotički neuron brzo napušta proliferišuću ventrikularnu zonu (VZ) i subventrikularnu zonu (SVZ) i migrira u korteks mozga. Postoje dva tipa migracije neurona, radijalna i tangencijalna migracija. Radijalna migracija se dešava uz pomoć radijalne glije, odnosno ćelija koje predstavljaju posebne fetalne astrocite koji su raspoređeni poput konopaca između ventrikularne zone i površine mozga (Rakic 1990). Migrirajući neuroni nakon proliferacije preuzimaju bipolarnu morfologiju i započinju migraciju uz radijalnu gliju kako bi došli do svog konačnog odredišta (Slika 7) (Kawauchi 2015). Zapravo, novonastali neuroni napuštaju proliferativnu zonu (ventrikularna i subventrikularna zona) kao multipolarni i migriraju ka intermedijalnoj zoni (IZ). Po napuštanju intermedijarne zone, neuroni poprimaju bipolarnu morfologiju, pružaju akson i započinju migraciju neurona u korteks duž radijalne glije (Slika 7) (Azzarelli et al. 2017). Neuroni na taj način migriraju paralelno površini mozga u intermedijalnoj/subventrikularnoj zoni i dalje nastavljaju migraciju do marginalne zone (Slika 7).



**Slika 7: Neuronalna polarizacija i radijalna migracija neurona u korteksu.** Radijalna glija (ćelije tamno plave boje na slici) su visoko polarizovane ćelije koje se pružaju kroz korteks. Postmitotički neuroni (zelene ćelije na slici) dobijaju multipolarnu morfologiju u subvertikalnoj zoni (SVZ) i u donjim slojevima intermedijalne zone (IZ) ( Faza 1). Nakon nekoliko sati, u gornjim slojevima IZ, migrirajući

neuroni postaju bipolarni i pružaju akson koji započinje migraciju neurona u korteks duž radijalne glije (tzv. *leading proces*- Faza 2). Neuron dalje nastavlja migraciju duž radijalne glije kako bi došao do svog konačnog mesta (Faze 3 i 4). VZ – ventrikularna zona; KP– kortikalna ploča; MZ – marginalna zona. Slika je modifikovana sa sajta <https://www.uni-muenster.de/Biologie.AllgmZoo/Gruppen/Pueschel/polarity.html>.

Za precizno pozicioniranje neurona u korteksu bitnu ulogu imaju Kahal-Recijusove ćelije (eng. *Cajal-Retzius*) koje eksprimiraju signalni protein Relin. Relin signalizuje neuronima da završe migraciju i da se pozicioniraju u korteksu (Bielle et al. 2005; Huang 2009; Valiente and Marin 2010). Pravilnom migracijom od ventrikularne zone do kortikalne i marginalne zone, neuroni zauzimaju odgovarajuću poziciju formirajući 6 slojeva u korteksu mozga. Ovaj proces formiranja korteksa tokom embrionalnog razvića naziva se kortikogeneza. Migracija neurona predstavlja proces razvoja mozga koji omogućava pravilnu slojevitost korteksa i nastanak svih struktura i funkcionalnih jedinica. Na taj način neuroni koji se prvi formiraju zauzimaju dublje slojeve kortikalne ploče, dok kasnije nastali neuroni zauzimaju površinske slojeve. Ovaj proces traje tokom gestacije (Cooper 2008). Na važnost procesa migracije neurona ukazuje činjenica da poremećena migracija može uzrokovati preuranjenu smrt fetusa, epileptične napade, kao i različita neurodegenerativna oboljenja (Gleeson and Walsh 2000).

Pored migracije neurona, bitan proces za organizaciju mozga tokom razvića jeste i diferencijacija neuralnih progenitora u određeni tip neurona. Brojne studije koje su sprovedli MekKonel (eng. *McConnell*) i saradnici, pokazale su da se tokom ranog perioda razvića korteksa neuralni progenitori mogu diferencirati u bilo koji tip neurona, dok kasnije tokom razvića njihova diferencijacija postaje restriktivnija tako da se neuralni progenitori mogu diferencirati samo u određeni tip neurona (Desai and McConnell 2000; Frantz and McConnell 1996; McConnell and Kaznowski 1991). Neuronalne ćelije poseduju nastavke aksone i dendrite pomoću kojih stupaju u međusobne veze i postaju deo aktivne mreže neurona u mozgu. Aksoni su nastavci koji omogućavaju neuronima da šalju signale drugim neuronima, dok dendriti omogućavaju neuronima primanje signala sa drugih neurona. Pomoću terminalnih završetaka aksoni ostvaruju komunikaciju sa okolnim neuronima formirajući sinapsu, pri čemu se ostvaruje transmisija elektrohemijskih signala između neurona (Munno and Syed 2003).

Za diferencijaciju neuralnih progenitora u neurone, astrocite ili oligodendrocite ključnu ulogu imaju transkripcioni regulatori koji određuju neuralnu sudbinu progenitorskih ćelija u centralnom nervnom sistemu (CNS). Bitnu ulogu za nastanak neurona, odnosno za proces neurogeneze, imaju proneuralni geni koji kodiraju grupu takozvanih bHLH (eng. *helix-loop-helix*) trans-aktivacionih proneuralnih proteina. Ovi proteini su prvo identifikovani kod vinske mušice (*Drosophila* sp.) 80-tih godina prošlog veka, a kasnije su njihovi homolozi otkriveni i kod hidre (*Hydra* sp.) i žarnjaka (*Cnidaria* sp.) (Reeves and Posakony 2005). To ukazuje da su ovi geni visoko evolutivno očuvani. Proneuralni proteini se eksprimiraju rano tokom razvića u progenitorskim ćelijama, ali se njihova ekspresija održava i kod postmitotičkih neurona gde reguliše migraciju i rast aksona i dendrita (Hand et al. 2005; Hassan et al. 2000; Pacary et al. 2011). Proneuralni proteini najčešće utiču na izlazak progenitora iz ćelijskog ciklusa i inicijaciju njihove diferencijacije (Bertrand et al. 2002), ali postoje i neki izuzeci kada oni podstiču proliferaciju progenitora (Flora et al. 2009). Kod vinske mušice su identifikovane dve familije ovih gena, *ac* geni (eng. *achaete-scute*) koji kontrolišu progenitorske ćelije centralnog i perifernog nervnog sistema, i *atonal* familija gena koja utiče na nastanak progenitora fotoreceptora, hordotonalnih organa i olfaktornih receptora (Campos-Ortega 1998; Modolell 1997). Kod kičmenjaka je identifikovan mnogo veći broj gena *bHLH* koji se eksprimiraju tokom embrionalnog razvića nervnog sistema, ali samo za neke od njih je pokazana proneuralna funkcija (Parras et al. 2002). Takođe, za neke od ovih gena je pokazano da, ne samo da imaju proneuralnu ulogu, već utiču i na specifikaciju određenog tipa neurona. Pokazano je da gen *Mash-1* (eng. *mammalian a\_achaete s\_scute h\_homolog-1*) indukuje ekspresiju markera GABA-ergičkih neurona u dorzalnim neuronima telencefalona (Fode et al. 2000).

Najviše studija o ulozi proneuralnih gena u određivanju sudbine neuralnih progenitora sprovedene su na model sistema vinske mušice. Tokom razvića centralnog i perifernog nervnog sistema, neurogeneza inicirana ekspresijom proneuralnih gena je prostorno ograničena na male grupe ćelija, nazvane proneuralni klasteri, koje imaju sposobnost da postanu neuroni (Reeves and Posakony 2005). U samim ćelijama proneuralnih klastera, ekspresija gena koji su bitni za proces neurogeneze je strogo kontrolisana proneuralnim genima. Progenitorne ćelije u okviru ovih klastera, u kojima

su određeni geni inhibirani Notch signalnim putem, postaju epidermalne ćelije (Reeves and Posakony 2005).

Za diferencijaciju i specifikaciju različitih tipova neurona tokom neurogeneze, pored proneuralnih gena bitnu ulogu imaju i brojni signalni putevi poput Wnt/ $\beta$ -katenin, Sonic Hedgehog, Notch, PDGF/EGF, STAT3 i BMP signalnog puta, ali i drugi transkripcioni regulatori koje kodiraju geni *Sox1*, *Sox2*, *Sox3*, *Sox21*, *Hes1* i *Hes5* (Wen et al. 2009). Zapravo, kompleksna mreža brojnih molekula, njihov nivo ekspresije u tačno određenom periodu i određena funkcija tokom embrionalnog razvića nervnog sistema odlučuje da li progenitorske ćelije nastavljaju da proliferišu ili dolazi do inicijacije njihove diferencijacije u određeni tip neurona (Karsten et al. 2003).

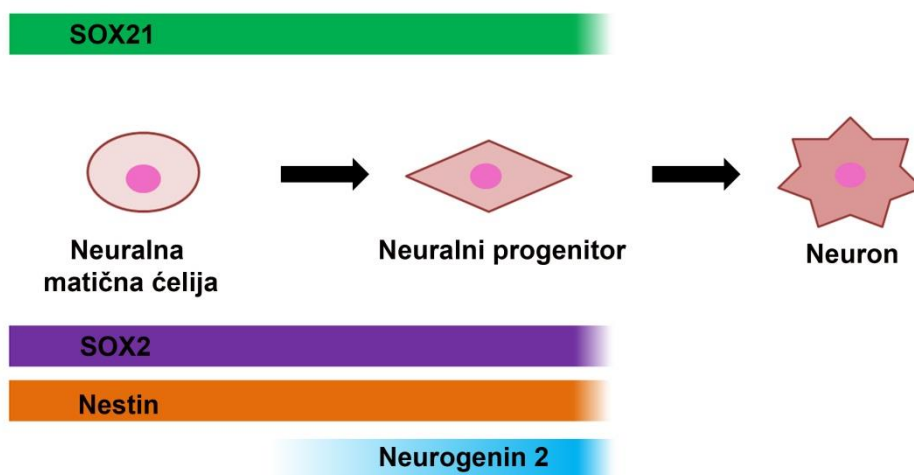
### **1.2.2. Uloga gena *SOXB/SoxB* u neuralnoj diferencijaciji**

Kao što je već pomenuto, veoma važna, zajednička funkcija SOXB proteina je regulacija ranih faza procesa neurogeneze. Članovi ove grupe su uglavnom ekspimirani tokom embrionalnog razvića centralnog nervnog sistema kao i u adultnom mozgu. Ekspresioni profil gena *SOXB* tokom razvića CNS-a je preklapajući i pokriva sve faze razvića, od neuralnih progenitorskih ćelija do neurona i glijalnih ćelija (Avilion et al. 2003; Pevny and Placzek 2005; Sarkar and Hochedlinger 2013; Schepers et al. 2002; Wood and Episkopou 1999). Funkcije gena *SOXB* u ovim ćelijama su veoma slične i smatra se da su redundantne (Bylund et al. 2003). Tokom razvića CNS-a, *Sox1*, *Sox2*, *Sox3* i *Sox21* su ekspimirani kako u embrionalnim, tako i u adultnim neuralnim progenitorskim ćelijama, dok je za razliku od njih *Sox14* ekspimiran samo u određenom setu neuralnih progenitorskih ćelija u rostralnom talamusu miša i u određenim tipovima zrelih neurona (Bylund et al. 2003; Cunningham et al. 2008; Hargrave et al. 2000b; Matsuda et al. 2012; Ohba et al. 2004; Sandberg et al. 2005; Sellers et al. 2014; Wood and Episkopou 1999).

*Sox2* se ekspimirira u embrionalnim matičnim ćelijama, neuralnim progenitorskim ćelijama neuralnog ektoderma u mozgu tokom embrionalnog razvića (Collignon et al. 1996; Ferri et al. 2004), kao i u neuralnim matičnim ćelijama adultnog mozga (Favaro et al. 2009; Ferri et al. 2004). Tokom diferencijacije neuralnih progenitorskih ćelija, kako ćelije završavaju ćelijski ciklus i prestaju sa deobom, dolazi

do smanjenja ekspresije ovog gena, tako da ekspresija gena *Sox2* nije detektovana u većini zrelih neurona (Graham et al. 2003). Neke studije su pokazale da se *Sox2* eksprimira u određenom setu zrelih neurona u hipotalamusu (Hoefflin and Carter 2014). Ekspresija gena *Sox2* se preklapa sa ekspresijom ostalih SOXB1 proteina, pa se tako i SOX1 i SOX3 ekspimiraju u embrionalnim matičnim ćelijama od kojih će nastati neuralne progenitorske ćelije (Collignon et al. 1996; Miyagi et al. 2008; Pevny et al. 1998).

*Sox21* ima ograničenu ekspresiju u embrionalnom i adultnom mozgu (Matsuda et al. 2012). Ovaj gen je ekspimiran u neuralnim matičnim i progenitorskim ćelijama, gde se njegova ekspresija preklapa sa ekspresijom gena *Sox2* i *Nestin* (Slika 8), kao i u neuralnim progenitorskim ćelijama, u ventrikularnoj zoni, koje ekspimiraju *Neurogenin 2* i ne ekspimiraju se u diferenciranim neuronima (Slika 8) (Ohba et al. 2004; Sandberg et al. 2005).



**Slika 8: Shematski prikaz ekspresije *Sox21* u ćelijama tokom neuralne diferencijacije.** *Sox21* se eksprimira u ranijim fazama neuralne diferencijacije (u neuralnim matičnim i u neuralnim progenitorskim ćelijama). U ovim ćelijama *Sox21* ima preklapajući profil ekspresije sa genima *Sox2* i *Nestin*, dok u neuralnim progenitorskim ćelijama ima preklapajući profil ekspresije sa genom *Neurogenin 2*. Ekspresija gena *Sox21* nije detektovana u neuronima.

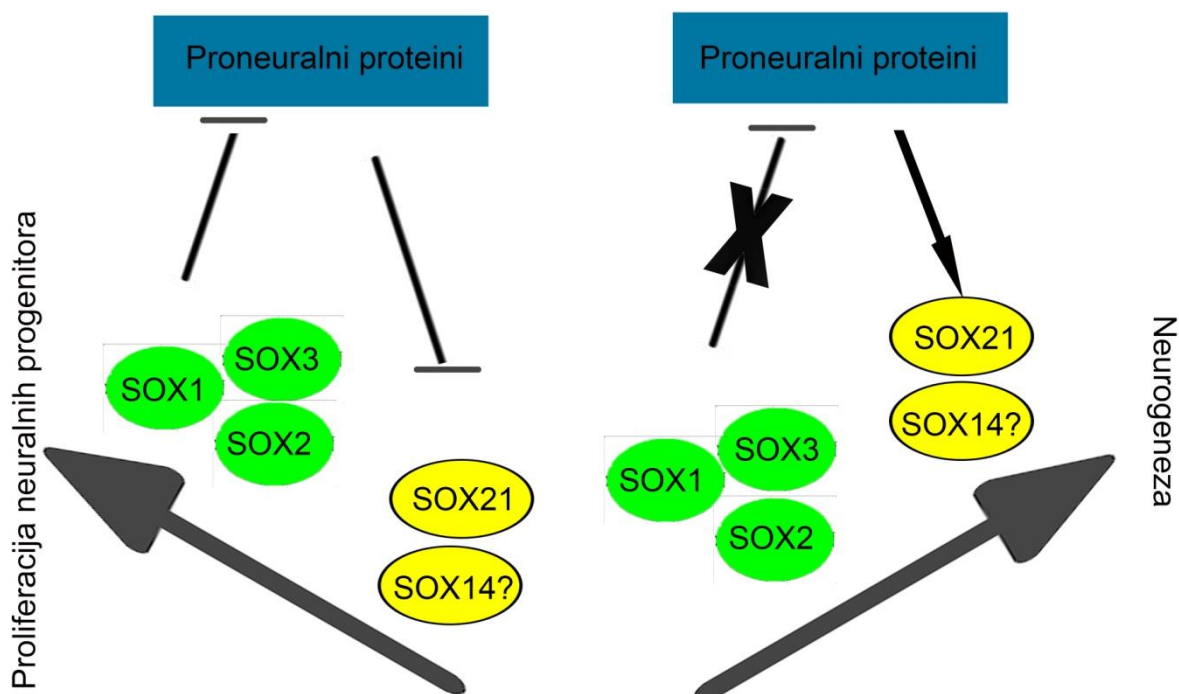
*Sox14* se eksprimira u tačno definisanom setu neurlanih progenitora od kojih će nastati GABA-ergički neuroni, u određenom podtipu GABA-ergičkih neurona i u postmitotičkim V2 interneuronima u tačno definisanoj dorzo-ventralnoj poziciji, blizu ventralnih motoneurona kičmene moždine (Hargrave et al. 2000b; Sellers et al. 2014).

Vremenski, ekspresija ovog gena se preklapa sa završnom fazom diferencijacije i formiranjem veza među populacijama interneurona (Hargrave et al. 2000b).

Pokazano je da geni *Sox1*, *Sox2* i *Sox3* održavaju neuralne progenitorske ćelije u proliferišućem stanju i imaju ulogu u određivanju sudbine ovih ćelija sprečavajući proces neuralne diferencijacije (Bylund et al. 2003; Holmberg et al. 2008; Oosterveen et al. 2013). Funkcionalne studije gena *SoxB1* kod embriona žabe i vinske mušice su ukazale na njihovu bitnu ulogu tokom ranog određivanja neuralne sudbine ćelija. Gubitak ekspresije *Sox1* dovodi do aktivacije ranih markera neuralnih progenitora, dok promenjena ekspresija gena *Sox1*, *Sox2* i *Sox3* kod embriona žabe sprečava formiranje CNS-a (Kishi et al. 2000; Pevny et al. 1998; Rogers et al. 2009). Eksperimenti rađeni na embrionima pileta su pokazali da je ekspresija gena *Sox2* neophodna za održavanje neuralnih progenitora u proliferišućem stanju, i da gubitkom ekspresije ovog gena, ćelija prestaje sa proliferacijom i diferencira se u neuron (Graham et al. 2003). Pokazano je i da gubitkom ekspresije *Sox1*, *Sox2* i *Sox3* neuralni progenitori ne ostvaruju svoj potpuni kapacitet diferencijacije u neurone (Graham et al. 2003). SOXB1 transkripcioni regulatori ne učestvuju u regulaciji ekspresije proneuralnih gena već deluju tako što inhibiraju aktivnost proneuralnih proteina (Bylund et al. 2003). Kako bi se neuralne progenitorske ćelije diferencirale u neurone, u ovim ćelijama mora doći do smanjenja ekspresije gena *SoxB1* (Bylund et al. 2003). Mehanizam delovanja proteina iz SOXB1 grupe nije u potpunosti poznat, ali se smatra da su neki od njihovih ciljnih gena koje aktiviraju u neuralnim progenitorima geni *Nestin* (Tanaka et al. 2004) i *Hes1* (Kan et al. 2004), koji su, između ostalog, bitni za održavanje populacije neuralnih progenitora (Qu and Shi 2009; Wood and Episkopou 1999). Takođe, neka istraživanja su pokazala da povećana ekspresija *Sox1* može dovesti do neuralne diferencijacije neuralnih progenitora, tako što SOX1 aktivira proneuralni gen *Neurogenin-1* čime ćelija izlazi iz proliferišućeg stanja. Međutim, to nije pokazano za gene *Sox2* i *Sox3* (Kan et al. 2004).

U trenutku kada proneuralni proteini aktiviraju ekspresiju gena *Sox21* započinje diferencijacija neuralnih progenitorskih ćelija u neurone (Sandberg et al. 2005). Zapravo, *in vivo* studije na piletu pokazale su da proneuralni proteini povećavaju nivo ekspresije gena *Sox21*, koji dalje ima inhibitorno dejstvo na aktivnost gena *Sox3*, što za posledicu ima izlazak ćelije iz proliferativnog stanja i ulazak u proces neuralne

diferencijacije (Sandberg et al. 2005). SOX1, SOX2, SOX3 i SOX21 potencijalno regulišu isti set ciljnih gena, pri čemu SOXB1 deluju kao transkripcioni aktivatori, a SOXB2 proteinikao transkripcioni represori (Sandberg et al. 2005). Smatra se da gubitak ekspresije gena *Sox21* dovodi do povećanja ekspresije gena *SoxB1* čime se sprečava embrionalna neurogeneza (Karnavas et al. 2013). Međusobni nivo ekspresije ovih gena i njihov fini balans tokom razvića CNS-a odlučuje da li će ćelija ostati neuralni progenitor ili će započeti proces neurogeneze. Pretpostavlja se da proneuralni proteini mogu, na isti način kao i *Sox21*, da aktiviraju i *Sox14* i da tako aktiviran *Sox14* indukuje neurogenezu (Sandberg et al. 2005) (Slika9).

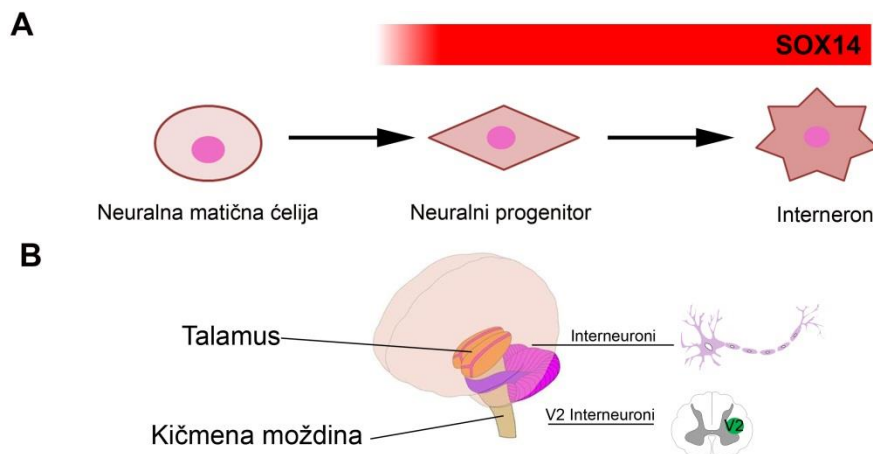


**Slika9: Shematski prikaz efekta balansa SOXB1 (SOX1, SOX2 i SOX3) i SOXB2 (SOX14 i SOX21) transkripcionih regulatora u određivanju sudbine neuralnih progenitora.** U prisustvu višeg nivoa ekspresije SOXB1 proteina neuralni progenitori nastavljaju da proliferišu, dok u slučaju povećane ekspresije SOXB2 proteina dolazi do inicijacije neurogeneze i diferencijacije progenitora u neurone.



### 1.2.2.1. Uloga gena *SOX14/Sox14* u neuralnoj diferencijaciji

*Sox14* se eksprimira vrlo ograničeno u određenim neuralnim progenitorima i interneuronima u mozgu (Slika 10). Početna analiza ekspresije gena *Sox14* kod miša i pileta pokazala je da se eksprimira u određenim terminalno diferenciranim interneuronima talamusa i kičmene moždine (Slika 10B) (Hargrave et al. 2000b; Uchikawa et al. 1999). Zbog činjenice da ima kolokalizovanu ekspresiju sa *Chx-10* (eng. ***Ceh-10*** *Homeodomain-Containing Homolog*) markerom V2 interneurona, SOX14 je okarakterisan, takođe, kao marker ovih interneurona (Clovis et al. 2016; Hargrave et al. 2000b). Zbog svoje specifične ekspresije, SOX14 se smatra i markerom talamusa (Kiecker and Lumsden 2004; Scholpp and Lumsden 2010). Novija istraživanja pokazala su da se *Sox14* eksprimira u progenitorskim ćelijama u rostralnom talamusu miša, od kojih će diferencijacijom nastati jedan tip interneurona - GABA-ergički neuroni, i da *Sox14* ima bitnu ulogu prilikom određivanja sudbine podtipova GABA-ergičkih neurona (Sellers et al. 2014). Takođe, imunocitohemijskim bojenjem pokazano je da se ekspresija *Sox14* podudara sa ekspresijom markera GABA-ergičkih neurona GAD65/67 (eng. ***Glutamic acid decarboxylase 65/67***) i *Calb2* (eng. ***Calbindin 2***) (Slika 10). Studije koje su rađene tokom embrionalnog razvića pileta, pokazale su da je za pravilnu ekspresiju gena *Sox14* u dorzalnom talamusu odgovoran SHH (eng. ***Sonic Hedgehog***) signalni put čiji je glavni posrednik grupa GLI transkripcionih regulatora (Hashimoto-Torii et al. 2003). Istraživanja su pokazala da je najverovatniji posrednik u ovoj kaskadi FOXA2 transkripcioni regulator, za koji je poznato da je regulisan od strane GLI transkripcionih regulatora (Popovic et al. 2010). Pokazano je da gubitak gena *Sox14* dovodi do anatomskog defekta subkortikalnog vizuelnog nukleusa (eng. *Subcortical Visual Shell Nuclei*). Daljom analizom ovi autori su pokazali i da je *Sox14* verovatno bitan za održavanje cirkadijalnog ritma (Delogu et al. 2012). Literaturni podaci ukazuju da se ekspresija gena *Sox14* ne preklapa sa ekspresijom SOXB proteina koji se pretežno ekspimiraju u neuralnim matičnim i progenitorskim ćelijama tokom razvića CNS-a. Međutim, na osnovu podataka dobijenih za SOX21 protein i njegove velike sličnosti sa SOX14 proteinom, pretpostavlja se da i SOX14 interferira sa funkcijom članova SOXB1 podgrupe tokom neuralne diferencijacije i da neuralnu progenitorsku ćeliju uvodi u proces neurogeneze (Sandberg et al. 2005; Uchikawa et al. 1999).



**Slika 10: Ekspresija SOX14 transkripcionog regulatora u mozgu.** **A** – Analiza ekspresije SOX14 proteina kod miša i pileta je pokazala da je ekspresija ovog proteina detektovana samo u određenom setu neuralnih progenitora i interneurona, kao što su V2 interneuroni i GABA-ergički neuroni. **B** – SOX14 je eksprimiran u određenim interneuronim (u okviru kojih su i GABA-ergički neuroni) u talamusu i u V2 interneuronima u kičmenoj moždini.

Hipoteza o ulozi gena *SOX14* u iniciranju neurogeneze otvara nova pitanja koja zahtevaju dalju analizu ekspresije i proučavanje uloge gena *SOX14* u ovom procesu, kako *in vivo* tako i *in vitro*.

### 1.2.3. Embrionalne karcinomske ćelije kao model sistem za izučavanje neuralne diferencijacije *in vitro*

Pluripotentnost karakteriše svojstvo ćelije da se diferencira u sve tipove ćelija odraslog organizma koje nastaju od tri klicina lista: mezoderm, endoderm i ektoderm (Tiedemann et al. 2001). Tokom ranog razvića, ćelije unutar epiblasta embriona su pluripotentne i pod dejstvom različitih faktora kao i aktivacijom specifičnih signalnih puteva, kao što su Wnt i Nodal, gube pluripotentnost i dovode do razvoja epiblasta u specijalizovane ćelije i tkiva (Morgani et al. 2017).

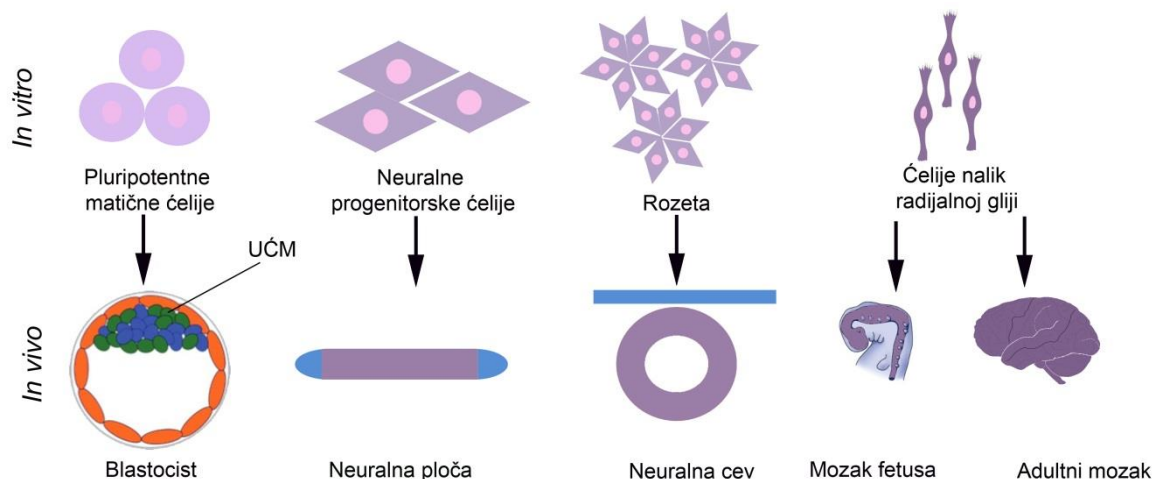
Studije na teratokarcinomima su još pedesetih godina prošlog veka dale neka od prvih otkrića vezana za pluripotentne matične ćelije. Teratokarcinomi predstavljaju maligne tumore germinativnih ćelija i sastavljeni su od nediferencirane mase i diferencirane mase koja vodi poreklo od sva tri klicina lista (Andrews 1998; Andrews

2002; Yu and Thomson 2008). Embrionalne karcinomske ćelije svojim karakteristikama, kao što su profil ekspresije antigenskih determinanti, biohemijska svojstva, potencijal za diferencijaciju i ekspresije gena markera pluripotentnosti, podsećaju na embrionalne matične ćelije (Andrews 1998). Ova svojstva ih čine izuzetnim model sistemom u oblasti istraživanja neurogeneze.

### **1.2.3.1. Pluripotentne matične ćelije kao model sistem za izučavanje neuralne diferencijacije *in vitro***

Uspešna izolacija i propagacija humanih embrionalnih matičnih ćelija 1998. godine u Laboratoriji Džejmsa Tompsona (eng. *James Thomson*) predstavljala je početak nove naučne ere o saznanjima vezanim za razviće čoveka, nastanak različitih tipova ćelija i razumevanje nastanka različitih bolesti (Jones and Zhang 2016). Brojne studije koje su se od tada bavile analizom pluripotentnih ćelija dovele su do mnogih otkrića koja su omogućila razvijanje novih model sistema za istraživanje molekularnih aspekata razvića. Pre nekoliko godina dodeljena je i Nobelova nagrada japanskom istraživaču Shinya Yamanaka u oblasti Medicine za otkriće indukovanih pluripotentnih matičnih ćelija. Ove ćelije predstavljaju generisane pluripotentne ćelije, nastale od reprogramiranih somatskih ćelija koje su uvedene u stanje pluripotentnosti forsiranom ekspresijom četiri transkripciona regulatora c-Myc, SOX2, OCT4 i KLF4 (Takahashi et al. 2007; Takahashi and Yamanaka 2006).

Pluripotentne matične ćelije (PMĆ, uključujući embrionalne matične i indukovane pluripotentne matične ćelije) se mogu diferencirati do neurona *in vitro* i ovaj proces oponaša proces razvića koji se dešava *in vivo* (Slika 11). Zapravo, različiti tipovi ćelija i progenitora koji nastaju tokom neuralne diferencijacije *in vitro* odgovaraju specifičnim tipovima ćelija, odnosno progenitora koji nastaju tokom neuralnog razvića *in vivo* (Slika 11). Zbog toga ove ćelije predstavljaju dobar model sistem za istraživanje mehanizama koji regulišu proces razvića, za proučavanje nastanka različitih oboljenja čoveka, kao i za razvoj različitih tipova terapeutika.



**Slika 11: Shematski prikaz neuralne diferencijacije kod čoveka *in vitro* i *in vivo*.** Kada se pluripotentne matične ćelije diferenciraju u neurone *in vitro* (gornji red), one prolaze kroz više faza tokom kojih se formiraju ćelije koje liče na različite populacije neuralnih progenitorskih ćelija koje su prisutne i tokom neuralnog razvika *in vivo* (donji red). Pluripotentne matične ćelije u svom početnom stupnju podsećaju na unutrašnju ćelijsku masu (UĆM) blastocista. Pluripotentne matične ćelije se diferenciraju u neuralne progenitore koji odgovaraju neuralnim progenitorima koji tokom razvika *in vivo* formiraju neuralnu ploču. Dalje tokom razvika *in vivo* dolazi do zatvaranja neuralne ploče pri čemu se formira neuralna cev. Ovaj stupanj odgovara formiranju rozeta tokom diferencijacije *in vitro*. Takođe, radijalna glija koja nastaje od rozeta tokom diferencijacije *in vitro* podseća na radijalnu gliju nastalu tokom fetalne i adultne neurogeneze *in vivo*. Slika je modifikovana iz (Mertens et al. 2016).

Iako su se tehnologije diferencijacije embrionalnih matičnih ćelija pokazale uspešnim, njihovo proučavanje se suočava sa brojnim tehničkim izazovima, kao što su održavanje u kulturi i spontana diferencijacija praćena „kontaminacijom“ raznim ćelijskim tipovima (Przyborski et al. 2004). Imajući to u vidu, kao i moralne, pravne i etičke dileme vezane za dobijanje humanih embrionalnih matičnih ćelija, za proučavanje različitih procesa, kao što je neuralna diferencijacija koriste se i embrionalne karcinomske (EK) ćelijske linije koje predstavljaju nediferencirane ćelije teratokarcinoma (Taketo et al. 1985).

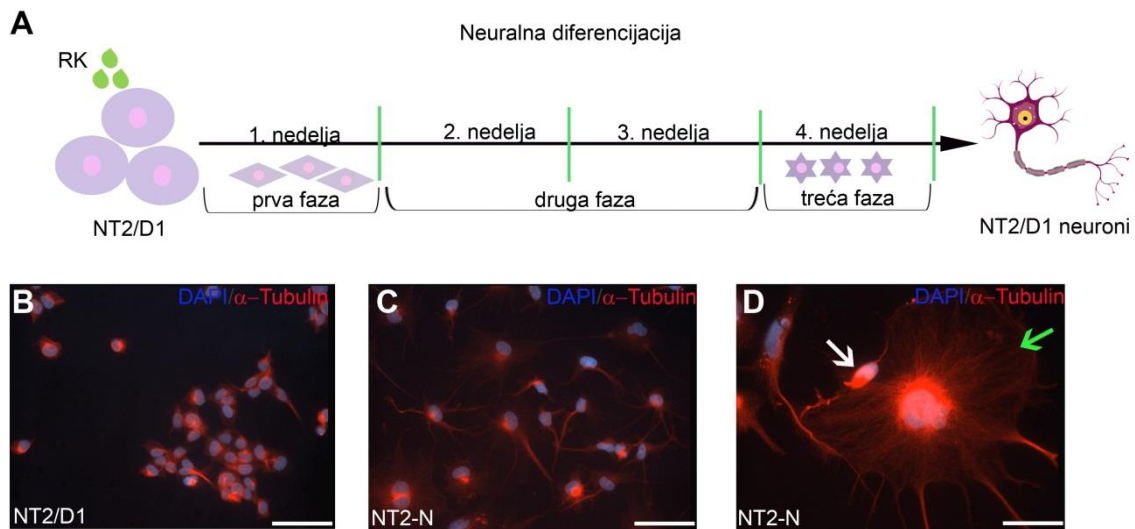
### 1.2.3.2. Humana embrionalna karcinomska NT2/D1 ćelijska linija

NT2/D1 je pluripotentna EK ćelijska linija koja vodi poreklo od humanog malignog testikularnog teratokarcinoma i koja po morfologiji, obrascima ekspresije antigena, biohemijskim svojstvima, potencijalu diferencijacije u različite tipove ćelija i regulaciji ekspresije gena veoma liči na humane embrionalne matične ćelije (Andrews 1984; Andrews 1988). Takođe, u nediferenciranom stanju ove ćelije pokazuju veliku sličnost ranim neuroepitelijalnim progenitorima, koje karakteriše visok nivo ekspresije markera pluripotencije OCT4 (Coyle et al. 2011). U prisustvu oksidovane forme vitamina A- retinoične kiseline (RK), dolazi do neuralne *in vitro* diferencijacije NT2/D1 ćelija. Precizno regulisana ekspresija markera neuralne diferencijacije tokom ovog procesa ukazuje na sličnost neuralne diferencijacije ovih ćelija sa procesom neurogeneze kod kičmenjaka, što implicira da ova ćelijska linija predstavlja dobar humani model sistem za proučavanje procesa neurogeneze *in vitro* (Przyborski et al. 2000).

Protokol za diferencijaciju ovih ćelija retinoičnom kiselinom u trajanju od četiri nedelja (Pleasure et al. 1992), koji je primenjen u ovoj disertaciji, detaljno je opisan u poglavlju Materijal i Metode (3.2.11.). Sam proces neuralne diferencijacije NT2/D1 ćelija se na osnovu ekspresije različitih markera može podeliti u tri faze (Slika 12A) (Przyborski et al. 2000). Prva faza diferencijacije NT2/D1 ćelija predstavlja ranu neuralnu diferencijaciju koja se dešava tokom prve nedelje tretmana retinoičnom kiselinom i karakteriše se pojavom neuroprogenitorskih ćelija (Slika 12A) (Przyborski et al. 2000). Druga faza diferencijacije se dešava početkom druge nedelje tretmana koja se karakteriše pojavom neuralnih progenitora koji su napustili ćelijski ciklus i predodređeni su da postanu neuralne ćelije. Ova faza se zadržava narednih 14 dana (Slika 12A) (Przyborski et al. 2000). Treća faza diferencijacije se dešava nakon treće nedelje tretmana kada dolazi do sazrevanja neurona (Slika 12A) (Przyborski et al. 2000).

Tokom procesa neuralne diferencijacije *in vitro* NT2/D1 ćelije se diferenciraju u različite neuralne tipove ćelija, kao što su funkcionalni neuroni, astrociti i oligodendrociti (Morfološki prikaz različitih ćelija tokom neuralne diferencijacije NT2/D1 ćelija na slici 12 B, C i D) (Andrews 1984; Lee and Andrews 1986; Pleasure

and Lee 1993; Pleasure et al. 1992; Sandhu et al. 2002). Pokazano je da neuroni koji se dobijaju nakon neuralne diferencijacije NT2/D1 mogu da formiraju funkcionalne sinapse, eksprimiraju markere zrelih neurona kao što su neurofilamenti, tetrodotoksin-senzitivni natrijumski kanali, voltažno-zavisni kalcijumski kanali, kao i da imaju sposobnost da generišu akcione potencijale (Coyle et al. 2011; Przyborski et al. 2003; Rendt et al. 1989; Squires et al. 1996). Ovako diferencirani neuroni reaguju na neurotransmitere (Coyle et al. 2011; Przyborski et al. 2003; Rendt et al. 1989; Squires et al. 1996), pa se među diferenciranim NT2/D1 neuronima mogu naći različiti tipovi neurona, uključujući GABA-ergičke, glutamatergičke, kateholaminergičke, holinergičke, dopaminergičke i serotonergičke neurone (Coyle et al. 2011; Guillemain et al. 2000; Iacovitti et al. 2001; Reeves and Posakony 2005; Schwartz et al. 2005; Yoshioka et al. 1997; Zeller and Strauss 1995). U populaciji diferenciranih NT2/D1 ćelija najveći broj čine neuroni koji se karakterišu malim telom sa kojeg se najčešće pruža par dugih nastavaka (bela strelica pod D na slici 12) (Klajn et al. 2014). U literaturi se za dokazivanje prisustva zrelih neurona od NT2/D1 ćelija često se koriste protein neuronskog citoskeleta-MAP2 (eng. *Microtubule associated protein-2*) i  $\beta$ -III-Tubulin (Coyle et al. 2011). MAP2 je posebno karakterističan za dendrite postmitotičkih neurona (Harada et al. 2002). Neuronski citoskelet je veoma specifičan i karakteriše se velikim brojem mikrotubula koji nastaju polimerizacijom dimera tubulina i koji su veoma važni za struktuiranje, funkcionisanje i vitalnost neurona (Kevenaar and Hoogenraad 2015). Mali procenat diferenciranih neuralnih ćelija su astrociti koji se karakterišu ekspresijom glijalnog kiselog fibrilarnog proteina - GFAP (eng. *Glial fibrillary acidic protein*) (Coyle et al. 2011). GFAP spada u grupu intemedijarnih filamenata koji su karakteristični za aktivne astrocite (Sofroniew and Vinters 2010). Pored neuralnih ćelija, NT2/D1 se diferenciraju i u ćelije koje ne eksprimiraju neuralne markere (Cheung et al. 1999). Zapravo, imunocitohemijskim bojenjem je pokazano da se pored neurona u diferenciranoj populaciji NT2/D1 ćelija javlja i veliki broj ćelija koje su epiteloidnog oblika, ali njihov pravi identitet nije dokazan (zelena strelica pod D na slici 12) (Przyborski et al. 2004).



**Slika 12: Shematski prikaz neuralne diferencijacije NT2/D1 ćelija.** A – Proces neuralne diferencijacije NT2/D1 ćelija traje četiri nedelje nakon indukcije retinoičnom kiselinom (RK) i može se podeliti u tri faze. Prva faza predstavlja ranu neuralnu diferencijaciju koja se dešava tokom prve nedelje tretmana i karakteriše se pojavom neuroprogenitorskih ćelija. Druga faza diferencijacije traje tokom druge i treće nedelje tretmana koja se karakteriše pojavom neuralnih progenitora koji su napustili ćelijski ciklus i predodređeni su da postanu neuralne ćelije. Treća faza diferencijacije se dešava nakon treće nedelje tretmana kada dolazi do sazrevanja neurona. B, C i D – Morfologija nediferenciranih i diferenciranih NT2/D1 ćelija. B – nediferencirane NT2/D1 ćelije, okruglog ili nepravilnog oblika nalik epitelijalnim ćelijama, sa manjom citoskeletnom masom. C i D – populacija prečišćenih NT2/D1 neurona koja sadrži ćelije sa kojih polazi po jedan ili više nastavaka, nalik neuronima (bela strelica pod C) i ćelije sa većom masom citoskeleta, epiteloidnog oblika (zelena strelica pod C). Nukleusi ćelija su obojeni plavom bojom – DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) koja se vezuje za AT bogate regione u molekulu DNK i boji hromatin, dok je citoskelet ćelija obojen  $\alpha$ -Tubulinom crvene boje ( $\alpha$ -Tubulin se smatra markerom citoskeleta). Razmernik je 20 $\mu$ M (A i B) i 50  $\mu$ M (C).

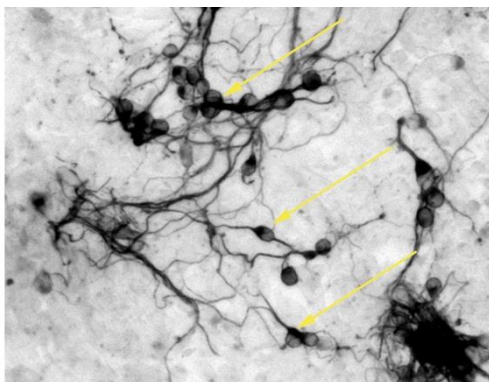
Zbog svih navedenih osobina NT2/D1 ćelije predstavljaju dobar humani model sistem za proučavanje ekspresije gena tokom neuralne diferencijacije, kao i za proučavanje osobina diferenciranih neurona (Paquet-Durand and Bicker 2007).

### 1.2.3.3. Mišija embrionalna karcinomska ćelijska linija P19

Mišija embrionalna karcinomska ćelijska linija P19 predstavlja pluripotentne ćelije izolovane iz transplantiranih ćelija epiblasta embrionalnog teratokarcinoma (McBurney and Rogers 1982). Ove ćelije su nastale tako što je mišiji embrion starosti 7.5 dana transplantiran u testis, što je dovelo do nastanka karcinoma iz kojeg su dalje izolovane i uspostavljene kulture nediferenciranih matičnih ćelija (McBurney and Rogers 1982). P19 ćelije na osnovu svojih karakteristika odgovaraju humanoj embrionalnoj karcinomskoj NT2/D1 ćelijskoj liniji (McBurney 1993). Na osnovu ekspresije antigena na površini ćelija, nalikuju ćelijama epiblasta ranog postimplantacionog blastocista (Xia et al. 2007). Jedan od najčešćih protokola za neuralnu diferencijaciju P19 ćelija je indukcija RK-om u trajanju od pet dana. Ovaj protokol je korišćen u eksperimentima prikazanim u okviru ove disertacije i detaljno je opisan u odeljku Materijal i Metode (3.2.12.) (McBurney 1993; Rudnicki et al. 1988). Njihova diferencijacija traje kratko zbog čega predstavljaju izuzetan model sistem za proučavanje procesa neuralne diferencijacije kod miša (Monzo et al. 2012). Nakon indukcije RK-om ove ćelije eksprimiraju neuralne markere karakteristične za neuralne progenitore koji se javljaju tokom razvića CNS-a *in vivo* (Monzo et al. 2012). P19 ćelije se mogu diferencirati u neurone, astrocite, oligodendrocite i fibroblaste (McBurney 1993; Staines et al. 1996). Već šestog dana nakon tretmana RK-om, 85% diferenciranih P19 ćelija predstavlja neurone (McBurney et al. 1988). Neuroni nastali diferencijacijom P19 ćelija imaju karakteristike neurona CNS-a (Lee et al. 2015). Dobijeni neuroni formiraju funkcionalne sinapse i reaguju na neurotransmitere. Većina dobijenih neurona su GABA-ergičkog tipa (60%), dok manji procenat eksprimira somatostatin (20%), neuropeptid Y (20%) i tiroksin hidroksilazu (1%) (McBurney 1993). Za P19 neurone je karakteristično ne samo da eksprimiraju proteine specifične za neurone, već i da njihove membrane elektrofiziološki sazrevaju i stvaraju akcioni potencijal (MacPherson and McBurney 1995). Dobijeni neuroni se karakterišu malim telom sa kojeg se pružaju dva do tri nastavaka u kojima se može detektovati ekspresija neuralnih markera  $\beta$ -III-Tubulin (Slika 13) i MAP2 (Belliveau et al. 1997). Mali procenat diferenciranih P19 ćelija predstavlja zrele astrocite koji se karakterišu ekspresijom proteina GFAP (Belliveau et al. 1997; Jones-Villeneuve et al. 1982). Ćelije koje takođe nastaju u



procesu diferencijacije, krupnije su od neurona, ne ekspiriraju neuralne markere i neophodne su za dalje preživljavanje diferenciranih P19 neurona, čineći njihovu potporu (McBurney 1993).



**Slika13: Neuroni dobijeni diferencijacijom P19 ćelija identifikovani su ekspresijom neuronalnog markera  $\beta$ -III-Tubulin.** Neuroni su obojenim specifičnim antitelom za  $\beta$ -III-Tubulin (crna boja označava ekspresiju  $\beta$ -III-Tubulin-a, a strelicom su označeni neki od neurona koji ekspiriraju ovaj protein).

U prisustvu RK neuralna diferencijacija P19 ćelija *in vitro* nalikuje embrionalnoj diferencijaciji neuroektoderma (Negraes et al. 2012). Zbog toga predstavljaju dobar model sistem za proučavanje neuralne diferencijacije *in vitro* kao i gena koji imaju bitnu ulogu u ovom procesu (Johnson et al. 1992; Lee et al. 2015). Nastanak nekoliko tipova neuralnih ćelija tokom diferencijacije P19 ćelija ukazuje na njihovu sličnost sa razvićem embrionalnog ektoderma (Staines et al. 1996), što je dodatna prednost ovih ćelija za proučavanje neuralne diferencijacije *in vitro*.

### 1.3. Maligna transformacija ćelije

Nekontrolisana deoba i rast ćelija dovode do jednog od vodećih uzročnika smrtnosti u svetu - malignih oboljenja. Iako prvi zapisi o malignim oboljenjima datiraju još 3000 godina pre nove ere u Egiptu, tek se u poslednjoj dekadi prošlog veka došlo do značajnih saznanja u ovoj oblasti. Maligne bolesti nastaju malignom transformacijom ćelija, što predstavlja višestepeni proces prouzrokovan akumulacijom genetičkih i epigenetičkih promena koje zdravu ćeliju transformišu u ćeliju sa malignim fenotipom (Fearon and Vogelstein 1990). Ćelije tumora se odlikuju fenotipskim karakteristikama kao što su promene u strukturi i ekspresiji gena, gubitak kontrole osnovnih ćelijskih procesa što najčešće vodi nekontrolisanoj proliferaciji, sposobnost invazije u susedna i udaljena tkiva i pojava metastaza (Hanahan and Weinberg 2000). Tokom samog procesa maligne transformacije dolazi do brojnih promena u samim ćelijama, kao što su uvećanje potencijala rasta, izmena na ćelijskim membranama, promene u kariotipu, kao i promene na morfološkom i biohemijskom nivou. Ove promene dovode do takozvanih "anarhijskih" deoba ćelije i inhibicije ćelijske smrti, što dalje vodi stvaranju malignog tumora. Prema tkivu iz kojeg potiču, maligni tumori se mogu podeliti na nekoliko tipova:

1. Karcinomi: tumori epitelnog porekla, pokrovnog ili žlezdanog (adenokarcinom);
2. Sarkomi: tumori potpornog, mezenhimnog tkiva, odnosno kostiju, hrskavice i mekih potpornih struktura;
3. Embrionalni tumori: potiču od embrionalnih ćelija.

Pojava tumora, odnosno proces tumorogeneze se odvija u tri osnovne etape: inicijacija, koja je uzrokovana dejstvom nekog kancerogena koji vodi ćeliju u ireverzibilan proces nekontrolisane deobe, progresija i metastaza. Kancerogeni mogu biti različiti, kao što su jonizujuće zračenje, ultravioletno svetlo, hemikalije i virusi (Borek 1993). Na genetičkom nivou kancerogeni najčešće dovode do mutacije, delecije ili amplifikacije gena koji su odgovorni za kontrolu osnovnih ćelijskih procesa, kao što su ćelijska deoba, ćelijska smrt i održavanje stabilnosti genoma (Borek 1993; Vogelstein and Kinzler 1993). Ove promene se mogu dogoditi ne samo na

pojedinačnim genima već i na velikom broju gena istovremeno (Fearon and Vogelstein 1990; Loeb et al. 2003). Na osnovu svoje funkcije u procesu nastanka tumora geni se mogu svrstati u dve osnovne grupe: onkogeni i tumor supresori (Weinberg 1995).

Onkogeni predstavljaju gene koji svojom aktivnošću doprinose nastanku tumora, što se može postići različitim molekularnim mehanizmima, kao što su tačkaste mutacije u promotoru koje dovode do konstatntne aktivnosti nekog gena, delecije negativnih regulatornih regiona, kao i višestruko umnožavanje regiona koji uslovljavaju povećanu ekspresiju određenih gena (amplifikacija) (Savelyeva and Schwab 2001). Poznato je da su onkogeni neaktivni u zdravim ćelijama, a njihova neaktivna forma naziva se proto-onkogen. Aktivacijom proto-onkogenata stvaraju se produkti neophodni za nastajanje i održavanje tumorske ćelije, što predstavlja dominantan mehanizam koji dovodi do maligne transformacije (Anderson et al. 1992).

Sa druge strane, tumor supresori su geni čija deregulacija dovodi do gubitaka funkcija koje su neophodne za održavanje normalnog stanja zdrave ćelije. Inaktivacija tumor supresora se dešava delecijom većeg regiona na hromozomu, manjom delecijom ili insercijom koja može promeniti otvoreni okvir čitanja gena, transkripcionalnim utišavanjem promotora ili tačkastom mutacijom koja narušava aktivne domene proteina (Chen and Baylin 2005; Nicot 2015). Imajući u vidu značajnu ulogu normalnog funkcionisanja tumor supresora za spečavanje jednog od vodećih uzročnika smrtnosti u svetu, dalja istraživanja o regulaciji aktivnosti ovih gena dobijaju sve veći smisao.

### **1.3.1. Uloga gena *SOXB/SoxB* u malignoj transformaciji ćelije**

Iako je uloga ovih gena prvobitno vezana za embrionalno razvića CNS-a, poslednjih godina se sve veći značaj pridaje proučavanju njihove uloge u procesu nastanka tumora. Izmenjena regulacija ekspresije gena *SOXB* detektovana je u brojnim malignim tumorima, gde ovi geni mogu imati ulogu onkogenata i/ili tumor supresora (Castillo and Sanchez-Cespedes 2012). Ovi geni mogu biti aktivirani ili inaktivirani putem različitih genetičkih i epigenetičkih mehanizama, uključujući varijacije u broju kopija genomske DNK koja sadrži gene *SOX*, metilaciju DNK ili aberantnu ekspresiju mikro RNK.

SOX1 je okarakterisan kao tumor supresor u tumorima dojke i grlića materice, gde deluje inhibitorno na Wnt/ $\beta$  katenin signalni put, koji je često deregulisan u brojnim tumorima (Lin et al. 2013; Song et al. 2016). U ćelijama poreklom od tumora dojki, povećana ekspresija SOX1 proteina smanjuje ekspresiju  $\beta$ -katenina kao i ekspresiju *CyclinD1* i *c-Myc* onkogeni, koji su okarakterisani kao ciljni geni  $\beta$ -katenina i smatraju se odgovornim za proliferaciju i progresiju tumora. Smatra se da su upravo geni *CyclinD1* i *c-Myc* odgovorni za onkogeni potencijal  $\beta$ -katenina (Li et al. 2005). Na taj način povećana ekspresija SOX1 proteina deluje inhibitorno na  $\beta$ -katenin i dovodi do inhibicije proliferacije i invazije kao i do indukcije apoptoze u ćelijama poreklom od karcinoma dojki *in vitro*. Na sličan način, inhibicijom  $\beta$ -katenina i njegovih ciljnih gena, SOX1 reguliše proliferaciju i invaziju ćelija poreklom od karcinoma jetre i tako ostvaruje ulogu tumor supresora *in vitro* (Tsao et al. 2012). I u ćelijama poreklom od karcinoma grlića materice, SOX1 deluje kao tumor supresor posredstvom Wnt/ $\beta$  katenin signalnog puta (Lin et al. 2013). Takođe, SOX1 ostvaruje ulogu tumor supresora inhibicijom proliferacije i aktivacijom apoptoze u ćelijama tumora želuca (Chen et al. 2016). Sa druge strane, novije studije pokazale su da SOX1 može imati i ulogu onkogeni u glioblastomu (Garcia et al. 2017). Zapravo, funkcionalna analiza uloge gena *SOX1* u ćelijama poreklom od glioblastoma, pokazala je da ovaj gen ima bitnu ulogu u regulaciji heterogenosti i plastičnosti ovih ćelija, nezavisno od Wnt/ $\beta$  katenin signalnog puta, sugerišući da SOX1 može biti potencijalni target tokom terapije koja se primenjuje u lečenju glioblastoma (Garcia et al. 2017).

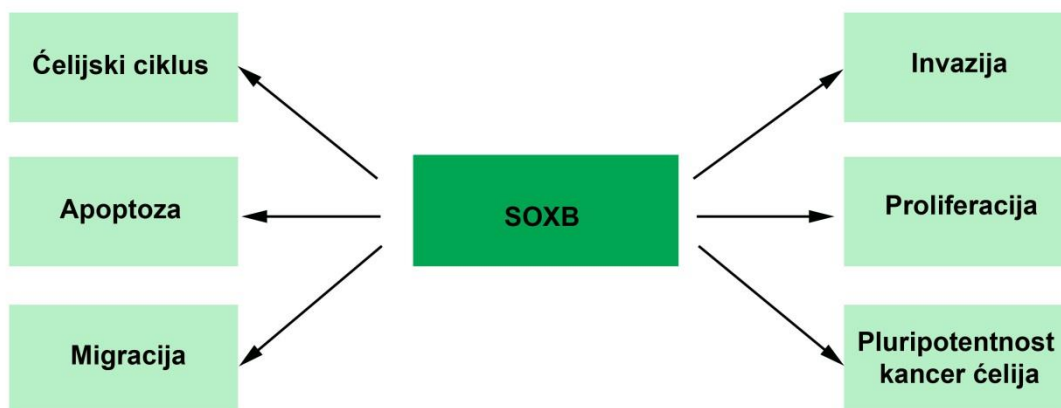
Najčešće proučavan gen u kontekstu maligne transformacije ćelije iz gena *SOXB* grupe jeste gen *SOX2*. Ovaj gen je amplifikovan i/ili povišeno eksprimiran u mnogim tipovima kancera i generalno prihvaćen kao onkogen u brojnim tumorima, s izuzetkom karcinoma želuca i dojke gde ima funkciju tumor supresora (Otsubo et al. 2008; Wu et al. 2013). Brojne studije su pokazale da *SOX2* obavlja funkciju onkogeni najčešće promovisanjem proliferacije, invazije i/ili migracije ili održavanjem tumorskih matičnih ćelija, u zavisnosti od tipa tumora (Weina and Utikal 2014). S obzirom da je *SOX2* već dobro okarakterisan kao marker pluripotentnosti, očekivano je da je upravo nivo ekspresije ovog gena visok u tumorskim matičnim ćelijama i važan za njihovo održavanje u karcinomu jajnika, grlića materice, pankreasa, dojke, glave i vrata, kao i kolorektalnog kancera (Lundberg et al. 2016). Studije na ćelijama poreklom od

karcinoma pluća su pokazale da utišavanje ekspresije gena *SOX2* pokreće apoptozu najčešće aktivacijom p53 i BAX proteina, oslobađanjem citohroma C iz mitohondrija, kao i smanjenjem ekspresije gena *BIRC5* (eng. **B**aculoviral **I**AP **R**epeat **C**ontaining **5** čiji je produkt protein Survivin) i oslobađanjem Prokaspaze-3 (eng. *Procaspase-3*) i Prokaspaze-8 (eng. *Procaspase-8*) (Chen et al. 2014). Pokazano je da u ćelijama poreklom od karcinoma prostate, *SOX2* povećava proliferaciju, kao i da smanjenjem ekspresije gena *Oral* (eng. **O**lfactory **r**eceptor class **A-1**), *SOX2* transkripcioni regulator ima anti-apoptotski efekat u ovim ćelijama (Jia et al. 2011). U ćelijama poreklom od karcinoma jajnika povećana ekspresija *SOX2* promoviše proliferaciju, migraciju i invaziju posredstvom *Src* kinaze (eng. **S**rc *Proto-Oncogene, Non-Receptor Tyrosine Kinase*) (Wang et al. 2014).

Pokazano je da gen *Sox3* poreklom od pileta ima onkogeni potencijal u ćelijama fibroblasta (Xia et al. 2000). Takođe, pokazano je da *SOX3* ima ulogu onkogenu u skvamoznom karcinomu jednjaka, limfomu T-ćelija, karcinomu ovarijuma i osteosarkomu (Kim et al. 2003; Li et al. 2013; Qiu et al. 2017; Yan et al. 2016). Zapravo, u ćelijama poreklom od karcinoma jajnika, *SOX3* deluje kao onkogen, isto kao i *SOX2*, posredstvom proto-onkogeno *Src* kinaze, te se ovaj gen smatra potencijalnim terapijskim targetom kod navedenog tipa tumora (Yan et al. 2016).

*SOX21* je okarakterisan kao tumor supresor u ćelijama poreklom od glioblastoma gde dovodi do smanjenja proliferacije i veličine tumora (Caglayan et al. 2013). Takođe, pokazano je da u ćelijama glioblastoma, *SOX21* deluje na starenje ćelije i apoptozu, i da posredstvom CDK inhibitora i p53 proteina blokira tumorogeni potencijal ovih ćelija (Kurtsdotter et al. 2017).

Na Slici 14 prikazani su procesi u malignim ćelijama a za koje je u literaturi poznato da su regulisani od strane gena *SOXB*.



Slika 14: Procesi i odlike tumorskih ćelija koji su regulisani od strane gena *SOXB* grupe.

Iako je već pokazano da su članovi *SOXB* grupe uključeni u nastanak barem jednog tipa tumora, još uvek nisu poznati svi tipovi tumora u kojima ovi geni mogu imati ulogu onkogena ili tumor supresora, kao ni mehanizmi njihovog delovanja tokom maligne transformacije ćelija. Zbog toga su istraživanja vezana za ulogu gena *SOX* u tumorogenezi od izuzetnog značaja i usmerena na svaki pojedinačni tip tumora zasebno.

### 1.3.1.1. Uloga gena *SOX14* u malignoj transformaciji ćelije

Kao i za ostale članove *SOXB* grupe, uloga gena *Sox14* vezana je za njegovu funkciju tokom razvića CNS-a. Međutim, novija istraživanja ukazuju na njegovu potencijalnu ulogu tokom maligne transformacije ćelije.

Analiza ekspresije gena *SOX14* na tkivima poreklom od 11 različitih tumora (urotelijalni karcinom mokraćne bešike, invazivni karcinom dojke, adenokarcinom debelog creva, skvamozni karcinom glave i vrata, karcinom bubrega, adenokarcinom i skvamozni karcinom pluća, adenokarcinom prostate, adenokarcinom želudca, karcinom tiroidne žlezde i karcinom endometrijuma) pokazala su da ekspresija ovog gena nije izmenjena u odnosu na zdravo tkivo (Thu et al. 2014a). Ipak, sveobuhvata genomska analiza na uzorcima poreklom od pacijenata sa karcinomom pluća je pokazala da je *SOX14* jedan od 22 identifikovana mutirana gena (Rudin et al. 2012). Međutim, u drugim studijama je pokazano da *SOX14*, za razliku od ostalih članova *SOXB* grupe, ne može poslužiti kao serološki marker za pacijente sa ovim tipom karcinoma pluća (Zhu

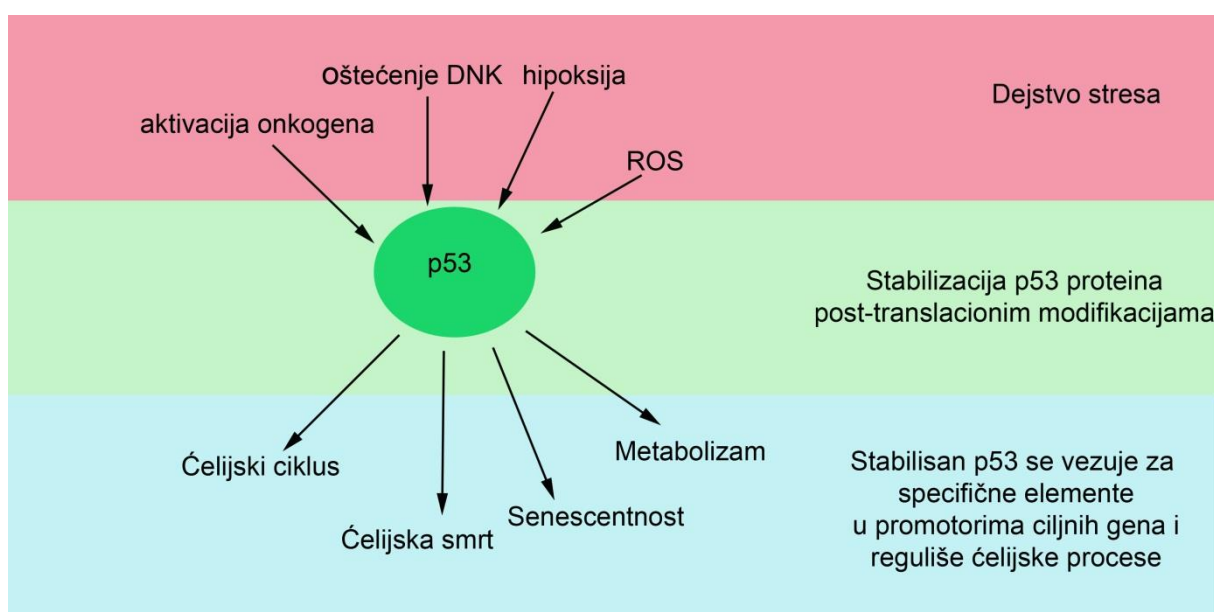
et al. 2012). Takođe, u tkivima poreklom od karcinoma grlića materice pokazano je da ekspresija gena *SOX14* može biti izmenjena. Zapravo, pretpostavlja se da ovaj gen može poslužiti kao marker za razlikovanje tipova tumora grlića materice i to tokom rane faze razvoja bolesti. Takođe, ovi autori su predložili da *SOX14* može imati potencijalnu ulogu tumor supresora u tumoru grlića materice, s obzirom da su njihove studije pokazale da je *SOX14* često metilovan ili deletiran u uzorcima tkiva poreklom od ovog tipa karcinoma (Senchenko et al. 2013). Analiza metilacionog statusa promotora gena *SOX14* u uzorcima tkiva poreklom od karcinoma grlića materice je takođe ukazala da *SOX14* može imati ulogu tumor supresora u ovom tipu tumora s obzirom da je otkriveno da je njegova ekspresija utišana posredstvom epigenetskih mehanizama, tačnije metilacijom promotora (Wang et al. 2016b). Međutim, analiza ekspresije nekoliko ćelijskih linija poreklom od karcinoma grlića materice (HeLa, Ca ski, HT-3 i SiHa) pokazala je visok nivo ekspresije gena *SOX14* u ovim ćelijama (Li et al. 2015). Isti autori su pokazali da u ovim ćelijama *SOX14* može imati ulogu onkogeno aktivacijom Wnt/ $\beta$ -katenin signalnog puta i indukcijom proliferacije i invazije *in vitro* (Li et al. 2015). Analizom ekspresije gena iz *SOX* familije u tkivima poreklom od tumora prostate, pokazano je da *SOX14* ima povećanu ekspresiju u odnosu na zdravo tkivo samo kod malog broja pacijenata (Zhong et al. 2012). Analiza metlacionog statusa DNK na nivou kompletnog genoma je pokazala da je *SOX14* metilovan u tkivima pacijenata sa hroničnom limfocitnom leukemijom (Tong et al. 2010). Nekoliko studija je pokazalo da je *SOX14* često metilovan u tkivima poreklom od tumora, što može ukazati na bitnu ulogu ovog gena u nastanku tumora. Najviše je literaturnih podataka koji svakako ukazuju na važnu ulogu *SOX14* gena u nastanku karcinoma grlića materice. Međutim, kontradiktornost ovih podataka otvorila je nove pravce istraživanja usmerene na detaljnu analizu ekspresije i uloge gena *SOX14* u regulaciji malignog fenotipa ćelija poreklom od karcinoma grlića materice.

### 1.3.2. Uloga p53 signalnog puta u malignoj transformaciji

Jedan od najpoznatijih tumor supresora, čija je ekspresija izmenjena u velikom broju tumora jeste transkripcioni regulator p53, koji se zbog svojih poznatih uloga često naziva čuvarom genoma (Lane 1992). Pre više od 40 godina, šest različitih grupa autora gotovo istovremeno je otkrilo multifunkcionalni protein, veličine od 53 kDa u mišjim i humanim ćelijama, koji je nazvan p53 (DeLeo et al. 1979; Kress et al. 1979; Lane and Crawford 1979; Linzer and Levine 1979; Melero et al. 1979; Smith et al. 1979). Ovaj protein kodira gen *TP53* (eng. *Tumor protein p53*) i prvobitno se verovalo da je onkogen. Međutim, tek deset godina nakon njegovog otkrića, istraživanja su pokazala da gubitak ili mutacija gena *TP53* dovodi do inaktivacije ovog danas najpoznatijeg tumor supresora i nastanka tumora (Eliyahu et al. 1989; Finlay et al. 1989). U literaturi je poznato da je više od 50% tumora prouzrokovano nekom genetičkom promenom koja dovodi do inaktivacije p53 proteina (Soussi and Wiman 2007). Najčešće je reč o tačkastim mutacijama, ali se dešavaju i druge promene u zavisnosti od tipa tumora (Hollstein et al. 1994; Soussi and Wiman 2007). p53 je transkripcioni regulator koji ima ključnu ulogu u regulaciji ekspresije gena koji su bitni za kontrolu ćelijskog ciklusa, ćelijske smrti i popravke oštećenja na DNK (Feng and Levine 2010; Levine et al. 2006; Levine and Oren 2009; Vogelstein et al. 2000; Vousden and Prives 2009). Poluživot p53 proteina je veoma kratak, i nivo ekspresije ovog proteina u zdravim ćelijama i tkivima je nizak. Ovako nizak nivo p53 proteina u zdravim ćelijama održavaju proteini MDM2/HDM2 (eng. *mouse/human double minute 2 homolog*) i MDM4 (eng. *mouse double minute 4 homolog*) (Marine et al. 2006). MDM2 je E3 ubikvitin ligaza koja dovodi do ubikvitinacije i degradacije p53 proteina, sprečavajući tako pravilnu regulaciju ekspresije p53 ciljnih gena (Kruse and Gu 2009; Wade et al. 2010). Različiti stresori, kao što su oštećenje DNK, aktivacija onkogena, hipoksija ili promena u nivou kiseoničnih slobodnih radikala (ROS), može dovesti do stabilizacije p53 proteina u ćeliji (Slika 15) (Levine et al. 2006; Levine and Oren 2009; Vogelstein et al. 2000; Vousden and Prives 2009). Ovi stresori aktiviraju p53 post-translacionim modifikacijama, kao što su fosforilacija, acetilacija i metilacija. Na taj način dolazi do stabilizacije p53 proteina i porasta nivoa aktivne forme ovog proteina u ćeliji (Brooks and Gu 2006; Levine et al. 2006; Levine and Oren 2009; Vogelstein et al. 2000;



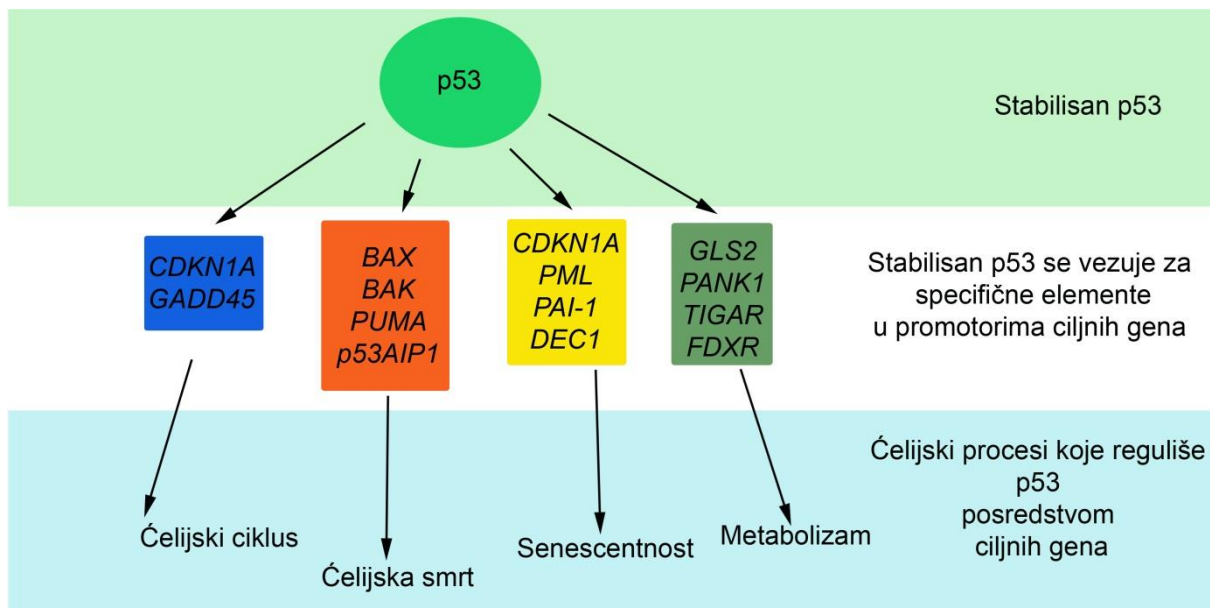
Vousden and Prives 2009). Stabilisan p53 nije više dostupan MDM2 ubikvitin ligazi i na taj način postaje zaštićen od degradacije. Tako stabilisan p53 može dalje da ostvari svoju funkciju transkripcionog regulatora u ćeliji. Zapravo, stabilisan p53 se vezuje za p53 DNK vezujuće elemente koji se nalaze u promotorima ciljnih gena. Ovi geni su predominantno uključeni u regulaciju važnih ćelijskih procesa, kao što su ćelijski ciklus, ćelijska smrt, senescentnost, popravka DNK oštećenja i metabolička regulacija (Slika 15) (Feng and Levine 2010; Levine et al. 2006; Levine and Oren 2009; Vogelstein et al. 2000; Vousden and Prives 2009). Aktivacija p53 transkripcionog regulatora i njegovih ciljnih gena usled oštećenja dovodi do aktivacije p53 signalnog puta koji obezbeđuje regularnost odvijanja pomenutih ćelijskih procesa, čime se obezbeđuje da se oštećene ćelije na adekvatan način uklone iz organizma i spreči rast tumora (Oren 2003).



**Slika 15: Shematski prikaz stresora koji utiču na stabilizaciju p53 proteina.** Stabilisan p53 protein ostvaruje svoju funkciju transkripcionog regulatora koji reguliše brojne ćelijske procese. ROS – kiseonični slobodni radikali.

### 1.3.2.1. Ciljni geni p53 transkripcionog regulatora

Među prvim otkrivenim ciljnim genima p53 transkripcionog regulatora su *CDKN1A* (eng. Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 1A), *GADD45A* (eng. Growth Arrest and DNA Damage-inducible 45) i *MDM2* (el-Deiry et al. 1993; el-Deiry et al. 1995; Juven et al. 1993; Kastan et al. 1992; Wu et al. 1993). Nakon toga usledile su brojne studije koje su se zasnivale na pronalaženju novih gena preko kojih p53 ostvaruje svoju tumor supresorsku ulogu. Tako su otkriveni i pro-apoptotski geni *BAX* (eng. BCL2 Associated X), *BAK* (eng. BCL2 Antagonist/Killer), *PUMA* (eng. P53 Up-Regulated Modulator Of Apoptosis) i *P53AIP1* (eng. P53 Regulated Apoptosis Inducing Protein 1) koji imaju ulogu u regulaciji ćelijske smrti (Slika 16) (Menendez et al. 2009; Miyashita and Reed 1995; Wang et al. 2007). Pored *CDKN1A*, koji ima ulogu u regulaciji ćelijskog ciklusa, otkriveno je još nekoliko mikro RNK iz familije miR-34 koje su uključene u regulaciju ćelijskog ciklusa, a predstavljaju ciljne gene p53 proteina (Bommer et al. 2007). Identifikovano je i nekoliko ciljnih gena p53 koji dovode do indukcije senescentnosti, kao što su *CDKN1A*, *PML* (eng. Promyelocytic Leukemia), *PAI-1* (eng. Plasminogen activator inhibitor-1) i *DEC1* (eng. Deleted in esophageal cancer 1) (Slika 16) (Qian and Chen 2013). Neki od ciljnih p53 gena kojim ovaj tumor supresor reguliše metabolizam su *GLS2* (eng. glutaminase 2), *PANK1* (eng. Pantothenate Kinase 1), *TIGAR* (eng. TP53-Induced Glycolysis And Apoptosis Regulator) i *FDXR* (eng. Ferredoxin Reductase) (Fischer 2017) (Slika 16). Današnje DNK analize na nivou kompletnog genoma ukazuju da postoji nekoliko hiljada potencijalnih p53 ciljnih gena (Li et al. 2012). Kako se povećava broj otkrivenih gena koje reguliše p53 usložnjava se i mreža interakcija među ciljnim genima p53 transkripcionog regulatora, koji zajedno čine kompleksni p53 signalni put. Regulacijom ciljnih gena, p53 dalje ostvaruje svoju funkciju regulacije osnovnih ćelijskih procesa i očuvanja stabilnosti genoma (Oren 2003).

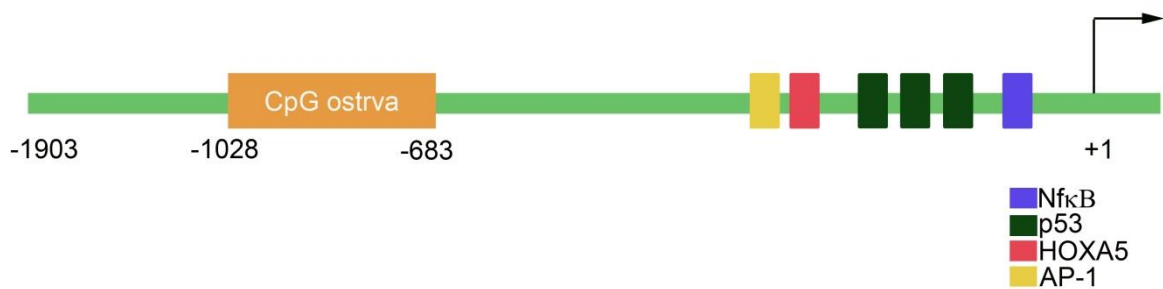


**Slika 16: Shematski prikaz p53 ciljnih gena.** Stabilisan p53 se vezuje za p53 DNK vezujuće elemente u promotorima ciljnih gena koji su uključeni u regulaciju ćelijskih procesa kao što su ćelijski ciklus, ćelijska smrt, senescentnost i metabolizam.

### 1.3.2.2. Regulacija ekspresije gena *TP53*

Imajući u vidu da je *TP53* okarakterisan kao tumor supresor koji obezbeđuje pravilno funkcionisanje ćelije, očekivano je da je njegova regulacija strogo kontrolisana na više različitih načina, brojnim pozitivnim i negativnim regulatorima. Novija istraživanja su pokazala da je regulacija *TP53* mnogo kompleksnija nego što se prvobitno mislilo. Studije *in vivo* i *in vitro* pokazuju da postoji više načina regulacije ekspresije gena *TP53*, što podrazumeva različite molekularne mehanizme koji doprinose regulaciji transkripcije, translacije, postranslacionim modifikacijama i protein-protein interakcijama (Kruse and Gu 2009).

Promotor humanog gena *TP53* se razlikuje od promotora većine drugih gena jer ne sadrži CAAT i TATA boks (Tuck and Crawford 1989). U okviru promotora gena *TP53* postoji i DNK vezujuće mesto za p53, što ukazuje na prisustvo autoregulacije transkripcije (Slika 17) (Deffie et al. 1993).



**Slika 17: Shematski prikaz strukture promotora gena TP53.** Na slici su prikazana vezivna mesta za Nfκβ, p53, HOXA5 i AP-1 u okviru promotora humanog gena TP53. Prikazana je i pozicija CpG ostrva u okviru ovog promotora. Slika je preuzeta i modifikovana iz (Saldana-Meyer and Recillas-Targa 2011).

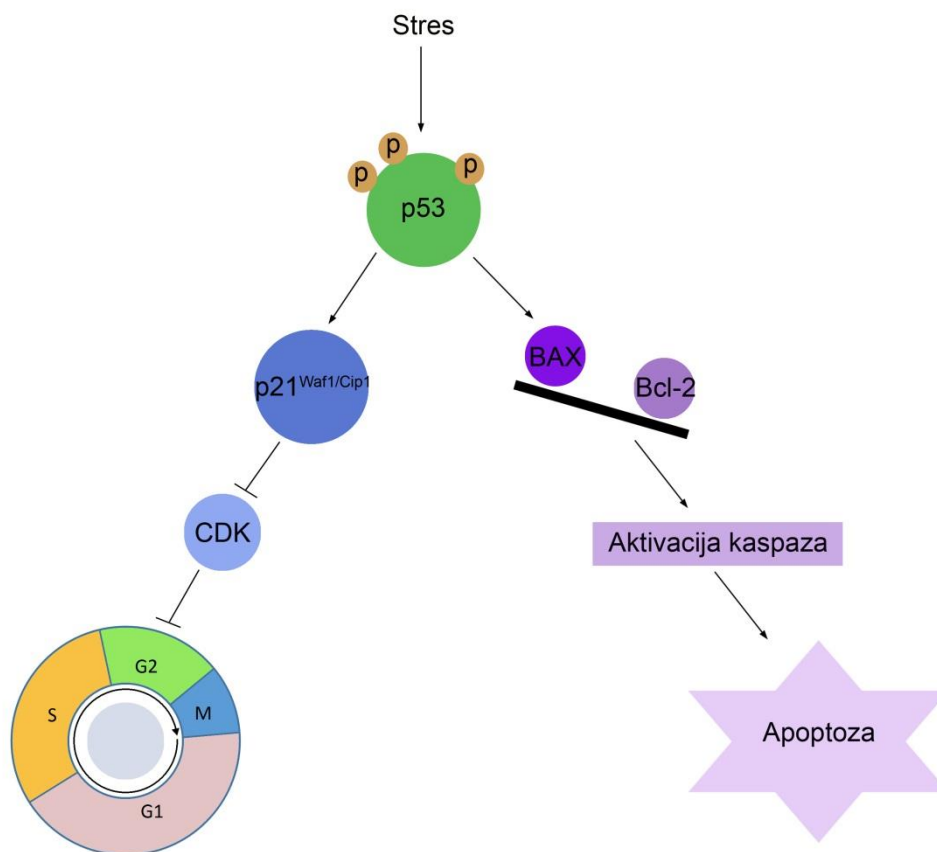
Među prvim otkrivenim transkripcionim regulatorima koji aktiviraju p53 su AP-1 (eng. *Activator protein 1*), NFκB (eng. *Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) i HOXA5 (eng. *Homeobox A5*) (Slika 17) (Saldana-Meyer and Recillas-Targa 2011). Od tada se broj transkripcionih regulatora koji pozitivno ili negativno regulišu transkripciju p53 stalno povećava. Uglavnom su to proteini uključeni u regulaciju ekspresije gena odgovornih za razviće, ćelijsku smrt ili različite procese koji dovode do maligne transformacije ćelije (Saldana-Meyer and Recillas-Targa 2011).

MDM2 se smatra glavnim negativnim regulatorom p53 proteina koji njegovu aktivnost reguliše preko protein-protein interakcije (Freedman et al. 1999; Momand et al. 2000). Poznato je da se MDM2 protein vezuje za transaktivacioni domen p53 (Lu and Levine 1995; Thut et al. 1995). Kao posledica ovog vezivanja dolazi do smanjenja nivoa p53 i do proteolitičke degradacije. Naime, MDM2 je E3 ubikvitin ligaza, i zahvaljujući svom RING domenu, ova ligaza interaguje sa p53 proteinom, dodaje ubikvitin regulatorni protein koji dovodi do toga da p53 biva prepoznat od strane poteozoma i degradovan (Fang et al. 2000). Sa druge strane, p53 protein aktivira ekspresiju MDM2, što za posledicu ima aktivaciju negativne povratne sprege i regulaciju nivoa p53 proteina u ćeliji (Momand et al. 2000). Najbolji primer koji opisuje važnost ove negativne povratne sprege je analiza MDM2 knock-out miševa koji su umirali rano tokom embrionalnog razvića. Zapravo, usled odsustva MDM2 proteina, p53 je deregulisan u tolikoj meri da njegova prekomerna akumulacija dovodi do smrti embriona (Jones et al. 1995). U nekim tipovima tumora poremećena ekspresija MDM2 gena uzrokovana amplifikacijom može dovesti do konstitutivne inhibicije p53, promovišući na taj način nastanak tumora (Shi and Gu 2012). S obzirom da je

interakcija između p53 i MDM2 neophodna za njegovu degradaciju, sprečavanjem ove interakcije može se izbjeći degradacija p53 proteina. Ova činjenica je od važnosti u slučajevima gde bi povećana ekspresija p53 obezbedila pravilno funkcionisanje ćelije. Neki od načina za sprečavanje ove interakcije su post-translacione modifikacije p53 koje štite ovaj protein od degradacije posredovane MDM2 proteinom. Najčešće post-translacione modifikacije p53 proteina su fosforilacija, acetilacija i sumoilacija, koje se dešavaju na nekoliko mesta u okviru N- i C-terminalnog domena p53. Step en fosforilacije utiče na konformaciju p53 proteina kao i na međuproteinske interakcije (Ashcroft et al. 1999). U uslovima kada je ćelija pod stresom, dolazi do fosforilacije vezivnog mesta za MDM2 u okviru p53 proteina, čime se sprečava interakcija između p53 i MDM2, što dovodi do stabilizacije p53 proteina. Takođe, fosforilacijom vezivnog mesta za MDM2 maskira se signal za izlazak iz jedra (eng. *NES-nuclear export signal*), što za posledicu ima akumulaciju p53 proteina u jedru (Zhang and Xiong 2001). p53 se u formi tetramera sa velikim afinitetom vezuje za specifične DNK sekvence i stimuliše transkripciju ciljnih gena (Halazonetis and Kandil 1993; Thut et al. 1995). Primarno mesto za fosforilaciju p53 proteina u odgovoru na oštećenje DNK jeste fosforilacija aminokiseline Serin na poziciji 15 (Ser15) od strane ATM (eng. *Ataxia Telangiectasia Mutated*) i ATR (eng. *Ataxia Telangiectasia and Rad3-related*) protein kinaza (Tibbetts et al. 1999). Fosforilacija p53 na poziciji Ser15 omogućava interakciju p53 sa histon/lizin acetiltransferazama, kao što su p300 i CBP (eng. *CREB binding protein*), što dalje promovise acetilaciju p53 i sprečava ubikvitinaciju, dovodeći do stabilnosti p53 proteina (Lambert et al. 1998). Ser15 fosforilacija takođe pokreće seriju fosforilacija u drugim delovima p53 proteina, uključujući Serin na poziciji 9, 20 i 46, kao i Treonin na poziciji 18, što dovodi do dalje stabilizacije i aktivacije p53 (Loughery et al. 2014). Iako su brojna istraživanja pokazala da p53 protein može pretrpeti oko 60 različitih post-translacionih modifikacija, ipak se prva otkrivena modifikacija Ser15 pokazala kao ključna za funkcionisanje i stabilnost p53 proteina (Loughery et al. 2014).

### 1.3.2.3. Uloga p53 tumor supresora u regulaciji ćelijskog ciklusa i apoptoze

Gubitak funkcionalnog p53 proteina dovodi do genomske nestabilnosti, akumulacije mutacija i inicijacije nastanka tumora. p53 ostvaruje ulogu tumor supresora kao transkripcioni regulator, vezujući se za ciljne gene koji imaju bitnu ulogu u regulaciji ćelijskog ciklusa i/ili apoptoze. Usled povećanja nivoa aktivnog p53 proteina dolazi do zaustavljanja ulaska ćelije u S fazu ćelijskog ciklusa i do popravke oštećenja DNK, ili ukoliko je došlo do velikih oštećenja DNK, dolazi do pokretanja apoptotske kaskade (Sharpless and DePinho 2002; Vousden and Lu 2002; Vousden and Prives 2009). Na Slici 18 je prikazana pojednostavljena shema uloge p53 proteina i komponente p53 signalnog puta u ćelijskom ciklusu i apoptozi.



**Slika 18: Pojednostavljeni shematski prikaz komponenti p53 signalnog puta i uloge p53 proteina u ćelijskom ciklusu i apoptozi.** U normalnim uslovima p53 signalni put je u stanju mirovanja, dok pod dejstvom nekog stresora dolazi do njegove aktivacije. Fosforilacija dovodi do stabilizacije p53 proteina. Ovako stabilisan p53 deluje kao transkripcioni regulator vezujući se za DNK vezivna mesta u

promotorima ciljnih gena. Vezivanjem za *CDKN1A* promotor aktivira p21<sup>Waf1/Cip1</sup> protein koji uvodi ćeliju u zastoje ćelijskog ciklusa. Ukoliko su DNK oštećenja tolika da reparacioni mehanizmi ne mogu da ih poprave, p53 stimuliše ekspresiju pro-apoptotskih gena, kao što je *BAX*, i pokreće proces kontrolisane ćelijske smrti - apoptoze.

p53 reguliše ekspresiju *CDKN1A*/p21<sup>Waf1/Cip1</sup> koji pripada familiji ciklin zavisnih kinaza (CDK) (Slika 18). Ciklin-zavisne kinaze su enzimi koji vrše fosforilaciju i aktivaciju određenih proteina i učestvuju u regulaciji napredovanja ćelijskog ciklusa. Stabilizovan p53 indukuje ekspresiju p21<sup>Waf1/Cip1</sup> proteina. p21<sup>Waf1/Cip1</sup> deluje direktno vezujući se za N-terminalni domen CDK ili indirektno fosforilacijom CDK1 i CDK2 (Abbas et al. 2007; Mandal et al. 1998; Smits et al. 2000). p21<sup>Waf1/Cip1</sup> vezivanjem za CDK inhibira njihovu aktivnost sprečavajući napredovanje u ćelijskom ciklusu (Slika 18). Zapravo, inhibicijom CDK proteina, p21<sup>Waf1/Cip1</sup> inhibira i G1/S i G2/M tranziciju (Rozan and El-Deiry 2007). Zastoj na G1/S prelazu ćelijskog ciklusa služi za proveru i popravku DNK oštećenja pre replikacije. Vreme tokom zastoja u ćelijskom ciklusu p53 koristi za aktivaciju reparacionih mehanizama i sprečavanje prenošenja mutacija u novonastale ćelije. Ukoliko reparacioni mehanizmi ne mogu da poprave oštećenja na molekulu DNK, p53 pokreće proces apoptoze (Oren 2003).

p53 protein, kao transkripcioni regulator, reguliše ekspresiju brojnih gena koji su bitni za pokretanje apoptoze, menjajući odnos pro- i anti-apoptotskih proteina (Slika 18) (Oren 2003). Pokazano je da tumor supresor p53, povećava transkripciju pro-apoptotskog gena *BAX* (Miyashita and Reed 1995), dok sa druge strane deluje kao represor transkripcije gena anti-apoptotskih molekula iz *Bcl-2* (eng. ***B-cell Lymphoma 2***) familije (Miyashita et al. 1994). Promenjen odnos pro- i anti-apoptotskih gena uvodi ćelije u završnu fazu pokretanja apoptoze, koja se karakteriše aktiviranjem složene kaspazne kaskade (Slika 18) (Rudel 1999). Aktivacija Kaspaze 3 predstavlja ključni korak u pokretanju apoptotskog događaja, koji dovodi do selektivne aktivacije i inaktivacije brojnih supstrata. Zapravo, Kaspaza 3 seče PARP protein (engl. *poly-(ADP-ribose) polymerase*) na poziciji Asparaginske kiseline 214 (Asp214) i na poziciji Glicina 215 (Gly215), čime nastaju dve neaktivne subjedinice ovog proteina različitih molekularnih masa: 89 kDa koja sadrži auto-modifikacioni i katalitički domen, kao i manja subjedinica od 24 kDa sa DNK-vezujućim domenom (Boulares et al. 1999). PARP je enzim uključen u reparaciju molekula DNK i aktivacija ovog proteina dešava

se usled oštećenja molekula DNK (Boulares et al. 1999). Apoptotska ćelija morfološki se karakteriše kondenzacijom hromatina, fragmentacijom jedra, ispupčenjima na površini membrane i apoptotskim telima u citoplazmi (Saraste and Pulkki 2000).

#### 1.3.2.4. Uloga gena *SOX* familije u regulaciji p53 signalnog puta

Jedan od gena *SOX* čija je uloga u regulaciji p53 signalnog puta najbolje proučena je *SOX4*. Pokazano je da *SOX4* stabilise p53 protein blokirajući MDM2 posredovanu ubikvitinaciju i povećavajući acetilovanu formu p53 proteina (Pan et al. 2009). Na taj način *SOX4* promovise zastoj ćelijskog ciklusa i indukciju apoptoze (Pan et al. 2009). U glioblastoma ćelijskim linijama je takođe pokazano da *SOX4* aktivira p53-p21<sup>Waf1/Cip1</sup> signalni put (Zhang et al. 2014). Sa druge strane, studije u hepatocelularnom karcinomu su pokazale da *SOX4* interaguje sa p53, blokirajući transkripciju gena *BAX*, što dovodi do inhibicije apoptoze (Hur et al. 2010). Slične uloge su pokazane i za druge članove gena *SOX* familije. Tako je za *SOX6* pokazano da stabilise p53 i dovodi do povećanja ekspresije p21<sup>Waf1/Cip1</sup> proteina, što za posledicu ima smanjenje proliferacije (Wang et al. 2016a). U ćelijama glioblastoma *SOX21* deluje na starenje ćelije i apoptozu i posredstvom CDK inhibitora i p53 proteina blokira tumorogeni potencijal ovih ćelija (Kurtsdotter et al. 2017). Studija na ćelijama poreklom od karcinoma pluća je pokazala da u ovim ćelijama *SOX30* ostvaruje ulogu tumor supresora aktivacijom transkripcije gena *TP53* (Han et al. 2015). Takođe, nedavno je pokazano da *SOX2* regulise ekspresiju gena *CDKN1A* vezujući se za promotor ovog gena u ćelijama poreklom od karcinoma endometrijuma (Yamawaki et al. 2017). *SOX9* je, takođe, uključen u regulaciju ekspresije gena *CDKN1A* i promovise zastoj u ćelijskom ciklusu (Panda et al. 2001). Imajući u vidu da brojni članovi gena *SOX* familije učestvuju u regulaciji p53 ili nekog od njegovih ciljnih gena, može se očekivati da je još neki od članova *SOX* familije gena uključen u regulaciji ovog važnog signalnog puta.



### 1.3.3. Karcinom grlića materice

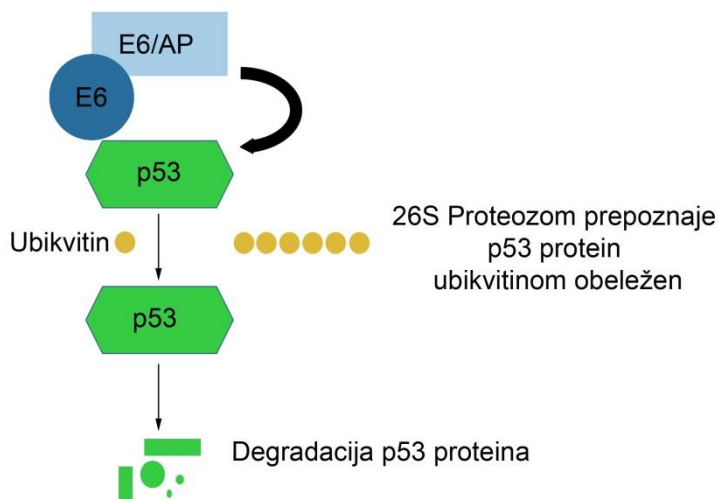
Karcinom grlića materice se smatra najčešćim ginekološkim malignitetom. U Srbiji je ovaj karcinom na drugom mestu po učestalosti među malignitetima kod žena, posle karcinoma dojke. Prema poslednjim istraživanjima godišnje se registruje oko 1400 novo-oboelih od karcinoma grlića materice (Perisic et al. 2013), a prema stopi mortaliteta u Evropi, Srbija se svrstava u jednu od zemalja sa visokom smrtnošću kada je ovaj karcinom u pitanju ([Globocan 2012 database. Available online at: http://globocan.iarc.fr/factsheets/cancers/cervix.asp](http://globocan.iarc.fr/factsheets/cancers/cervix.asp)).

Kod karcinoma grlića materice izdvajaju se tri tipa, skvamocelularni tip koji je najčešći (učestalost 85%), adenokarcinom (učestalost 10%-15%) i adenoskvamozni karcinom (učestalost 3%). Karcinom grlića materice se razvija kroz niz premalignih promena koje predstavljaju oštećenja površinskog sloja epitela i nazivaju se displazije ili skvamozne intraepitelijalne lezije (CIN). Neophodan i ključni faktor za nastanak karcinoma grlića materice je infekcija Humanim papilomavirusom (HPV). DNK ovog virusa je otkrivena u 99.7% uzoraka karcinoma grlića materice (Walboomers et al. 1999). Do sada je poznato preko 200 HPV tipova (Doorbar et al. 2015). U HPV tipove visokog onkogenog rizika spadaju HPV16, HPV18, HPV31 i HPV33. DNK poreklom od HPV16 virusa je najčešća i može se detektovati u preko 50% karcinoma grlića materice, dok je drugi po učestalosti HPV18. Funkcionalne studije su pokazale da mehanizam delovanja HPV uključuje ekspresiju dva glavna viralna gena *E6* i *E7* čiji produkti utiču na tumor supresore u ćelijama epitela indukujući njihovu degradaciju (Scheffner et al. 1993).

Kao primarno lečenje karcinoma grlića materice koriste se hirurgija, zračenje i hemoterapija, a često se primenjuje i kombinacija ovih tipova lečenja. Međutim, i pored razvoja novih terapijskih metoda, stopa mortaliteta je i dalje visoka (Duska 2016). Zbog toga su neophodna dalja istraživanja koja će omogućiti bolje razumevanje mehanizama uključenih u malignu transformaciju ćelija karcinomagrlića materice i razvoja novih terapijskih pristupa.

### 1.3.3.1. Uloga p53 signalnog puta u nastanku karcinoma grlića materice

Kao i u drugim tipovima karcinoma, p53 ima bitnu ulogu i u karcinomu grlića materice . Poznato je da jedan od mehanizama koji dovodi do nastanka ovog tipa tumora uključuje E6 onkoprotein i p53 tumor supresor. Kako ne bi došlo do nastanka karcinoma grlića materice, neophodno je pravilno funkcionisanje p53 tumor supresora. Mehanizam dejstva podrazumeva da se E6 onkoprotein vezuje za p53, inaktivirajući ga, što dalje dovodi do gubitka funkcija ovog tumor supresora. E6 onkoprotein promovise degradaciju p53 proteina ubikvitinacijom (Scheffner et al. 1993). Svoju ulogu u degradaciji p53 proteina E6 onkoprotein ostvaruje pomoću E6 asociranog proteina (E6-AP), koji funkcioniše kao E3 ubikvitin ligaza (Scheffner et al. 1993). Da bi se desila degradacija p53 proteina posredstvom E6 onkoproteina, potrebno je da E6 napravi kompleks sa E6 asociranim proteinom (E6-AP) (Waddell and Jenkins 1998). Ovako formiran kompleks degraduje p53 protein, što dovodi do genomske nestabilnosti, odsustva apoptoze i nekontrolisane proliferacije (Slika 19).



**Slika 19: Vezivanje virusnog E6 onkoproteina za p53 tumor supresor dovodi do degradacije ovog tumor supresora. E6 onkoprotein ostvaruje kompleks sa E6 asociranim proteinom (E6-AP). Ovako formiran kompleks ubikvitinuje p53. Ubikvitovan p53 biva prepoznat od strane 26S Proteozoma i degradovan. Na taj način p53 gubi funkcije tumor supresora. Slika je modifikovana iz (Yim and Park 2005).**

Na sličan način, E7 protein vezujući se za članove *POCKET* familije odgovorne za ćelijsku proliferaciju, kao što su retinoblastom-protein (pRb), p107 i p130, i dovodi do inaktivacije E2F zavisnih gena i poremećaja ćelijskog ciklusa, što dalje uzrokuje nekontrolisanu ćelijsku deobu (Jones and Munger 1996). Takođe, postoje i drugi mehanizmi regulacije p53 od strane virusnog E6 proteina. Pokazano je da se E6 vezuje za p53 ali ne dovodi do njegove degradacije, već na taj način suprimira ulogu p53 proteina u transaktivaciji ciljnih gena (Pim et al. 1994). Gubitak funkcije p53 transkripcionog regulatora dovodi do odsustva kontrole u regulaciji ćelijskog ciklusa i apoptoze, pri čemu dolazi do nekontrolisane deobe ćelije i rasta tumora. Imajući u vidu važnu ulogu p53 proteina, veoma je bitno pronaći odgovarajući mehanizam za aktivaciju p53 u ovom tipu tumora, kako bi ovaj protein ostvario svoju tumor supresorsku ulogu.

#### **1.3.3.2. Uloga gena *SOX* u karcinomu grlića materice**

Do sada je poznato da nekoliko članova gena *SOX* familije ima ulogu u nastanku karcinoma grlića materice. *SOX1* suprimira ćelijski rast i invaziju *in vitro*, a svoju ulogu tumor supresora ostvaruje inhibicijom Wnt/ $\beta$ -katenin signalnog puta (Lin et al. 2013). Drugi član *SOXB1* podgrupe, *SOX2*, ima ulogu onkogeni i promoviše ćelijsku migraciju i invaziju u ćelijama poreklom od karcinoma grlića materice (Chang et al. 2015). Novije funkcionalne studije su pokazale da *SOX4* promoviše ćelijski ciklus i proliferaciju i inhibira rezistentnost CaSki ćelija na lekove koji se često koriste u terapiji ovog kancera (Sun et al. 2015). Takođe, pokazano je i da *SOX18* promoviše maligni potencijal ćelija poreklom od karcinoma grlića materice indukcijom migracije (Petrovic et al. 2015).

Dosadašnji literaturni podaci ukazuju na važnost ispitivanih gena *SOX* u etiologiji karcinoma grlića materice, zbog čega je opravdano ispitivanje drugih članova ove familije gena u nastanku ili supresiji ovog tipa kancera.

## 2. CILJEVI RADA

Iako je gen *SOX14* identifikovan pre dvadesetak godina funkcija ovog gena još uvek nije dovoljno istražena. Ova doktorska disertacija ima za cilj analizu ekspresije i dalje rasvetljavanje potencijalne uloge gena *SOX14* u procesu neuralne diferencijacije *in vitro*, kao i detaljniju analizu ekspresije i uloge gena *SOX14* u regulaciji malignog fenotipa ćelija poreklom od karcinoma grlića materice.

U svrhu realizacije navedenog cilja istraživanja u ovoj doktorskoj disertaciji definisani su sledeći specifični ciljevi:

1. Ispitati ekspresiju humanog gena *SOX14* i mišijeg gena *Sox14* tokom neuralne diferencijacije pluripotentnih ćelijskih linija pod dejstvom retinoične kiseline *in vitro*.
2. Izvršiti uporednu analizu ekspresije gena *SOXB/SoxB* grupe, markera pluripotentnosti i markera karakterističnih za različite faze neuralne diferencijacije.
3. Identifikovati tipove diferenciranih ćelija u kojima se eksprimira *SOX14* metodom imunocitohemije.
4. Analizirati ekspresiju i metilacioni status gena *SOX14* u komercijalnim ćelijskim linijama poreklom od karcinoma grlića materice.
5. Modulirati ekspresiju gena *SOX14* u ovim ćelijama i analizirati uticaj njegove izmenjene ekspresije na proliferaciju, ćelijski ciklus, ćelijsku smrt, migraciju i invaziju ćelija poreklom od karcinoma grlića materice.
6. Identifikovati signalne puteve u kojima učestvuje transkripcioni regulator *SOX14*.

Analiza ekspresije i uloge gena *SOX14/Sox14* u procesu neuralne diferencijacije *in vitro* sprovedena je u ćelijskim linijama poreklom od embrionalnih teratokarcinoma čoveka (NT2/D1) i miša (P19). Navedene ćelijske linije, kao što je već opisano u uvodnom delu, imaju odlike pluripotentnih ćelija koje se pod dejstvom retinoične kiseline diferenciraju u zrele, funkcionalne neurone. Predloženi model sistemi su dobro okarakterisani i predstavljaju dragoceni *in vitro* izvor terminalno diferenciranih neuralnih ćelija. Tokom procesa diferencijacije ispitana je ekspresija gena *SOX14/Sox14*, ostalih članova *SOXB* grupe kao i ekspresija poznatih markera

pluripotentnih i diferenciranih ćelija. Posebna pažnja je posvećena identifikaciji diferenciranih ćelija u kojima se eksprimira SOX14.

U drugom delu doktorske disertacije analizirana je uloga gena *SOX14* u ćelijskim procesima vezanim za maligni fenotip ćelija poreklom od karcinoma grlića materice. Eksperimentalni pristup u definisanju uloge gena *SOX14* zasnovan je na praćenju efekata povećane ekspresije ovog gena na proliferaciju, ćelijsku smrt, ćelijski ciklus, migraciju i invaziju. Posebna pažnja je posvećena ulozi SOX14 proteina u regulaciji signalnog puta u karcinomu grlića materice.

Gen *SOX14* je opisan kod brojnih vrsta ali je uloga koju ovaj gen ostvaruje u ćelijskim procesima malo poznata. Rezultati ove disertacije daće važan doprinos u proučavanju uloge jednog od evolutivno najočuvanijih SOX proteina.

### 3. MATERIJAL I METODE

#### 3.1. Eksperimentalni materijal

##### 3.1.1. Bakterijski soj korišćen u radu

Tabela 2: Bakterijski soj korišćen u radu

Soj	Karakteristike-genotip	Referenca
XL1 Blue	<i>lac recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F'proAB lacI<sup>q</sup>ZDM15 Tn10 (Tet<sup>r</sup>)]</i>	Stratagene®

##### 3.1.2. Vektori i plazmidni konstrukti korišćeni u radu

Tabela 3: Vektori korišćeni u radu

Plazmid	Veličina	Karakteristike	Referenca
pJet1.2/blunt	2974 bp	Vektor koji služi za kloniranje PCR produkata, nosi gena za rezistenciju na ampicilin.	Thermo Scientific
pcDNA3.1	5428 bp	Eukariotski ekspresioni vektor koji nosi rezistenciju na ampicilin i neomicin kao i promotor poreklom od citomegalovirusa (CMV) uzvodno od mesta za kloniranje gena od interesa	Invitrogen®

Tabela 4: Plazmidni konstrukti korišćeni u radu

Plazmid	Veličina	Karakteristike	Referenca
SOX14P3XbaI 2.2	5100 bp	Sadrži 2.2 kb dugu genomsku sekvencu u okviru koje se nalazi humani gen <i>SOX14</i> . Sadrži otvoreni okvir čitanja (ORF) i deo 5' nekodirajućeg regiona. Konstrukt u koji je uz pomoć restrikcionih enzima <i>XbaI</i> i <i>PstI</i> ukloniran fragment genomske DNK veličine 2.2 kb koji sadrži i deo 5' nekodirajućeg regiona gena <i>SOX14</i> u pBSII KS + vektoru.	(Arsic et al. 1998)
SOX14wt	6352 bp	Sadrži kodirajući region humanog gena <i>SOX14</i> dužine 872 bp koji je obuhvaćen sekvencom na poziciji +196/+1068 u odnosu na start transkripcije. Sadrži deo mesta za kloniranje pJet1.2/blunt vektora (Detaljno prikazano na Slici 34, poglavlje Rezultati). Nosi gen za rezistenciju na ampicilin.	(Popovic et al. 2014) Ova doktorska disertacija
SOX14DN1	5781 bp	Sadrži kodirajući region gena <i>SOX14</i> dužine 332 bp koji je obuhvaćen sekvencom +196/+528 u odnosu na start transkripcije. Sadrži deo mesta za kloniranje pJet1.2/blunt vektora. Nosi gen za rezistenciju na ampicilin.	(Gredic 2015)
pEGFP-C1	4731 bp	Eukariotski ekspresioni vektor u koji je ukloniran gen za zeleni fluorescentni protein (eng. <i>Green Fluorescent Protein</i> - GFP). Nosi gene za rezistenciju na ampicilin i kanamicin.	BD Bioscience Clontech
3xSXLuc	NA#	Sadrži tri ponovljene oligonukleotidne sekvence koje sadrže SOX vezivna mesta,	(Kuhlbrodt et al. 1998)

		uklonirane u pTATA <sub>luc</sub> vektor. Vektor eksprimira reporter gen za luciferazu koji je pod kontrolom $\beta$ -globinskog minimalnog promotora. Nosi gen za rezistenciju na ampicilin.	
pRLSV40	3705 bp	Eukariotski ekspresioni vektor u koji je ukloniran gen za luciferazu poreklom iz vrste kolonijalnih žarnjaka <i>Renilla reniformis</i> . Nosi gen za rezistenciju na ampicilin.	Promega
pGL2-356bp	5954 bp	Sadrži promotor humanog gena <i>TP53</i> (na poziciji od -344 do +12 u odnosu na start transkripcije), ukloniran uzvodno od gena za luciferazu. Nosi gen za rezistenciju na ampicilin.	Addgene
pGL2-200bp	5798 bp	Sadrži promotor humanog gena <i>TP53</i> (na poziciji od -344 do -144 u odnosu na start transkripcije), ukloniran u pGL2 vektor uzvodno od gena za luciferazu. Nosi gen za rezistenciju na ampicilin.	Addgene
pGL2-100bp	5698 bp	Sadrži promotor humanog gena <i>TP53</i> (na poziciji od -344 do -244 u odnosu na start transkripcije), ukloniran u pGL2 vektor uzvodno od gena za luciferazu. Nosi gen za rezistenciju na ampicilin.	Addgene
pGL2-50bp	5648 bp	Sadrži promotor humanog gena <i>TP53</i> (na poziciji od -344 do -294 u odnosu na start transkripcije gena <i>TP53</i> ), ukloniran u pGL2 vektor uzvodno od gena za luciferazu. Nosi gen za rezistenciju na ampicilin.	Addgene
p21-Luc	6373 bp	Sadrži promotor humanog gena <i>CDKN1A</i> ukloniran u pGL2	Addgene



		vektor uzvodno od gena za luciferazu. Nosi gen za rezistenciju na ampicilin.	
pcDNA3-p53 WT	6649 bp	Eukariotski ekspresioni vektor, u koji je ukloniran ORF humanog gena <i>TP53</i> . Nosi gen za rezistenciju na ampicilin.	Addgene

### 3.1.3. Čelijske linije korišćene u radu

U ovom radu su korišćene komercijalno dostupne permanentne čelijske linije embrionalnog teratokarcinoma: NT2/D1 humanog porekla (ATCC br. CRL-1973) (Andrews 1984; Andrews 1988) i P19 mišijeg porekla (ATCC® CRL-1825™) (Jones-Villeneuve et al. 1982). Obe čelijske linije su gajene u standardnim uslovima, u DMEM-u (eng. *Dulbecco's Modified Eagle Medium*) sa visokim sadržajem glukoze, 10% FBS-a (eng. *Fetal Bovine Serum*) i 2mM L-glutaminom (Invitrogen™, NY, USA) na 37°C, pri čemu su NT2/D1 gajene na 10 % CO<sub>2</sub>, dok su P19 gajene na 5 % CO<sub>2</sub>.

Takođe, korišćene su tri čelijske linije poreklom iz humanog karcinoma grlića materice: HeLa (ATCC®, CCL-2), SiHa (ATCC® HTB-35™) i Ca Ski (ATCC® CRL-1550™). HeLa je čelijska linija poreklom od adenokarcinoma grlića materice i karakteriše se prisustvom HPV18. SiHa je čelijska linija poreklom od skvamoznog karcinoma grlića materice (2. stepen) i karakteriše se prisustvom HPV16 virusa (1-2 kopije po ćeliji), dok su Ca Ski poreklom od epidermalnog karcinoma grlića materice i karakterišu se prisustvom HPV16 virusa (600 kopija po ćeliji). HeLa ćelije su gajene u DMEM-u sa niskim sadržajem glukoze, 10% FBS-a i 1x neesencijalnim aminokiselinama (Invitrogen™, NY, USA) na 37°C i 5%CO<sub>2</sub>, dok su SiHa i Ca Ski gajene u DMEM-u sa visokim sadržajem glukoze, 10% FBS-a i 2mM L-glutaminom (Invitrogen™, NY, USA) na 37°C, na 5 % CO<sub>2</sub>.

### 3.1.4. Antitela korišćena u radu

U Western blot (WB) i u imunocitohemijskoj (ICH) analizi korišćena su sledeća antitela

#### 1. primarna antitela (u zagradi su data korišćena razblaženja):

- Zečje anti-SOX14 (Abcam, Cambridge, UK, ab49047) (razblaženje 1:400 za WB i 1:200 za ICH)
- Zečje anti-GFAP (DakoCytomation, Glostrup, Denmark, Z 0334) (razblaženje 1:20000 za WB i 1:2000 za ICH)
- Mišje anti- $\beta$ -III-Tubulin (Sigma-Aldrich, MO, USA, T-8660,) (razblaženje 1:10000 za WB)
- Mišje anti-SNAP25 (Sternberger Monoclonals, San Diego, USA) (razblaženje 1:100000 za WB)
- Zečje anti-OCT4 (Cell Signaling, Technology Denvers, MA, USA, 2840) (razblaženje 1:1000 za WB)
- Mišje anti-MAP2 (Abcam, ab11267) (razblaženje 1:500 za ICH)
- Zečje anti-SOX1 (Abcam, ab109290) (razblaženje 1:1000 za WB)
- Zečje anti-SOX2 (Active Motif, La Hulpe, Belgium, 39824) (razblaženje 1:3000 za WB)
- Zečje anti-SOX3 (Abcam, ab42471) (razblaženje 1:2000 za WB)
- Mišje anti-SOX21 (Abcam, ab56837) (razblaženje 1:500 za WB)
- Mišje anti-cleaved PARP (Cell Signaling, Asp214) (razblaženje 1:1000 za WB)
- Mišje anti-p53 DO-1(Santa Cruz Biotechnology, Texas, USA, sc-126X) (razblaženje 1:1000 za WB i 1:200 za ICH)
- Zečje anti-fosfo-p53 (Ser15) (Cell Signaling, 9284) (razblaženje 1:1000 za WB i 1:50 za ICH)
- Zečje anti-p21<sup>Waf1/Cip1</sup> (Cell Signaling, 2947 ) (razblaženje 1:1000 za WB i 1:50 za ICH)
- Mišje anti-GAPDH (Abcam, ab9484) (razblaženje 1:5000 za WB)

- Mišje anti- $\alpha$ -Tubulin (Calbiochem, MA, USA, CP06) (razblaženje 1:30000 za WB i 1:200 za ICH)

## 2. Sekundarna antitela:

- HRP-konjugovano anti-zečji-IgG (Amersham Biosciences, NJ, USA) (razblaženje 1:10000 za WB)
- HRP-konjugovano anti-mišji IgG (Amersham Biosciences, NJ, USA) (razblaženje 1:10000 za WB)
- HRP-konjugovano anti-zečji-IgG (Active motif) (razblaženje 1:5000 za WB)
- HRP-konjugovano anti-mišji-IgG (Active motif) (razblaženje 1:5000 za WB)
- Alexa Fluor 488- biotinizovana kozja anti-zečja IgG (Vector, Burlingame) (razblaženje 1:5000 za ICH)
- Alexa Fluor 594- biotinizovana kozja anti-zečja IgG (Vector, Burlingame) (razblaženje 1:5000 za ICH)
- Alexa Fluor 488- biotinizovana kozja anti-mišija IgG (Vector, Burlingame) (razblaženje 1:5000 za ICH)
- Alexa Fluor 594- biotinizovana kozja anti-mišija IgG (Vector, Burlingame) (razblaženje 1:5000 za ICH)
- DyLight<sup>®</sup>594-streptavidin (Vector, Burlingame, CA, USA) ( razblaženo 1:1000 za ICH)
- DyLight<sup>®</sup>649-streptavidin (Vector, Burlingame, CA, USA) ( razblaženo 1:1000 za ICH)
- 

### 3.1.5. Oligonukleotidi korišćeni u radu

Tabela 5: Oligonukleotidi korišćeni u radu

Naziv	Sekvenca
<i>SOX14</i> F1	5'-CTCGTCTGCAGAACCCTTGCAC-3'
<i>SOX14</i> R3	5'-GCTCAAGAAGGACAGGTATGTC-3'
<i>SOX14</i> R6	5'-GACCCCGGAGGCGTCTGCAG-3'
<i>TP53</i> F	5'-CCCCTCCTGGCCCCTGTCATCTTC-3'
<i>TP53</i> R	5'-GCAGCGCCTCACAACCTCCGTCAT-3'

<i>GAPDH</i> F	5'-GGACCTGACCTGCCGTCTAG-3'
<i>GAPDH</i> R	5'-CAGTTATGGGCCAGCCAGAGA-3'
<i>aktin</i> F	5'-AGCTGAGAGGGGAAATCGTGC-3'
<i>aktin</i> R	5'-GATGGAGGGGCCGACTCAT-3'
<i>CDKN1A</i> F	5'-GACACCACTGGAGGGTGACT-3'
<i>CDKN1A</i> R	5'-CAGGTCCACATGGTCTTCCT-3'
<i>BAX</i> F	5'-TGGCAGCTGACATGTTTTCTGAC-3'
<i>BAX</i> R	5'-TCACCCAACCACCCTGGTCTT-3'
<i>Bcl-2</i> F	5'-TCGCCCTGTGGATGACTGA-3'
<i>Bcl-2</i> R	5'- CAGAGACAGCCAGGAGAAATC-3'
M1 F	5'-TAAGGGTTTATTAATTAGGGTTCTGA-3'
M1 R	5'-ACGATACTTTAACAATATTCTCCCG-3'
U1 F	5'-TAAGGGTTTATTAATTAGGGTTTGA-3'
U1 R	5'-AATACTTTAACAATATTCTCCCAA-3'
M2 F	5'-ATAGTGTTTCGAGATAATGTGGAATC-3'
M2 R	5'-AAAAACGCGACTAATAAAAACG-3'
U2 F	5'-AGTGTTTGAGATAATGTGGAATTGA-3'
U2 R	5'-CAAAAACACAATAATAAAAACAAA-3'

### 3.1.6. Komercijalni kitovi i reagensi

Sekvenciranje plazmidnih konstrukata urađeno je pomoću kita ABI PRISM BigDye® Terminator v3.1 Ready Reaction Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, MA, USA). Za oslobađanje fragmenata DNK iz agaroznog gela korišćen je QIAquick® Gel Extraction Kit (Qiagen, Nemačka). Za kloniranje produkata lančane reakcije polimeraze u pJet1.2/blunt plasmid korišćen je CloneJET\* PCR Cloning Kit (Fermentas, Thermo Fisher Scientific, USA). Plazmidna DNK je izolovana i prečišćena upotrebom “Endofree plasmid Midi Kit”- a (Qiagen). Totalna RNK iz ćelija je izolovana korišćenjem kita “TRI-Reagent” (Ambion). Prečišćavanje RNK od prisustva DNK urađeno je pomoću DNA-free™ Kit-a (Ambion, USA). Za sintezu

komplementarne DNK (cDNK) je korišćena MuLV reverzna transkriptaza (Applied Biosystems). RT-PCR je urađen pomoću “KAPA 2G Fast Hot Start Ready Mix” PCR kita (Byosistems). Kvantitativni, qRT-PCR je urađen pomoću “Power SYBR Green PCR master mix” reagensa (Applied Biosystems). Tranzijentne transfekcije ćelija su rađene “LIPOFECTAMINE” reagensom (Invitrogen) ili polietilenimin agensom (eng. *polyethyleneimine* “MAX” –PEI, Polysciences, Inc, 24765). Luciferazna aktivnost je analizirana uz pomoć kita Dual-luciferase® Reporter Assay System (Promega, USA). Za detekciju hemiluminescencije tokom Western blot metode korišćen je HRP supstrat (ECL, Millipore).

### 3.1.7. Kompjuterski programi

Pretraživanje potencijalnih mesta za vezivanje SOX14 transkripcionog regulatora je urađeno pomoću Jaspar programa (<http://jaspar.genereg.net/>) (Mathelier et al. 2016). Količina proteina dobijenih Western blot metodom je kvantifikovana pomoću ImageJ kompjuterskog programa. Za detekciju CpG ostrva u okviru promotora humanog gena *SOX14* i dizajn oligonukleotida za MSP korišćen je *online* dostupan MethPrimer alat (Li and Dahiya 2002).

## 3.2. Eksperimentalne metode

### 3.2.1. Kloniranje humanog gena *SOX14* u pJet1.2 vektor

Lančana reakcija polimeraze (eng. *polymerase chain reaction* - PCR) je urađena pomoću KAPA 2G Fast Hot Start Ready Mix Kit (Kapa Biosystems, MA, USA) prema uputstvu proizvođača. Reakciona smeša ukupne zapremine od 10 µl sadržala je: 5 µl KapaMix (0.2 U KAPA2G Fast HotStart DNK polimeraze, u odgovarajućem reakcionom puferu koji u 1× razblaženju sadrži 0.2 mM svakog dNTP i 1.5 mM MgCl<sub>2</sub> i stabilizatore), 0.5 pmol/µl F1 (eng. *forward* - F) oligonukleotida, 0.5 pmol/µl R6 (eng.

*reverse - R*) oligonukleotida, 3  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O i 50 ng DNK matrice (korišćen je plazmidni konstrukt SOX14P32.2XbaI). PCR reakcija urađena je po sledećem programu: početna denaturacija 95°C, 2 minuta; 35 ciklusa koji uključuju: 15 sekundi denaturacije na 95°C, 15 sekundi renaturacije na 60°C, 30 sekundi elongacije na 72°C; i finalna sinteza 72°C, 2 minuta. Dobijen je PCR produkt F1R6 koji sadrži 882 bp kodirajućeg regiona humanog gena *SOX14*. Dobijeni PCR produkt je nakon elucije iz gela od agaroze, ukloniran u pJet1.2 vektor (Clone JET\* PCR Cloning Kit, Fermentas, Thermo Fisher Scientific, USA), namenjen za kloniranje PCR produkata, prema uputstvima proizvođača. U reakcionoj smeši ligacije molarni odnos plazmida i inserta je iznosio 1:3, a zatim su ligacionom smešom transformisane kompetentne bakterije (XL1Blue soj *E. coli*). Dobijeni konstrukt je nazvan pJet1.2SOX14.

### **3.2.2. Sekvenciranje**

Sekvenciranje predhodno dobijenog plazmidnog konstrukta pJet1.2SOX14 urađeno je uz pomoć kita ABI PRISM BigDye® Terminator v3.1 Ready Reaction Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, MA, USA), na aparatu 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, MA, USA), po uputstvima proizvođača.

### **3.2.3. Enzimska reakcija isecanja vektora pcDNA3.1 i plazmidnog konstrukta pJet1.2SOX14 restrikcijom enzimima**

Enzimsko isecanje vektora pcDNA3.1 i plazmidnog konstrukta pJet1.2SOX14 vršeno je u ukupnoj zapremini reakcione smeše od 50  $\mu$ l, a smeše je sadržala DNK (5-7  $\mu$ g plazmidnog vektora ili konstrukta), restrikcioni enzim(i) koncentracije 2U po  $\mu$ g DNK, kao i odgovarajući komercijalni pufer u kome je aktivnost enzima optimalna. Reakcije su se odvijale preko noći, na temperaturi od 37°C.

### **3.2.4. Kloniranje humanog gena *SOX14* u pcDNA3.1 vektor**

Insercija linearnog dvolančanog fragmenta DNK, koji obuhvata kodirajući region humanog gena *SOX14* (koji je prethodno kao PCR produkt ukloniran u pJet1.2), u prethodno linearizovan plazmidni vektor pcDNA3.1 obavljena je uz pomoć enzima T4 ligaze. Reakciona smeša, ukupne zapremine 20 µl, sadržala je 4 U T4 Ligaze (Promega, USA), pufer za ligazu, kao i insert i linearizovan vektor u molarnom odnosu 5:1. Reakcija se odvijala preko noći, na temperaturi od 16°C. Dobijen je plazmidni konstrukt SOX14wt. Usledila je provera plazmidnog konstrukta na 1% gelu od agaroze i provera odgovarajućim restrikcionim enzimima.

### **3.2.5. Precipitacija DNK etanolom**

Nakon ligacije, DNK iz reakcione smeše je prečišćena precipitacijom etanolom. Prvi korak u postupku precipitacije DNK bilo je dodavanje 2 µl (0.1× volumena uzorka) Na<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>COOH pH 5.2 i 50 µl (2.5× volumena uzorka) 96% etanola, nakon čega je smeša inkubirana 1 h na suvom ledu (-20°C). Po centrifugiranju na 13000 obrtaja (Centrifuga 5417R, Eppendorf, Nemačka) u trajanju od 20 minuta, na temperaturi 4°C, talog je osušen u vakuum uparivaču i potom resuspendovan u ddH<sub>2</sub>O.

### **3.2.6. Provera SOX14wt konstrukta restrikcionim enzimima**

Enzimsko isecanje SOX14wt konstrukta vršeno je u ukupnoj zapremini reakcione smeše od 50 µl, a smeša je sadržala DNK (5-7 µg konstrukta), restrikcioni enzim(i) koncentracije 2U po µg DNK, kao i odgovarajući komercijalni pufer u kome je aktivnost enzima optimalna. Reakcije su se odvijale preko noći, na temperaturi od 37°C.

### **3.2.7. Elektroforeza u gelu od agaroze i oslobađanje fragmenata DNK iz gela od agaroze**

Fragmenti DNK su po veličini razdvojeni elektroforezom na 1% ili 2% gelu od agaroze. Agarozna je zagrevanjem rastvorena u 1×TAE puferu (40 mM Tris, 20 mM CH<sub>3</sub>COOH i 1 mM EDTA), a neposredno pre izlivanja gela dodat je 0.5 µg/ml etidijum bromida (EtBr). Elektroforeza je tekla u TAE puferu, pri konstantnom naponu od 90 V, a fragmenti DNK su nakon razdvajanja bili vizualizovani pod UV svetlom i upoređeni sa veličinama traka u DNK markeru (1 kb Biolabs Ladder, New England BioLabs, Inc., MA, USA). DNK je potom bila izdvojena i prečišćena od agaroze pomoću kita QIAquick® Gel Extraction Kit (Qiagen, Nemačka), po uputstvima proizvođača.

### **3.2.8. Kultivacija bakterija i priprema kompetentnih bakterija za transformaciju toplotnim šokom**

Bakterije *E. coli* su gajene na čvrstoj hranljivoj LB (eng. *Luria Bertani Broth*) podlozi ili u tečnoj hranljivoj LB podlozi, na temperaturi 37°C. Za potrebe selekcije transformisanih bakterija u oba medijuma dodavan je ampicilin u koncentraciji od 100 µg/µl.

Prvi korak u pripremi kompetentnih bakterija za transformaciju toplotnim šokom bila je inokulacija prekoćne kulture XL1Blue soja *E. coli* u 100 ml tečne LB podloge u odnosu 1:100. Bakterije su gajene na 37°C do dostizanja vrednosti OD<sub>600</sub> između 0.5 i 1. Potom je ova kultura inkubirana na ledu 15 minuta, nakon čega su bakterije istaložene centrifugiranjem (GS-3 rotor, Sorvall RC-5B Refrigerated Superspeed centrifuga, Du Pont Company, USA) 10 minuta na 3000 obrtaja na temperaturi od 4°C. Talog bakterija resuspendovan je u 50 ml hladnog 100 mM CaCl<sub>2</sub>, inkubiran na ledu 15 minuta, a potom istaložen centrifugiranjem 10 min na 3000 obrtaja na temperaturi od 4°C. Nakon toga, talog je resuspendovan u 4 ml sveže pripremljenog RF2 pufera pH 6.8 (10 mM MOPS, 10 mM RbCl<sub>2</sub>, 75 mM CaCl<sub>2</sub>, 15% glicerol) i uz mešanje inkubiran na ledu 15 minuta, nakon čega su kratko zamrznute u tečnom azotu.



### **3.2.9. Transformacija bakterija toplotnim šokom**

U prvom koraku transformacije, u 200  $\mu$ l XL1Blue soja *E. coli* bakterija kompetentnih za transformaciju toplotnim šokom dodata je polovina smeše ligacije prečišćene precipitacijom etanolom (pogledati poglavlje 3.2.3, 3.2.4. i 3.2.5). Smeša je inkubirana 30 min na ledu uz povremeno mešanje, nakon čega je sledila inkubacija 2 min na temperaturi od 42°C. Potom je smeša inkubirana na ledu još 5 minuta i prebačena u 1 ml toplog tečnog LB medijuma radi oživljavanja. Bakterije su se od toplotnog šoka oporavljale 1 h na 37°C, nakon čega je 100-300  $\mu$ l kulture zasejano na čvrstu LB podlogu sa ampicilinom i inkubirano preko noći na 37°C.

### **3.2.10. Izolacija plazmidne DNK**

#### **3.2.10.1. Izolacija plazmidne DNK na maloj skali**

Izolacija plazmidne DNK na maloj skali (eng. *Mini prep*) rađena je radi provere uspešnosti kloniranja željenog fragmenta DNK u plazmidni vektor.

1.5 ml prekonodne kulture bakterija istaloženo je centrifugiranjem 90 sekundi na 13000 rpm u centrifugi (MiniSpin, Eppendorf, Nemačka), nakon čega je talog resuspendovan u 50-100  $\mu$ l medijuma preostalog nakon odlivanja. Po dodatku 300  $\mu$ l svežeg TENS pufera (10 mM Tris-Cl, 1 mM EDTA, 0.1 M NaOH, 0.5% SDS) smeša je kratko vorteksovana. Po dodavanju 150  $\mu$ l 3 M Na<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>COOH (pH 5.2) smeša je promešana na vorteksu 10 sekundi. Ostaci ćelija istaloženi su centrifugiranjem 5-10 minuta na 13000 rpm u centrifugi (MiniSpin, Eppendorf, Nemačka). Supernatant je prebačen u novu eprvetu i dodat je 1 ml hladnog 96% etanola. DNK je istaložena centrifugiranjem 10 min na 13000 rpm u centrifugi (MiniSpin, Eppendorf, Nemačka). Talog je potom opran u 70% etanolu, osušen u vakum uparivaču i resuspendovan u smeši od 30  $\mu$ l bidestilovane vode i 1  $\mu$ l RNK-aze. Nakon resuspendovanja, usledila je inkubacija od 15 minuta na 37° C, a prinos je potom analiziran elektroforezom na 1% gelu od agaroze.

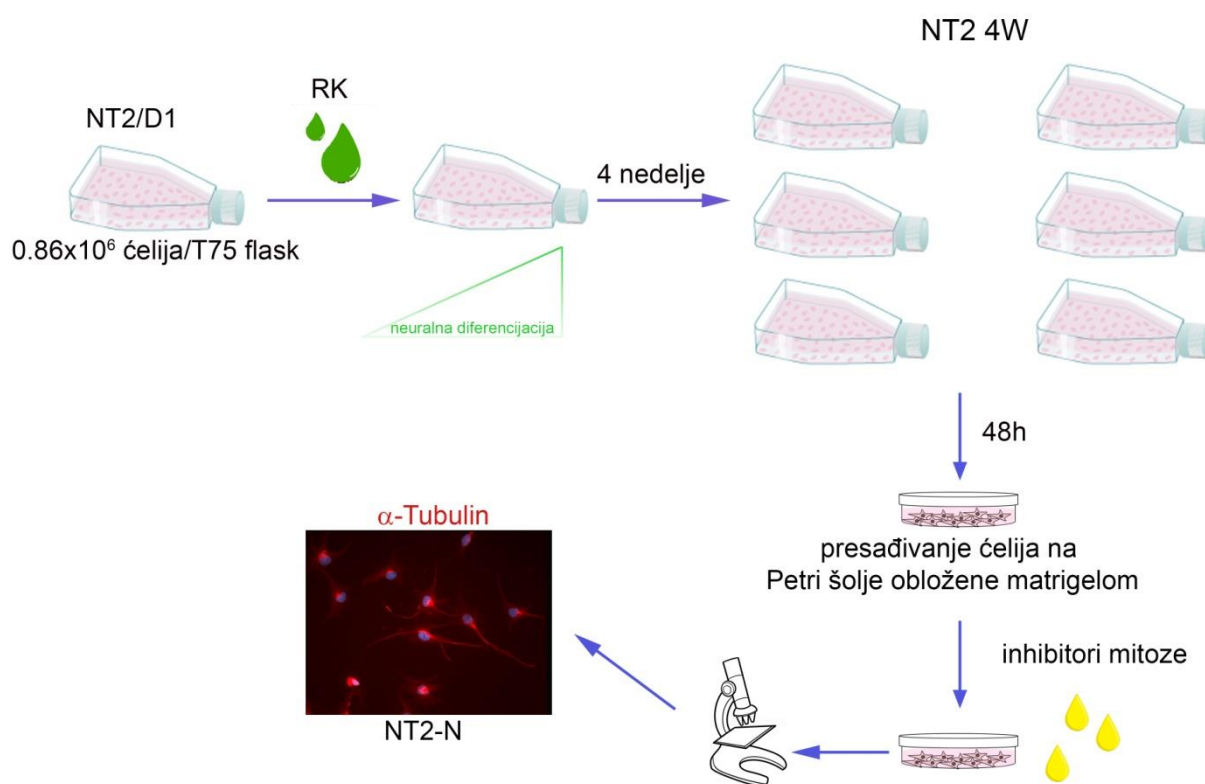
### 3.2.10.2. Izolacija plazmidne DNK na srednjoj skali

Izolacija plazmidnih konstrukata korišćenih za transfekciju izvršena je na srednjoj skali (eng. *Midi prep*) uz pomoć kita DNK “EndoFree Midi Plasmid” (Quiagen, USA). Quiagen kit za izolaciju plazmidne DNK se zasniva na modifikovanoj proceduri alkalne lize, nakon čega sledi vezivanje plazmidne DNK za patentirani Quiagen anjonski-jonoizmenjivački matriks, pod odgovarajućim uslovima niskih jonskih jačina i vrednosti pH. RNK, proteini i ostale nečistoće se uklanjaju pranjem rastvorima srednje jonske jačine. Plazmidna DNK se eluira u puferu visoke jonske jačine, a zatim koncentriše i odsoljava izopropanolskom precipitacijom. Kako su plazmidi korišćeni i za potrebe tranzijentne transfekcije, bilo je neophodno da iz izolata budu uklonjeni bakterijski endotoksini. Endotoksini su lipopolisaharidi Gram-negativnih bakterija, kao što je *E.coli*. Prisustvo endotoksina znatno umanjuje efikasnost transfekcije eukariotskih ćelija. Korišćenjem patentiranog ER (eng. *Endotoxin removal*) pufera, onemogućava se vezivanje endotoksina za DNK vezujući matriks. Izolovana plazmidna DNK je čuvana na -20°C do upotrebe u tranzijentnim transfekcijama.

### 3.2.11. Protokol za diferencijaciju NT2/D1 ćelija

Neuralna diferencijacija NT2/D1 ćelija *in vitro* rađena je prema protokolu koji je ranije opisan (Pleasure et al. 1992) (Slika 20). Oko  $0.8 \times 10^6$  ćelija zasađeno je u T75 flask, a zatim tretirano 10  $\mu$ M *all-trans* retinoičnom kiselinom (RK), pri čemu je svež medijum sa RK menjan na svakih 48h. Po isteku prve (NT2 1W), druge (NT2 2W), treće (NT2 3W) i četvrte (NT2 4W) nedelje tretmana pokupljen je talog za izolaciju ukupnih ćelijskih proteina. a deo ćelija je zasađen na pokrovna stakalca za imunocitohemijsko bojenje. U cilju izdvajanja prečišćene populacije neurona, ćelije su po završetku tretmana retinoičnom kiselinom subkultivisane u odnosu 1:6. Tako subkultivisane ćelije su dalje gajene dva dana na 37°C u medijumu za gajenje ćelija bez RK, a zatim se pristupilo izdvajanju populacije neurona. Izolacija neurona se zasniva na osobini diferenciranih ćelija da su manje adherentne za površinu na kojoj rastu u odnosu

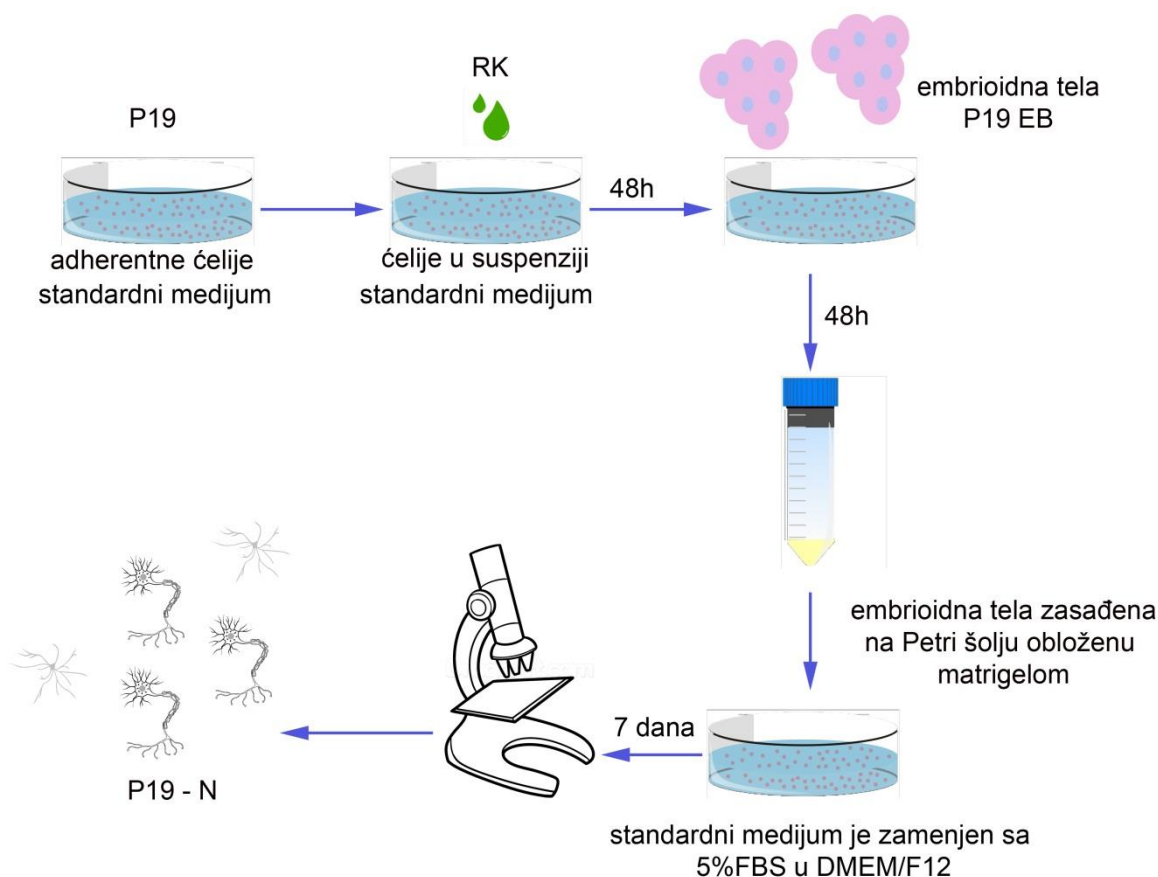
na ćelije koje nisu neuroni, te se mogu izolovati mehaničkim putem. Svaka ivica flaska je snažno udarana deset puta rukom, a zatim je pokupljen medijum zajedno sa plutajućim ćelijama. Ćelije su zatim pokupljene centrifugiranjem na 1300 obrtaja/min 5 minuta na sobnoj temperaturi, a zatim je talog resuspendovan u medijumu za gajenje ćelija koji sadrži inhibitore mitoze: 1  $\mu\text{M}$  citozin  $\beta$ -D-arabinofuranozid (AraC), 10  $\mu\text{M}$  5-fluoro 2'-deoksiuridin (dFUR) i 10  $\mu\text{M}$  uridin (Sigma Aldrich). Zatim su ćelije zasađene na petri šolje i pokrovna stakalca koja su prethodno obložena matrigelom (Becton Dickerson, NJ, USA). Ćelije su tretirane inhibitorima mitoze 10 dana, pri čemu je medijum za gajenje ćelija sa svežim inhibitorima mitoze menjan na svakih 48h. Nakon toga su izolovani ukupni ćelijski protein i totalna RNK, a ćelije zasađene na pokrovna stakalca su fiksirane i pripremljena za imunocitohemijsko bojenje.



Slika 20: Shematski prikaz protokola za neuralnu diferencijaciju NT2/D1 ćelija *in vitro*.

### 3.2.12. Protokol za diferencijaciju P19 ćelija

Neuralna diferencijacija P19 ćelija (Slika 21) rađena je po opisanom protokolu (Jones-Villeneuve et al. 1982), uz male izmene. P19 ćelijama je po postizanju konfluentnosti između 70 i 80%, zamenjen medijum za gajenje ćelija (standardni uslovi u DMEM-u sa visokim sadržajem glukoze i 10% FBS). Nakon toga, ćelije su tripsinizovane i resuspendovane u medijumu za gajenje sa dodatkom 1  $\mu$ M RK, a zatim su prebačene u petri šolje za gajenje ćelija u suspenziji. Nakon 48h došlo je do formiranja ćelijskih agregata, odnosno embrioidnih tela (P19EB, eng. *Embryoid body*, EB). Iz jednog dela ćelija su izolovani ukupni ćelijski proteini. Nakon 48h, embrioidna tela su pažljivo prebačena u veću sterilnu epruvetu i staložena pomoću sile Zemljine teže, a medijum je zamenjen svežim standardnim medijumom sa 1  $\mu$ M RK. P19 embrioidna tela su ponovo istaložena, medijum je zamenjen svežim medijumom bez RK i embrioidna tela su zasađena na Petri šolju prethodno obloženu matrigelom. Nakon 24h ćelije su isprane i standardni medijum je zamenjen sa DMEM/F12 (Sigma-Aldrich) koji sadrži 5% FBS. U ovim uslovima su ćelije gajene narednih sedam dana uz promenu svežeg medijuma na svakih 48h. Nakon toga iz jednog dela ćelija su izolovani totalni ćelijski proteini (P19-N), dok je deo ćelija zasađen napokrovna stakalca za dalju analizu imunocitohemijskim bojenjem.



Slika 21: Shematski prikaz protokola za neuralnu diferencijaciju P19 ćelija *in vitro*.

### 3.2.13. Tranzijentna transfekcija ćelija LIPOFECTAMINE reagensom

Dan pre transfekcije oko  $3 \times 10^5$  ćelija je zasađeno u Petri šolje prečnika 35 mm<sup>2</sup>, a oko  $7 \times 10^4$  ćelija u posude sa 24 bunarića (eng. 24 *well*). Nakon 24h, kada su ćelije dostigle približno 90% konfluentnosti, promenjen je medijum i dodat medijum bez seruma. Transfekcija je rađena u minimalnom OPTI-MEM medijumu (Invitrogen) u odsustvu seruma.

Prema protokolu za Petri šolje od 35 mm napravljene su dve smeše, u jednoj smeši je 3 µg DNK (odgovarajućeg kontrolnog vektora ili odgovarajućeg konstrukta) rastvoreno u 250 µl OPTI-MEM-a (*Gibco*, USA). U drugoj smeši je 8 µl LIPOFECTAMINE<sup>®</sup> 2000 ili 3000 reagensa (Invitrogen<sup>™</sup>, USA) rastvoreno u 250 µl OPTI-MEM-a. Potom su smeše spojene i inkubirane 20 minuta na sobnoj temperaturi

radi formiranja DNK-lipidnih kompleksa. Nakon formiranja kompleksa u ukupnoj zapremini od 500  $\mu$ l za svaku pojedinačnu transfekciju, smeše su nakapane na ćelije koje su zatim inkubirane 5h. Nakon toga, ćelije su isprane 1xPBS-om i dodat je svež, kompletan medijum. 24h, 48h i/ili 72h nakon transfekcije izolovana je RNK i/ili ukupni ćelijski proteini.

Za eksperimente rađene u posudama sa 24 bunarića napravljene su takođe dve smeše. U jednoj smeši je 0.65 ili 0.85  $\mu$ g DNK (odgovarajućeg kontrolnog vektora ili odgovarajućeg konstrukta) rastvoreno u 50  $\mu$ l OPTI-MEM-a. U drugoj smeši je 1.2  $\mu$ l LIPOFECTAMINE<sup>®</sup> 2000 ili 3000 reagensa rastvoreno u 50  $\mu$ l OPTI-MEM-a. Potom su smeše spojene i inkubirane 20 minuta na sobnoj temperaturi radi formiranja DNK-lipidnih kompleksa. Nakon formiranja kompleksa u ukupnoj zapremini od 100  $\mu$ l za svaku pojedinačnu transfekciju, smeše su nakapane na ćelije koje su zatim inkubirane 5 h. Nakon toga, ćelije su isprane 1xPBS-om i dodat je svež, kompletan medijum. 24h, 48h i/ili 72h nakon transfekcije praćena je luciferazna aktivnost ili su ćelije fiksirane za potrebe imunocitohemijskog bojenja.

### **3.2.14. Tranzijentna transfekcija Hela ćelija PEI reagensom**

Oko  $3 \times 10^5$  ćelija je dan pre transfekcije zasađeno u Petri šolje prećnika 35 mm<sup>2</sup>, a oko  $7 \times 10^4$  ćelija je zasađeno u posude sa 24 bunarića. Neposredno pre transfekcije ćelijama je zamenjen medijum.

U 250  $\mu$ l OPTI-MEM medijuma, dodati su PEI-Max agens (pH 7.2) (eng. *polyethyleneimine* "MAX", Polysciences, Inc, Kataloški broj 24765) i plazmidna DNK u odnosu 5:1 ili 3:1 i inkubirani 15 minuta na sobnoj temperaturi. Zatim je smeša PEI i DNK nakapana na ćelije koje su zasađene u Petri šolje prećnika 35 mm<sup>2</sup>. Iz ćelija je 24h, 48h i/ili 72h nakon transfekcije izolovana RNK ili ukupni ćelijski proteini.

U 50  $\mu$ l OPTI-MEM medijuma, dodati su PEI-Max agens (pH 7.2) i plazmidna DNK u odnosu 5:1 ili 3:1 i inkubirani 15 minuta na sobnoj temperaturi. Zatim je smeša PEI i DNK nakapana na ćelije koje su zasađene u posude sa 24 bunarića i 24h, 48h i/ili 72h nakon transfekcije praćena je luciferazna aktivnost ili su ćelije fiksirane za potrebe imunocitohemijskog bojenja.

U cilju analize uticaja povećane ekspresije SOX14 proteina na nivo ekspresije fosfo-p53 (Ser15) proteina, oko  $7 \times 10^4$  HeLa ćelija je zasađeno na pokrovna stakalca u posude sa 24 bunarića. Narednog dana, ćelije su ko-transfektovane sa 0.6  $\mu$ g SOX14wt i 50 ng pEGFP-C1 konstrukta. DNK pomenutih konstrukata je rastvorena u 50  $\mu$ l OPTI-MEM medijuma uz PEI reagens prema prethodno opisanoj proceduri. 24h nakon transfekcije ćelije su fiksirane i spremljene za imunocitohemijsko bojenje prema opisanoj proceduri iz poglavlja 3.2.19. EGFP-C1 je plazmid koji eksprimira zeleni fluorescentni protein (eng. *Green Fluorescent Protein - GFP) i signali su detektovani FITC filterom na konfokalnom mikroskopu (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany, TCS SP8 softver).*

### **3.2.15. Transfekcija HeLa ćelija u cilju praćenja luciferazne aktivnosti promotora**

U cilju analize aktivacione/represorske funkcije gena *SOX14*, HeLa ćelije su zasejane u broju od oko  $7 \times 10^4$  u posude sa 24 bunarića. Sledećeg dana je urađena transfekcija sa ukupno 650 ng DNK, od čega je 300 ng 3xSXLuc vektora, 50 ng pRLSV40 vektora korišćenog za normalizaciju, i 300 ng vektora pcDNA3.1 ili konstrukta SOX14wt. DNK je rastvorena u OPTI-MEM medijumu uz LIPOFECTAMINE ili PEI reagens prema opisanoj proceduri iz poglavlja 3.2.12. i 3.2.13.

U cilju praćenja efekta povećane ekspresije SOX14 proteina na aktivnost promotora gena *TP53* ili *CDKN1A* koji su uklonirani uzvodno od luciferaznog reporterskog gena, HeLa ćelije su zasejane u broju od oko  $7 \times 10^4$  ćelija u posude sa 24 bunarića. Sledećeg dana je urađena transfekcija sa ukupno 850 ng DNK, od čega je 500 ng odgovarajućeg konstrukta (*TP53* delecioni konstrukt ili p21-Luc), 50 ng pRLSV40 vektora korišćenog za normalizaciju i 300 ng vektora pcDNA3.1 ili jednog od tri konstrukta: SOX14wt, SOX14DN1 ili pcDNA3-p53. DNK je rastvorena u OPTI-MEM medijumu uz LIPOFECTAMINE ili PEI reagens prema opisanoj proceduri iz poglavlja 3.2.12. i 3.2.13. .

### **3.2.16. Kvantifikacija luminiscentnih signala primenom Dual-Luciferase® Reporter Assay sistema**

24 h nakon transfekcije, ćelije su lizirane u 1× Passive Lysis Buffer (Promega, USA) prema uputstvu proizvođača. 10 µl dobijenog ćelijskog lizata, od ukupno 100 µl, korišćeno je za merenje luciferazne aktivnosti uz pomoć kita Dual-luciferase® Reporter Assay System (Promega, USA), prema uputstvu proizvođača, na aparatu Glomax 20/20 Luminometer (Promega, USA).

### **3.2.17. Izolacija ukupnih ćelijskih proteina**

Talog transfektovanih ćelija (sakupljen istog dana ili čuvan na -80°C) 30 minuta je inkubiran na ledu sa odgovarajućom zapreminom (1 ml/10<sup>7</sup> ćelija) pufera za lizu ćelija (50 mM TrisHCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 5 µg/ml PMSF, 1 µg/ml aprotinin, 1 µg/ml leupeptin, 1 µg/ml pepstatin A). Za potrebe imunološke detekcije antitelima specifičnim za fosfo-p53, u pomenuti pufer su dodati i inhibitori fosfataza (PhosSTOP, Roche). Nakon centrifugiranja 15 minuta na 4°C pri brzini od 11 600 rpm (Centrifuga 5417R, Eppendorf, Nemačka) ukupni ćelijski proteini iz supernatanta odvojeni su od ostataka ćelija i čuvani na -80°C. Koncentracija proteina je određivana primenom Bradford eseja (Bio-Rad Laboratories, Inc., CA, USA).

### **3.2.18. Merenje koncentracije proteina po Bradfordu**

Bradford metoda se zasniva na kolorimetrijskom određivanju nepoznate koncentracije proteina u uzorku na osnovu standardne krive dobijene merenjem apsorbance standarda poznate koncentracije. Standardi za merenje koncentracije dobijeni su rastvaranjem BSA (eng. *Bovin serum albumin*) u ddH<sub>2</sub>O u sledećim koncentracijama: 1, 2, 4, 6, 8, 10 i 20 µg/ml. Uzorci su pripremljeni tako što je 1 µl



ukupnog ćelijskog lizata rastvoren u 799  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O nakon čega je dodato 200  $\mu$ l “BioRad Protein Assay Dye” reagensa (Bio-Rad Laboratories, Inc., CA, USA). Apsorbancija je merena na spektrofotometru na talasnoj dužini od 595 nm (Bradford, 1976).

### **3.2.19. Imunološka detekcija proteina (Western blot)**

Nakon elektroforeze u 10% ili 12% gelu od poliakrilamida u odgovarajućem puferu za SDS-PAGE elektroforezu (25 mM Tris, 190 mM glicin, 0.1% SDS u ddH<sub>2</sub>O) pri naponu od 90 V dok su uzorci putovali u gelu za koncentrovanje i naponu od 160 V dok su uzorci putovali u gelu za razdvajanje uzoraka, usledio je elektroforetski polusubi transfer proteina (Biometra, Nemačka) iz gela na PVDF membranu (Immobilone-P, Millipore, MA, USA). Posle blokade nespecifičnog vezivanja inkubacijom membrana u 5% nemasnom mleku preko noći na 4°C, membrane su inkubirane sa odgovarajućim primarnim antitelom u trajanju od 1 h na sobnoj temperaturi ili preko noći na +4°C. Membrane su potom više puta isprane u odgovarajućem puferu (1xTBST, 50 mM Tris, 150 mM NaCl i 0.05% Tween 20), a zatim inkubirane 1 h sa odgovarajućim sekundarnim antitelom na sobnoj temperaturi. Nakon temeljnog ispiranja odgovarajućim puferom (1xTBST), signali su vizuelizovani ECL sistemom za detekciju (Millipore). Kao kontrola za ujednačenu količinu proteina u uzorcima podvrgnutim Western blot analizi, služio je GAPDH ili  $\alpha$ -Tubulin protein.

### **3.2.20. Imunofluorescentna citohemijska analiza**

Ova metoda omogućava detekciju ekspresije, ali i lokalizaciju proteina unutar adherentnih ćelija. Imunofluorescentni esej je zasnovan na vezivanju specifičnih primarnih antitela za membranske, citosolne ili nuklearne proteine, koja se vizuelizuje korišćenjem sekundarnih i/ili tercijernih antitela konjugovanih fluorohromama.

Ćelije koje su zasađene na pokrovna stakalca, isprane su 1xPBS-om i fiksirane 4% paraformaldehidom (PFA) u trajanju od 20 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon toga je usledila permeabilizacija, a posle toga i blokada nespecifičnog vezivanja u trajanju od 30 minuta sa 0.1% tritonom i 5% goveđem serum albuminu (BSA)

rastvorenom u 1xPBS-u na sobnoj temperaturi. Inkubacija sa primarnim antitelima adekvatnog razblaženja, rastvorenim u 1xPBS-u koji sadrži 0.1% triton i 1% BSA, vršena je u trajanju od 60 minuta na sobnoj temperaturi ili preko noći na +4 °C. Pokrovna stakalca su zatim oprana tri puta po 10 minuta u 1xPBS-u koji sadrži 0.1% triton i inkubirana sa odgovarajućim sekundarnim antitelima (razblaženje 1:500) u trajanju od 60 minuta na sobnoj temperaturi u 1xPBS-u koji sadrži 0.1% triton i 1% BSA. Za pojedina antitela rađen je i dodatni korak u cilju amplifikacije signala. U ovom dodatnom koraku, nakon primarnih antitela, ćelije su bojene sekundarnim anti-mišijim ili anti-zečjim DyLight®-streptavidinom (Vector, Burlingame, CA, USA, 1:1000) a zatim su dodatno inkubirane sa streptavidin konjugovanom Cy3 bojom (Jackson ImmunoResearch, 1: 500) rastvorenom u 1xPBS-u, 1h na sobnoj temperaturi. Nakon isteka ovog vremena ćelije su oprane tri puta po 10 minuta 1xPBS puferom, i bojene 0.1 mg/ml diaminofenilindolom (DAPI, Sigma). Pokrovna stakalca su uz pomoć agensa Mowiol-a zalepljenja na staklenu pločicu. Tako pripremljeni preparati su analizirani korišćenjem konfokalnog mikroskopa (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany, TCS SP8 softver) i fluorescentnog mikroskopa (Leica Microsystems, LAS AF-TCS SP8 softver).

### **3.2.21. Izolacija RNK**

U talog ćelija dodata je ona količina TRIzol reagensa (Ambion®, Invitrogen, USA) koja odgovara površini suda u kome su ćelije gajene, prema uputstvima proizvođača, a nakon kratke homogenizacije pipetiranjem homogenati su inkubirani 5 minuta na sobnoj temperaturi. Potom je dodat hloroform (1/5 od dodate količine TRIzol reagensa), smeša je promešana i inkubirana 10 minuta na sobnoj temperaturi. Posle centrifugiranja u trajanju od 15 minuta pri brzini od 12000 g na 4°C, u ependorfici se izdvojila vodena faza u kojoj se nalazi RNK. U novoj ependorfici, RNK iz vodene faze precipitirana je dodatkom izopropanola (1/2 od dodate količine TRIzol reagensa). Nakon temeljnog mešanja sledila je inkubacija u trajanju od 10 minuta i centrifugiranje na 12000 g, 8 minuta na 4°C. Nakon uklanjanja supernatanta, precipitatu RNK dodat je 75% etanol (u ukupnom volumenu dodatog TRIzol reagensa), a zatim je uzorak centrifugiran na 7500 g, 5 min na sobnoj temperaturi. Nakon centrifugiranja supernatant

je uklonjen a precipitirana RNK je rastvorena u 30-75  $\mu$ l vode oslobođene od nukleaza. Tako rastvorena RNK je inkubirana 5 min na temperaturi od 55°C radi boljeg rastvaranja.

### **3.2.22. Oslobađanje totalne RNK od ostataka genomske DNK**

Kako bi se izolovana totalna RNK oslobodila tragova DNK koji se mogu naći u izolovanoj RNK korišćen je DNA-free Kit (Ambion, Invitrogen, USA) po uputstvima proizvođača. 5  $\mu$ g izolovane RNK tretirano je sa 2U DNKaze I (eng. *Deoxyribonuclease*) u prisustvu DNKaza I pufera u ukupnoj zapremini od 25  $\mu$ l. Reakciona smeša je inkubirana na 37°C u trajanju od 30 minuta. Po isteku inkubacije, reakcionoj smeši je dodat resuspendovani DNKaza I inaktivacioni reagens. Nakon toga reakciona smeša je inkubirana u trajanju od 2 minuta na sobnoj temperaturi a zatim centrifugirana u trajanju od 90 sekundi na 13000 rpm. Nakon centrifuge, supernatant je čuvan na -80°C i korišćen za sintezu cDNK.

### **3.2.23. Sinteza komplementarne DNK i PCR kome prethodi reverzna transkripcija (RT-PCR)**

Reakcija reverzne transkripcije izvedena je u reakcionoj smeši u ukupnoj zapremini od 20  $\mu$ l. Reakcija je sadržala 125 ng oligonukleotida (Random hexamers, Applied Biosystems, MA, USA), 2.5 U reverzne transkriptaze (MuLV, Applied Biosystems, MA, USA), 10 U inhibitora RNKaza (Applied Biosystems, MA, USA), 1.5 mM mix nukleotida (dNTP mix, Applied Biosystems, MA, USA), odgovarajući reakcioni pufer za reverznu transkriptazu (Applied Biosystems, MA, USA), 5 mM  $MgCl_2$  (Applied Biosystems, MA, USA), i 1 $\mu$ g izolovane RNK prethodno tretirane DNazom I (poglavlje 3.2.21.) i ddH<sub>2</sub>O. Proces sinteze je izveden u PCR aparatu prema programu 10 minuta na 25°C, 40 minuta na 40°C, 5 minuta na 99°C i 5 minuta na 5°C.

Dobijena cDNK korišćena je kao matrica u RT-PCR reakciji za umnožavanje željenih sekvenci, uporedo sa kontrolnom *GAPDH*. U reakcijama je korišćen KAPA 2G Fast Hot Start Ready Mix Kit (Kapa Biosystems, MA, USA) prema uputstvu

proizvođača. Reakciona smeša ukupne zapremine od 10  $\mu$ l sadržala je: 5  $\mu$ l KapaMix (0.2 U KAPA2G Fast HotStart DNK polimeraze, u odgovarajućem reakcionom puferu koji u 1 $\times$  razblaženju sadrži 0.2 mM svakog dNTP i 1.5 mM MgCl<sub>2</sub> i stabilizatore), 0.5 pmol/ $\mu$ l odgovarajućeg F (eng. *forward* - F) oligonukleotida, odgovarajućeg 0.5 pmol/ $\mu$ l R (eng. *reverse* - R) oligonukleotida, 3  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O i 50 ng DNK matrice (odgovarajuća cDNK). PCR reakcija sa odgovarajućim oligonukleotidima za *GAPDH* urađena je po sledećem programu: početna denaturacija 95°C, 2 minuta; 20 ciklusa koji uključuju: 15 sekundi denaturacije na 95°C, 15 sekundi renaturacije na 60°C, 30 sekundi elongacije na 72°C; i finalna sinteza 72°C, 2 minuta. PCR reakcija sa odgovarajućim oligonukleotidima za *SOX14* urađena je po sledećem programu: početna denaturacija 95°C, 2 minuta; 30 ili 35 ciklusa koji uključuju: 15 sekundi denaturacije na 95°C, 15 sekundi renaturacije na 60°C, 30 sekundi elongacije na 72°C; i finalna sinteza 72°C, 2 minuta. Dobijeni produkti su razdvojeni elektroforezom na 2% gelu od agaroze i vizuelizovani bojenjem etidijum bromidom.

### 3.2.24. Kvantitativni PCR u realnom vremenu (qRT-PCR)

qRT-PCR je tehnika koja omogućava amplifikaciju i istovremenu relativnu kvantifikaciju molekula DNK od interesa. Reakcije qRT-PCR su rađene sa Power SYBR Green PCR master mix-om (Applied Biosystems, MA, USA) u ukupnoj zapremini od 10  $\mu$ l u aparatu 7500 Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems, MA, USA). Pored SYBR Green PCR master mixa, reakciona smeša je sadržala i odgovarajuće prajmere i odgovarajuću cDNK kao matricu. SYBR Green boja se vezuje za dvolančanu DNK i nakon ekscitacije emituje fluorescentni signal određene talasne dužine. Naime kako se PCR produkti amplifikuju i akumuliraju intenzitet fluorescentnog signala se povećava, odnosno količina fluorescencije je proporcionalna količini PCR produkta. Svaka reakcija je rađena u triplicatu i uzimana je u obzir srednja vrednost za svaki uzorak. *GADPH* je korišćen kao kontrola ujednačenosti količine uzoraka. Relativni nivo ekspresije analiziranih gena je određen pomoću komparativnog algoritma za kvantifikaciju, gde je  $\Delta\Delta C_t$  vrednost inkorporisana u formulu  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  čime se dobija stepen razlike u ekspresiji između dva uzorka. Relativna ekspresija ispitivanih

gena je predstavljena kao procenat u odnosu na ekspresiju u kontrolnim ćelijama ili u ćelijama transfektovanim kontrolnim vektorom, kojima je dodeljena vrednost 100%.

### **3.2.25. *In silico* analiza promotora humanog gena *SOX14***

Za predikciju CpG ostrva i dizajn oligonukleotida za metilacija-specifičan PCR (eng. *methylation-specific PCR-MSP*) korišćen je *online*-dostupan program MethPrimer (Li and Dahiya 2002). Sekvenca promotora humanog gena *SOX14* dužine 1385 bp (Popovic and Stevanovic 2009) je podvrgnuta analizi.

Prilikom unosa sekvence, program generiše dva tipa sekvence, jednu bisulfitno modifikovanu i metilovanu, u kojoj su svi C, osim 5mC, konvertovani u T; drugu bisulfitno modifikovanu i nemetilovanu, u kojoj su svi C, uključujući i 5mC, konvertovani u T. Program koristi algoritam koji prati GC sastav i odnos između detektovanih i očekivanih CG dinukleotida. CpG ostrvo definiše se kao sekvenca DNK duga najmanje 200 bp sa GC sastavom većim od 50% i detektovanim odnosom CG dinukleotida većim od 0.6 (Gardiner-Garden and Frommer 1987). Za predikciju oligonukleotida za nizvodne reakcije MethPrimer koristi Primer3 algoritam (Li and Dahiya 2002), dok zavisno od tipa nizvodne analize moraju biti zadovoljeni dodatni uslovi. Oligonukleotidi za MSP se dizajniraju u 2 para, od kojih jedan odgovara metilovanoj sekvenci DNK (M) dok drugi odgovara nemetilovanoj sekvenci DNK (N). Za ovu analizu oligonukleotidi moraju sadržavati bar 1 CG dinukleotid na svom 3' – kraju, a poželjno je i više CG dinukleotida. Takođe, M i N parovi oligonukleotida u svojoj sekvenci moraju sadržavati identične CG dinukleotide, kao i identične tačke topljenja.

Prema navedenim kriterijumima u okviru promotora humanog gena *SOX14* detektovana su 4 CpG ostrva (CpG1, CpG2, CpG3 i CpG4) (Slika 38).

### **3.2.26. Metilacija-specifičan PCR (eng. *methylation-specific PCR-MSP*)**

Jedna od čestih epigenetičkih modifikacija je metilacija DNK, kojom se citozin konvertuje u 5-metilcitozin (Gonzalez-Recio 2011). Taj proces uključuje prenos metil

grupe od S-adenozin-L-metionina do citozina i adenina pomoću DNK metiltransferaze. Na ovaj način se dodaje metil grupa na peti ugljenikov atom citozina. Najčešće tehnike za detekciju metilacije DNK oslanjaju se na proces bisulfitne konverzije (Clark et al. 1994). Ovim tretmanom C se deaminuje u U, dok je 5-metil citozin (5mC) zaštićen od bisulfitom-posredovane deaminacije. U nizvodnim PCR reakcijama, U se umnožava kao timin (T) dok se 5mC umnožavaju kao C, čime je omogućeno razlikovanje nemetilovanih od metilovanih CG dinukleotida (Patterson et al. 2011). MSP je jednostavan, specifičan i senzitivnan metod za određivanje metilacionog statusa CpG bogatih regiona. Ova metoda omogućava istovremenu detekciju metilovanog i nemetilovanog produkta uz korišćenje iste matrice, a zasnovana je na PCR reakcijama u kojima se koriste oligonukleotidi koji razlikuju metilovane od nemetilovanih sekvenci bisulfitno konvertovane DNK (Herman et al. 1996). Za analizu metilacionog statusa promotora humanog gena *SOX14* analizirana su CpG1 i CpG3 ostrva u okviru promotora (Slika 38). Oligonukleotidi za umnožavanje ovih regiona su dizajnirani korišćenjem programa MethPrimer koji je prethodno opisan. Metilacija specifičan PCR produkt za CpG1 ostrvo je označeno kao MSP1, a metilacija specifičan PCR produkt za CpG3 ostrvo je označeno kao MSP2. Regioni koji obuhvataju CpG2 i CpG4 ostrvo nisu bili pogodni za umnožavanje zbog specifičnosti sekvence promotora gena *SOX14*. Za umnožavanje metilovane sekvence CpG1 ostrva korišćeni su oligonukleotidi M1F i M1R, a za umnožavanje nemetilovane sekvence CpG1 ostrva korišćeni su oligonukleotidi U1F i U1R. Za umnožavanje metilovane sekvence trećeg CpG3 ostrva korišćeni su oligonukleotidi M3F i M3R, a za umnožavanje nemetilovane sekvence CpG3 ostrva korišćeni su oligonukleotidi U3F i U3R. Sekvence korišćenih oligonukleotida prikazane su u Tabeli broj 5.

DNK izolovana iz HeLa, SiHa, Ca Ski i NT2/D1 ćelija je bisulfitno konvertovana pomoću kita EZ DNA Methylation-Direct™ Kit (Zymo Research Corporation, CA, USA). Ćelije su tripsinizovane i oprane dva puta 1xPBS-om. Izdvojeno je oko  $10^5$  ćelija za dalju konverziju uz protokol prema uputstvu proizvođača. Ukratko, ćelije su inkubirane sa digestionim puferom (eng. *M-Digestion*) i Proteinazom K na  $50^{\circ}\text{C}$  u trajanju od 20 minuta. Nakon 5-minutnog centrifugiranja na 10000 g supernatanti su odvojeni i pomešani sa CT reagensom (eng. *CT Conversion Reagent*), a zatim inkubirani na  $98^{\circ}\text{C}$  8 minuta a zatim na  $64^{\circ}\text{C}$  3.5 sata. Uzorak je zatim nanet na

IC kolonu (eng. *Zymo-Spin*) u koju je prethodno dodat pufer za vezivanje (eng. *M-Binding puffer*), a zatim centrifugiran na maksimalnoj brzini 30 sekundi. Usledilo je pranje puferom za pranje (eng. *M-Wash puffer*) a zatim inkubacija sa puferom za desulfonaciju (eng. *M-Desulphonationpuffer*) na sobnoj temperaturi u trajanju od 20 minuta. Kolona sa uzorkom je opet isprana puferom za pranje, a nakon toga je bisulfitno konvertovana DNK eluirana sa kolone puferom za eluciju (eng. *M-Elution puffer*). Bisulfitno konvertovana DNK je korišćena kao matrica za PCR umnožavanje KAPA 2G Fast HotStart Ready Mix (Kapa Biosystems, MA, USA) pri uslovima: 95°C u trajanju od 5 minuta, zatim 35 ciklusa koji uključuju denaturaciju na 95°C u trajanju od 30 sekundi, renaturaciju na 60°C u trajanju od 20 sekundi i elongaciju na 72°C u trajanju od 2 minuta, in a kraju finalna sinteza na 72°C u trajanju od 2 minuta. Dobijeni produkti su razdvojeni elektroforezom na 2% gelu od agaroze i vizuelizovani bojenjem etidijum bromidom.

### **3.2.27. Test proliferacije**

Test proliferacije je kvantitativna kolorimetrijska metoda koja se koristi za merenje vijabilnosti i proliferativnog kapaciteta ćelija. Ova metoda se zasniva na sposobnosti vijabilnih ćelija da redukuju žuti MTS (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolijum) u ljubičasti formazin. Ova reakcija se odvija samo u živim ćelijama u kojima su dehidrogenaze aktivne, pa je količina dobijenog formazina proporcijalna broju vijabilnih ćelija. Za ovaj esej je korišćen kit "Promega CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay" (Promega, USA). Sađeno je oko  $2 \times 10^3$  HeLa ćelija u svaki bunarić ploče sa 96 bunarića. Nakon zasejavanja ćelije su transfektovane praznim vektorom (mock), SOX14wt ili SOX14DN1 ekspresionim konstruktom. 24h nakon transfekcije medijum je zamenjen rastvorom MTS boje u svežem medijumu u razblaženju 1:10. Ćelije su inkubirane 1h na 37°C do razvijanja ljubičaste boje. Apsorbanca ovako dobijenog rastvora izmerena je na čitaču mikrotitar ploča (Tecan, Austria), na talasnoj dužini od 490nm.

### **3.2.28. Test zarastanja povrede (eng. *Wound scratch*)**

Ovaj test se koristi za određivanje migratornog potencijala ćelija *in vitro*. Konfluentne HeLa ćelije su tranzijentno transfektovane kontrolnim vektorom (pcDNA3.1) i plazmidnim konstruktima SOX14wt i SOX14DN1. Nakon 24 h, nastavkom je napravljena brazda koju su ćelije određenim tempom popunjavale. Migracija ćelija u nekoliko različitih polja je uslikana u početnom trenutku i nakon 5 dana, mikroskopom DM IL LED Inverted Microscope (Leica Microsystems). Popunjavanje prostora je analizirano softverom Leica Application Suite V4.3.0.

### **3.2.29. Test invazivnosti i migratornog potencijala (eng. *Transwell test*)**

Za praćenje migratornog potencijala ćelija korišćeni su inserti (Transwell polycarbonate membrane, Corning, NY, USA) za ćelijsku kulturu sa porama veličine 8.0  $\mu\text{m}$ , dok su za potrebe praćenja invazionog potencijala ćelija ovi inserti bili dodatno oblagani sa 50  $\mu\text{l}$  Matrigel (Basement Membrane Matrix-om, Corning, NY, USA) pri finalnoj koncentraciji od 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ . Za oba testa ćelije su zasejane u posude sa 24 bunarića i sutradan su tranzijentno transfektovane pcDNA3.1 vektorom (mock) ili SOX14wt ekspresionim konstruktom. Inserti su zatim stavljeni u posudama sa 24 bunarića, tako da u bunariću “nastaju” 2 komore. U donjoj komori je stavljen DMEM medijum sa 10% FBS, dok je u gornjoj komori zasejano oko  $10^5$  transfektovanih ćelija u DMEM medijumu bez FBS-a. Nakon inkubacije od 12h za migraciju ili 24h za invaziju, ćelije koje su migrirale u donju komoru su fiksirane i obojene rastvorom kristal violet (eng. *crystal violet*). 0.5% kristal vajolet boje je rastoreno u 1xPBS-u koji je sadržao 20% Metanol i 2% Paraformaldehid. Nakon bojenja, gornja površina je nežno brisana štapićem za uvo. Ćelije u porama ili na donjoj strani membrane su brojane pod fazno-kontrastnim mikroskopom DM IL LED Inverted Microscope (Leica Microsystems) (x200 uveličanje). Pet nasumično odabranih polja je prebrojano na svakoj membrani. Tri nezavisna eksperimenta su urađena u duplikatu.



### **3.2.30. Analiza faza ćelijskog ciklusa fluorescentnom protočnom citometrijom**

Protočnom citometrijom može se meriti količina DNK u ćelijama. Po dodatku fluorescentne boje u suspenziju permeabilizovanih ćelija dolazi do vezivanja ove boje sa DNK. Ćelije ugrađuju boju proporcionalno količini DNK. U protočnom citometru emitovani fluorescentni signal se detektuje i prevodi u električni puls sa amplitudom proporcionalnoj totalnoj emisiji fluorescencije iz jedne ćelije. Na ovaj način se omogućava praćenje ćelija u različitim fazama ćelijskog ciklusa.

HeLa ćelije su transfektovane pcDNA3.1 vektorom (mock), SOX14wt ili SOX14DN1 ekspresionim konstruktom, i 24h nakon transfekcije, ćelije su odvojene od podloge tripsinom, staložene centrifugiranjem i oprane dva puta u 1xPBS fiziološkom rastvoru. U odgovarajućoj plastičnoj tubi rastvoreno je oko  $10^6$  ćelija u 1 ml 1xPBS-a. Nakon vorteksovanja, ćelije su fiksirane u hladnom 80% etanolu. Ćelije su inkubirane 30 minuta na sobnoj temperaturi a zatim obojene DAPI bojom finalne koncentracije 0.01mg/ml. Ćelije su analizirane na protočnom citometru BD LSRFortessa<sup>TM</sup> aparatu (BD Biosciences, USA). Nakon toga distribucija ćelija po fazama ćelijskog ciklusa je analizirana FACSDiva i FCS Express softverom, Verzija 3.

### **3.2.31. Analiza ćelija u apoptozi metodom fluorescentne protočne citometrije**

Apoptoza je programirana ćelijska smrt u kojoj ćelija prolazi kroz strogo regulisan proces "umiranja". Odlikuje se kondenzovanjem hromatinskog materijala, pojavom vakuola u nukleusu i internukleozomalnom degradacijom. Apoptozu karakterišu i promene na nivou membrane kada fosfatidil serin koji se uobičajeno nalazi sa unutrašnje strane membrane postaje izložen sa spoljne strane ćelijske membrane. Upravo ova karakteristika je prepoznata kao dobar marker ranih i kasnih faza apoptoze kada se korišćenjem antitela Anexin V, koje specifično prepoznaje fosfatidil serin na površini membrane, može detektovati apoptoza. U ovom radu je za kvantifikaciju apoptotskih ćelija korišćena protočna citometrija. Kvantifikacija ćelija sa narušenom

membranom se zasniva na dvostrukom bojenju ćelija sa Annexin V-FITC i propidium jodidom (PI) (Vermes et al. 1995). Propidijum jodid je fluorescentna boja koja pasivno ulazi u ćelije sa narušenim integritetom membrane, što ga čini korisnim u pravljenju razlike između nekrotičnih, apoptotičnih i zdravih ćelija.

HeLa ćelije su transfektovane pcDNA3.1 vektorom (mock), SOX14wt ili SOX14DN1 ekspresionim konstruktom, i 24 h nakon transfekcije, ćelije su odvojene od podloge tripsinom, staložene centrifugiranjem i oprane dva puta u 1xPBS fiziološkom rastvoru. Nakon toga  $10^6$  ćelija je resuspendovano u  $1\times$  Annexin vezujućem puferu. Ćelijama je dodato 5  $\mu$ l Annexin V antitela (Annexin V, Alexa Fluor® 488, Invitrogen™) i 5  $\mu$ l propidium jodida (PI – Invitrogen). Nakon toga ćelije su promešane i inkubirane 10 minuta na sobnoj temperaturi u mraku i analizirane na protočnom citometru BD LSRFortessa™ aparatom (BD Biosciences, USA). Analiza apoptotskih ćelija je urađena FACSDiva and FCS Express softverom, Verzija 3.

### 3.2.32. Statistička analiza rezultata

Statistička obrada podataka urađena je uz pomoć statističkog paketa SPSS (<http://www-01.ibm.com/software/analytics/spss/>). Svi rezultati prikazani su kao srednja vrednost  $\pm$  srednja vrednost standardne greške (eng. *Standard Error Mean* – SEM). Statistička značajnost rezultata analizirana je Studentovim t testom. Dobijena vrednost koja je iznosila manje od 0.05 smatrana je statistički značajnom i obeležena je jednom zvezdicom (\*). Dobijena vrednost koja je iznosila manje od 0.01 smatrana je statistički značajnom i obeležena je sa dve zvezdice (\*\*). Dobijena vrednost koja je iznosila manje od 0.001 smatrana je statistički značajnom i obeležena je sa tri zvezdice (\*\*\*)

## **4. REZULTATI**

### **4.1. Analiza ekspresije i uloge gena *SOX14/Sox14* tokom neuralne diferencijacije *in vitro***

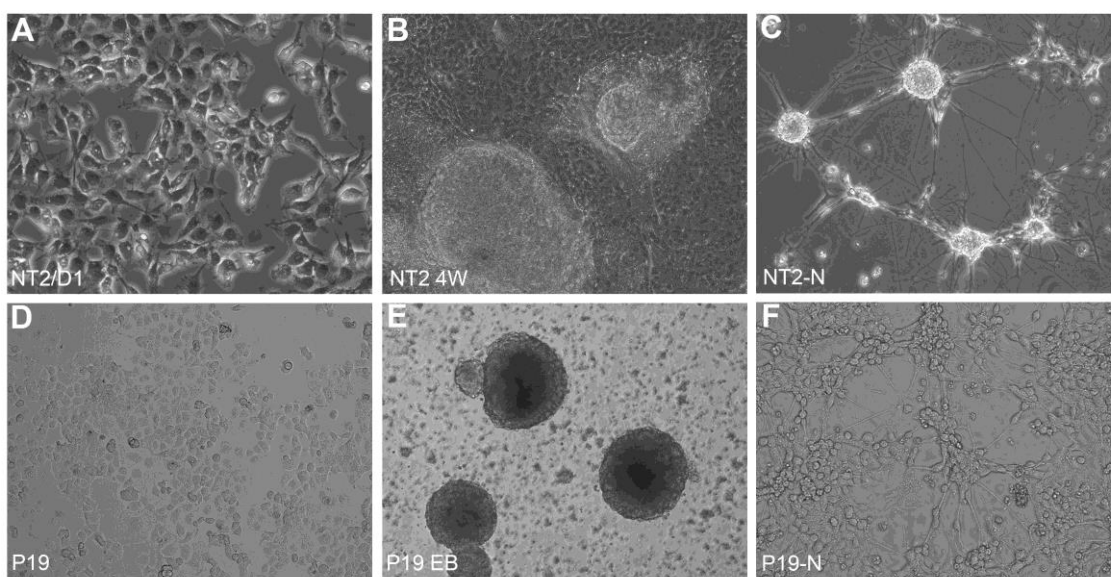
#### **4.1.1. Analiza procesa neuralne diferencijacija NT2/D1 i P19 ćelijskih linija *in vitro***

U cilju ispitivanja ekspresije gena *SOX14/Sox14* tokom procesa neuralne diferencijacije *in vitro* korišćene su embrionalne teratokarcinomske ćelijske linije NT2/D1 (poreklom od čoveka) i P19 (poreklom od miša). Obe ćelijske linije imaju osobine pluripotentnih matičnih ćelija i u prisustvu retinoične kiseline ćelije se diferenciraju u zrele neurone, na način detaljno opisan u poglavlju Materijal i metode. Na slikama 20 i 21 u poglavlju Materijal i metode dat je shematski prikaz procesa neuralne diferencijacije *in vitro*. Sposobnost neuralne diferencijacije pluripotentnih NT2/D1 i P19 ćelija do neurona, praćena je analizom njihovih morfoloških karakteristika i ekspresije molekularnih markera karakterističnih za različite faze neuralne diferencijacije.

Nediferencirane pluripotentne NT2/D1 i P19 ćelije morfološki podsećaju na epitelijalne ćelije (Slika 22A i 22D). Tokom četiri nedelje tretmana retinoičnom kiselinom, NT2/D1 ćelije formiraju gustu višeslojnu strukturu sa fokusima ćelija koji se uočavaju na površini (Slika 22B). Kako bi se dobila prečišćena populacija neurona, ćelije su mehanički odvajane od podloge zbog smanjene adhezivne moći neurona, a zatim sađene u odgovarajuće posude obložene matrigelom za poboljšanu adheziju. Mehaničkim odvajanjem iz populacije diferenciranih ćelija izdvojeni su terminalno diferencirani neuroni (NT2-N) koji se pod fazno kontrastnim mikroskopom karakterišu malim, svetlim, okruglim telom, najčešće sa parom izduženih aksona (Slika 22C). Prilikom prečišćavanja izdvojene su i krupnije ćelije epitelijalnog oblika koje formiraju podlogu na kojoj rastu izdvojeni neuroni (Slika 22C).

Diferencijacija P19 ćelija traje kraće u odnosu na diferencijaciju NT2/D1 ćelija. Tokom 5 dana tretmana retinoičnom kiselinom formiraju se loptaste strukture u

suspenziji koje se nazivaju embrioidna tela (P19 EB) (Slika 22E). U ovoj fazi diferencijacije, embrioidna tela sačinjena su od mešane populacije ćelija u kojoj se između ostalog nalaze i neuroni. Dobijena embrioidna tela su potom sađena u posude obložene matrigelom, bez prisustva retinoične kiseline. Nakon nekoliko dana formirani su fokusi iz kojih je uočena migracija zrelih neurona (P19-N) (Slika 22F). Kao i kod NT2/D1 ćelija, tokom diferencijacije mišijih P19 ćelija nastaju i krupnije ćelije epitelijalnog oblika (Slika 22F).

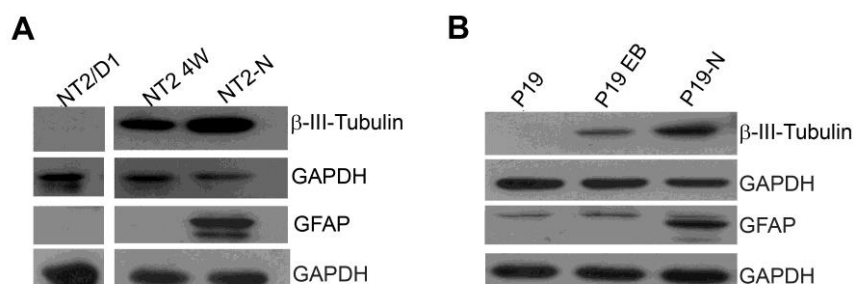


**Slika 22: Mikroskopski prikaz morfologije nediferenciranih i diferenciranih NT2/D1 i P19 ćelija.** NT2/D1 i P19 ćelije su indukovane retinoičnom kiselinom a promena morfologije tokom procesa neuralne diferencijacije *in vitro* praćena je pod fazno kontrastnim mikroskopom. **A** – Nediferencirane NT2/D1 ćelije. **B** – NT2/D1 ćelije u završnoj fazi diferencijacije (NT2 4W) (višeslojna kultura sa fokusima ćelija na površini). **C** – Populacija diferenciranih NT2/D1 neurona međusobno povezanih u fokuse, dobijena nakon mehaničkog prečišćavanja (NT2-N). **D** – Nediferencirane P19 ćelije. **E** – Embrioidna tela (P19 EB) (završna faza diferencijacije P19 ćelija). **F** – Populacija međusobno povezanih P19 neurona (P19-N).

Literaturni podaci ukazuju da u procesu diferencijacije NT2/D1 i P19 ćelijskih linija u prisustvu retinoične kiseline nastaju neuroni i astrociti (Belliveau et al. 1997; Lee and Andrews 1986; Sandhu et al. 2002). U cilju analize uspešnosti neuralne diferencijacije NT2/D1 i P19 ćelija u neurone i astrocite praćena je ekspresija

molekularnog  $\beta$ -III-Tubulin markera specifičnog za postmitotičke neurone i GFAP molekularnog markera specifičnog za astrocite. Western blot analiza ekspresije  $\beta$ -III-Tubulina pokazala je da ovaj protein nije eksprimiran u neindukovanim pluripotentnim NT2/D1 i P19 ćelijama (Slika 22-A i B). Nakon indukcije retinoičnim kiselinom detektovana je ekspresija ovog markera, što ukazuje na prisustvo postmitotičkih neurona u dobijenoj populaciji ćelija (Slika 22-A i B). Nakon prečišćavanja neurona detektovan je porast ekspresije  $\beta$ -III-Tubulina u odnosu na NT2 4W, što ukazuje na efikasno izdvajanje populacije zrelih neurona iz ukupne populacije NT2 4W ćelija (Slika 22-A i B). Western blot analiza ekspresije markera astrocita (GFAP) pokazala je da se ovaj protein eksprimira samo u populaciji neurona NT2-N i P19-N ćelija (Slika 22-A i B).

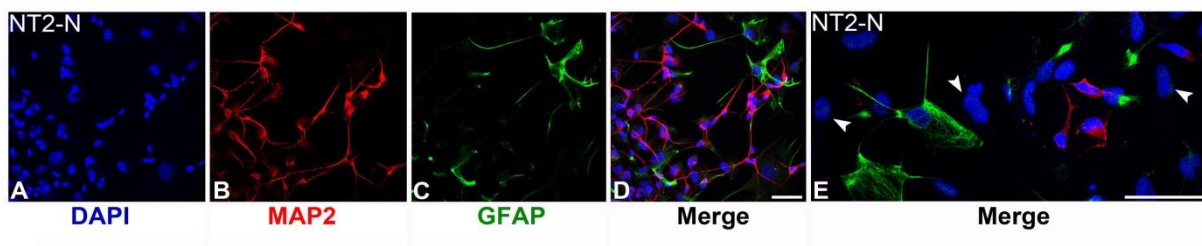
Analiza ekspresije markera diferenciranih neurona i astrocita pokazala je da su se pluripotente NT2/D1 i P19 ćelije nakon indukcije retinoičnom kiselinom uspešno diferencirale u neurone i astrocite.



**Slika 22: Western blot analiza ekspresije molekularnih markera karakterističnih za neurone i astrocite tokom procesa neuralne diferencijacije NT2/D1 i P19 ćelija *in vitro*.** **A** – Ćelijski proteini izolovani iz nediferenciranih NT2/D1, iz ćelija 4 nedelja nakon tretmana retinoičnom kiselinom (NT2 4W) i prečišćenih neurona (NT2-N). Urađen je Western blot antitelima specifičnim za  $\beta$ -III-Tubulin i GFAP. Kao kontrola ujednačenosti nanetih uzoraka korišćen je GAPDH. Western blot je urađen na tri nezavisne diferencijacije i prikazana je reprezentativna slika. **B** – Ćelijski proteini izolovani iz nediferenciranih P19 ćelija, embrioidnih tela (P19 EB) i neurona (P19-N). Urađen je Western blot antitelima specifičnim za  $\beta$ -III-Tubulin i GFAP. Kao kontrola količine nanetih uzoraka korišćen je GAPDH. Western blot je urađen za tri nezavisne diferencijacije i prikazana je reprezentativna slika.

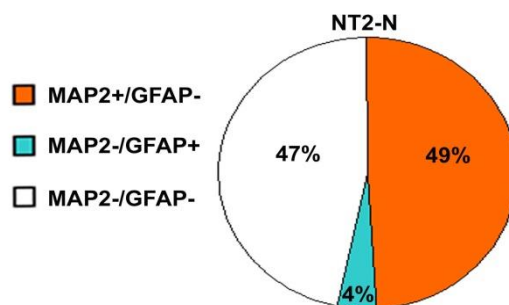
U cilju identifikacije ćelijskih tipova u okviru NT2-N i P19-N populacija, urađena je imunocitohemijska analiza, korišćenjem antitela specifičnih za MAP2 (marker diferenciranih neurona) i GFAP (marker diferenciranih astrocita).

Dobijeni rezultati su pokazali da se NT2-N populacija sastoji od najmanje tri tipa ćelija: ćelije koje eksprimiraju MAP2, a ne eksprimiraju GFAP (MAP2+/GFAP-), ćelije koje ne eksprimiraju MAP2 a eksprimiraju GFAP (MAP2-/GFAP+) i ćelije koje ne eksprimiraju ni MAP2 ni GFAP (MAP2-/GFAP-) (Slika 23). MAP2+/GFAP- ćelije predstavljaju terminalno diferencirane neurone, MAP2-/GFAP+ ćelije predstavljaju astrocite, dok MAP2-/GFAP- ćelije predstavljaju ćelije koje ne eksprimiraju neuralne markere i koje karakteriše epitelijalna morfologija (vrhovi strelica na slici 23E).



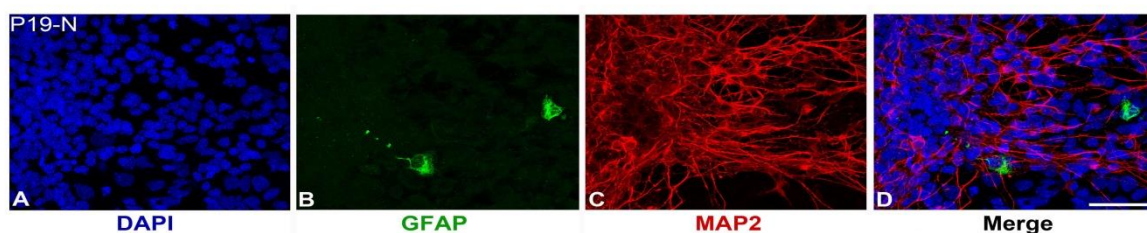
**Slika 23: Analiza populacije diferenciranih neurona (NT2-N) imunocitohemijskim bojenjem.** Preparati NT2-N ćelija podvrgnuti su imunocitohemijskom bojenju antitelima specifičnim za MAP2 (crveni signal - B, D i E) i GFAP (zeleni signal - C, D i E). Pored ćelija koje su pozitivne na MAP2 ili GFAP, prisutne su i ćelije koje su negativne za oba markera (vrh strelice - E). Jedra su bojena DAPI bojom (A, D i E); za vizuelizaciju je korišćen konfokalni mikroskop, razmernik 50  $\mu$ m.

Statistička obrada podataka dobijenih brojanjem ćelija koje eksprimiraju ili ne eksprimiraju MAP2 i/ili GFAP je pokazala da skoro polovinu populacije NT2-N (49%) čine terminalno diferencirani neuroni koji eksprimiraju MAP2 (MAP2+/GFAP-), 4% ćelija predstavlja astrocite koji eksprimiraju GFAP (MAP2-/GFAP+), dok je preostalih 47% ćelija negativno na oba markera i predstavlja ćelije koje ne eksprimiraju neuralne markere (MAP2-/GFAP-) (Slika 24).



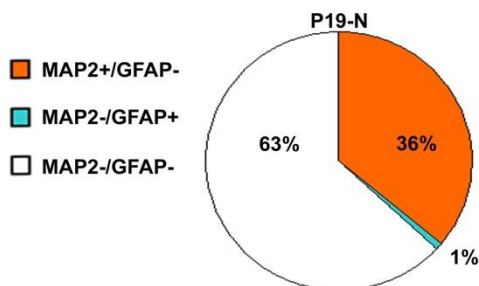
**Slika 24:** Shematski prikaz statistički obrađenih rezultata dobijenih brojanjem ćelija koje eksprimiraju neuralni marker MAP2 ili marker astrocита GFAP. Analiza je urađena brojanjem ćelija koje eksprimiraju ili ne eksprimiraju MAP2 i/ili GFAP u odnosu na ukupan broj od 200 ćelija. Ćelije su detektovane DAPI bojom na fluorescentnom mikroskopu.

Imunocitohemijska analiza P19-N populacije diferenciranih ćelija navedenim markerima (MAP2 i GFAP) takođe je pokazala prisustvo najmanje tri različita tipa ćelija: ćelije koje eksprimiraju MAP2, a ne eksprimiraju GFAP (MAP2+/GFAP-), ćelije koje ne eksprimiraju MAP2 a eksprimiraju GFAP (MAP2-/GFAP+) i ćelije koje ne eksprimiraju ni MAP2 ni GFAP (MAP2-/GFAP-) (Slika 25). U okviru ove populacije 36% ćelija predstavlja neurone koji eksprimiraju MAP2 (MAP2+/GFAP-), 1% ćelija čine astrociti koji eksprimiraju GFAP (MAP2-/GFAP+), dok je 63% ćelija negativno na oba markera i predstavlja ćelije koje ne eksprimiraju neuralne markere (MAP2-/GFAP-) (Slika 25).



**Slika 25:** Analiza populacije diferenciranih neurona (P19-N) imunocitohemijskim bojenjem. Preparati P19-N ćelija podvrgnuti su imunocitohemijskom bojenju antitelima specifičnim na MAP2 (crveni signal – C i D) i GFAP (zeleni signal – B i D). Jedra su obojena DAPI bojom (plava boja, A i D); za vizuelizaciju je korišćen konfokalni mikroskop, razmernik 50 µm.

U okviru P19-N populacije 36% ćelija predstavlja neurone koji ekspimiraju MAP2 (MAP2+/GFAP-), 1% ćelija su astrociti koji ekspimiraju GFAP (MAP2-/GFAP+), dok je 63% ćelija negativno na oba markera i predstavlja ćelije koje ne ekspimiraju neuralne markere (MAP2-/GFAP-) (Slika 25).



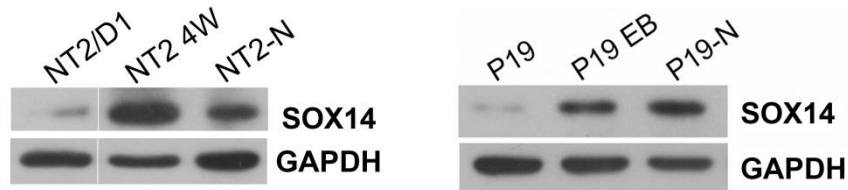
**Slika 26:** Shematski prikaz statistički obrađenih rezultata dobijenih brojanjem ćelija koje ekspimiraju neuralni marker MAP2 ili marker astrocita GFAP. Analiza je urađena brojanjem ćelija koje ekspimiraju ili ne ekspimiraju MAP2 i/ili GFAP u odnosu na ukupan broj od 200 ćelija. Ćelije su detektovane DAPI bojom na fluorescentnom mikroskopu.

#### 4.1.2. Analiza ekspresije SOX14 proteina tokom neuralne diferencijacije NT2/D1 i P19 ćelija *in vitro*

S obzirom da se gen *SOX14* ekspimirira u određenim progenitorskim ćelijama kao i u terminalno diferenciranim neuronima kod miša i pileta (Hargrave et al. 2000b; Sellers et al. 2014), urađena je analiza ekspresije gena *SOX14* tokom neuralne diferencijacije NT2/D1 i P19 ćelija *in vitro*. Analiza ekspresije gena *SOX14* sprovedena je u pluripotentnim NT2/D1 i P19 ćelijama, u NT2 4W i P19 EB, kao i u terminalno diferenciranim neuronima (NT2-N i P19-N) metodom Western blot-a.

Dobijeni rezultati su pokazali da se SOX14 ekspimirira u pluripotentnim NT2/D1 i P19 ćelijama i da ekspresija SOX14 proteina raste tokom neuralne diferencijacije NT2/D1 i P19 ćelija *in vitro* (Slika 27). U NT2/D1 ćelijama SOX14 ima najviši nivo ekspresije u NT2 4W, dok se u populaciji prečišćenih neurona (NT2-N) njegova ekspresija smanjuje u odnosu na NT2 4W, ali i dalje ostaje povećana u odnosu na nediferencirane pluripotentne ćelije (Slika 27). Za razliku od NT2/D1 ćelija, u P19 ćelijama ekspresija SOX14 proteina je najviša u populaciji P19 neurona (P19-N) (Slika 27).





**Slika 27: Western blot analiza ekspresije SOX14 tokom neuralne diferencijacije NT2/D1 i P19 ćelija *in vitro*.** Na ukupnim ćelijskim proteinima izolovanim iz NT2/D1 i P19 ćelija tokom neuralne diferencijacije, urađen je Western blot antitelima specifičnim za SOX14. Kao kontrola ujednačenosti nanetih uzoraka korišćen je GAPDH. Analiza je urađena na tri nezavisne diferencijacije i prikazana je reprezentativna slika. NT2/D1 – pluripotentne nediferencirane NT2/D1 ćelije. NT2 4W – završna faza indukcije NT2/D1 ćelija. NT2-N - prečišćena populacija neurona NT2/D1 ćelija. P19 – pluripotentne nediferencirane P19 ćelije. P19 EB - završna faza diferencijacije P19 ćelija. P19-N – populacija P19 neurona.

Dobijeni rezultati su pokazali da se SOX14 eksprimira u zreлим neuronima, što je u skladu sa literaturnim podacima. Dobijeni rezultati su po prvi put pokazali da je gen *SOX14/Sox14* ekspimiran i u pluripotentnim ćelijama.

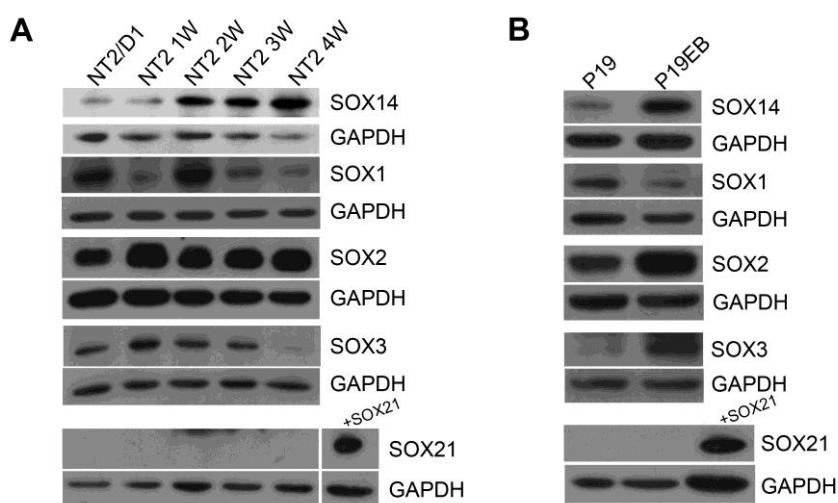
#### **4.1.3. Usporedna analiza ekspresije gena *SOXB/SoxB* tokom neuralne diferencijacije NT2/D1 i P19 ćelija *in vitro***

*In vivo* studije na piletu pokazale su da proneuralni proteini povećavaju nivo ekspresije gena *Sox21*, koji ima inhibitorno dejstvo na aktivnost gena *Sox3*, što za posledicu ima izlazak ćelije iz proliferativnog stanja i ulazak u proces neuralne diferencijacije (Sandberg et al. 2005). Geni *SoxB1* i *Sox21* potencijalno regulišu isti set ciljnih gena, pri čemu geni *SoxB1* deluju kao transkripcioni aktivatori, a *Sox21* kao transkripcioni represor (Sandberg et al. 2005). Smatra se da gubitak ekspresije gena *Sox21* dovodi do predominantne ekspresije gena *SoxB1* čime se sprečava embrionalna neurogeneza (Karnavas et al. 2013). Međusobni nivo ekspresije ovih gena i njihov fini balans tokom razvića CNS-a odlučuje da li će ćelija ostati neuralni progenitor ili će započeti proces neurogeneze. Slično genu *Sox21*, pretpostavlja se da proneuralni proteini mogu da aktiviraju i gen *Sox14* i da aktivacija ovog gena interferira sa genima *SoxB1* i indukuje neurogenezu (Sandberg et al. 2005).

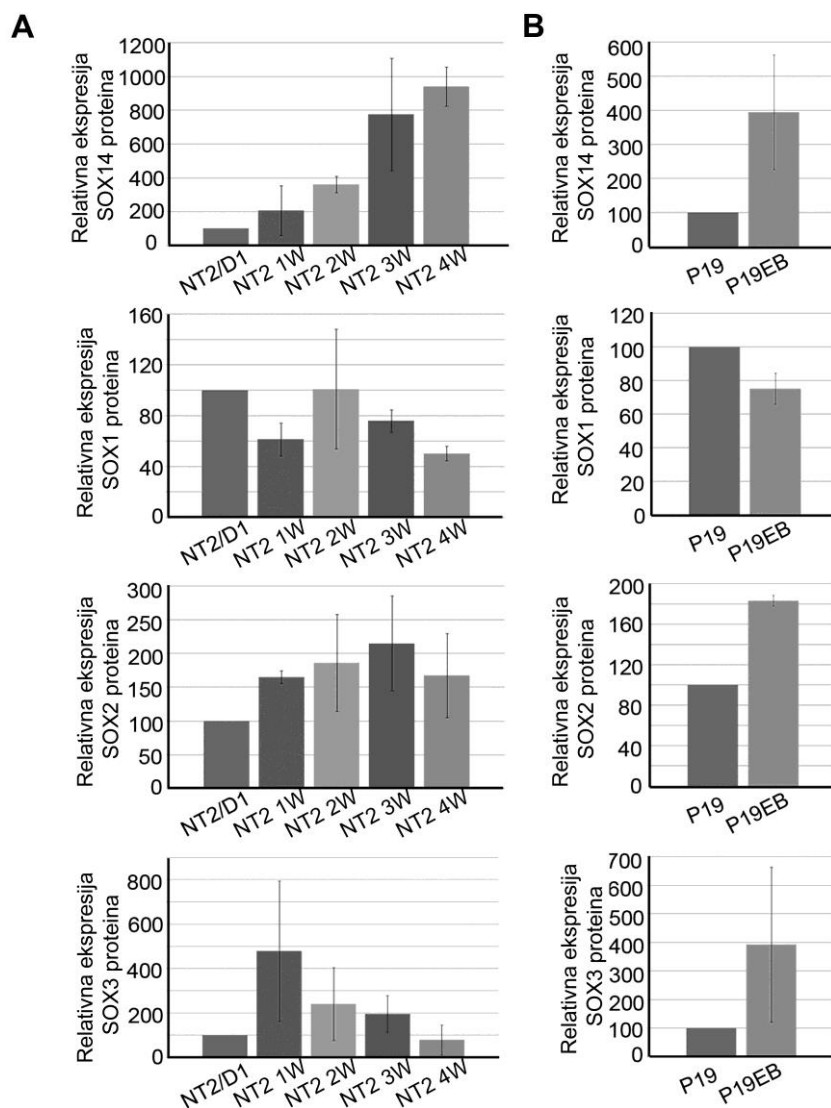
Kako bi se ispitalo da li SOX14 potencijalno ima ulogu u određivanju sudbine ćelije tokom neuralne diferencijacije *in vitro*, urađena je uporedna analiza ekspresije gena *SOXB/SoxB* tokom neuralne diferencijacije NT2/D1 i P19 ćelija *in vitro*. Western blot metodom analizirana je ekspresija svih članova SOXB grupe u precizno definisanim vremenskim intervalima tokom procesa neuralne diferencijacije tokom koje se ćelije diferenciraju u zrele neurone. Odabrani vremenski intervali uključili su pluripotentne NT2/D1 ćelije, kao i prvu (NT2 1W), drugu (NT2 2W), treću (NT2 3W) i četvrtu (NT2 4W) nedelju indukcije retinoičnom kiselinom. S obzirom da je protokol za neuralnu diferencijaciju P19 ćelija trajao kraće u odnosu na neuralnu diferencijaciju NT2/D1 ćelija, pored pluripotentnih P19 ćelija analiziran je još jedan vremenski period tokom diferencijacije - P19 EB.

Ekspresija SOXB1 proteina je varirala i imala fluktuirajući profil ekspresije tokom neuralne diferencijacije NT2/D1 ćelija (Slike 28A i 29A) dok je ekspresija SOX14 proteina postepeno rasla tokom neuralne diferencijacije NT2/D1 ćelija, sa najvišim nivoom ekspresije u poslednjoj nedelji tretmana retinoičnom kiselinom (NT2 4W) (Slike 28A i 29A). Sa druge strane, odgovarajućim antitelom na SOX21 nije detektovana ekspresija ovog proteina ni u jednoj od navedenih faza neuralne diferencijacije NT2/D1 ćelija (Slika 28A).

Tokom neuralne diferencijacije P19 ćelija uočen je rast ekspresije SOX14, SOX2 i SOX3 proteina, smanjena ekspresija SOX1 proteina, dok ekspresija SOX21 proteina nije detektovana (Slike 28B i 29B).



**Slika 28: Analiza ekspresije članova SOXB grupe tokom neuralne diferencijacije NT2/D1 i P19 ćelija *in vitro*.** **A** – Western blot analiza ekspresije SOX1, SOX2, SOX3, SOX14 i SOX21 na ukupnim ćelijskim proteinima izolovanim iz pluripotentnih NT2/D1, NT2 1W, NT2 2W, NT2 3W i NT2 4W. Kao kontrola ujednačenosti nanetih uzoraka korišćen je GAPDH. Prikazana je reprezentativna slika Western blot-a. **B** – Western blot analiza ekspresije SOX1, SOX2, SOX3, SOX14 i SOX21 na ukupnim ćelijskim proteinima izolovanim iz pluripotentnih P19 ćelija i iz P19 EB. Kao kontrola ujednačenosti nanetih uzoraka korišćen je GAPDH. Prikazana je reprezentativna slika Western blot-a.



**Slika 29: Analiza ekspresije članova SOXB grupe tokom neuralne diferencijacije NT2/D1 i P19 ćelija *in vitro*.** **A**- Kvantifikacija ekspresije SOX1, SOX2, SOX3 i SOX14 proteina tokom neuralne diferencijacije NT2/D1 ćelija *in vitro*. Rezultati dva nezavisna Western blot eksperimenta kvantifikovani su ImageJ softverom i predstavljeni grafički. Vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost  $\pm$  SD (standardna devijacija). **B**- Kvantifikacija ekspresije SOX1, SOX2, SOX3 i SOX14 proteina tokom neuralne diferencijacije P19 ćelija *in vitro*. Rezultati dva nezavisna Western blot eksperimenta su

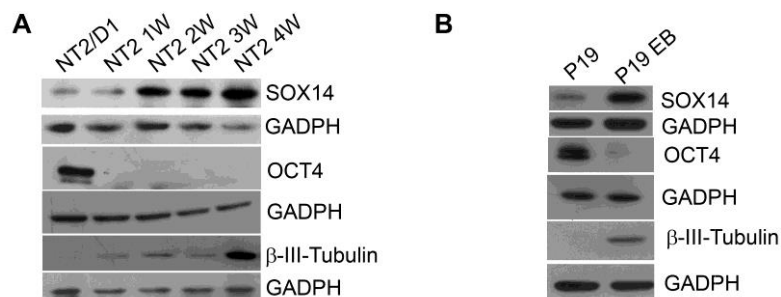
kvantifikovana ImageJ softverom i predstavljeni grafički. Vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost  $\pm$  SD.

Ovi rezultati pokazuju da se SOX14 i SOXB1 proteini ekspimiraju u pluripotentnim NT2/D1 i P19 ćelijama kao i tokom neuralne diferencijacije ovih ćelija, dok ekspresija SOX21 proteina nije detektovana ni u jednoj od ispitanih faza diferencijacije NT2/D1 i P19 ćelija. Na osnovu promena u profile ekspresije može se pretpostaviti da tokom procesa neuralne diferencijacije NT2/D1 i P19 ćelija *in vitro* SOX14, zajedno sa SOXB1 proteinima, potencijalno ima ulogu tokom neuralne diferencijacije ovih ćelija.

#### **4.1.4. Uporedna analiza ekspresije SOX14, OCT4 i $\beta$ -III-Tubulin proteina tokom neuralne diferencijacije NT2/D1 i P19 ćelija *in vitro***

SOX14 je u literaturi prepoznat kao marker neurona (Butts et al. 2017; Delogu et al. 2012; Jager et al. 2016). Prethodni rezultati u ovom radu su pokazali da se SOX14 ne ekspimiraju samo u neuronima, već i u ranijim fazama tokom neuralne diferencijacije NT2/D1 i P19 ćelija *in vitro*. Zbog toga, naredni korak u istraživanju bio je da se pored analize ekspresije SOX14 proteina tokom neuralne diferencijacije NT2/D1 i P19 ćelija *in vitro*, analizira i ekspresija markera pluripotentnosti OCT4 i markera postmitotičkih neurona  $\beta$ -III-Tubulina.

Rezultati Western blot-a su pokazali da nediferencirane NT2/D1 i P19 ćelije ekspimiraju OCT4 (Slika 30-A i B), što je i očekivano s obzirom da su obe ćelijske linije u literaturi okarakterisane kao pluripotentne. Tokom neuralne diferencijacije NT2/D1 i P19 ćelija dolazi do potpunog utišavanja ekspresije markera pluripotentnosti OCT4 (Slika 30-A i B). Za razliku od ovog markera, ekspresija  $\beta$ -III-Tubulina, neuralnog markera, raste tokom neuralne diferencijacije i najviša je u terminalnoj fazi diferencijacije, odnosno u NT2 4W i P19 EB (Slika 30-A i B). Na osnovu analize profila ekspresije pomenutih markera, može se zaključiti da profil ekspresije SOX14 tokom neuralne diferencijacije NT2/D1 i P19 ćelija prati profil ekspresije neuralnog markera  $\beta$ -III-Tubulina (Slika 30-A i B). Iako se SOX14 ekspimiraju u pluripotentnim ćelijama, profil ekspresije ovog proteina podseća na profil ekspresije markera postmitotičkih neurona tokom procesa neuralne diferencijacije *in vitro*.



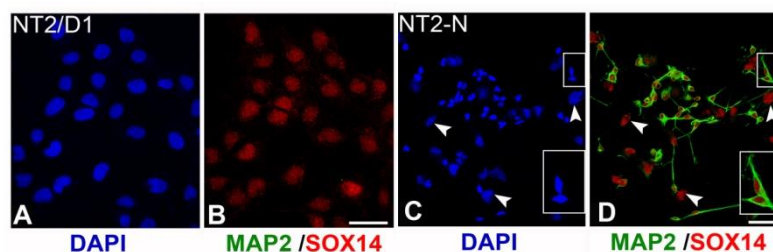
**Slika 30: Analiza ekspresije SOX14 proteina, markera pluripotencnosti OCT4 i neuralnog markera  $\beta$ -III-Tubulin-a tokom neuralne diferencijacije NT2/D1 i P19 ćelija.** **A** – Analiza ekspresije metodom Western blot-a antitelima specifičnim za SOX14, OCT4 i  $\beta$ -III-Tubulin na ukupnim ćelijskim proteinima izolovanim iz nediferenciranih NT2/D1, NT2 1W, NT2 2W, NT23W i NT2 4W. Kao kontrola ujednačenosti nanetih uzoraka korišćen je GAPDH. **B** – Analiza ekspresije metodom Western blot-a antitelima specifičnim za SOX14, OCT4 i  $\beta$ -III-Tubulin na ukupnim ćelijskim proteinima izolovanim iz nediferenciranih P19 ćelija i iz P19EB. Kao kontrola ujednačenosti nanetih uzoraka korišćen je GAPDH.

#### 4.1.5. Analiza ekspresije proteina SOX14 metodom imunocitohemije u različitim tipovima diferenciranih NT2/D1 i P19 ćelija

S obzirom da je imunocitohemijsko bojenje antitelima specifičnim za MAP2 i GFAP proteine pokazalo da se, pored neurona, diferencijacijom NT2/D1 i P19 ćelija dobijaju i astrociti, kao i krupne ćelije epiteloidne morfologije, postavilo se pitanje u kojim od navedenih tipova ćelija je eksprimiran SOX14, koji je u literaturi okarakterisan kao marker neurona (Butts et al. 2017; Delogu et al. 2012; Jager et al. 2016). Kako bi se dobio odgovor na ovo pitanje, urađeno je dvostruko imunocitohemijsko bojenje antitelom specifičnim za protein SOX14 i antitelom specifičnim za terminalno diferencirane neurone – MAP2 u nediferenciranim NT2/D1 i P19 ćelijama i u neuronalnim populacijama ovih ćelija (NT2-N i P19-N) (Slike 31 i 32). Rezultati ove analize su pokazali rast ekspresije SOX14 proteina tokom neuralne diferencijacije NT2/D1 i P19 ćelija *in vitro* (Slike 31 i 32), što je u skladu sa rezultatima dobijenim Western blot metodom (Slika 27).

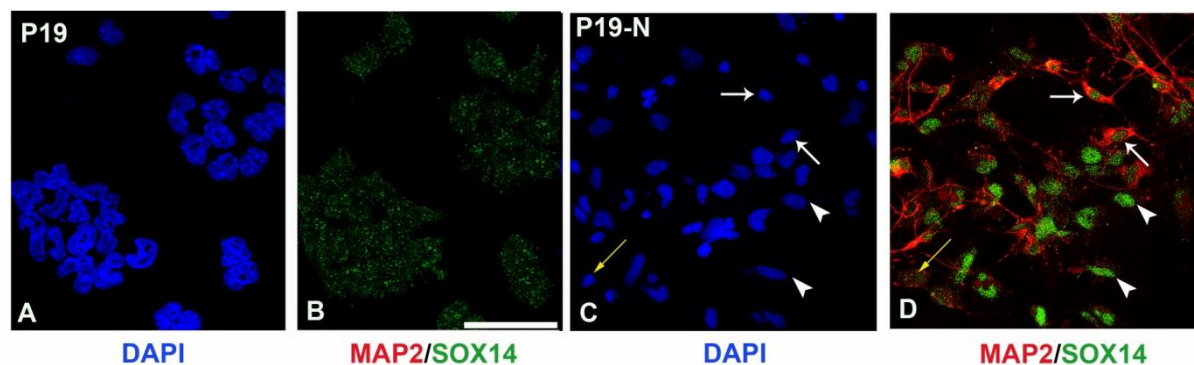
Imunocitohemijsko bojenje antitelom specifičnim za SOX14 je pokazalo različitu ekspresiju ovog proteina u NT2/D1 ćelijama (Slika 31-A i B). U NT2-N ćelijama

detektovana je ekspresija SOX14 proteina kako u neuronima koji ekspimiraju MAP2 (uokvireni deo Slike 27-C i D), tako i u ćelijama koje ne ekspimiraju MAP2 (strelice na Slici 27-C i D).



**Slika 31: Analiza ekspresije SOX14 proteina metodom imunocitohemije tokom neuralne diferencijacije NT2/D1 ćelija *in vitro*.** Imunocitohemijsko bojenje urađeno je antitelima specifičnim na MAP2 protein (zeleni signal - B i D) i SOX14 protein (crveni signal - B i F). Prikazana je ekspresija SOX14 u neuronima koji ekspimiraju MAP2 (uokvireni deo - C i D), kao i u ćelijama koje se ne boje antitelima specifičnim za MAP2 (vrh strelice - C i D). Jedra su obojena DAPI bojom (A i C). Razmernik 50  $\mu$ M.

Na nivou pojedinačnih P19 ćelija metodom imunocitohemije primećen je nizak nivo ekspresije SOX14 proteina (Slika 32-A i B). U P19-N ćelijama detektovana je ekspresija SOX14 proteina u neuronima koji ekspimiraju MAP2 (bele strelice na Slici 32-C i D) kao i u ćelijama epitelijalne morfoligije koje su imunonegativne na MAP2 (vrh strelice na Slici 32-C i D). Zanimljivo je istaći da je nivo ekspresije SOX14 proteina niži u terminalno diferenciranim neuronima u odnosu na krupne ćelije koje ne ekspimiraju neuralne markere (uporediti ćelije obeležene belom strelicom i ćelije obeležene vrhom strelice (Slika 32-C i D). Ova analiza je pokazala i da se u P19-N populaciji primećuju neuroni koji ekspimiraju MAP2, a ne ekspimiraju SOX14 (žuta strelica na Slici 32-C i D).

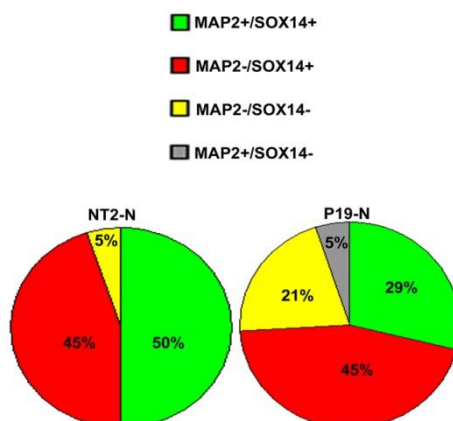


**Slika 32: Analiza ekspresije SOX14 proteina metodom imunocitohemije tokom neuralne diferencijacije P19 ćelija *in vitro*.** Imunocitohemijsko bojenje urađeno je antitelima specifičnim na SOX14 (zeleni signal - B i D) i MAP2 (crveni signal - B, D). U P19-N populaciji detektovani su neuroni koji ekspiriraju MAP2 i SOX14 (strelice - C i D), kao i ćelije koje ne ekspiriraju neuralne markere a ekspiriraju SOX14 (vrh strelice - C i D). Jedra su bojena DAPI bojom (A i C), razmernik 50  $\mu$ M od A do B i 20 $\mu$ M na C i D.

Na osnovu dobijenih rezultata, pokazano je da se populacija diferenciranih NT2/D1 ćelija (NT2-N) sastoji od najmanje tri različite populacije ćelija: neuroni koji ekspiriraju SOX14 (MAP2+/SOX14+), ćelije koje ne ekspiriraju neuralne markere i SOX14 (MAP2-/SOX14-) i ćelije koje ne ekspiriraju neuralne markere a ekspiriraju SOX14 (MAP2-/SOX14+). Na osnovu statističke analize rezultata dobijenih brojenjem ćelija koje ekspiriraju i/ili ne ekspiriraju SOX14 i MAP2, može se zaključiti da polovina NT2-N populacije (50%) predstavlja zrele neurone koji ekspiriraju SOX14 (MAP2+/SOX14+), dok 45% NT2-N ćelija čine krupne ćelije koje ne ekspiriraju neuralne markere a ekspiriraju SOX14 (MAP2-/SOX14+) (Slika 33). Samo mali broj ćelija, odnosno 5%, kod NT2-N nije ekspiriralo ni SOX14 ni MAP2 (Slika 33).

Za razliku od NT2-N populacije, analiza P19-N populacije metodom imunocitohemije antitelima specifičnim za SOX14 i MAP2 pokazala je prisustvo najmanje četiri različite populacije: neuroni koji ekspiriraju SOX14 (MAP2+/SOX14+), ćelije koje ne ekspiriraju neuralne markere i SOX14 (MAP2-/SOX14-), krupne ćelije koje ne ekspiriraju neuralne markere a ekspiriraju SOX14 (MAP2-/SOX14+) i neuroni koji ne ekspiriraju (MAP2+/SOX14-) (Slika 33). U populaciji P19-N, 29% neurona je ekspiriralo SOX14, dok je 45% ćelija koje ne ekspiriraju neuralne markere ekspiriralo SOX14 (Slika 33). Iako su svi dobijeni

rezultati ukazivali da postoji sličnost u ekspresiji SOX14 tokom neuralne diferencijacije *in vitro* kod čoveka i miša, detaljna analiza je pokazala da postoji razlika, odnosno da svi dobijeni NT2/D1 neuroni ekspresiraju SOX14, dok u P19-N populaciji postoji 5% neurona koji ne ekspresiraju SOX14 (Slika 33).



**Slika 33:** Shematski prikaz statistički obrađenih rezultata dobijenih brojanjem ćelija nakon imunocitohemijskog bojenja antitelima specifičnim za MAP2 i SOX14 populacija NT2-N i P19-N. Analiza je urađena brojanjem ćelija koje ekspresiraju ili ne ekspresiraju MAP2 i/ili SOX14 u odnosu na ukupan broj od 200 ćelija. Ćelije su detektovane DAPI bojom na fluorescentnom mikroskopu.

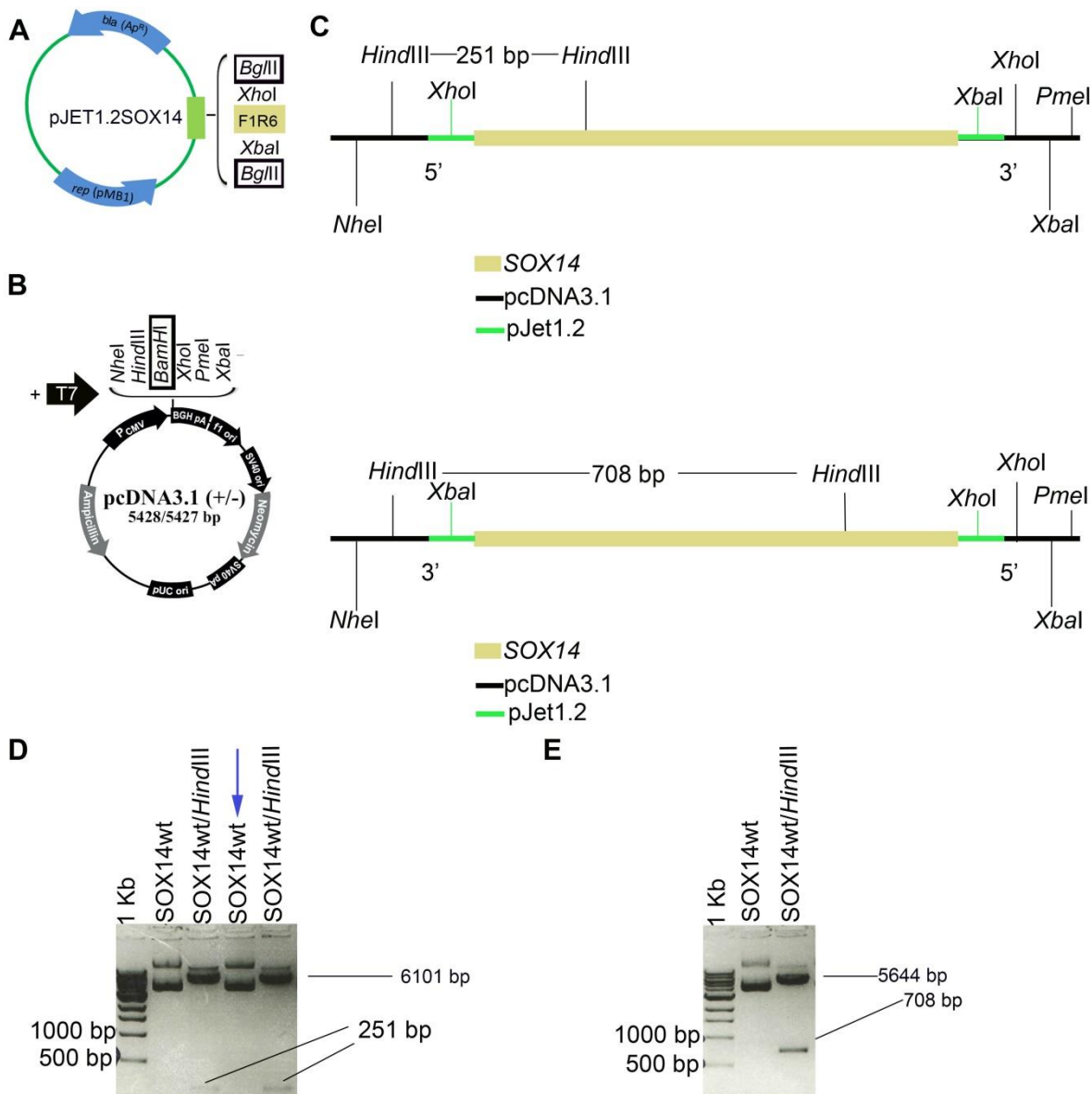
#### 4.1.6. Generisanje SOX14<sup>wt</sup> ekspresionog konstrukta

U cilju daljeg ispitivanja uloge gena *SOX14* u procesu neuralne diferencijacije *in vitro* konstruisan je SOX14 ekspresioni konstrukt.

Strategija kloniranja gena *SOX14* u pcDNA3.1 ekspresioni vektor (Slika 34) obuhvatala je konstruisanje dva tipa konstrukta. Metodom PCR-a amplifikovan je kodirajući region humanog gena *SOX14* dužine 872 bp korišćenjem oligonukleotida F1 i R6. Dobijeni fragment F1R6 je ukloniran u pJet1.2 vektor prema uputstvima proizvođača opisanog u poglavlju 3.2.1., pri čemu je generisan prvi plazmidni konstrukt pJET1.2SOX14 (Slika 34A). Insert (koji sardži kodirajući region humanog gena *SOX14*) je digestijom restrikcionim enzimom *Bgl*III (uokvireno na Slici 34A) subkloniran u *Bam*HI mesto pcDNA3.1 vektora (uokvireno na Slici 34B). S obzirom da



*Bgl*III i *Bam*HI restrikcioni enzimi imaju komplementarne lepljive krajeve, na ovaj način je generisan plazmidni konstrukt SOX14wt. Na taj način je pored kodirajućeg regiona humanog gena *SOX14* obuhvaćenog oligonukleotidima F1 i R6, u pcDNA3.1 vektor ligacijom dodat i deo regiona za kloniranje pJET1.2 vektora koji sadrži *Xho*I i *Xba*I restrikciona mesta (Slika 34C). S obzirom da se jedno restrikciono mesto za *Hind*III nalazi u kodirajućem regionu gena *SOX14*, a jedno restrikciono mesto *Hind*III u pcDNA3.1 vektoru (Slika 34C), digestijom SOX14wt konstrukta ovim enzimom dobijaju se fragmenti pogodni za proveru orijentacije kloniranja, sledećih dužina: ukoliko je insert koji sadrži region humanog gena *SOX14* ukloniran u pcDNA3.1 vektor u 5'-3' orijentaciji dobijaju se fragmenti dužine 251 bp i 6101 bp (Slika 34C i D), a ukoliko je insert koji sadrži region humanog gena *SOX14* ukloniran u pcDNA3.1 vektor u 3'-5' orijentaciji dobijaju se fragmenti dužine 708 bp i 5644 bp (Slika 34C i E). Na taj način su digestijom *Hind*III restrikcionim enzimom identifikovani klonovi u kome je kodirajući region gena *SOX14* usmereno ukloniran u 5'-3' orijentaciji u pcDNA3.1 vektoru (Slika 34D). Za dalji rad je odabran jedan od identifikovanih klonova.



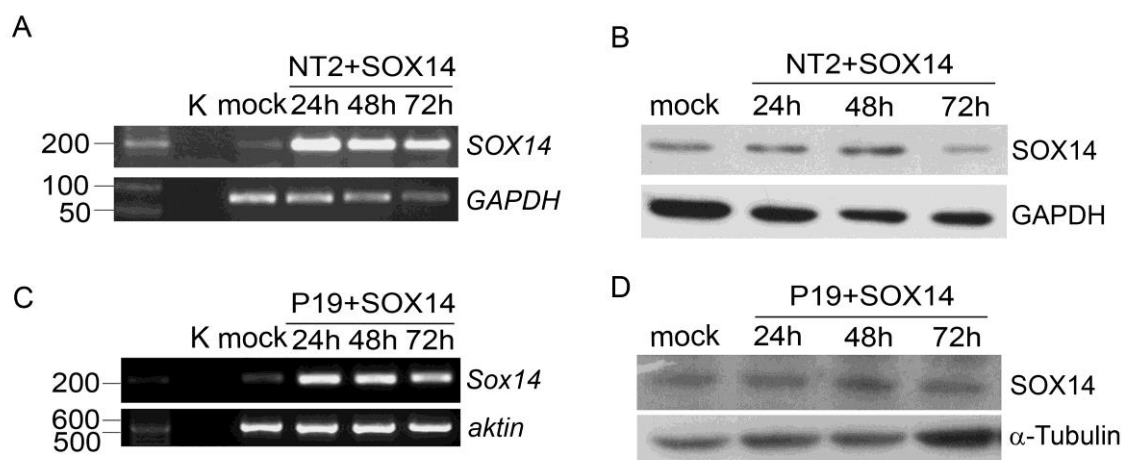
**Slika 34: Shematski prikaz strategije kloniranja kodirajućeg regiona humanog gena *SOX14* u *pcDNA3.1* vektor.** **A** – Shematski prikaz pJet1.2 vektora. Mesto restrikcionog enzima *Bgl*II korišćeno za kloniranje je uokvireno. F1R6 označava kodirajući region humanog gena *SOX14* dobijen PCR metodom koji je ukloniran u pJet1.2 vektor. **B** – Shematski prikaz *pcDNA3.1* vektora. Restrikciono mesto *Bam*HI iskorišćeno za subkloniranje humanog gena *SOX14* u *pcDNA3.1* vektor je uokvireno. **C** – Shematski prikaz generisanog *SOX14wt* konstrukta. Na slici je prikazana pozicija restrikcionog mesta *Hind*III, u *SOX14wt* generisanom konstrukt, koji je korišćen za proveru orijentacije kodirajućeg regiona gena *SOX14*. Prikazana je i pozicija *Nhe*I, *Xho*I, *Xba*I i *Pme*I restrikcioni enzima u generisanom *SOX14wt* konstrukt. **D** i **E** – Digestijom *SOX14wt* konstrukata izolovanih iz odabranih klonova pomoću *Hind*III enzima, proverena je orijentacija kloniranja. Ukoliko je insert koji sadrži region humanog gena *SOX14* ukloniran u *pcDNA3.1* vektor u 5'-3' orijentaciji dobijaju se fragmenti dužine 251 bp i 6101 bp, a ukoliko

je insert koji sadrži region humanog gena *SOX14* ukloniran u pcDNA3.1 vektor u 3'-5' orijentaciji dobijaju se fragmenti dužine 708 bp i 5644 bp. Za dalji rad je odabran jedan od identifikovanih klonova, obeležen strelicom na slici. Crticama su označene trake koje odgovaraju očekivanim dužinama.

#### 4.1.7. Provera generisanog *SOX14*wt konstrukta u eksperimentima tranzijentne transfekcije

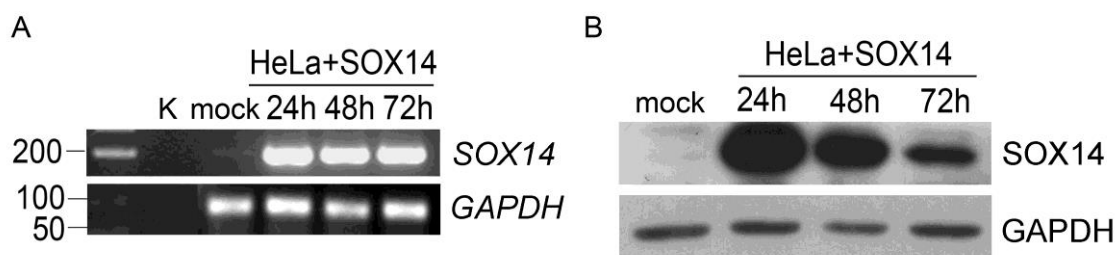
U cilju dalje analize uloge gena *SOX14* tokom procesa neuralne diferencijacije *in vitro*, bilo je neophodno proveriti ektopičnu ekspresiju ovog gena nakon tranzijentne transfekcije u NT2/D1 i P19 ćelijama. NT2/D1 i P19 ćelije su tranzijentno transfektovane pcDNA3.1 vektorom (na slikama označen kao mock) ili *SOX14*wt ekspresionim konstruktom (označen kao +*SOX14*). Ektopična ekspresija gena *SOX14* analizirana je metodom RT-PCR na ukupnoj RNK izolovanoj u tri različita vremenska perioda nakon tranzijentne transfekcije (24h, 48h i 72h) i Western blot metodom na ukupnim ćelijskim proteinima izolovanim u tri različita vremenska perioda nakon tranzijentne transfekcije (24h, 48h i 72h). Dobijeni rezultati su pokazali da se sa generisanog *SOX14*wt konstrukta *SOX14* uspešno eksprimira na nivou iRNK u sva tri ispitana vremenska perioda nakon transfekcije NT2/D1 i P19 ćelija (Slika 35-A i C).

Da bi utvrdili porast ekspresije *SOX14* proteina urađen je Western blot. Ovom metodom nije detektovana povećana ekspresija *SOX14* proteina ni u jednom od tri ispitana vremenska perioda nakon transfekcije NT2/D1 i P19 ćelija (Slika 35-B i D).



**Slika 35: Detekcija povećane ekspresije SOX14 metodama RT-PCR i Western blot nakon tranzijentne transfekcije NT2/D1 i P19 ćelija.** **A i C** – prikaz rezultata RT-PCR analize ukupne RNK izolovane iz ćelija u tri vremenska perioda (24h, 48h i 72h) nakon transfekcije sa pcDNA3.1 vektorom (mock) ili SOX14wt konstruktom (+SOX14). K- negativna kontrola PCR reakcije. *GAPDH* i *aktin* su korišćeni kao kontrola ujednačenosti količine uzoraka. **B i D** – Western blot na ukupnim ćelijskim proteinima izolovanim u tri vremenska perioda (24h, 48h i 72h) nakon transfekcije sa pcDNA3.1 vektorom (mock) ili SOX14wt konstruktom (+SOX14). Kao kontrola ujednačenosti nanetih uzoraka korišćeni su *GAPDH* i  $\alpha$ -Tubulin.

Kako bi se utvrdilo da li je odsustvo povećane ekspresije SOX14 na nivou proteina u NT2/D1 i P19 ćelijama specifično svojstvo pluripotentnih ćelija, urađena je tranzijentna transfekcija HeLa ćelija koje vode poreklo od karcinoma grlića materice. Totalna RNK i ukupni ćelijski proteini izolovani su u tri vremenska perioda (24h, 48h i 72h) nakon tranzijentne transfekcije HeLa ćelija pcDNA3.1 vektorom (mock) i SOX14wt konstruktom (+SOX14). Metodom RT-PCR-a pokazano je povećanje ektopične ekspresije gena *SOX14* u HeLa ćelijama u sva tri vremenska perioda nakon transfekcije (Slika 36A). Za razliku od pluripotentnih NT2/D1 i P19 ćelija, u HeLa ćelijama poreklom od karcinoma grlića materice detektovan je značajan porast ekspresije SOX14 proteina u sva tri vremenska perioda nakon transfekcije (Slika 36B). Dobijeni rezultat je ukazao na pravilno konstruisan ekspresioni vektor i doveo do pretpostavke da je odsustvo povećane ekspresije SOX14 proteina u NT2/D1 i P19 ćelijama najverovatnije posledica nepoznatog mehanizma koji je specifičan za pluripotentne ćelije.



**Slika 36: Detekcija povećane ekspresije SOX14 nakon tranzijentne transfekcije SOX14wt konstrukta u HeLa ćelijama.** **A** – rezultat RT-PCR analize oligonukleotidima specifičnim za SOX14

kodirajući region na ukupnoj RNK izolovanoj iz ćelija 24h, 48h i 72h nakon transfekcije sa pcDNA3.1 vektor (mock) ili SOX14wt konstruktom . K-negativna kontrola PCR reakcije. *GAPDH* je korišćen kao kontrola ujednačenosti cDNK uzoraka. **B** – Western blot analiza ekspresije SOX14 na ukupnim ćelijskim proteinima izolovanim iz HeLa ćelija 24h, 48h i 72h nakon transfekcije sa pcDNA3.1 (mock) vektorom ili SOX14wt (+SOX14) konstruktom. Kao kontrola ujednačenosti nanetih uzoraka korišćen je GAPDH.

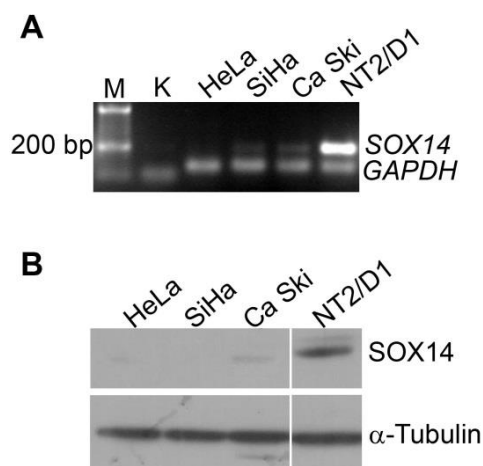
Dobijeni rezultati nakon tranzijentne transfekcije SOX14wt konstrukta u NT2/D1 i P19 ćelijama su ukazali na mogućnost da u pluripotentnim ćelijama postoji mehanizam regulacije ekspresije gena *SOX14* koji je specifičan za ovaj tip ćelija. Za dalju analizu uloge gena *SOX14* u procesu neuralne diferencijacije *in vitro* neophodna su dalja istraživanja koja bi ukazala na potencijalni mehanizam regulacije ekspresije gena *SOX14* u pluripotentnim ćelijama.

## **4.2. Analiza ekspresije i uloge humanog gena *SOX14* u regulaciji malignog fenotipa ćelija poreklom od karcinoma grlića materice**

### **4.2.1. Analiza nivoa ekspresije gena *SOX14* u ćelijama poreklom od karcinoma grlića materice**

Podaci u literaturi ukazuju da je SOX14 uključen u proces nastanka karcinoma grlića materice (Li et al. 2015; Senchenko et al. 2013; Wang et al. 2016b). Studije koje su se bavile analizom ekspresije gena *SOX14* u uzorcima tkiva pacijentkinja obolelih od ovog tipa karcinoma su pokazale da SOX14 ima potencijalnu ulogu tumor supresora (Wang et al. 2016b). Sa druge strane, *in vitro* studije na ćelijskim linijama poreklom od karcinoma grlića materice su ukazale na potencijalna onkogeno svojstva gena *SOX14* u ovom tipu tumora (Li et al. 2015). Kako bi se dalje ispitala uloga gena *SOX14* u ovom tipu maligniteta, za dalju analizu odabrane su tri komercijalno dostupne ćelijske linije koje vode poreklo od različitih tipova karcinoma grlića materice: HeLa, SiHa i CaSki. Prvi cilj u analizi bio je da se utvrdi nivo ekspresije SOX14 u navedenim ćelijskim

linijama. Metodom RT-PCR-a pokazano je da je nivo ekspresije gena *SOX14* nizak u ćelijama koje vode poreklo od karcinoma grlića materice (Slika 37A). Metodom Western blot-a takođe je pokazano da je nivo ekspresije SOX14 proteina nizak u ćelijama koje vode poreklo od karcinoma grlića materice (Slika 37B).



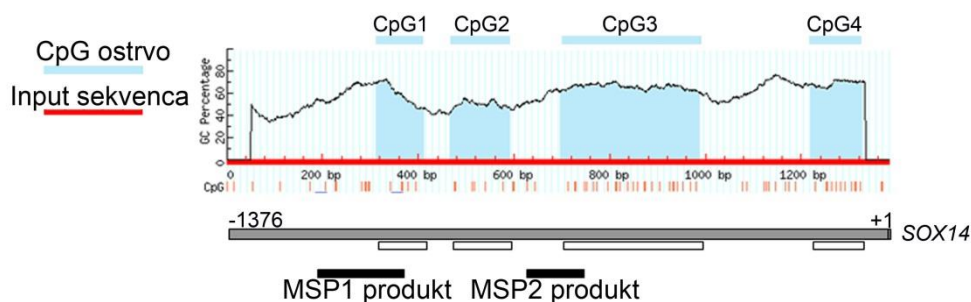
**Slika 37: Analiza ekspresije SOX14 u ćelijama poreklom od karcinoma grlića materice.** **A** – RT-PCR na cDNK dobijenoj od ukupne RNK izolovane iz tri ćelijske linije koje vode poreklo od karcinoma grlića materice: HeLa, SiHa i CaSki. Za poređenje korišćena je cDNK dobijena iz RNK izolovana iz ćelijske linije NT2/D1. *GAPDH* je korišćen kao kontrola ujednačenosti cDNK uzoraka. M: DNK marker dužina, K- kontrola PCR reakcije. **B** – Analiza ekspresije SOX14 proteina metodom Western blot-a na ukupnim ćelijskim proteinima izolovanim iz HeLa, SiHa i CaSki i NT2/D1 ćelija. Kao kontrola ujednačenosti nanetih uzoraka korišćen je  $\alpha$ -Tubulin.

#### 4.2.2. Analiza metilacionog statusa promotora gena *SOX14* u ćelijama poreklom od karcinoma grlića materice

Jedan od važnih epigenetičkih mehanizama koji su povezani sa nastankom i razvojem tumora je metilacija CpG ostrva u okviru gena koji kodiraju proteine sa tumor supresorskim svojstvima (Esteller 2002). CpG ostrva su sekvence u genu dužine od 500 do nekoliko hiljada baznih parova bogate CG baznim parovima (Bird 1986). U promotoru gena je učestalost CpG dinukleotida veća nego u drugim regionima datog gena (Saxonov et al. 2006).

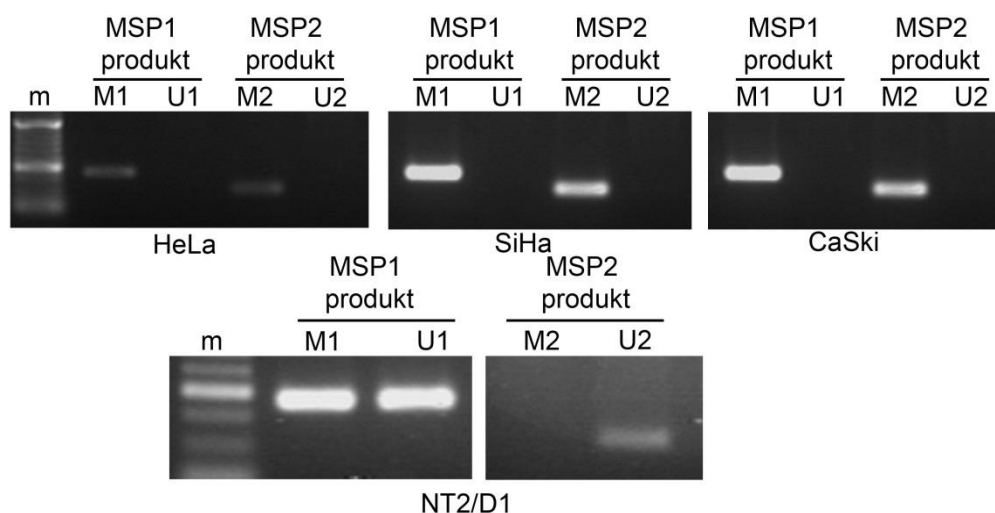
Imajući u vidu nizak nivo ekspresije gena *SOX14* u ćelijama poreklom od karcinoma grlića materice, kao i činjenicu da je identifikovana metilacija *SOX14* promotora u uzorcima tkiva poreklom od pacijentkinja obolelih od karcinoma grlića materice, ispitan je metilacioni status promotora humanog gena *SOX14* u HeLa, SiHa i CasKi ćelijama.

Promotorski region gena *SOX14* u dužini od 1376 bp (-1376 do +1, Djurovic and Stevanovic 2004) analiziran je *in silico* programom MethPrimer koji vrši identifikaciju potencijalnih CpG ostrva (Li and Dahiya 2002). Rezultati dobijeni MethPrimer analizom pokazali su da se u okviru optimalnog promotora gena *SOX14* nalaze četiri CpG ostrva označenih kao CpG1, CpG2, CpG3 i CpG4 (Slika 38).



**Slika 38: Shematski prikaz MethPrimer analize CpG ostrva u promotoru gena *SOX14*.** Pozicije CpG1, CpG2, CpG3 i CpG4 ostrva u okviru promotora gena *SOX14* su predstavljene plavom bojom. Sa MSP1 i MSP2 označene su pozicije PCR produkata. Sa MSP1 je označen PCR produkt za CpG1 ostrve, amplifikovan korišćenjem oligonukleotida M1F i M1R, odnosno U1F i U1R, dok je sa MSP2 označen PCR produkt za CpG3 ostrvo, amplifikovan korišćenjem oligonukleotida M2F i M2R, odnosno U2F i U2R. Pozicija CpG1 ostrva je od -1065 do -965, CpG2 ostrva je od -909 do -786, CpG3 ostrva je od -679 do -388, CpG4 ostrva je od -175 do -51, MSP1 produkta je od -1191 do -984 i MSP2 je od -756 do -613 u odnosu na start transkripcije gena *SOX14*.

Za dalju analizu metilacionog statusa promotora gena *SOX14* odabrana su CpG1 i CpG3 ostrva za koja su dobijeni specifični PCR produkti. Dizajniranje oligonukleotida za CpG2 i CpG4 ostrva bilo je onemogućeno zbog specifičnosti sekvence promotora gena *SOX14* u tom regionu. Nakon bisulfitne konverzije DNK izolovane iz HeLa, SiHa, CaSki i NT2/D1 ćelija, metodom RT-PCR-a amplifikovana su CpG1 i CpG3 ostrva, na način opisan u poglavlju Materijal i metode (3.2.25.). Oligonukleotidima koji odgovaraju metilovanoj DNK u sve tri ćelijske linije poreklom od karcinoma grlića materice dobijeni su specifični produkti za oba ostrva, dok su produkti izostali nakon PCR reakcije oligonukleotidima koji odgovaraju nemetilovanoj DNK (Slika 39). Nasuprot tome, u NT2/D1 ćelijama za CpG1 ostrvo dobijeni su i produkti i na metilovanoj i na nemetilovanoj DNK, dok je za CpG3 ostrvo dobijen samo produkt na nemetilovanoj DNK (Slika 39). Ovi rezultati su pokazali da je promotor gena *SOX14* metilovan u ćelijama poreklom od karcinoma grlića materice. Dobijeni rezultati su pokazali da u NT2/D1 ćelijama promotor gena *SOX14* ima niži nivo metilacije (Slika 39).





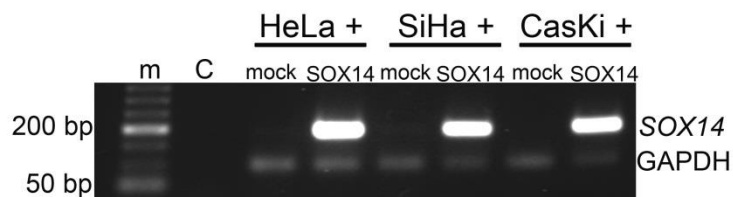
**Slika 39: Analiza metilacionog statusa promotora gena *SOX14* metodom MSP na HeLa, SiHa, CaSki i NT2/D1 ćelijama.** Sa MSP1 je označen PCR produkt za CpG1 ostrvo, amplifikovan korišćenjem oligonukleotida M1F i M1R, odnosno U1F i U1R, dok je sa MSP2 označen PCR produkt za CpG3 ostrvo, amplifikovan korišćenjem oligonukleotida M2F i M2R, odnosno U2F i U2R. M1 – produkt dobijen korišćenjem oligonugleotida M1F i M1R na metilovanoj DNK, M2- produkt dobijen korišćenjem oligonugleotida M2F i M2R na metilovanoj DNK, U1- produkt dobijen korišćenjem oligonugleotida U1F i U1R na nemetilovanoj DNK, U2-prodakt dobijen korišćenjem oligonugleotida U2F i U2R na nemetilovanoj DNK. M – DNK marker dužina. Sekvence korišćenih oligonukleotida su predstavljene u poglavlju Materijal i metode u Tabeli 5.

Dobijeni rezultati su pokazali smanjen nivo ekspresije *SOX14* usled metilacije u ćelijskim linijama poreklom od karcinoma grlića materice. Imajući u vidu ove rezultate kao i literaturne podatke o odsustvu metilacije gena *SOX14* u tkivu poreklom od zdravih žena (Wang et al. 2016b) došlo se do zaključka da *SOX14* može imati potencijalnu ulogu tumor supresora u ćelijama poreklom od karcinoma grlića materice.

#### 4.2.3. Analiza ektopične ekspresije *SOX14* u ćelijama poreklom od karcinoma grlića materice

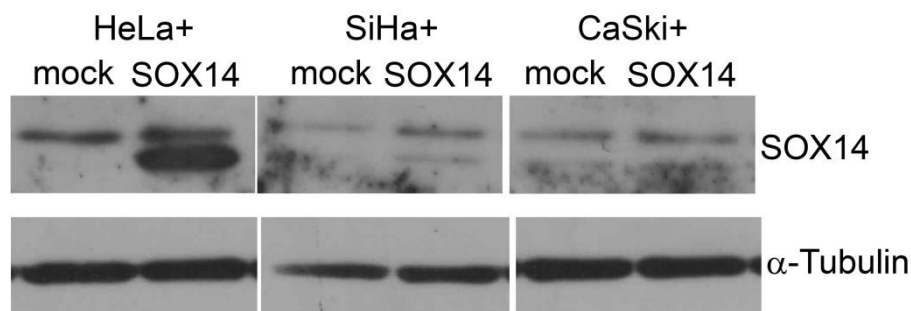
U cilju ispitivanja uloge *SOX14* gena kao potencijalnog tumor supresora u ćelijama poreklom od karcinoma grlića materice, urađeni su eksperimenti tranzijentne transfekcije sa pcDNA3.1 vektorom (mock) ili *SOX14*wt konstruktom (označen kao *SOX14* na slikama 40 i 41) u HeLa, SiHa i CaSki ćelijama. Ektopična ekspresija *SOX14* proteina praćena je 24h nakon transfekcije metodama RT-PCR, Western blot i imunocitohemijskim bojenjem.

Metodom RT-PCR-a, potvrđena je ektopična ekspresija gena *SOX14* sa generisanog konstrukta *SOX14*wt u sve tri ispitane ćelijske linije (Slika 40).



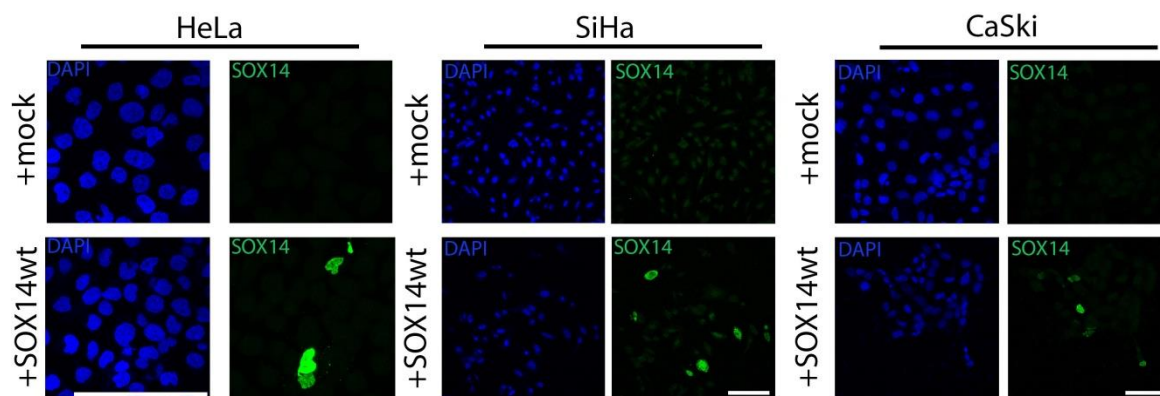
**Slika 40. RT-PCR analiza ektopične ekspresije gena *SOX14* u HeLa, SiHa i CaSki ćelijama nakon transfekcije sa *SOX14*wt generisanim konstruktom.** Ukupna RNK izolovana iz ćelija 24h nakon transfekcije sa pcDNA3.1 vektorom (mock) ili *SOX14*wt generisanim konstruktom (*SOX14*) analizirana je RT-PCR metodom oligonukleotidima specifičnim za kodirajući region humanog gena *SOX14* (F1 i R3). M – DNK marker dužina, C – negativna kontrola. *GADPH* je korišćen kao kontrola ujednačenosti količine uzoraka.

U sledećim eksperimentima analiziran je nivo ektopične ekspresije *SOX14* proteina u transfektovanim ćelijama primenom Western blot metode. Dobijeni rezultati su pokazali da je najveći nivo ektopične ekspresije *SOX14* proteina detektovan u HeLa ćelijama (Slika 41).



**Slika 41: Western blot analiza ekspresije *SOX14* u HeLa, SiHa i CaSki ćelijama nakon transfekcije sa *SOX14*wt konstruktom.** Ukupni ćelijski proteini izolovani su iz ćelija 24h nakon transfekcije sa pcDNA3.1 vektorom (mock) ili *SOX14*wt generisanim konstruktom (*SOX14*) i analizirani Western blot metodom korišćenjem antitela specifičnog za *SOX14*. Kao kontrola ujednačenosti nanetih uzoraka korišćen je  $\alpha$ -Tubulin.

Dalje je metodom imunocitohemije praćen nivo ektopične ekspresije SOX14 proteina na nivou pojedinačnih ćelija. Ćelija transfektovane sa pcDNA3.1 vektorom (mock) ili SOX14wt generisanim konstruktom su imunocitohemijski bojene antitelom specifičnim za SOX14 protein i posmatrane na fluorescentom mikroskopu (Slika 42). Rezultati ove analize su pokazali da je u sve tri ispitane ćelijske linije postignut približno isti nivo ektopične ekspresije SOX14 proteina (Slika 42).



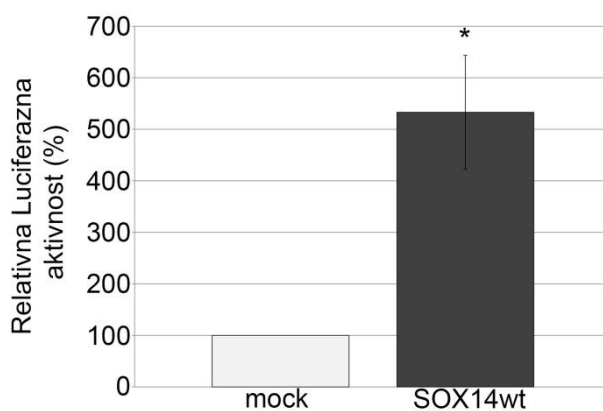
**Slika 42: Analiza ektopične ekspresije SOX14 metodom imunocitohemije u HeLa, SiHa i CaSki ćelijama nakon tranzijentne transfekcije pcDNA3.1 vektorom (mock) i generisanim SOX14wt konstruktom.** Imunocitohemijsko bojenje urađeno je antitelima specifičnim na SOX14 (zeleni signal). Jedra su bojena DAPI bojom (plavi signal), razmernik 100  $\mu$ M.

S obzorom da je Western blot pokazao najviši nivo ektopične ekspresije SOX14 proteina u HeLa ćelijama, ova ćelijska linija izabrana je kao model sistem za dalje ispitivanja funkcije gena *SOX14* u ćelijama poreklom od karcinoma grlića materice.

#### **4.2.4. Analiza aktivatorske/represorske funkcije humanog gena *SOX14* u HeLa ćelijama**

U literaturi je prvobitno pokazano da C-terminalni domen SOX14 proteina ima represorska svojstva (Uchikawa et al. 1999). Noviji literaturni podaci ukazuju da SOX protein može imati ulogu i transkripcionog aktivatora i represora zavisno od ćelijskog konteksta (Kopp et al. 2008).

Imajući u vidu ove podatke, naredni korak u ispitivanju bio je analiza aktivacione/represorske funkcije gena *SOX14* u HeLa ćelijama. Za potrebe ovog eksperimenta korišćen je 3xSXLuc konstrukt, koji je u prethodnim studijama korišćen za analizu aktivnosti SOX4, SOX10 i SOX18 proteina (Petrovic et al. 2015; Schreiber et al. 1997). Ovaj konstrukt sadrži tri ponovljene oligonukleotidne sekvence koje odgovaraju SOX vezivnom mestu, uklonirane u pTATALuc plazmid koji eksprimira luciferazni reporter gen pod kontrolom  $\beta$ -globinskog minimalnog promotora (Kuhlbrodt et al. 1998). HeLa ćelije su ko-transfektovane SOX14wt konstrutom i 3xSXLuc konstrutom i nakon transfekcije je praćena luciferazna aktivnost reporter gena. Rezultati ovog eksperimenta su pokazali da se aktivnost reporter gena povećava 5 puta u uslovima povećane ekspresije gena *SOX14* (Slika 43). Skoro 20 godina u literaturi se na osnovu podele SOXB grupe na aktivatore i represore SOX14 opisuje kao protein sa represorskom funkcijom (Uchikawa et al. 1999). Rezultat dobijen korišćenjem konstrukta koji poseduje 3 SOX vezivna mesta i luciferazni reporter gen je pokazao da SOX14 može imati svojstvo aktivatora ciljnih gena u HeLa ćelijama.



**Slika 43: Analiza aktivacionog/represorskog svojstva SOX14 proteina.** Na grafiku je prikazana relativna luciferazna aktivnost nakon ko-transfekcije HeLa ćelija sa 3xSXLuc konstrutom koji sadrži luciferazni reporter gen i pcDNA3.1 (mock) vektorom ili SOX14wt konstrutom. Luciferazna aktivnost reporter gena detektovana nakon transfekcije sa SOX14wt je normalizovana u odnosu na luciferaznu aktivnost reporter gena detektovanu nakon transfekcije sa mock, kojoj je dodeljena vrednost 100%. Vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost  $\pm$  SEM najmanje tri nezavisna eksperimenta. Srednje vrednosti su upoređene Studentovim *t*-testom. Vrednost  $p \leq 0.05$  označena je \*.

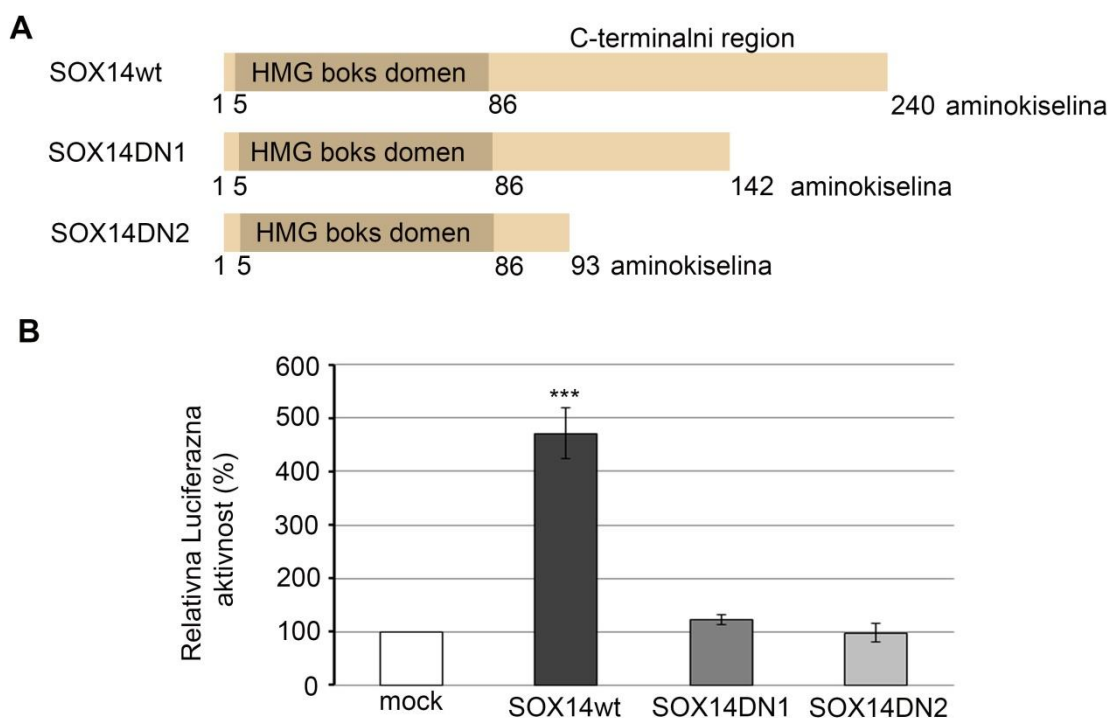
#### **4.2.5. Generisanje dominantno negativnih mutanata za SOX14 protein i analiza njihove aktivatorske/represorske funkcije u HeLa ćelijama**

Pojava funkcionalne redundantnosti među članovima familije *SOX* gena otežava njihovo izučavanje klasičnim metodama utišavanja ekspresije. Funkcionalna redundantnost podrazumeva da član iste grupe *SOX* gena može preuzeti funkciju drugog gena *SOX* u uslovima njegovog odsustva usled delecije ili usled prisustva mutacije koja ga čini neaktivnim (Cermenati et al. 2008; Wegner 2010). Zbog toga je poželjniji pristup u izučavanju funkcije ove grupe gena konstruisanje dominantno-negativnih (DN) mutanata. DN mutanti *SOX* proteina imaju očuvan HMG boks domen kojim se vezuju za svoje konsenzusno mesto u okviru promotora ali ne i deo proteina kojim ostvaruju svoju funkciju aktivacije ili represije. Na taj način *SOX* DN mutanti okupiraju vezivna mesta na molekulu DNK i tako onemogućavaju da se za istu regulatornu sekvencu veže neki drugi član *SOX* familije proteina koji može zamaskirati odsustvo proteina od interesa.

Imajući to u vidu, za potrebe dalje analize uloge gena *SOX14* u ćelijama poreklom od karcinoma grlića materice, pored generisanog *SOX14*wt konstrukta koji eksprimira wt formu *SOX14* proteina dužine 240 amino kiselina generisana su i dva DN mutanta za *SOX14* – *SOX14DN1* i *SOX14DN2* koji poseduju skraćene forme *SOX14* proteina (Gredic 2015).

*SOX14DN1*, DN mutant *SOX14* proteina, eksprimira skraćenu formu *SOX14* proteina dužine 93 amino kiseline (Slika 44A). Ovako skraćen *SOX14* protein poseduje N-terminalni region i očuvan HMG boks, dok mu nedostaje veći deo C-terminalnog domena (Slika 44A) (Gredic 2015). *SOX14DN2*, DN mutant *SOX14* proteina, eksprimira skraćenu formu *SOX14* proteina dužine 142 amino kiseline. Ovako skraćen *SOX14* protein takođe poseduje N-terminalni region i očuvan HMG boks, a nedostaje mu deo C-terminalni domen (Slika 44A) (Gredic 2015).

Analiza aktivatorske/represorske funkcije oba DN mutanta za SOX14 je pokazala da je skraćivanjem C-terminalnog domena i očuvanjem HMG boks domena SOX14 proteina izostao efekat oba mutanta na luciferaznu aktivnost reporter gena u HeLa ćelijama (Slika 44B) (Gredic 2015). Rezultati analize oba mutanta su pokazali da su konstruisani SOX14DN1 i SOX14DN2 sposobni da kompetiraju sa wt SOX14 proteinom za vezivanje za ciljnu sekvencu u molekulu DNK (Gredic 2015).

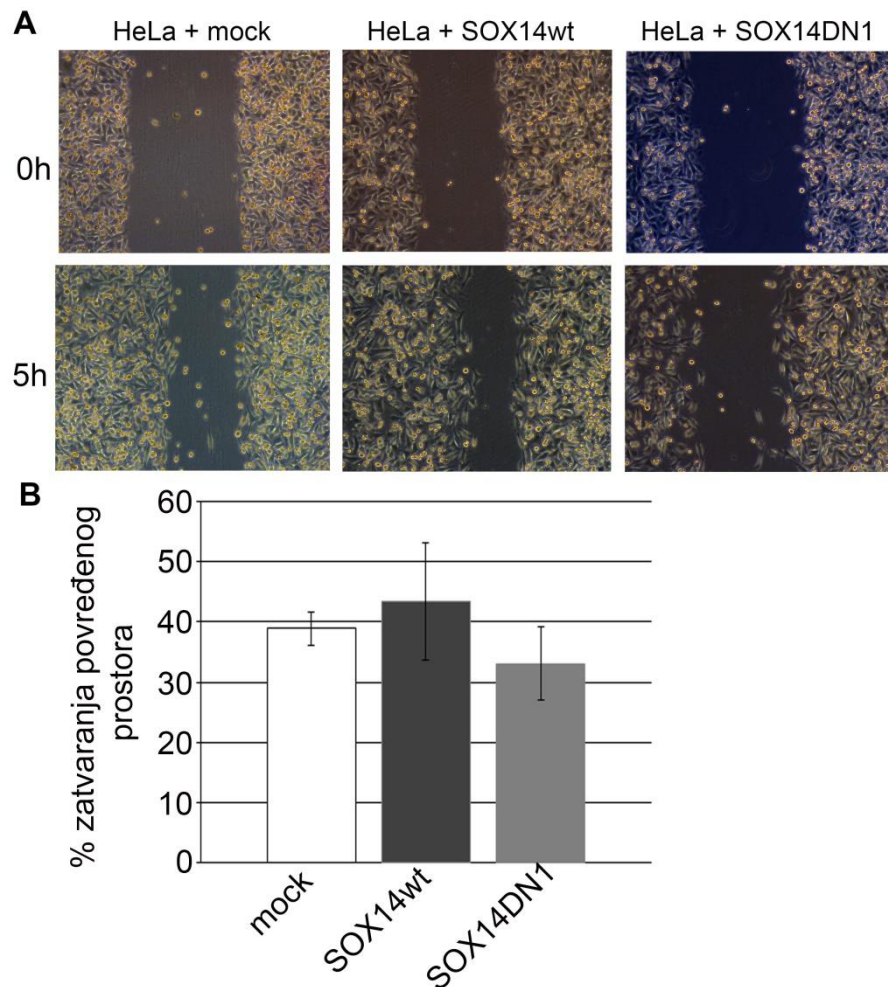


**Slika 44: Generisanje dominant negativnih mutanata za SOX14 protein i analiza njihove aktivatorske/represorske funkcije u HeLa ćelijama.** **A** – Shematski prikaz generisanih SOX14 wt konstrukta i dominant negativnih mutanata za SOX14 – SOX14DN1 i SOX14DN2. **B** – Na grafiku je prikazana relativna luciferazna aktivnost nakon ko-transfekcije HeLa ćelija sa 3xSXLuc konstruktom koji sadrži luciferazni reporter gen i pcDNA3.1 vektorom (mock), kao i SOX14wt, SOX14DN1 ili SOX14DN2 konstrukti. Luciferazna aktivnost reporter gena detektovana nakon transfekcije sa SOX14wt, SOX14DN1 ili SOX14DN2 je normalizovana u odnosu na luciferaznu aktivnost reporter gena detektovanu nakon transfekcije sa mock, kojoj je dodeljena vrednost 100%. Vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost  $\pm$  SEM najmanje tri nezavisna eksperimenta. Srednje vrednosti su upoređene Studentovim t-testom. Vrednost  $p \leq 0.01$  označena je \*\*\*. Slika je preuzeta i modifikovana iz (Gredic 2015).

Na osnovu prikazanih rezultata i rezultata prethodnih studija (Gredic 2015) zaključeno je da SOX14DN1 konstrukt može biti korišćen u daljim eksperimentima analize uloge gena *SOX14* u HeLa ćelijama kao kontrola s obzirom da funkcioniše na dominantno-negativan način, vezuje za istu ciljnu sekvencu kao i SOX14wt, ali zbog nedostatka većeg dela C-terminalnog regiona ne ostvaruje funkcionalni efekat.

#### **4.2.6. Uticaj povećane ekspresije SOX14 proteina na migratorni potencijal HeLa ćelija**

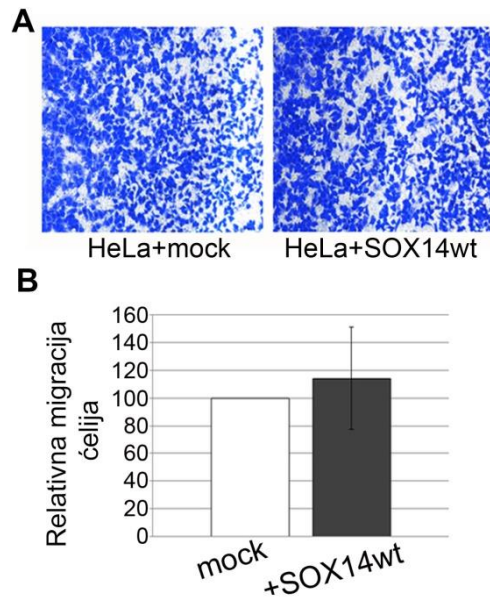
Širenje karcinoma predstavlja kaskadu procesa koji uključuju migraciju i invaziju malignih ćelija u okolna tkiva. U cilju ispitivanja da li SOX14 utiče na migraciju, HeLa ćelije su transfektovane pcDNA3.1 vektorom (mock), SOX14wt ili SOX14DN1 ekspresionim konstruktom. Nakon postizanja konfluentnosti, na ćelijama je primenjen test zarastanja povrede (eng. *Wound scratch*) prema proceduri detaljno opisanoj u poglavlju Materijal i metode (3.2.28.). Nakon toga, ćelije su posmatrane pod mikroskopom u različitim vremenskim intervalima. Nakon 5h od nastanka povrede došlo je do blagog popunjavanja praznog prostora (Slika 45). Analiza dobijenih rezultata dovela je do zaključka da povećana ekspresija SOX14 proteina nije uticala na migracioni potencijal HeLa ćelija (Slika 45) u odnosu na ćelije transfektovane pcDNA3.1 vektorom (mock). SOX14DN1 kome nedostaje veći deo C-terminalnog domena SOX14 proteina takođe nije uticao na migracioni potencijal HeLa ćelija (Slika 45),



**Slika 45: Uticaj povećane ekspresije SOX14wt i SOX14DN1 na migraciju HeLa ćelija praćen testom zarastanja povrede (eng. *Wound scratch*).** **A** – vizuelizacija praznog prostora nakon povrede HeLa ćelija i praćenje popunjavanja 5h nakon pomenute povrede. **B** – statistička analiza merenja širine zatvaranja povređenog prostora, izraženo u procentima, u HeLa ćelijama transfektovanim sa pcDNA3.1 vektorom (mock), SOX14wt i SOX14DN1 konstruktom u tri nezavisna eksperimenta, koja je predstavljena kao srednja vrednost  $\pm$  SEM.

Uticaj SOX14 na migratorni potencijal HeLa ćelija, ispitan je i eksperimentom u kome su korišćeni specijalni inserti (eng. *Transwelltest*). Dobijeni rezultati su takođe pokazali da SOX14wt ne utiče na migraciju HeLa ćelija (Slika 46). S obzirom da u prethodnom eksperimentu ni SOX14wt ni SOX14DN1 nisu pokazali efekat na migraciju, u ovom eksperimentu testiran je samo SOX14wt.



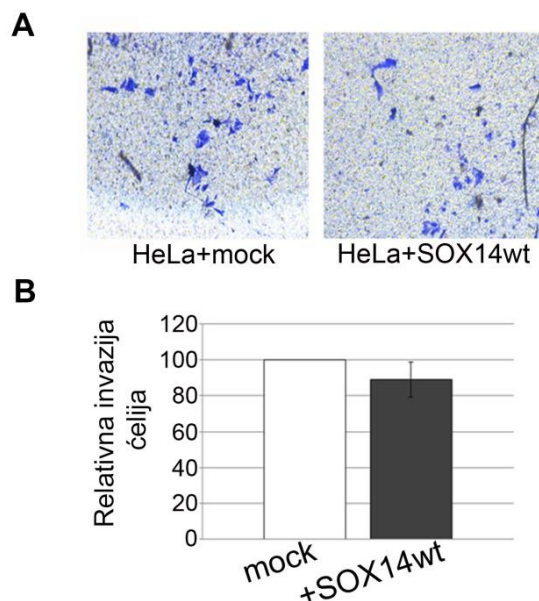


**Slika 46: Uticaj povećane ekspresije SOX14wt na migratorni potencijal HeLa ćelija praćen korišćenjem inserata (eng. *Transwell test*). Na gornjem delu slike su prikazane HeLa ćelije koje su nakon što su transfektovane sa pcDNA3.1 (mock) ili SOX14wt migrirale na membranu a zatim obojene kristal violet bojom. Na donjem delu slike je statistička obrada rezultata koja je predstavljena kao srednja vrednost  $\pm$  SEM najmanje tri nezavisna eksperimenta.**

Oba prethodna eksperimenta su pokazala da povećana ekspresija SOX14 proteina ne utiče na migratorni potencijal HeLa ćelija.

#### **4.2.7. Uticaj povećane ekspresije SOX14 proteina na invazivnost HeLa ćelija**

Naredni korak u praćenju efekta SOX14 na osobine tumorskih ćelija *in vitro* bila je analiza uticaja ovog proteina na invazivnost HeLa ćelija. Dobijeni rezultati su pokazali da nakon transfekcije HeLa ćelija sa SOX14wt nije došlo do promene u invazivnosti u odnosu na ćelije koje su transfektovane pcDNA3.1 vektorom označenim kao mock (Slika 47).

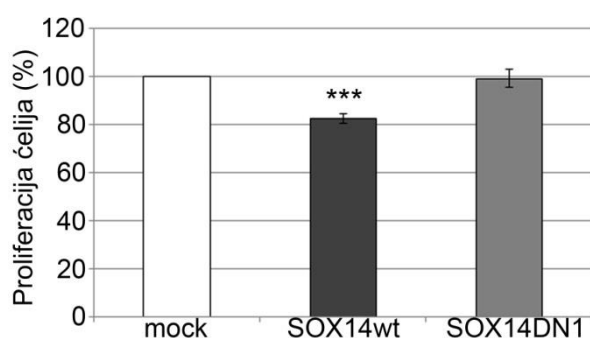


**Slika 47: Praćenje uticaja povećane ekspresije SOX14wt na invazivnost HeLa ćelija korišćenjem inserata (eng. *Transwell test*). **A** - Vizuelizacija HeLa ćelija na donjoj strani membrane bunarića nakon transfekcije sa pcDNA3.1 (mock) vektorom ili SOX14wt konstruktom. **B** - statistička obrada rezultata dobijenih brojanjem ćelija koje su prošle kroz membranu inserta je predstavljena kao srednja vrednost  $\pm$  SEM najmanje tri nezavisna eksperimenta.**

#### 4.2.8. Uticaj povećane ekspresije SOX14 proteina na proliferaciju HeLa ćelija

Jedna od osnovnih karakteristika tumora jeste proliferacija ćelija, koja uslovljava nekontrolisan i brz rast tumorske mase. Kako bi se ispitalo da li povećana ekspresija SOX14wt utiče na proliferaciju HeLa ćelija, urađen je test proliferacije koji podrazumeva kolorimetrijski metod koji se zasniva na redukciji MTS tetrazolijum jedinjenja od strane metabolički aktivnih ćelija koje ga prevode u obojeni produkt formazan. Ova konverzija se vrši od strane NADPH-zavisne dehidrogenaze u metabolički aktivnim ćelijama.

Dvadeset četiri sata nakon transfekcije sa pcDNA3.1 vektorom (mock), SOX14wt ili SOX14DN1 konstruktom, ćelijama je dodata MTS boja a nakon 30 minuta merena je absorbanca. Dobijeni rezultati su pokazali da je SOX14wt smanjio proliferaciju HeLa ćelija za 20% (Slika 48). SOX14DN1 nije uticao na proliferaciju ćelija, što je i očekivano s obzirom da je pokazano da nema aktivatorsku/represorsku funkciju u HeLa ćelijama (Slika 48). Ovi rezultati ukazuju da SOX14DN1, kome nedostaje veći deo C-terminalnog domena SOX14 proteina ne ostvaruje efekat na proliferaciju HeLa ćelija u odnosu na SOX14wt.

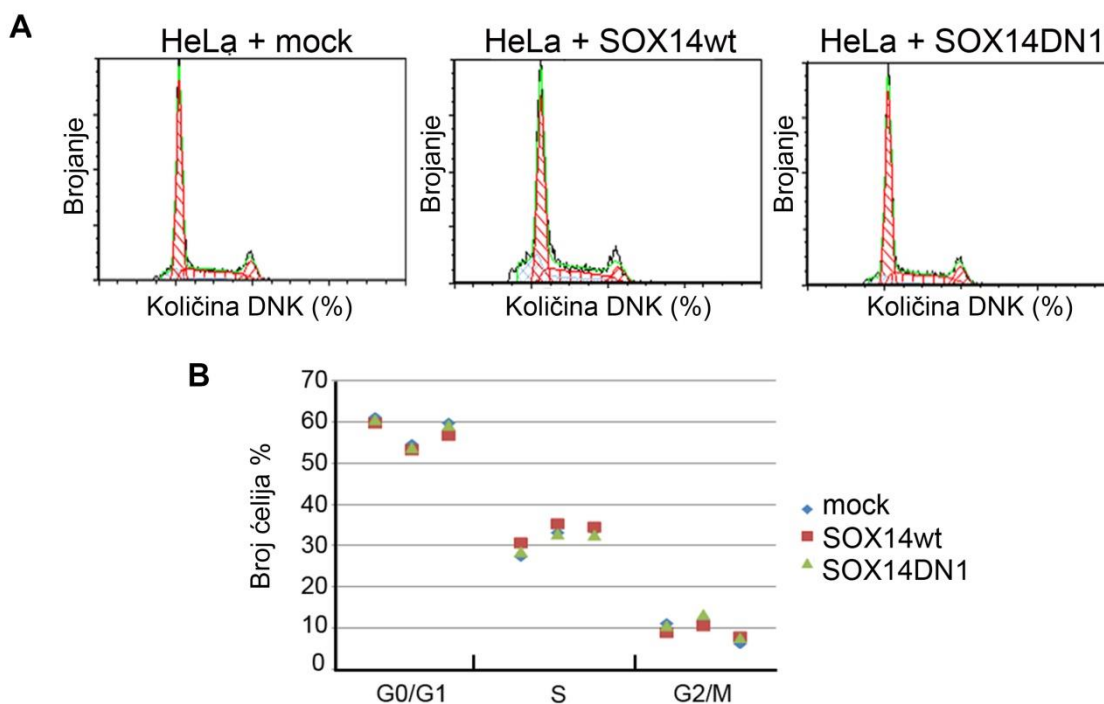


**Slika 48: Uticaj povećane ekspresije SOX14wt i SOX14DN1 ekspresionih konstrukata na proliferaciju HeLa ćelija.** Proliferacija je praćena testom koji se zasniva na redukciji MTS tetrazolijum jedinjenja 24h nakon transfekcije ćelija pcDNA3.1 (mock) vektorom, SOX14wt ili SOX14DN1 ekspresionim konstruktom. Vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost  $\pm$  SEM najmanje tri nezavisna eksperimenta. Srednje vrednosti su upoređene Studentovim t-testom. Vrednost  $p \leq 0.001$  označena je \*\*\*.

#### 4.2.9. Uticaj povećane ekspresije SOX14 proteina na ćelijski ciklus HeLa ćelija

Ćelijski ciklus se sastoji iz četiri faze: M, G1, S i G2. Tokom M faze odigravaju se mikroskopom najuočljiviji događaji poput podele jedra i ćelije. U toku S faze se odvija replikacija, odnosno sinteza jedarne DNK, dok G1 i G2 faza predstavljaju “međufaze” (eng. *gap*) bez makroskopski vidljivih promena, u okviru kojih se ćelija priprema za deobu uvećavajući količinu ćelijskih organela i ćelijske mase. Svaka faza ćelijskog ciklusa je strogo kontrolisana mrežom različitih signalnih molekula koji obezbeđuju pravilnost u napredovanju ćelijskog ciklusa.

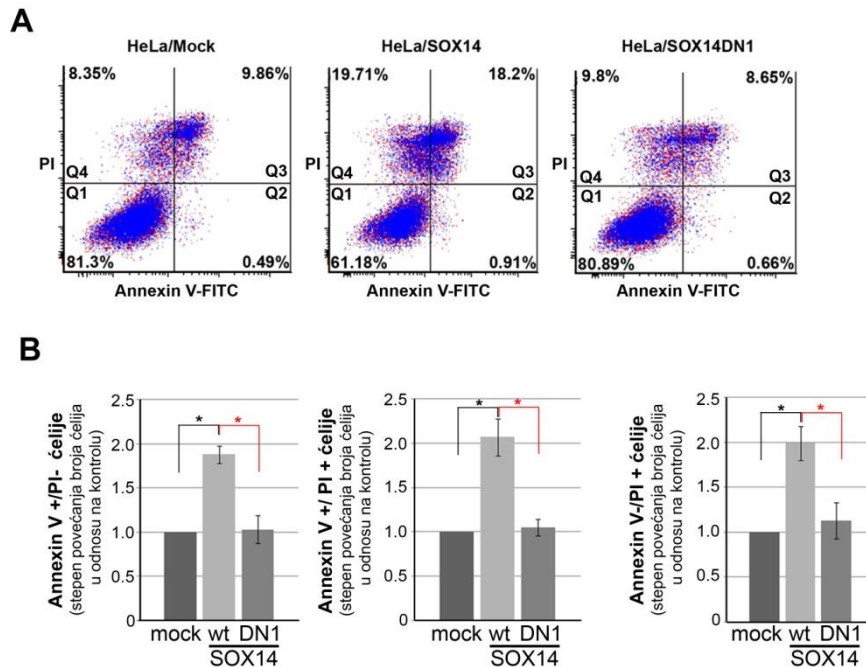
Kako bi se ispitalo da li povećana ekspresija gena *SOX14* utiče na odvijanje ćelijskog ciklusa, HeLa ćelije su transfektovane sa pcDNA3.1 vektorom (mock), SOX14wt ili SOX14DN1 ekspresionim konstruktom. 24h nakon transfekcije metodom protočne citometrije analiziran je ćelijski ciklus transfektovanih ćelija. Ova analiza je pokazala da je usled povećane ekspresije SOX14wt došlo do blagog povećanja broja ćelija u S fazi, kao i do smanjenja broja ćelija u G2/M fazi ćelijskog ciklusa (Slika 49). Povećana ekspresija SOX14DN1 nije uticala na odvijanje ćelijskog ciklusa u HeLa ćelijama (Slika 49). Na osnovu dobijenih rezultata došlo se do zaključka da povećana ekspresija SOX14 proteina dovodi do zaustavljanja ćelija u S fazi, što znači da izvestan broj ćelija nije nastavio ćelijski ciklus u pravcu deobe.



**Slika 49: Uticaj povećane ekspresije SOX14wt na ćelijski ciklus HeLa ćelija.** Metodom protočne citometrije 24h nakon transfekcije HeLa ćelija pcDNA3.1 vektorom (mock), SOX14wt ili SOX14DN1 ekspresionim konstruktom analiziran je broj ćelija u svakoj od faza ćelijskog ciklusa na osnovu količine DNK. **A** – reprezentativna slika kvantifikacije DNK sadržaja predstavljena je kvadrantima. **B** – Rezultati tri nezavisna eksperimenta prikazani su na grafikonu kao *dot plot*.

#### 4.2.10. Uticaj povećane ekspresije SOX14 proteina na apoptozu

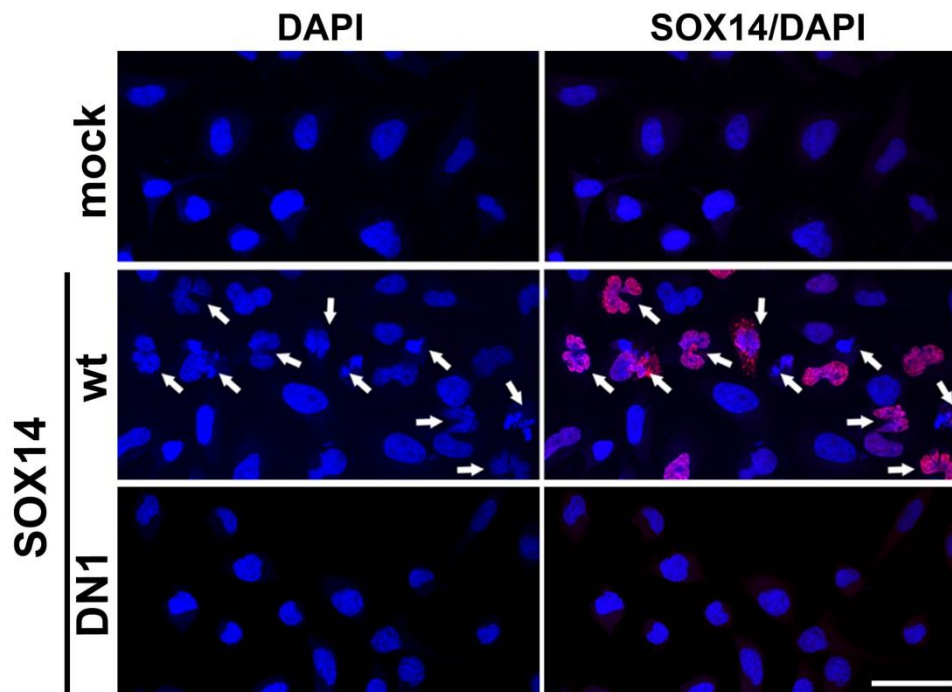
Jedan od mehanizama eliminacije malignih ćelija iz organizma odvija se putem ćelijske smrti. U literaturi je poznato da tumor supresor geni često obavljaju svoju funkciju upravo regulacijom procesa kontrolisane ćelijske smrti. Kako bi se utvrdilo da li povećana ekspresija SOX14 utiče na ćelijsku smrt, HeLa ćelije su transfektovane praznim vektorom, SOX14wt ili SOX14DN1 ekspresionim konstruktima. 48h nakon transfekcije ćelije su analizirane protočnom citometrijom korišćenjem FITC konjugovanog antitela - Annexin V koje specifično prepoznaje fosfatidilserin na površini ćelijske membrane i bojenjem propidijum jodidom (PI). Fosfatidilserin je fosfolipidna komponenta, koja je obično prisutna na unutrašnjoj (citosolnoj) strani ćelijske membrane. Kad ćelija podleže apoptozi, fosfatidilserin nije više ograničen na citosolni deo membrane, nego postaje izložen na površini ćelije (Verhoven et al. 1995). PI je fluorescentan interkalirajući agens koji se koristi za bojenje ćelija. Propidijum jodid ne može da prođe kroz membranu živih ćelija, što ga čini korisnim u pravljenju razlike između nekrotičnih, apoptotičnih i zdravih ćelija (Vermes et al. 1995). Dvostruko bojenje ćelija sa Annexin V-FITC i propidijum jodidom (PI) je pokazalo da je povećana ekspresija SOX14wt dovela do povećanja broja ćelija koje su imale odlike ćelijske smrti (Slika 50). Rezultati dobijeni na protočnom citometru su pokazali da je nakon transfekcije HeLa ćelija SOX14wt ekspresionim konstruktom došlo do porasta broja ćelija u ranim fazama (Q2 kvadrant na Slici 50A) i kasnim fazama apoptoze (Q3 kvadrant na Slici 50A), kao i do povećanja broja mrtvih ćelija (Q4 kvadrant na Slici 50A) u odnosu na HeLa ćelije transfektovane pcDNA3.1 ekspresionim vektorom (Slika 50A). Statistička obrada dobijenih rezultata je pokazala da je broj ćelija u ranoj apoptozi (označene na grafiku kao Annexin V +/PI-), broj ćelija u kasnoj apoptozi (prikazane na grafiku kao Annexin V +/PI+), kao i broj nekrotičnih ćelija obojen samo propidium jodidom (prikazane na grafiku kao Annexin V-/PI+) bio dva puta veći nakon povećane ekspresije SOX14 proteina u HeLa ćelijama (Slika 50B). U isto vreme, u prisustvu SOX14DN1 ekspresionog konstrukta nije došlo do promene u broju ćelija sa odlikama ćelijske smrti (Slika 50-A i B). Rezultati dobijeni analizom ćelijske smrti na protočnom citometru su pokazali da je povećana ekspresija SOX14 proteina dovela do indukcije ćelijske smrti u HeLa ćelijama.



**Slika 50: Uticaj povećane ekspresije SOX14wt i SOX14DN1 na ćelijsku smrt.** Ćelijska smrt je analizirana 48h nakon transfekcije ćelija pcDNA3.1 ekspresionim vektorom (mock), SOX14wt ili SOX14DN1ekspresionim konstruktom. **A** – Ćelije su dvostruko bojene Annexin V –FITC i propidijum jodidom (PI) i analizirane metodom protočne citometrije. Jedna reprezentativna slika je predstavljena kvadrantima. **B**– Rezultati kvantitativne analize Annexin V i PI pozitivnih ćelija su predstavljeni grafikom na kome su prikazane srednje vrednosti  $\pm$  SEM najmanje tri nezavisna eksperimenta. Promene u broju ćelija sa odlikama ćelijske smrti prikazane su u odnosu na ćelije transfektovane pcDNA3.1 ekspresionim vektorom (mock) kojima je dodeljena vrednost 1. Q4-PI+ ćelije; Q3-PI+/Annexin V+ ćelije; Q1 – PI-/AnnexinV- ćelije; Q2 – Annexin V+ ćelije. Srednje vrednosti su upoređene Studentovim t-testom. Vrednost  $p \leq 0.05$  označena je \*.

Naredni korak bio je analiza uticaja povećane ekspresije SOX14 proteina na apoptozu praćenjem morfoloških promena na jedrima. HeLa ćelije su transfektovane sa pcDNA3.1 ekspresionim vektorom (mock), SOX14wt ili SOX14DN1 ekspresionim konstruktom i bojene DAPI bojom koja ima sposobnost vezivanja za AT regione u molekulu DNK i na taj način boji hromatin. Posmatranjem jedara koja su obojena DAPI bojom, primećeno je da fragmentisana jedra karakteristična za proces apoptoze, koja nisu uočena kod kontrolnih ćelija (ćelije transfektovane sa pcDNA3.1 ekspresionim vektorom - mock), imaju povećanu ekspresiju SOX14 proteina (Slika 51). Kod ćelija transfektovanih sa SOX14DN1 nisu uočena ovakva fragmentisana jedra (Slika 51).

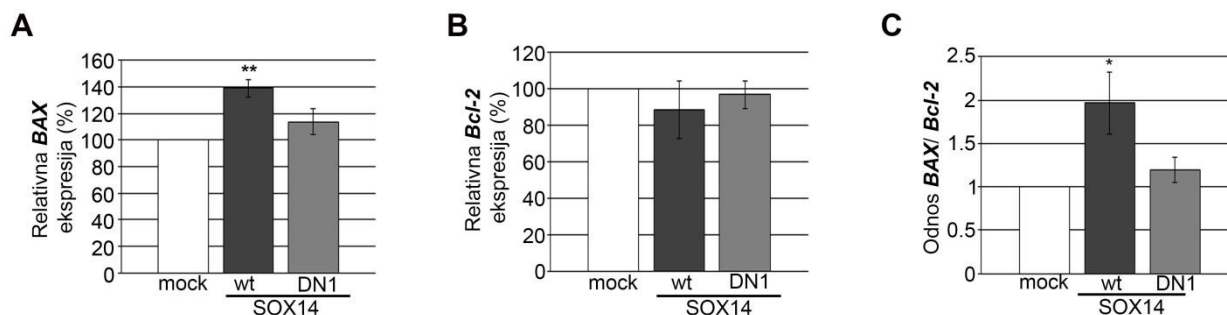
Ovim rezultatima je na još jedan način pokazano da povećana ekspresija SOX14 proteina indukuje proces ćelijske smrti.



**Slika 51: Uticaj povećane ekspresije SOX14 na pojavu morfoloških promena u jedrima HeLa ćelija.** Morfologija jedara je analizirana 24h nakon transfekcije ćelija pcDNA3.1 ekspresionim vektorom (mock), SOX14wt ili SOX14DN1 ekspresionim konstruktom. Ćelije su bojene DAPI bojom i morfološke promene jedara su zabeležene konfokalnim mikroskopom. Povećana ekspresija SOX14 proteina detektovana je antitelom specifičnim za SOX14 (crveni signal). Fragmentisana/apoptotska jedra obeležena su strelicom. Razmernik je 50  $\mu$ M.

Da bi se dodatno razjasnili proapoptotski mehanizmi delovanja povećane ekspresije SOX14 proteina na ćelijsku smrt HeLa ćelija, analizirana je ekspresija članova porodice gena *Bcl-2* koji regulišu proces apoptoze: pro-apoptotskog gena *BAX* i anti-apoptotskog gena *Bcl-2*. Rezultati dobijeni metodom qRT-PCR su pokazali da je povećana ekspresija SOX14 proteina dovela do značajnog povećanja ekspresije gena *BAX* (Slika 52A), dok je ekspresija gena *Bcl-2* ostala nepromenjena (Slika 52B). To je dovelo do povećanja odnosa *BAX/Bcl-2* gena (Slika 52C). Povećani odnos *BAX/Bcl-2* gena u ćeliji je poznati indikator ulaska ćelije u proces apoptoze (Salakou et al. 2007). S

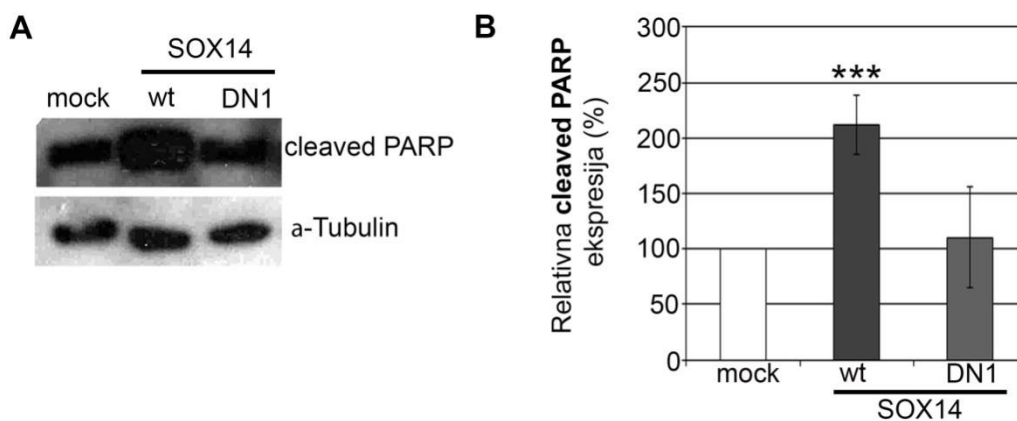
obzirom da SOX14DN1 nije imao uticaja na ćelijsku smrt, potvrđeno je da SOX14DN1 nema uticaja na ekspresiju gena *BAX* i *Bcl-2*, kao ni na odnos ova dva gena (Slika 52).



**Slika 52: Analiza uticaja povećane ekspresije SOX14 proteina na ekspresiju apoptotskih gena *BAX* i *Bcl-2*.** Metodom qRT-PCR analizirana je ekspresija gena *BAX* i *Bcl-2*, pri čemu je ispitan i izmeren njihov odnos 24h nakon transfekcije Hela ćelija pcDNA3.1 vektorom (mock), SOX14wt ili SOX14DN1 (DN1) ekspresionim konstruktom. Svi uzorci su testirani u triplikatu. Kvantifikacija rezultata dobijenih metodom qRT-PCR je predstavljena graficima. Relativna ekspresija gena *BAX* i *Bcl-2* u ćelijama transfektovanim SOX14wt ili SOX14DN1 ekspresionim konstruktom upoređena je u odnosu na ekspresiju ovih gena u ćelijama transfektovanim sa praznim vektorom kojem je data vrednost 100%. Na graficima su prikazane srednje vrednosti  $\pm$  SEM najmanje tri nezavisna eksperimenta. Srednje vrednosti su upoređene Studentovim t-testom. Vrednost  $p \leq 0.05$  označena je \*, vrednost  $p \leq 0.01$  označena je \*\*.

Poznato je da tokom procesa apoptoze najčešće dolazi do kaskadne aktivacije gena iz familije cisteinil-aspartat proteaza (kaspaza) (Li and Yuan 2008). Aktivacijom kaspaza dolazi do oslobađanja sečenog oblika PARP-a čime se dalje indukuje apoptoza. Oslobađanje PARP-a smatra se markerom ćelijske smrti (Oliver et al. 1998). Radi dodatne potvrde o indukciji ćelijske smrti u prisustvu povećane ekspresije SOX14wt proteina analizirana je i količina markera ćelijske smrti PARP. Rezultati dobijeni Western blot metodom, korišćenjem specifičnog antitela za PARP, su pokazali da je došlo do povećanja količine oslobođenog PARP proteina u ćelijama koje su transfektovane sa SOX14wt ekspresionim konstruktom (Slika 53). U ovom eksperimentu je izostao efekat SOX14DN1 ekspresionog konstrukta na količinu PARP proteina (Slika 53).





**Slika 53: Uticaj povećane ekspresije SOX14wt naprisustvo sečenog oblika PARP proteina. A-** Western blot analiza ekspresije sečenog oblika proteina PARP 24h nakon transfekcije HeLa ćelija pcDNA3.1 vektorom (mock), SOX14wt ili SOX14DN1ekspresionim konstruktom. **B-** Relativna količina proteina Western blot analize je kvantifikovana ImageJ softverom. Vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost  $\pm$  SEM najmanje tri nezavisna eksperimenta. Relativna ekspresija sečenog oblika PARP proteina prikazana je u odnosu na ekspresiju u mock transfektovanim ćelijama kojoj je dodeljena vrednost 100%. Srednje vrednosti su upoređene Studentovim t-testom. Vrednost  $p \leq 0.001$  označena je \*\*\*.

Svi rezultati dobijeni praćenjem ćelijske smrti, uključujući protočnu citometriju, morfologiju jedara i analizu ekspresije apoptotskih markera, su ukazali da je usled povećane ekspresije SOX14 proteina u HeLa ćelijama dolazi do indukcije ćelijske smrti. Zbog toga je pažnja u daljim istraživanjima bila usmerena na analizu uticaja povećane ekspresije SOX14 na gene uključene u regulaciju ovog procesa.

#### 4.2.11. *In silico* analiza promotora humanog gena *TP53*

Gen *TP53* kodira jedan od najvažnijih proteina koji reguliše mnoge ćelijske procese, kao što su ćelijska smrt i ćelijski ciklus. Njegova aktivacija u prisustvu različitih stresora obezbeđuje očuvanje integriteta DNK i zbog toga se smatra glavnim čuvarom genoma. U najvećem broju slučajeva tumori nastaju kao posledica mutacija i nepravilnog funkcionisanja p53 transkripcionog regulatora, ujedno i najpoznatijeg tumor supresora u genomu. Zbog toga je aktivnost gena *TP53* strogo kontrolisana.

Imajući u vidu da su prethodni rezultati pokazali da SOX14 indukuje ćelijsku smrt čiji je glavni regulator upravo p53, naredni cilj je bio da se ispita da li SOX14 direktno reguliše gen *TP53*. Prvi korak je bio da se ispita da li se u promotoru gena *TP53* nalaze potencijalna vezivna mesta za SOX14. *Online* dostupni program JASPAR (<http://jaspar.genereg.net/>) (Mathelier et al. 2016) je pokazao da su u okviru promotor gena *TP53* (Tuck and Crawford 1989) prisutna dva potencijalna vezivna mesta za SOX14 (Slika 54). U literaturi je poznato da p53 ima sposobnost autoregulacije (Deffie et al. 1993). *In silico* analiza je pokazala da se vezivno mesto za p53 nalazi između dva vezivna mesta za SOX14 u okviru promotor gena *TP53* (Slika 54).

```

-344 TAGACTTTTGGAGAAGCTCAAAACTTTTGTAGCGCCAGTCTTGAGCACATGGGAG
GGGAAAACCCCAATCCCATCAACCCCTGCGAGGCTCCTGGCACAAAGCTGGA
CAGTCGCCATCACAGTAAGCCCAAGTAATCCGCCTGCCGGAGGAAGCAAAG
GAAATGGAGTTGGGGAGGAGGGTGCAGAGTCAGGATTCTCGCCGACCTGGTG
CCGTAGATACTAACATTTTGGGGTGGAAAATTCTGCAAGCCAGAGCTGTGAG
GGCAGAATTGGTGGAAATCATTTTGGAGGAATCCTGCATTGTGTCAAATATG
AAGGGTGGGAAGGAAGAAAGCTTTTGCCTTGTCTCAGCTGGAT +12

```

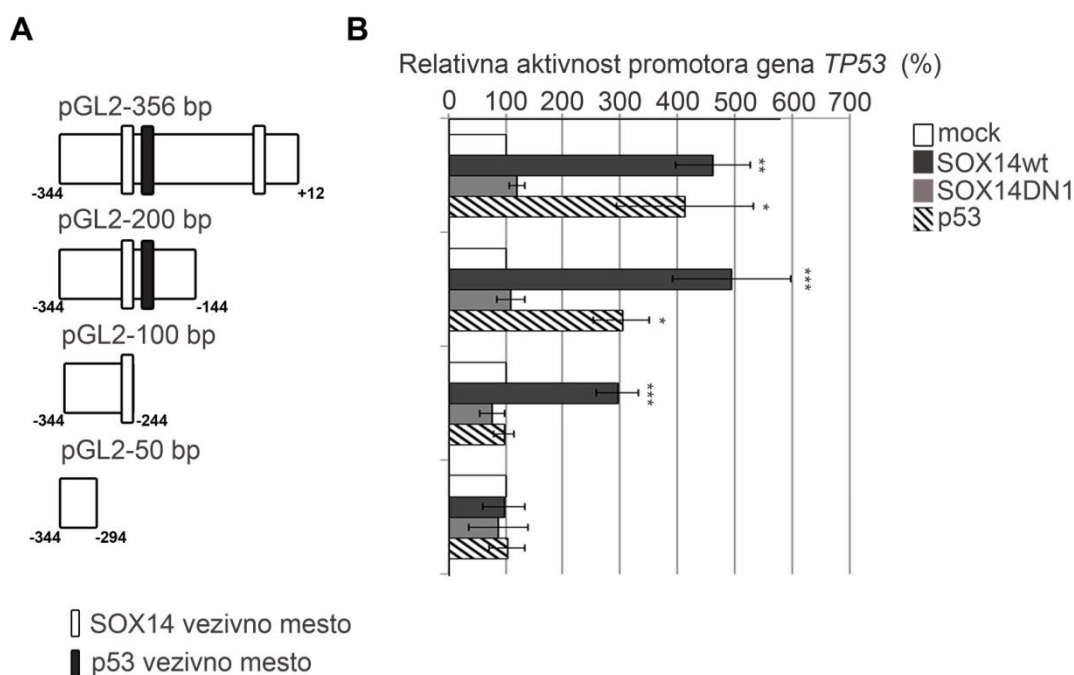
SOX14 vezivno mesto  
 p53 vezivno mesto

**Slika 54: Sekvenca promotora humanog gena *TP53*.** Promotorski region humanog gena *TP53* na poziciji od -344 do +12 u odnosu na start transkripcije sadrži 2 vezivna mesta za SOX14 transkripcioni regulator (uokvirena belim pravougaonikom) i jedno p53 vezivno mesto (uokvireno crnim pravougaonikom). Sekvence jezga vezivnih mesta su podvučene crtom.

#### 4.2.12. Uticaj povećane ekspresije SOX14 proteina na aktivnost promotora gena *TP53* u HeLa ćelijama

Sledeći korak je bila analiza uticaja povećane ekspresije SOX14 transkripcionog regulatora na aktivnost promotora humanog gena *TP53*. U te svrhe je urađen funkcionalni esej korišćenjem četiri deleciona konstrukta koji sadrže različite regione promotora gena *TP53* uklonirane uzvodno od reporter gena za luciferazu (Slika 55A). Konstrukt pGL2-356bp obuhvata fragment promotora gena *TP53* na poziciji od -344 do +12 u odnosu na start transkripcije i sadrži oba vezivna mesta za SOX14 i jedno

vezivno mesto za p53 (Slika 55A). Delecioni konstrukt pGL2-200bp obuhvata region promotora gena *TP53* na poziciji od -344 do -144 u odnosu na start transkripcije i sadrži jedno vezivno mesto za SOX14 i jedno vezivno mesto za p53 (Slika 55A). Delecioni konstrukt pGL2-100bp obuhvata region promotora gena *TP53* na poziciji od -344 do -244 u odnosu na start transkripcije i sadrži jedno vezivno mesto za SOX14, dok delecioni konstrukt pGL2-50bp obuhvata region promotora gena *TP53* na poziciji od -344 do -294 u odnosu na start transkripcije i ne sadrži vezivna mesta za SOX14 i p53 (Slika 55A). Na Slici 55B prikazani su rezultati dobijeni u eksperimentima ko-transfekcije HeLa ćelija sa kontrolnim pcDNA3.1 vektorom (mock), SOX14wt ili SOX14DN1 ekspresionim konstruktima i jednog od četiri *TP53* promotorska konstrukta – pGL2-356bp, pGL2-200bp, pGL2-100bp ili pGL2-50bp. Rezultati su pokazali da je povećana ekspresija SOX14 proteina dovela do povećanja aktivnosti sva tri deleciona konstrukta promotora gena *TP53* koja sadrže bar jedno vezivno mesto za SOX14 (pGL2-356bp, pGL2-200bp i pGL2-100bp konstrukt), pri čemu je veća aktivnost promotora gena *TP53* detektovana sa konstruktima koji imaju dva vezivna mesta za SOX14 (pGL2-356bp i pGL2-200bp konstrukt) (Slika 55B). Usled povećane ekspresije SOX14 proteina izostala je aktivnost promotora gena *TP53* koji ne sadrži nijedno vezivno mesto za SOX14 (pGL2-50 bp konstrukt, Slika 55B). Sa druge strane SOX14DN1 ekspresioni konstrukt nije doveo do promene u aktivnosti delecioni konstrukta promotora humanog gena *TP53*, (Slika 55B). S obzirom da se u okviru promotora humanog gena *TP53* nalazi i vezivno mesto za p53 transkripcioni regulator, kao dodatna kontrola ovom eksperimentu u funkcionalnom eseju korišćen je i pcDNA3-p53WT konstrukt koji sadrži kompletan kodirajući region humanog gena *TP53*. Rezultati ovog funkcionalnog eseja su pokazali da je povećana ekspresija p53 proteina indukovala aktivnost konstrukata koji sadrže region promotora gena *TP53* sa vezivnim mestom za p53 (pGL2-356bp i pGL2-200bp konstrukt), dok je aktivacija izostala kod delecioni konstrukata koji ne sadrže vezivno mesto za p53 (pGL2-100bp i pGL2-50bp konstrukt) (Slika 55B).



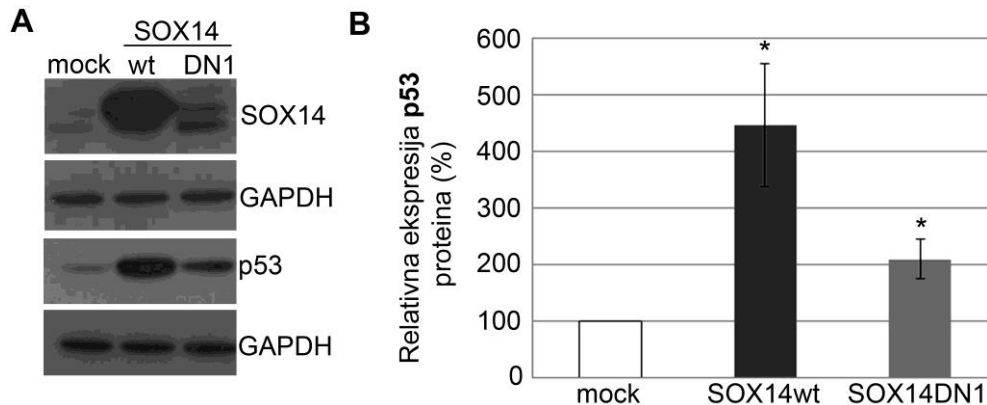
**Slika 55: Analiza uticaja SOX14 transkripcionog regulatora na aktivnost promotora gena *TP53*.**

**A** – Shematski prikaz delecionih konstrukata promotora gena *TP53* sa pozicijama u odnosu na start transkripcije. **B** – Statistička obrada rezultata dobijenih u funkcionalnom eseu. Prikazana je normalizovana luciferazna aktivnost *TP53* promotorskih konstrukata u ćelijama transfektovanim ekspresionim SOX14wt, SOX14DN1 ili p53 konstruktom u odnosu na luciferaznu aktivnost *TP53* promotorskih konstrukata u ćelijama transfektovanim sa kontrolnim pcDNA3.1 vektorom (mock) kojem je zadata vrednost 100%. Vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost ± SEM najmanje tri nezavisna eksperimenta. Srednje vrednosti su upoređene Studentovim t-testom. Vrednost  $p \leq 0.05$  označena je \*, vrednost  $p \leq 0.01$  označena je \*\*, vrednost  $p \leq 0.001$  označena je \*\*\*.

Rezultati dobijeni ovim funkcionalnim esejom u HeLa ćelijama pokazali su da povećana ekspresija SOX14 proteina ostvaruje aktivaciju promotora gena *TP53*. Dobijeni rezultati su ukazali da humani gen *TP53* može biti direktni ciljani gen SOX14 transkripcionog regulatora.

#### 4.2.13. Uticaj povećane ekspresije SOX14 na ekspresiju p53 proteina u HeLa ćelijama

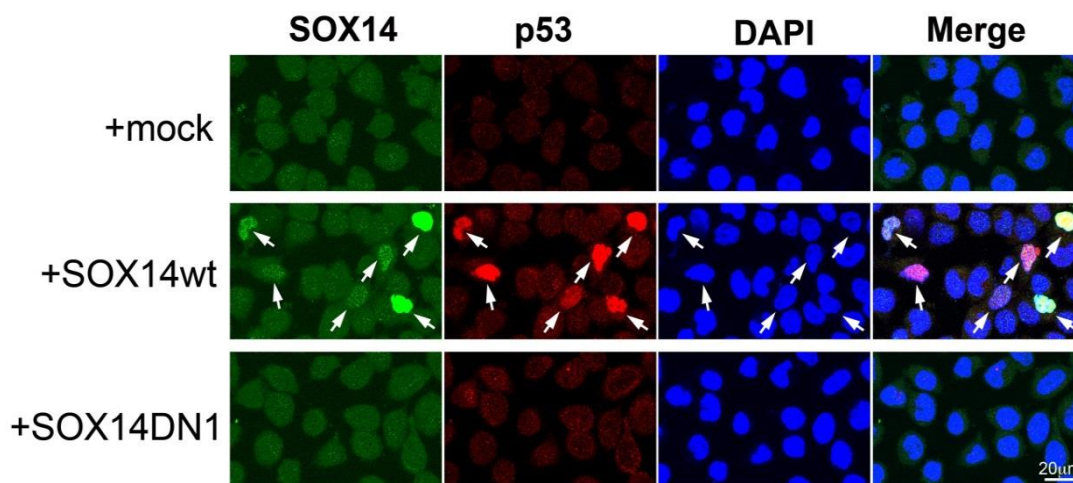
S obzirom da su prethodni eksperimenti pokazali da SOX14 dovodi do povećanja aktivnosti promotora gena *TP53*, naredni korak je bio da se proveriti da li povećana ekspresija SOX14 proteina dovodi i do povećanja nivoa p53 proteina u HeLa ćelijama. Poznato je da se u HeLa ćelijama nalazi *wt* forma gena *TP53* ali je zbog prisustva HPV virusnog proteina E6 nivo p53 proteina veoma nizak (Scheffner et al. 1993). Western blot metodom je prvo potvrđena uspešna ektopična ekspresija SOX14wt proteina (Slika 56A), a zatim je istom metodom analiziran nivo ekspresije p53 proteina (Slika 56A). Rezultati su pokazali da je povećana ekspresija SOX14 proteina dovela do povećanja p53 proteina i do 4 puta (Slika 56B). U prisustvu SOX14DN1 ekspresionog konstrukta je došlo do blagog povećanja nivoa p53 proteina u HeLa ćelijama (Slika 56), što ukazuje da SOX14DN1, kome nedostaje veći deo kompletnog C-terminalnog domena SOX14 proteina ima smanjeno aktivaciono svojstvo u odnosu na SOX14wt.



**Slika 56: Uticaj povećane ekspresije SOX14 na p53 protein u HeLa ćelijama.** **A** – Western blot analiza ekspresije SOX14 i p53 proteina 24h nakon transfekcije HeLa ćelija pcDNA3.1 vektorom (mock), SOX14wt ili SOX14DN1 ekspresionim konstruktom. **B** – Kvantifikacija Western blot rezultata. Količina proteina dobijena metodom Western blot je kvantifikovana ImageJ softverom. Vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost  $\pm$  SEM najmanje tri nezavisna eksperimenta. Srednje vrednosti su upoređene Studentovim t-testom. Vrednost  $p \leq 0.05$  označena je \*.

Kako bi se potvrdio dobijeni rezultat urađeno je i imunocitohemijsko bojenje, pri čemu je analiziran efekat povećane ekspresije SOX14 proteina na nivo p53 proteina u

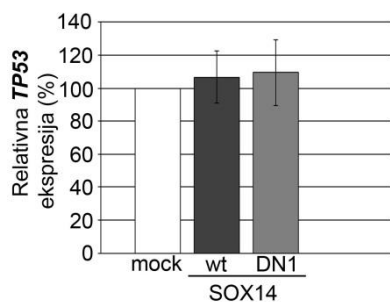
pojedinačnim ćelijama (Slika 57). Za ovaj eksperiment, HeLa ćelije su transfektovane pcDNA3.1 vektorom (mock), SOX14wt ili SOX14DN1 ekspresionim konstruktom. Rezultati su pokazali da na nivou pojedinačnih ćelija SOX14wt protein dovodi do povećanja nivoa p53 proteina u jedru, dok mutirana forma SOX14 proteina, SOX14DN1, ne menja nivo p53 proteina u jedrima HeLa ćelija (Slika 57).



**Slika 57: Analiza uticaja povećane ekspresije SOX14 na p53 protein u pojedinačnim ćelijama metodom imunocitohemije.** 24h posle transfekcije sa pcDNA3.1 vektorom (mock), SOX14wt ili SOX14DN1 ekspresionim konstruktom ćelije su fiksirane i na njima je urađeno imunocitohemijsko bojenje ćelija specifičnim antitelima za SOX14 (zeleni signal) i p53 (crveni signal). Jedra ćelija su obojena DAPI bojom koja specifično boji hromatin. Ćelije sa povećanom ekspresijom SOX14 i p53 proteina su obeležene strelicama. Razmernik je 20 μm

Na osnovu dobijenih rezultata zaključeno je da povećana ekspresija SOX14 proteina dovodi do povećanja nivoa p53 tumor supresora u HeLa ćelijama.

Istovremeno je analiziran efekat povećane ekspresije gena *SOX14* na transkripciju gena *TP53* metodom qRT-PCR-a. Dobijeni rezultat je pokazao da nakon povećane ekspresije SOX14 proteina nema promene u ekspresiji *TP53* na nivou iRNK (Slika 53).



**Slika 53: Analiza uticaja povećane ekspresije SOX14 proteina na ekspresiju gena *TP53*.**

Metodom qRT-PCR analizirana je ekspresija gena *TP53* 24h nakon transfekcije Hela ćelija pcDNA3.1 vektorom (mock), SOX14 wt ili SOX14DN1 ekspresionim konstruktom. Svi uzorci su testirani u triplikatu i u tri nezavisna eksperimenta transfekcije. Kvantifikacija rezultata dobijenih metodom qRT-PCR je predstavljena grafikom. Relativna ekspresija gena *TP53* u ćelijama transfektovanim ekspresionim SOX14wt ili SOX14DN1 upoređena je u odnosu na ekspresiju ovog gena u ćelijama transfektovanim sa praznim vektorom kojem je data vrednost 100%. Srednje vrednosti su statistički analizirane Studentovim *t*-testom.

Predhodno dobijeni rezultati funkcionalnog eseja ukazali su na to da u promotoru humanog gena *TP53* postoje regulatorni elementi za koje se najverovatnije vezuje SOX14 transkripcioni regulator i na taj način ostvaruje svoju funkciju. Međutim, analiza gena *TP53* na iRNK nivou je otkrila da SOX14 ne utiče na promenu u količini *TP53* transkripta u ćelijama, što je dalje dovelo do pretpostavke da SOX14 na neki drugi način dovodi do povećanja nivoa p53 proteina u HeLa ćelijama.

U literaturi je poznato da, kao odgovor na različite vidove stresa, dolazi do stabilizacije p53 proteina post-translacionim modifikacijama. Tako stabilisan p53 se akumulira u jedru gde funkcioniše kao transkripcioni regulator i ostvaruje ulogu tumor supresora u ćeliji (Marine et al. 2006).

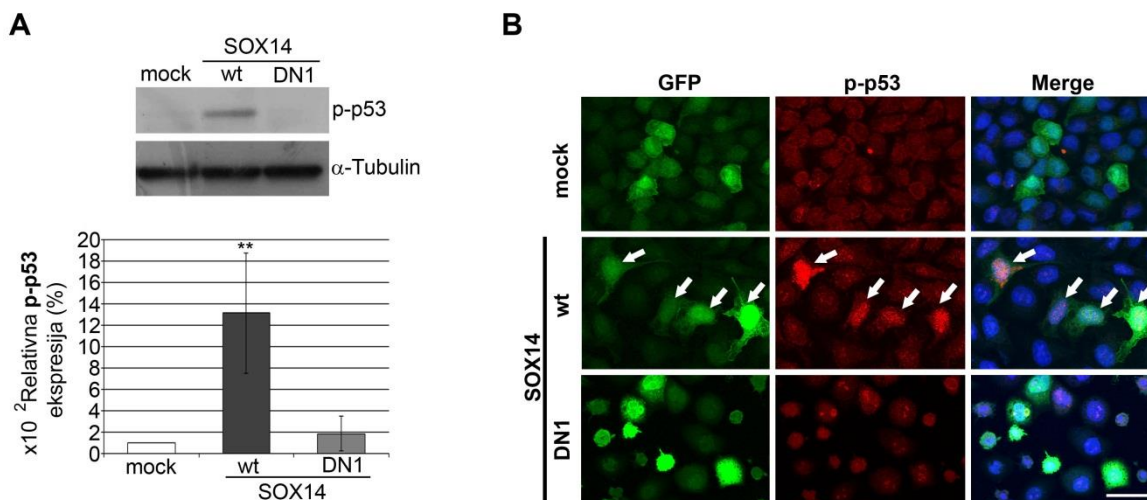
Imajući u vidu navedeno, dalja analiza je tekla u pravcu ispitivanja uticaja povećane ekspresije SOX14 proteina na stabilnost p53 tumor supresora.

#### **4.2.14. Uticaj povećane ekspresije SOX14 na nivo fosforilisane forme p53 proteina u HeLa ćelijama**

S obzirom da su rezultati qRT-PCR-a pokazali da SOX14 ne utiče na nivo transkripcije gena *TP53* iako dovodi do povećanja nivoa p53 proteina, u narednom koraku je ispitano da li povećana ekspresija SOX14 proteina utiče na stabilizaciju i aktivaciju p53 proteina. Prva otkrivena modifikacija Ser15 pokazala se kao ključna za funkcionisanje i stabilnost p53 proteina (Loughery et al. 2014). Kako bi se ispitao efekat SOX14 proteina na stabilnost p53 tumor supresora izolovani su ukupni proteini iz HeLa ćelija, u prisustvu inhibitora fosfataza, 24h nakon transfekcije praznim vektorom, SOX14wt ili SOX14DN1 ekspresionim konstruktom. Western blot urađen korišćenjem specifičnog antitela na fosfo-p53 (Ser15) je pokazao da povećana ekspresija SOX14 proteina dovodi do povećanja količine fosfo-p53 (Ser15) proteina i do 10 puta (Slika 59A). Nasuprot tome, transfekcija HeLa ćelija sa SOX14DN1 ekspresionim konstruktom nije dovela do promene u ekspresiji fosfo-p53 (Ser15) proteina (Slika 59A).



Zatim je metodom imunocitohemije analiziran efekat povećane ekspresije SOX14 proteina na nivo fosfo-p53 (Ser15) proteina u pojedinačnim ćelijama, 24h nakon transfekcije (Slika 59B). Rezultati ovog eksperimenta su pokazali da na nivou pojedinačnih ćelija SOX14wt protein dovodi do povećanja nivoa fosfo-p53 (Ser15) proteina u jedru, dok mutirana forma SOX14 proteina – SOX14DN1 nije uticala na nivo fosfo-p53 (Ser15) proteina u jedrima HeLa ćelija, kao što je i očekivano (Slika 59B).



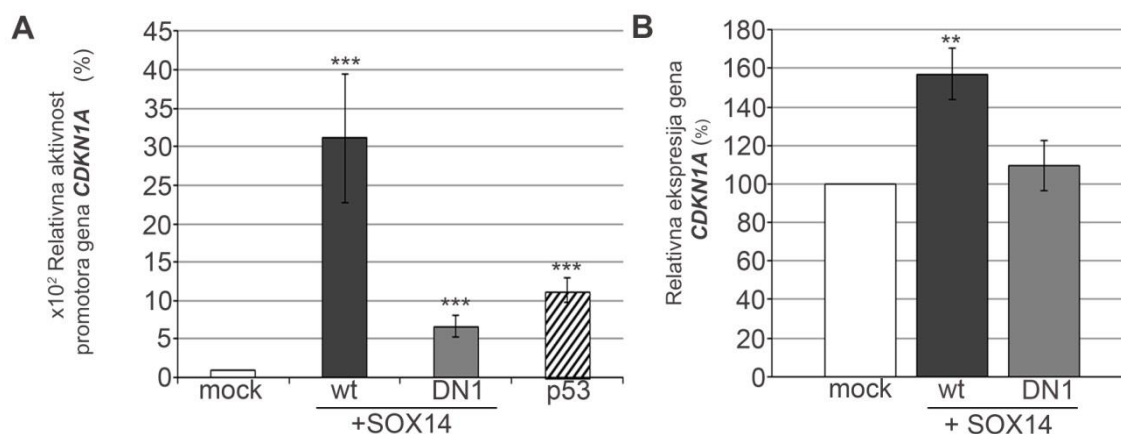
**Slika 59: Uticaj povećane ekspresije SOX14 na fosfo-p53 protein u HeLa ćelijama.** **A** – Western blot analiza ekspresije fosfo-p53 (Ser15) (p-p53) 24h nakon transfekcije HeLa ćelija pcDNA3.1 vektorom (mock), SOX14wt ili SOX14DN1 ekspresionim konstruktom.  $\alpha$ -Tubulin je korišćen kao kontrola ujednačenosti količine nanetih uzoraka. Količina proteina dobijena metodom Western blot je kvantifikovana ImageJ softverom. Vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost  $\pm$  SEM najmanje tri nezavisna eksperimenta. Srednje vrednosti su upoređene Studentovim t-testom. Vrednost  $p \leq 0.01$  označena je \*\*. **B** – Analiza ekspresije p53 metodom imunocitohemije. Ćelije su fiksirane 24h nakon ko-transfekcije pcDNA3.1 vektorom (mock), SOX14wt ili SOX14DN1 ekspresionim konstruktom i pEGFP-C1 ekspresionim konstruktom koji eksprimira zeleni fluerescirajući protein (GFP). Imunocitohemijsko bojenje ćelija rađeno je u prisustvu specifičnog antitela na fosfo-p53 (Ser15) (crveni signal). Ćelije sa zelenim signalom (GFP) predstavljaju ćelije u kojima je transfektovan SOX14wt, odnosno SOX14DN1 ekspresioni konstrukt, dok su jedra ćelija obojena DAPI bojom (plavo). Ćelije sa zelenim signalom (GFP) imunopozitivne na fosfo-p53 (Ser15) su obeležene strelicama. Razmernik je 20  $\mu$ m.

#### 4.2.15. Uticaj povećane ekspresije SOX14 proteina na transkripciju gena *CDKN1A* u HeLa ćelijama

Kako bi se potvrdilo da je stabilizacija p53 proteina u prisustvu SOX14 proteina dovela i do njegove aktivacije, naredni korak u istraživanju je bio da se analizira uticaj povećane ekspresije SOX14 na poznate p53 ciljne gene. p53 svoju ključnu ulogu tumor supresora obavlja pomoću regulatorne mreže koju čini veliki broj gena koji su direktno regulisani od strane p53 transkripcionog regulatora (Menendez et al. 2009). Među najviše izučenim ciljnim genima p53 proteina je i gen *CDKN1A*. Ovaj gen kodira inhibitor ciklin-zavisnu kinazu p21<sup>Waf1/Cip1</sup> do čije sinteze dolazi usled aktivacije p53, što za posledicu ima zastoj u ćelijskom ciklusu (el-Deiry et al. 1993).

U cilju ispitivanja povećane ekspresije SOX14 proteina na ekspresiju *CDKN1A*/p21<sup>Waf1/Cip1</sup>, prvo je ispitan efekat povećane ekspresije SOX14 proteina na aktivnost promotor gena *CDKN1A*. Kao dodatna kontrola ovom eksperimentu u funkcionalnom eseju korišćen je ipcDNA3-p53WT konstrukt koji sadrži kompletan kodirajući region humanog gena *TP53*. Rezultati dobijeni funkcionalnim esejom su grafički predstavljani na Slici 60A. Ovi rezultati su pokazali da je SOX14wt povećao aktivnost promotora gena *CDKN1A* oko 30 puta (Slika 60A), dok je SOX14DN1 doveo do povećanja aktivnosti promotora gena *CDKN1A* oko šest puta (Slika 60A). Povećana ekspresija p53 proteina je povećala aktivnost promotora gena *CDKN1A* oko 10 puta, što je znatno slabije u odnosu na aktivnost promotora gena *CDKN1A* usled povećane ekspresije SOX1wt proteina (Slika 60A).

Nakon transfekcije HeLa ćelija pcDNA3.1 vektorom (mock), SOX14wt ili SOX14DN1 ekspresionim konstruktom analizirana je ekspresija gena *CDKN1A* na nivou iRNK. Rezultati ove analize su pokazali da nakon povećane ekspresije SOX14wt proteina dolazi do porasta količine transkripta *CDKN1A* za oko 60% (Slika 60B). Istovremeno, SOX14DN1 nije imao efekat na nivo iRNK ovog gena (Slika 60B).

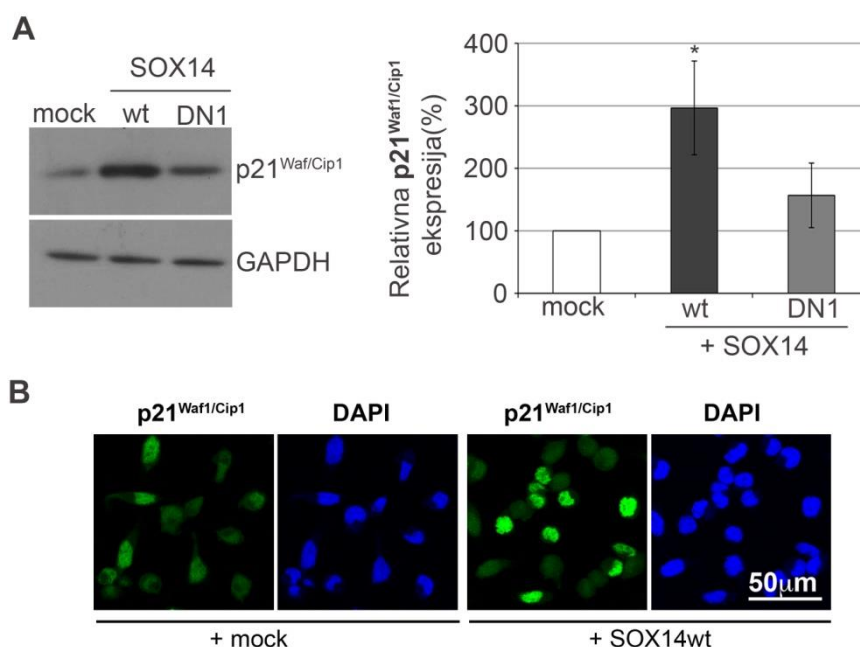


**Slika 60: Uticaj povećane ekspresije SOX14 proteina na transkripciju *CDKN1A*.** **A** – Analiza aktivnosti promotor gena *CDKN1A* u prisustvu pcDNA3.1 vektora (mock), SOX14wt, SOX14DN1, ili p53 ekspresionim konstruktom. Luciferazna aktivnost p21-Luc konstrukta u ćelijama transfektovanim ekspresionim SOX14wt, SOX14DN1, ili p53 konstruktom je normalizovana u odnosu na luciferaznu aktivnost p21-Luc konstrukta u ćelijama transfektovanim sa praznim vektorom kojem je zadana vrednost 1. Vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost  $\pm$  SEM najmanje tri nezavisna eksperimenta. Srednje vrednosti su upoređene Studentovim t-testom, a vrednost  $p \leq 0.001$  označena je \*\*\*. **B** – Analiza ekspresije gena *CDKN1A* metodom qRT-PCR. Analiza je sprovedena 24h nakon transfekcije HeLa ćelija praznim vektorom (mock), SOX14 wt ili DN1 ekspresionim konstruktom. Svi uzorci su analizirani u triplikatu i u tri nezavisna eksperimenta transfekcije. Kvantifikacija rezultata dobijenih metodom qRT-PCR je predstavljena grafikom. Relativna ekspresija gena *CDKN1A* u ćelijama transfektovanim ekspresionim SOX14wt ili SOX14DN1 upoređena je u odnosu na ekspresiju ovog gena u ćelijama transfektovanim sa praznim vektorom kojem je zadana vrednost 100%. Srednje vrednosti su upoređene Studentovim t-testom. Vrednost  $p \leq 0.01$  označena je \*\*.

#### 4.2.16. Uticaj povećane ekspresije SOX14 proteina na ekspresiju p21<sup>Waf1/Cip1</sup> proteina u HeLa ćelijama

Imajući u vidu da je povećana ekspresija SOX14 proteina imala aktivacioni efekat na transkripciju gena *CDKN1A*, u narednom koraku je analizirano da li povećana ekspresija SOX14 proteina dovodi do povećane ekspresije p21<sup>Waf1/Cip1</sup> proteina u HeLa ćelijama. U tu svrhu urađen je eksperiment tranzijente transfekcije pcDNA3.1 vektora (mock), SOX14wt ili SOX14DN1 ekspresionog konstrukta u HeLa ćelijama.

Western blot analiza je pokazala da je usled povećane ekspresije SOX14 proteina došlo do povećanja ekspresije p21<sup>Waf1/Cip1</sup> proteina za oko 3 puta (Slika 61A). Za razliku od transfekcije sa SOX14wt konstruktom, povećanje nivoa p21<sup>Waf1/Cip1</sup> proteina je izostalo nakon transfekcije sa DN1 mutiranom formom SOX14 proteina (Slika 61A). Uticaj povećane ekspresije SOX14 proteina na nivo p21<sup>Waf1/Cip1</sup> proteina U HeLa ćelijama je dodatno potvrđen metodom imunocitohemijskog bojenja (Slika 61B). Dobijeni rezultati su pokazali da je došlo do povećanja nivoa p21<sup>Waf1/Cip1</sup> proteina na nivou pojedinačnih ćelija nakon transfekcije HeLa ćelija sa SOX14wt ekspresionim konstruktom (Slika 61B).



**Slika 61: Uticaj povećane ekspresije SOX14 na p21<sup>Waf1/Cip1</sup> protein u HeLa ćelijama.** **A** – Analiza ekspresije p21<sup>Waf1/Cip1</sup> Western blot metodom. Ukupni ćelijski proteini su izolovani 24h nakon transfekcije HeLa ćelija pcDNA3.1 vektorom (mock), SOX14wt ili SOX14DN1 ekspresionim konstruktom. Količina proteina dobijena metodom Western blot je kvantifikovana ImageJ softverom. Vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost ± SEM najmanje tri nezavisna eksperimenta. Srednje vrednosti su upoređene Studentovim *t*-testom. Vrednost  $p \leq 0.05$  označena je \*. **B** – Analiza ekspresije p21<sup>Waf1/Cip1</sup> metodom imunocitohemije. Ćelije su fiksirane 24h nakon transfekcije ćelija pcDNA3.1 vektorom (mock) ili SOX14wt ekspresionim konstruktom. p21<sup>Waf1/Cip1</sup> pozitivne ćelije detektovane su specifičnim antitelom za p21<sup>Waf1/Cip1</sup> (zeleni signal). Ćelije su takodje bojene DAPI bojom koja se specifično vezuje za hromatin. Razmernik je 50 μm.

Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da SOX14, osim što dovodi do povećanja nivoa aktivne, fosforilisane forme p53, dovodi do aktivacije i njegovog ciljnog gena *CDKN1A/p21<sup>Waf1/Cip1</sup>* što implicira aktivaciju p53 signalnog puta.

Dobijeni rezultati su od izuzetnog značaja jer je po prvi put opisano da SOX14 može imati tumor supresorsku funkciju u ćelijama poreklom od karcinoma grlića materice i to regulacijom p53 signalnog puta, jednog od najvažnijih signalnih puteva u ćeliji.

## 5. DISKUSIJA

### 5.1. Analiza ekspresije i uloge gena *SOX14/Sox14* tokom neuralne diferencijacije *in vitro*

#### 5.1.1. NT2/D1 i P19 ćelijske linije kao model sistemi za proučavanje neuralne diferencijacije *in vitro*

Neuralna diferencijacija je složen proces koji se odvija tokom embrionalnog razvića i koji vodi nastajanju najkompleksnijeg sistema u organizmu – nervnog sistema. Iako postoje brojne studije koje se bave analizom ovog procesa, još uvek postoje nepoznanice o genima i mehanizmima koji su uključeni u neuralnu diferencijaciju. Imajući u vidu moralne i etičke dileme vezano za upotrebu embrionalnih matičnih ćelija, embrionalne karcinomske ćelije, sa karakteristikama matičnih ćelija i potencijalom za neuralnu diferencijaciju, predstavljaju dobar model sistem za analizu ekspresije gena, kao i za proučavanje njihovih potencijalnih uloga tokom ovog procesa (Andrews 1998; Johnson et al. 1992; Przyborski et al. 2000). Rezultati dobijeni tokom izrade ove doktorske disertacije potvrdili su da embrionalne karcinomske linije NT2/D1 i P19 mogu biti dobar model sistem za praćenje procesa neuralne diferencijacije *in vitro*.

Praćenje morfologije ćelija i ekspresije odabranih markera tokom neuralne diferencijacije humane NT2/D1 i mišije P19 ćelijske linije *in vitro*, pokazalo je da se ove pluripotentne ćelije, tokom indukcije retinoičnom kiselinom, diferenciraju u neurone i astrocite, ćelije koje nastaju i tokom embrionalnog razvića *in vivo*. Nediferencirane NT2/D1 i P19 ćelije morfološki podsećaju na epitelijalne ćelije (Slika 22) i eksprimiraju OCT4 marker pluripotentnosti koji ima bitnu ulogu za održavanje ćelija u pluripotentnom stanju (Slika 30) (Boyer et al. 2005). Tokom diferencijacije, kod obe ćelijske linije dolazi do potpunog utišavanja ekspresije OCT4 proteina i porasta ekspresija  $\beta$ -III-Tubulina, markera postmitotičkih neurona, što ukazuje da su ove ćelije napustile stanje pluripotentnosti i ušle u proces diferencijacije (Slika 30) (Popovic et al. 2014). Analiza morfologije diferenciranih NT2/D1 i P19 ćelija pokazala je da su u

populaciji neurona (NT2-N i P19-N, Slika 22-C i F) prisutne ćelije sa sitnim ćelijskim telom sa kojeg polazi jedan ili više nastavaka koji formiraju mrežu koja morfološki podseća na sinapse koje neuroni formiraju *in vivo*. Analize ekspresije neuralnih markera je pokazala da ove ćelije eksprimiraju MAP2, marker zrelih neurona (Slike 23 i 25). Skoro polovinu NT2-N i P19-N populacije čine ćelije koje eksprimiraju MAP2 (Slike 24 i 26). Pored neurona, u ovim populacijama se nalazi i mali procenat astrocita koji eksprimiraju GFAP (Slike 23 i 25), kao i ćelije sa morfologijom karakterističnom za epitelijalne ćelije i bez ekspresije neuralnih markera MAP2 i GFAP (Slike 22, 23, 24, 25 i 26) (Popovic et al. 2014). Ovi rezultati potvrđuju da populacija nastala tokom procesa neuralne diferencijacije NT2/D1 i P19 ćelija *in vitro* predstavlja skup ćelija koje se međusobno razlikuju ne samo morfološki, već i po ekspresiji neuralnih markera. Literaturni podaci pokazuju da NT2/D1 diferencirani neuroni mogu da generišu akcioni potencijal, kao i da eksprimiraju i oslobađaju neurotransmitere, zbog čega mogu predstavljati značajan izvor neurona pogodnih za terapiju neuroloških oboljenja (Gonzalez-Burguera et al. 2016). Studije su pokazale da su astrociti dobijeni neuralnom diferencijacijom NT2/D1 ćelija funkcionalni i da pored GFAP eksprimiraju i druge markere glijalnih ćelija, kao što je Vimentin (Sandhu et al. 2002), dok ćelijama epiteloidnog oblika nije utvrđen pravi identitet (Przyborski et al. 2004). Za neurone koji se dobijaju indukcijom P19 ćelija retinoičnom kiselinom je pokazano da eksprimiraju neurotransmitere, generišu akcioni potencijal i formiraju sinapse i da mogu biti dobar *in vitro* model sistem za proučavanje regeneracije CNS-a (Takayama et al. 2011), dok je za astrocite dobijene diferencijacijom P19 pokazano da eksprimiraju nekoliko markera glijalnih ćelija (Belliveau et al. 1997; Halder et al. 2017).

Rezultati ovog istraživanja potvrđuju da se NT2/D1 i P19 ćelije, koje u nediferenciranom stanju imaju karakteristike pluripotentnih ćelija, tretmanom retinoičnom kiselinom diferenciraju u neurone i astrocite i da predstavljaju dobar model sistem za proučavanje neurogeneze sisara, što je u skladu sa literaturnim podacima (Andrews 1998; Monzo et al. 2012; Negraes et al. 2012; Przyborski et al. 2000). Saznanja dobijena analizom ekspresije i uloge gena na ovim model sistemima mogu dati uvid o potencijalnoj ulozi ispitanih gena u procesu neuralne diferencijacije.

### 5.1.2. Ekspresija gena *SOX14/Sox14* raste tokom neuralne diferencijacije NT2/D1 i P19 ćelija *in vitro*

*SOX14* je specifično eksprimiran u određenom setu neuralnih progenitora i neurona u mozgu. Prve studije su pokazale da se ovaj gen eksprimira samo u određenim, terminalno diferenciranim inhibitornim interneuronima u talamusu i kičmenoj moždini miša i pileta (Hargrave et al. 2000b; Uchikawa et al. 1999). Novija istraživanja su pokazala da se *Sox14* eksprimira i u progenitorskim ćelijama u rostralnom talamusu miša, od kojih će diferencijacijom nastati GABA-ergički inhibitorni neuroni, kao i u određenom podtipu GABA-ergičkih neurona (Sellers et al. 2014). U literaturi SOX14 je okarakterisan kao marker neurona (Butts et al. 2017; Delogu et al. 2012; Jager et al. 2016).

Analiza ekspresije SOX14 proteina u NT2/D1 i P19 ćelijama pokazala je da se SOX14 ekspirmira u nediferenciranim, pluripotentnim NT2/D1 i P19 ćelijama (Slike 27, 28, 31B i 32B). Zanimljivo je istaći da su ovi rezultati prvi put pokazali da se SOX14 eksprimira u pluripotentnim ćelijama, ukazujući da se njegova ekspresija ne može striktno vezati za terminalno diferencirane neurone (Popovic et al. 2014). Ipak, nakon indukcije ovih ćelija retinoičnom kiselinom došlo je do porasta ekspresije SOX14 proteina (Slike 27, 28, 31 i 32). S obzirom da je SOX14 ranije okarakterisan kao marker neurona, porast ekspresije ovog proteina tokom procesa neuralne diferencijacije *in vitro* je očekivan. Rezultati analize ekspresije Western blot metodom su pokazali da ekspresija SOX14 proteina raste tokom druge nedelje neuralne diferencijacije NT2/D1 ćelija *in vitro* (Slika 28). Druga nedelja tretmana RK-om NT2/D1 ćelija se karakteriše pojavom neuralnih progenitora koji su napustili ćelijski ciklus (Przyborski et al. 2000), što je u korelaciji sa literaturnim podacima koji pokazuju ekspresiju gena *SOX14* u neuralnim progenitorima (Sellers et al. 2014). Dobijeni rezultati su dalje pokazali da tokom neuralne diferencijacije NT2/D1 ćelija *in vitro*, SOX14 ima najviši nivo ekspresije u završnoj fazi indukcije retinoičnom kiselinom (NT2 4W) (Slike 27 i 28), dok tokom neuralne diferencijacije P19 ćelija *in vitro* SOX14 ima najviši nivo ekspresije u populaciji neurona (P19-N) (Slike 27 i 28) (Popovic et al. 2014). Imajući u vidu da je SOX14 eksprimiran u neuronima u mozgu miša i pileta i da se smatra markerom neurona, očekivano je da je njegova ekspresija visoka u završnim fazama



diferencijacije u kojima se javljaju neuroni. Razlika u ekspresiji SOX14 proteina kod mišjih i humanih ćelija može biti posledica primene različitih protokola za diferencijaciju navedenih ćelija ili usled činjenice da se neuronalne populacije NT2-N i P19-N razlikuju po tipu neurona (Popovic et al. 2014). Zapravo, dok se među diferenciranim NT2/D1 neuronima mogu naći različiti tipovi neurona, uključujući GABA-ergičke, glutamatergičke, kateholaminergičke, holinergičke, dopaminergičke i serotonergičke neurone (Coyle et al. 2011; Guillemain et al. 2000; Iacovitti et al. 2001; Schwartz et al. 2005; Yoshioka et al. 1997; Zeller and Strauss 1995), većina dobijenih neurona kod P19 ćelija su GABA-ergičkog tipa (60%), dok manji procenat eksprimira somatostatin (20%), neuropeptid Y (20%) i tiroksin hidroksilazu (1%) (McBurney 1993).

Rezultati dobijeni u ovom radu ukazuju da se SOX14 eksprimira kako u pluripotentim ćelijama, tako i u terminalno diferenciranim neuronima (Popovic et al. 2014). Dalje, rezultati pokazuju da ekspresija gena *SOX14/Sox14* raste tokom procesa neuralne diferencijacije *in vitro* i kod NT2/D1 i kod P19.

### **5.1.3. Usporedna analiza ekspresije gena *SOXB/SoxB* tokom neuralne diferencijacije *in vitro***

Ekspresioni profil gena *SOXB/SoxB* grupe tokom razvića CNS-a je uglavnom preklapajući i pokriva sve faze razvića, od neuralnih progenitorskih ćelija do neurona i glijalnih ćelija (Avilion et al. 2003; Pevny and Placzek 2005; Sarkar and Hochedlinger 2013; Schepers et al. 2002; Wood and Episkopou 1999). Za razliku od gena *Sox14* koji se specifično eksprimira samo u određenom setu neuralnih progenitora i neurona u mozgu, ostali članovi SOXB grupe imaju širu ekspresiju u CNS-u. Funkcionalne studije gena *SoxB* grupe su pokazale da ovi geni imaju bitnu ulogu tokom embrionalnog razvića. Zapravo, dok geni *SoxB1* tokom razvića CNS-a održavaju neuralne progenitore u proliferišućem stanju (Bylund et al. 2003; Holmberg et al. 2008; Oosterveen et al. 2013), *Sox21* promovise proces neurogeneze (Sandberg et al. 2005). Smatra se da gubitak ekspresije gena *Sox21* dovodi do predominantne ekspresije članova *SoxB1* grupe čime se sprečava embrionalna neurogeneza (Karnavas et al. 2013). Naime, međusobni odnos ekspresije gena *SoxB1* i *Sox21* i njihov fini balans tokom razvića

CNS-a, odlučuje da li će ćelija ostati na stupnju neuralnog progenitora ili će započeti proces neurogeneze (Sandberg et al. 2005). Na osnovu visoke homologije gena *SOX14* i *SOX21* i funkcionalnih studija o ulozi gena *Sox21* tokom neurogeneze, pretpostavljeno je da *Sox14* ima sličnu ulogu tokom embrionalnog razvića CNS-a (Sandberg et al. 2005). Za dalju analizu potencijalne uloge SOX14 tokom procesa neuralne diferencijacije NT2/D1 i P19 ćelija *in vitro*, važno je bilo analizirati i ekspresiju ostalih članova SOXB grupe u pomenutim model sistemima.

Tokom neuralne diferencijacije NT2/D1 i P19 ćelija *in vitro*, ekspresija članova SOXB grupe analizirana je Western blot metodom. U nediferenciranim pluripotentnim ćelijama eksprimiraju se SOX14 i svi članovi SOXB1 podgrupe (Slika 28) (Popovic et al. 2014). Imajući u vidu da se SOX2 smatra markerom pluripotentnih ćelija (Graham et al. 2003), a SOX1 i SOX3 markerima neuralnih matičnih ili neuralnih progenitorskih ćelija (Collignon et al. 1996; Miyagi et al. 2008; Pevny et al. 1998; Venere et al. 2012; Wang et al. 2006), ekspresija članova SOXB1 podgrupe u pluripotentnim NT2/D1 i P19 ćelijama je očekivana. U obe ćelijske linije ekspresija SOX14 proteina raste tokom neuralne diferencijacije (Slike 28 i 29), dok ekspresija SOXB1 proteina varira tokom neuralne diferencijacije *in vitro* i razlikuje se između analiziranih model sistema (Slike 28 i 29). Nasuprot očekivanju, ekspresija SOX21 proteina nije detektovana ni u jednoj fazi neuralne diferencijacije *in vitro* (Slika 28). Iako je SOX2 okarakterisan kao marker pluripotentnosti, SOX1 i SOX3 kao markeri neuralnih progenitora, a SOX14 kao marker neurona, ekspresija ovih proteina je prisutna u svim fazama diferencijacije NT2/D1 i P19 ćelija (Slike 28 i 29).

Prva faza diferencijacije NT2/D1 ćelija predstavlja ranu neuralnu diferencijaciju koja se dešava tokom prve nedelje tretmana retinoičnom kiselinom i karakteriše se pojavom neuroprogenitorskih ćelija (Przyborski et al. 2000). U ovoj fazi diferencijacije ekspresija SOX3 markera neuralnih progenitorskih ćelija ima najviši nivo tokom neuralne diferencijacije NT2/D1 ćelija *in vitro* (Slike 28A i 29A), što može ukazati na povećanje broja neuralnih progenitora u ovoj fazi diferencijacije. Druga faza diferencijacije se dešava početkom druge nedelje tretmana RK-om i karakteriše se pojavom neuralnih progenitora koji su napustili fazu proliferacije (Przyborski et al. 2000). Već u ovoj fazi je uočljiv porast ekspresije SOX14 (Slika 28A i 29A). Treća faza diferencijacije se dešava nakon treće nedelje tretmana RK-om kada dolazi do sazrevanja

neurona (Pleasure et al. 1992). Imajući u vidu ove podatke kao i činjenicu da se SOX14 smatra markerom neurona, očekivana je njegova visoka ekspresija u ovoj fazi diferencijacije, ali i niska ekspresija SOX1 proteina koji je marker neuralnih progenitora (Slike 28A i 29A).

Ranije je pokazano je da SOX2 može imati važnu ulogu u proliferaciji i migraciji NT2/D1 ćelija, kao i da je nivo ekspresije ovog proteina važan za sam proces neuralne diferencijacije *in vitro* (Drakulic et al. 2012; Drakulic et al. 2015; Klajn et al. 2014). Takođe, u literaturi je poznato da SOX1 može imati važnu ulogu tokom neuralne diferencijacije P19 ćelija (Pevny et al. 1998). Imajući u vidu visoku homologiju u okviru SOXB grupe, kao i da ovi proteini često ostvaruju vrlo slične funkcije, može se očekivati da tokom procesa neuralne diferencijacije i SOX14 ima važnu ulogu u ovim ćelijama. Na osnovu ovih rezultata može se zaključiti da u korišćenim model sistemima, SOX14 ima preklapajući profil ekspresije sa članovima SOXB1 podgrupe, za razliku od SOX21 proteina čija ekspresija nije detektovana. Ovi rezultati ukazuju na mogućnost da tokom neuralne diferencijacije NT2/D1 i P19 ćelija *in vitro*, usled odsustva ekspresije SOX21 proteina, SOX14 preuzima njegovu ulogu i da potencijalno utiče na diferencijaciju ćelija u neurone. Kako bi se ovo potvrdilo neophodna je dalja funkcionalna analiza gena *SOX14* u NT2/D1 i P19 ćelijama.

#### **5.1.4. Uporedna analiza ekspresije SOX14, OCT4 i $\beta$ -III-Tubulin proteina tokom ranih faza neuralne diferencijacije NT2/D1 i P19 ćelija *in vitro***

Rezultati analize ekspresije Western blot metodom pokazali su da se ekspresija SOX14 proteina menja tokom neuralne diferencijacije *in vitro*, pri čemu je pokazano da ona raste od druge nedelje tretmana retinoičnom kiselinom (NT2 2W) i dostiže najviši nivo ekspresije u završnoj fazi diferencijacije NT2/D1 ćelija (NT2 4W) (Slike 27, 28A i 29A), dok kod P19 ćelija ekspresija SOX14 proteina raste u završnoj fazi diferencijacije (P19 EB) i ima najviši nivo u P19-N populaciji (27). Zatim je bilo važno ispitati u kojoj fazi neuralne diferencije dolazi do pada ekspresije markera pluripotentnosti OCT4, odnosno do porasta ekspresije  $\beta$ -III-Tubulin markera postmitotičkih neurona. U

NT2/D1 i P19 ćelijama, ekspresija SOX14 i OCT4 proteina se detektuje u nediferenciranim pluripotentnim ćelijama (Slika 30). OCT4 se smatra univerzalnim markerom pluripotentnih ćelija koji ima bitnu ulogu u održavanju pluripotentnosti matičnih ćelija (Rizzino 2009), tako da je ekspresija ovog proteina u nediferenciranim pluripotentnim NT2/D1 i P19 ćelija očekivana. Sa druge strane ekspresija SOX14 proteina u pluripotentnim ćelijama je u ovom radu po prvi put detektovana (Popovic et al. 2014). Tokom neuralne diferencijacije obe ćelijske linije dolazi do potpunog gašenja ekspresije OCT4 proteina, dok ekspresija SOX14 i  $\beta$ -III-Tubulin proteina raste tokom ovog procesa i dostiže najviši nivo ekspresije u finalnoj fazi diferencijacije (Slika 30). S obzirom da u finalnoj fazi diferencijacije dolazi do sazrevanja neurona, očekivan je visok nivo ekspresije SOX14 i  $\beta$ -III-Tubulin neuralnih markera u ovoj fazi.

Ovi rezultati pokazuju da SOX14 ima drugačiji profil ekspresije u odnosu na OCT4 marker pluripotentnosti i da prati profil ekspresije  $\beta$ -III-Tubulin markera postmitotičnih neurona tokom neuralne diferencijacije NT2/D1 i P19 ćelija *in vitro*. Izlaskom ćelija iz stanja pluripotentnosti i ulaskom u proces neuralne diferencijacije, dolazi do rasta ekspresije SOX14 proteina, što ukazuje da ovaj protein potencijalno ima važnu ulogu u navedenom procesu i da nivo ekspresije SOX14 može uticati na prelazak ćelija iz pluripotentnog u diferencirano stanje.

### **5.1.5. Analiza ekspresije SOX14 proteina u pojedinačnim ćelijama nakon neuralne diferencijacije *in vitro***

Prve studije su pokazale da se gen *Sox14* eksprimira samo u određenim interneuronima (Hargrave et al. 2000b; Uchikawa et al. 1999), dok su novija istraživanja pokazala da se SOX14 eksprimira i u ćelijama neuralnih progenitora i u određenom podtipu GABA-ergičkih neurona (Sellers et al. 2014). NT2/D1 se mogu diferencirati u različite tipove neurona, uključujući GABA-ergičke, glutamatergičke, kateholaminergičke, holinergičke, dopaminergičke i serotonergičke neurone (Coyle et al. 2011; Guillemain et al. 2000; Iacovitti et al. 2001; Schwartz et al. 2005; Yoshioka et al. 1997; Zeller and Strauss 1995), dok najčešći tip neurona koji nastaje diferencijacijom P19 ćelija jesu GABA-ergički neuroni (Staines et al. 1996). Takođe diferencijacijom ovih ćelija nastaju i astrociti i ćelije epitelijalne morfologije koje ne ekspimiraju

neuralne markere (Belliveau et al. 1997; Cheung et al. 1999; Coyle et al. 2011; Jones-Villeneuve et al. 1982; McBurney 1993; Przyborski et al. 2004) (Slike 23, 24, 25 i 26). Imajući u vidu ove podatke, zanimljivo je bilo analizirati ekspresiju gena *SOX14/Sox14* na nivou pojedinačnih ćelija tokom procesa neuralne diferencijacije *in vitro*.

Iako je *SOX14* do sada okarakterisan kao marker neurona, zanimljivo je da je imunocitohemijsko bojenje pokazalo da se ovaj gen eksprimira u pluripotentnim ćelijama, u neuronima i u drugim tipovima ćelija koje se dobijaju nakon neuralne diferencijacije NT2/D1 i P19 ćelija *in vitro* (Slike 31 i 32)(Popovic et al. 2014). Ovi rezultati ukazuju da ekspresija gena *SOX14* nije usko specifična, kao i da nije vezana isključivo za neurone. Takođe, s obzirom da se u NT2-N populaciji *SOX14* eksprimira u svakom neuronu koji eksprimira MAP2 marker terminalno diferenciranih neurona (Slike 23 i 24), moguće je očekivati da se *SOX14* eksprimira u različitim tipovima neurona koji nastaju diferencijacijom NT2/D1 ćelija, uključujući GABA-ergičke, glutamatergičke, kateholaminergičke, holinergičke, dopaminergičke i serotonergičke neurone. Ovi rezultati ukazuju da u ovom model sistemu *SOX14* nije eksprimiran samo u određenom setu neurona. Zanimljivo je istaći da, dok svi dobijeni neuroni nakon diferencijacije NT2/D1 ćelija ekspimiraju *SOX14*, 5% neurona dobijenih diferencijacijom P19 ćelija ne eksprimira *SOX14* (Slike 24 i 26) (Popovic et al. 2014). Ovaj rezultat može biti posledica prisustva različitih tipova neurona u dobijenim populacijama neurona, što navodi na zaključak da se *SOX14* ne eksprimira u svim tipovima neurona koji nastaju diferencijacijom P19 ćelija, i da je možda u ovom model sistemu njegova ekspresija vezana za određeni tip neurona. Dalja istraživanja su neophodna kako bi se utvrdio tačan tip neurona koji ekspimiraju *SOX14*.

#### **5.1.6. Odsustvo ektopične ekspresije *SOX14* proteina u NT2/D1 i P19 ćelijama nakon tranzijentne transfekcije sa *SOX14*wt ekspresionim konstruktom**

U cilju dalje analize uloge *SOX14* proteina tokom neuralne diferencijacije *in vitro*, konstruisan je *SOX14*wt ekspresioni konstrukt koji sadrži kodirajući region humanog gena *SOX14* ispred koga se nalazi promotor poreklom od citomegalovirusa (CMV) (Slika 34). Analiza iRNK nakon eksperimenata tranzijentne transfekcije sa

SOX14wt je pokazala povećanu ekspresiju gena *SOX14* u NT2/D1 i P19 ćelijama (Slika 35-A i C). Nasuprot očekivanju, u isto vreme nije detektovano povećanje ekspresije SOX14 proteina u ovim ćelijama (Slika 35-B i D) (Popovic et al. 2014). Sa druge strane, nakon tranzijentne transfekcije SOX14wt ekspresionim konstruktom u HeLa ćelijama poreklom od karcinoma grlića materice, došlo je do povećanja ekspresije gena *SOX14* i na nivou iRNK i proteina (Slika 36) (Popovic et al. 2014). Dobijeni rezultati su nagovestili potencijalno specifičnu regulaciju ekspresije gena *SOX14* u pluripotentnim NT2/D1 i P19 ćelijama. Zapravo, odsustvo translacije SOX14 proteina u ovim ćelijama može ukazati na prisustvo mehanizma koji održava određeni nivo ekspresije gena *SOX14* u ovim ćelijama (Popovic et al. 2014). U prethodnim istraživanjima je pokazano da je FOXA2 transkripcioni regulator uključen u regulaciju ekspresije gena *SOX14* u HepG2 ćelijama poreklom od karcinoma jetre i U87MG ćelijama poreklom od glioblastoma (Popovic et al. 2010). Međutim, regulacija gena *SOX14* u pluripotentnim ćelijama još uvek nije poznata.

U embrionalnim matičnim ćelijama kontrola translacije ima bitnu ulogu u sudbini iRNK molekula. Naime, pokazano je da samoobnavljanje i diferencijacija pluripotentnih ćelija zavisi od post-transkripcionih mehanizama koji kontrolišu sintezu proteina (Haston et al. 2009; Kolle et al. 2011; Sampath et al. 2008). Jedan od mogućih post-transkripcionih mehanizama regulacije ekspresije gena *SOX14* je pomoću RNK-vezivnih proteina (eng. *RNA-binding proteins* (RBPs)). RBPs utiču na strukturu iRNK, njenu stabilnost, transport i lokalizaciju u ćeliji i na taj način obezbeđuju selektivnu translaciju. RBPs se vezuju za specifične elemente najčešće u 3' UTR regionu (eng. *untranslated region*), što uglavnom dovodi do izostanka translacije (Szostak and Gebauer 2013). Drugi od mogućih mehanizama uključenih u regulaciju ekspresije gena *SOX14* može se zasnivati na prisustvu specifičnih mikro RNK koje se vezuje za 3' UTR i potencijalno onemogućavaju translaciju *SOX14* iRNK. Mikro RNK (miRNK) su male RNK dužine od 19-24 nukleotida koje imaju bitnu ulogu u mnogobrojnim procesima, između ostalog i u održavanju pluripotentnosti i proliferacije embrionalnih matičnih ćelija (Lee et al. 2016). Između ostalog, poznato je da miRNK-145 post-transkripciono kontroliše ekspresiju gena *SOX2* u embrionalnim pluripotentnim ćelijama (Xu et al. 2009). Nakon integracije u RISC (eng. *RNA-induced silencing complex*) mikro RNK se vezuju za specifičnu iRNK, prepoznajući je preko komplementanog baznog sparivanja,

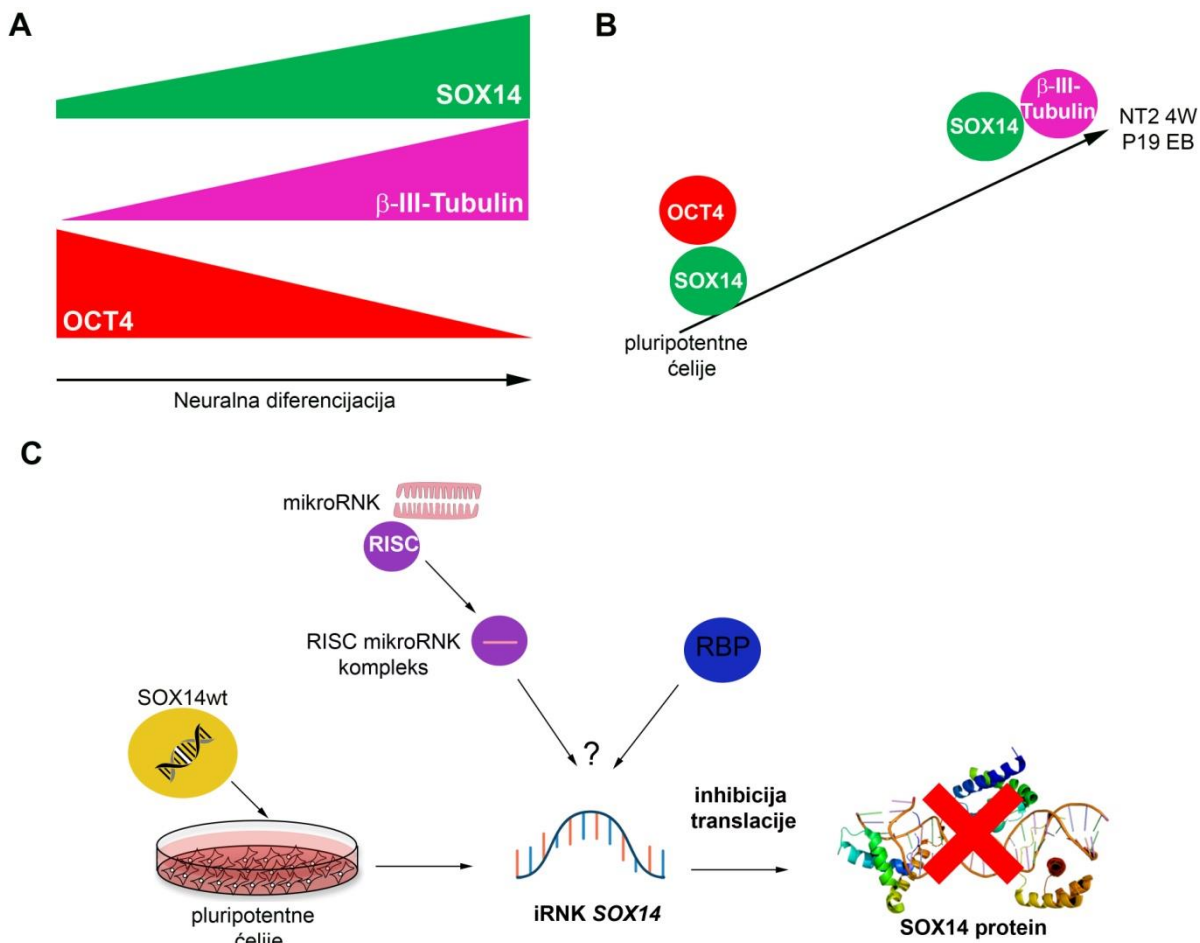
i aktiviraju proces njene degradacije, represije translacije ili njenu destabilizaciju (Oliveto et al. 2017). Još jedan od potencijalnih mehanizama koji reguliše ekspresiju gena u pluripotentnim ćelijama na post-transkripcionom nivou podrazumeva i sinergistički efekat RBPs i mikro RNK kompleksa (Szostak and Gebauer 2013). Kako bi se ovaj fenomen ispitaio, neophodna su dalja istraživanja u pronalaženju mehanizma koji uključuje potencijalne RBPs i/ili mikro RNK u regulaciju ekspresije gena *SOX14*.

Analiza ekspresije gena *SOX14/Sox14* tokom procesa neuralne diferencijacije NT2/D1 i P19 ćelija *in vitro* je pokazala da ekspresija SOX14 proteina raste tokom ovog procesa i da se SOX14 eksprimira i u pluripotentnim ćelijama i u neuronima kod obe ćelijske linije (Shematski prikaz na Slici 62-A i B). Profil ekspresije SOX14 proteina tokom neuralne diferencijacije *in vitro* je praćen rastom ekspresije markera postmitotičkim neurona  $\beta$ -III-Tubulin i padom ekspresije OCT4 markera pluripotentnosti, što ukazuje da profil ekspresije SOX14 više nalikuje profilu ekspresije markera postmitotičkim neurona (Shematski prikaz na Slici 62A). Sa izlaskom ćelija iz stanja pluripotentnosti i ulaskom u proces neuralne diferencijacije, dolazi do rasta ekspresije SOX14 proteina, što ukazuje da ovaj protein potencijalno ima važnu ulogu u navedenom procesu i da nivo ekspresije SOX14 može uticati na prelazak ćelija iz pluripotentnog u diferencirano stanje (Slika 62 – A i B).

Za razliku od ekspresije SOX14 proteina, ekspresija SOXB1 proteina varira tokom neuralne diferencijacije *in vitro* i razlikuje se između analiziranih model sistema, dok ekspresija SOX21 proteina nije detektovana (Slike 28 i 29). Na osnovu ovih rezultata može se pretpostaviti da u korišćenim model sistemima, za razliku od SOX21, SOX14 ima preklapajuću ekspresiju sa članovima SOXB1 podgrupe. Ovi rezultati ukazuju na mogućnost da tokom neuralne diferencijacije NT2/D1 i P19 ćelija *in vitro*, usled odsustva ekspresije SOX21 proteina, SOX14 preuzima njegovu ulogu i utiče na diferencijaciju ovih ćelija u neurone.

Eksperimenti tranzijentne transfekcije SOX14wt konstruktom su potencijalno nagovestili specifičnu regulaciju ekspresije gena *SOX14* u pluripotentnim NT2/D1 i P19 ćelijama. Za pluripotentne ćelije je karakteristična regulacija ekspresije gena post-transkripcionim mehanizama u kojima ključnu ulogu imaju RBPs i mikro RNK (Shematski prikaz na Slici 62C). Otvara se pitanje da li do inhibicije translacije *SOX14* iRNK u pluripotentnim ćelijama dovode određeni RBPs ili mikro RNK, ili njihov

sinergistički efekat (Shematski prikaz na Slici 62C). Dobijeni rezultati ukazuju na potencijalnu ulogu gena *SOX14* tokom procesa neuralne diferencijacije, kao i na specifičnu regulaciju nivoa ekspresije ovog gena u pluripotentnim ćelijama. Neophodna su dalja istraživanja koja bi dokazala ove pretpostavke.



**Slika 62: Shematski prikaz analize ekspresije i uloge SOX14 tokom procesa neuralne diferencijacije *in vitro*.** **A** – SOX14 se eksprimira u pluripotentnim ćelijama i njegova ekspresija raste tokom neuralne diferencijacije *in vitro* i najviši nivo ekspresije detektuje se u završnoj fazi diferencijacije. Njegov profil ekspresije je praćen porastom ekspresije markera postmitotičkih neurona  $\beta$ -III-Tubulin, dok istovremeno ekspresija markera pluripotentnosti OCT4 opada. **B** – SOX14 se eksprimira i u pluripotentnim i u neuronalnim ćelijama, pri čemu njegova ekspresija raste tokom neuralne diferencijacije *in vitro*. **C** – Shematski prikaz potencijalne regulacije ekspresije gena *SOX14* u pluripotentnim ćelijama. Ključnu ulogu u post-transkripcionim mehanizmima imaju RNK vezivni proteini (RBPs) i mikro RNK. Može se pretpostaviti da određeni RBPs ili mikro RNK, pojedinačno ili sinergistički dovode do inhibicije translacije *SOX14* iRNK u pluripotentnim ćelijama.



## **5.2. Analiza ekspresije i uloge humanog gena *SOX14* u regulaciji malignog fenotipa ćelija poreklom od karcinoma grlića materice**

### **5.2.1. Ekspresija i metilacioni status gena *SOX14* u ćelijama poreklom od karcinoma grlića materice**

Literaturni podaci ukazuju na potencijalno važnu ulogu SOX14 proteina u karcinomu grlića materice. Međutim, dok sa jedne strane studije o metilacionom statusu u uzorcima tkiva pacijentkinja obolelih od ovog karcinoma ukazuju na gubitak njegove ekspresije i potencijalnu ulogu tumor supresora (Senchenko et al. 2013; Wang et al. 2016b), sa druge strane *in vitro* studije na ćelijama poreklom od karcinoma grlića materice ukazale su na njegovu potencijalnu ulogu onkogeni u ovom tipu karcinoma (Li et al. 2015). Dosadašnje funkcionalne studije su pokazale da pojedini geni iz SOX familije, poput *SOX1*, *SOX2* i *SOX4*, mogu imati i ulogu tumor supresora i ulogu onkogeni u različitim tipovima kancera (Garcia et al. 2017; Otsubo et al. 2008; Pan et al. 2009; Song et al. 2016; Wu et al. 2013). Takođe, *in vivo* studije su pokazale da je kod raznih tipova kancera prisutna izmenjena ekspresija ili amplifikacija regiona u kojem se nalazi neki od gena iz SOX familije (Dong et al. 2004).

Rezultati RT-PCR-a i Western blot metode su pokazali da se SOX14 slabo eksprimira i na nivou iRNK i na nivou proteina u sve tri ispitane ćelijske linije poreklom od karcinoma grlića (Slika 37). Dalja analiza metilacionog statusa promotora gena *SOX14* je pokazala da je on metilovan u ovim ćelijskim linijama (Slika 39). Ovi rezultati su u skladu sa podacima iz literature koji ukazuju da je promotor gena *SOX14* metilovan u uzorcima tkiva pacijentkinja obolelih od karcinoma grlića materice (Wang et al. 2016b). Analiza metilacionog statusa DNK na nivou kompletnog genoma pokazala je da je *SOX14* jedan od metilovanih gena kod pacijenata sa hroničnom limfocitnom leukemijom (Tong et al. 2010). Pokazano je da je *SOX14* jedan od 4 hipermetilovana markera pogodan za skrining adeno i skvamoznog karcinoma grlića materice (Wang et al. 2016b). Takođe, pokazano je da je SOX14 lociran u regionu

hromozoma 3 u kome se nalazi nekoliko poznatih tumor supresora (Senchenko et al. 2013).

Poznato je da je metilacija CpG ostrva u okviru promotora jedan od važnih mehanizama za inaktivaciju tumor supresora (Esteller 2002). Takođe, metilacija DNK je prepoznata kao jedan od ranih i čestih mehanizama koji su uključeni u nastanak karcinoma grlića materice (Yang 2013). U skladu sa literaturnim podacima, rezultati prikazani u ovoj disertaciji ukazuju da bi SOX14 mogao imati ulogu tumor supresora u ćelijama poreklom od karcinoma grlića materice. Gen *SOX14* nije prvi član *SOXB* grupe gena za koji je pokazano da ostvaruje ulogu tumor supresora u karcinomu poreklom od grlića materice. Zapravo, pokazano je da u ovom tipu tumora SOX1 suprimira ćelijski rast i invaziju *in vitro* inhibicijom Wnt/ $\beta$ -katenin signalnog puta (Lin et al. 2013). Kako bi se ispitala uloga gena *SOX14*, za dalju analizu, od tri ćelijske linije poreklom od karcinoma grlića materice odabrana je HeLa ćelijska linija. U ovim ćelijama Western blot metodom potvrđen je najviši nivo ekspresije SOX14 nakon tranzijentne transfekcije, u poređenju sa SiHa i CaSki ćelijskim linijama (Slika 41). To je ukazalo da je HeLa ćelijska linija dobar model sistem za dalje ispitivanje uloge gena *SOX14* u ćelijama poreklom od karcinoma grlića materice.

### **5.2.2. SOX14 ima aktivatorsku ulogu na reporter gen u HeLa ćelijama**

Skoro 20 godina u literaturi se na osnovu podele SOXB grupe na aktivatore i represore, SOX14 karakteriše kao protein sa represorskom funkcijom (Uchikawa et al. 1999). Zapravo, eksperimenti o karakterizaciji transkripcionih svojstva gena iz SOXB grupe rađeni su na DC5 minimalnom enhenseru gena  $\delta$ 1-kristalin pileta. SOXB1 proteini su pokazali aktivaciona svojstva (Kamachi et al. 1995; Kamachi et al. 1998), dok su, za razliku od njih, C-terminalni domeni SOXB2 proteina pokazali svojstva represora. Pokazano je da SOX21 jako reprimira aktivaciju enhensera gena  $\delta$ 1-kristalin, a SOX14 slabije (Uchikawa et al. 1999). Nasuprot tome, rezultat dobijen u luciferaznim esejima u HeLa ćelijama pokazao je da SOX14 ima aktivatorsko svojstvo reporterskog gena (Slika 43) (Popovic et al. 2014). Aktivatorska funkcija SOX14 proteina je pokazana i na promotorima gena *TP53* i *CDKN1A* (Slika 55 i 60A) (Stanisavljevic et al. 2017). Dobijeni rezultati sugerišu da je neophodno revidirati podelu gena SOXB grupe

na aktivatore (SOXB1) i represore (SOXB2) i definisati da je aktivnost određenog člana SOXB grupe zavisna od tipa ćelija i ciljnog gena koji je regulisan ovim transkripcionim regulatorima.

Naime, poznato je da u okviru SOX familije postoje proteini koji imaju dvojaku ulogu. Tako je na primer SOX2 dugo smatran aktivatorom brojnih gena, međutim, novije studije su pokazale da ovaj protein može imati i transrepresorska svojstva (Greber et al. 2007; Masui et al. 2007). SOX2 aktivira OCT-SOX enhensere u embrionalnim matičnim ćelijama, dok sa druge strane reprimira nekoliko gena u neuralnim matičnim ćelijama (Liu et al. 2014). Takođe, poznato je da proteini SOX familije, u zavisnosti od interakcije sa drugim proteinima, mogu funkcionisati kao aktivatori ili represori (Chew and Gallo 2009). Imajući ovo u vidu, očekivano je da i SOX14 može imati i represorsku i aktivatorsku ulogu upravo u zavisnosti od ćelijskog tipa kao i od partnerskih proteina sa kojim interaguje u datom trenutku.

### **5.2.3. Analiza SOX14DN1 - dominantno-negativnog mutanta SOX14 proteina**

Tokom eksperimentalnog rada, pored generisanog ekspresionog konstrukta za SOX14, korišćen je i DN mutant za SOX14 – SOX14DN1 (Gredic 2015). Pojava funkcionalne redundantnosti među članovima familije gena *SOX* otežava izučavanje funkcije gena ove familije klasičnim metodama utišavanja ekspresije. Funkcionalna redundantnost podrazumeva da član iste grupe *SOX* gena može preuzeti funkciju drugog gena *SOX* u uslovima njegovog odsustva, usled delecije ili usled prisustva mutacije koja ga čini neaktivnim (Cermenati et al. 2008; Wegner 2010). Zbog toga je poželjniji pristup u izučavanju funkcije ove grupe gena konstruisanje DN mutanata. DN mutanti SOX proteina imaju očuvan HMG boks domen kojim se vezuju za svoje konsenzusno mesto u okviru promotora ali ne i deo proteina kojim ostvaruju funkciju aktivacije ili represije. Na taj način SOX DN mutanti okupiraju vezivna mesta na molekulu DNK i tako onemogućavaju da se za istu regulatornu sekvencu veže neki drugi član SOX familije proteina koji može preuzeti funkciju i zamaskirati odsustvo proteina od interesa.

Korišćenje SOX14DN1 mutanta, koji pored HMG boks domena poseduje manji deo C-terminalnog regiona SOX14 proteina, tokom ispitivanja uloge gena *SOX14* u HeLa ćelijama, pokazalo se kao dobra strategija. Zapravo, u svim eksperimentima u kojima je korišćen paralelno sa SOX14wt konstruktom, pokazalo se da SOX14DN1, ili nema efekta, ili ne postiže isti efekat kao SOX14 na ispitane procese i ekspresiju odabranih gena (Slike 44, 45, 48 – 53, 55 – 61) (Stanisavljevic et al. 2017). Korišćenjem SOX14wt konstrukta koji sadrži kodirajući region humanog gena *SOX14*, pokazano je da SOX14 ima uticaja na osnovne ćelijske procese: proliferaciju, ćelijski ciklus i apoptozu, kao i na ekspresiju gena uključenih u regulaciju ovih procesa (Slike 48, 49 i 50). Sa druge strane, SOX14DN1 nije doveo do značajnog efekta na pomenute procese i ekspresiju gena (Slike 48, 49 i 50).

Dobijeni rezultati ukazuju da SOX14DN1, kome nedostaje veći deo C-terminalnog domena SOX14 proteina nema aktivaciono ili represorsko svojstvo u odnosu na SOX14wt i da funkcioniše na dominantno-negativan način, i da se ovaj dominantno negativni mutant može koristiti u daljim istraživanjima uloge gena *SOX14*.

#### **5.2.4. Povećana ekspresija SOX14 proteina smanjuje proliferaciju, dovodi do zastoja ćelijskog ciklusa i indukuje apoptozu u HeLa ćelijama**

Malignu transformaciju karakteriše niz promena u ćeliji koji se odražavaju na ćelijski ciklus, proliferaciju, apoptozu, migraciju i invaziju. Regulacija ovih procesa je od velikog značaja za širenje i rast tumora, zbog čega je poznavanje gena i mehanizama koji u njoj učestvuju izuzetno važna. Kako bi se analizirala potencijalna uloga SOX14 proteina u ćelijama poreklom od karcinoma grlića materice, praćen je efekat povećane ekspresije ovog gena na različite ćelijske procese u HeLa ćelijskoj liniji.

Rezultati dobijeni u ovoj doktorskoj disertaciji su pokazali da povećana ekspresija SOX14 proteina ne utiče na migratorni potencijal (Slike 45 i 46) i invazivnost HeLa ćelija (Slika 47), što je očekivano s obzirom da su migracija i invazija dva usko povezana procesa (Stanisavljevic et al. 2017). Dobijeni rezultati, međutim, nisu u

korelaciji sa ranije objavljenom studijom koja je pokazala da SOX14 promoviše invaziju SiHa i HeLa ćelija (Li et al. 2015).

Dalja analiza uloge SOX14 proteina u ćelijama poreklom od karcinoma grlića materice je pokazala da je povećana ekspresija SOX14 proteina značajno smanjila proliferaciju HeLa ćelija (Slika 48) (Stanisavljevic et al. 2017). Proliferacija ćelija je bitna za dalji rast i razvoj tumora (Jones and Thompson 2009). S obzirom da je inhibicija proliferacije jedna od osobina tumor supresor gena, dobijeni rezultati ukazuju da SOX14 može imati ulogu tumor supresora u ćelijama poreklom od karcinoma grlića materice. Suprotno, Li i saradnici su pokazali da povećana ekspresija SOX14 proteina promoviše proliferaciju HeLa i SiHa ćelija (Li et al. 2015).

Rezultati su dalje pokazali da je povećana ekspresija SOX14 dovela do blagog povećanja broja ćelija u S fazi, kao i do smanjenja broja ćelija u G2/M fazi ćelijskog ciklusa (Slika 49) (Stanisavljevic et al. 2017). Sposobnost SOX14 proteina da reguliše ćelijski ciklus je jako bitna, s obzirom da je kontrola ćelijskog ciklusa bitna za sprečavanje daljeg razvoja tumora.

Povećana ekspresija SOX14 proteina je dovela i do indukcije apoptoze u HeLa ćelijama (Slike 50, 51, 52 i 53) (Stanisavljevic et al. 2017). Analiza efekta SOX14 proteina na apoptozu u HeLa ćelijama, pokazala je da u prisustvu njegove povećane ekspresije dolazi do stabilizacije p53 proteina, ključnog regulatora apoptoze (Slike 56, 57, 58 i 59). Stabilizacija p53 proteina, indukovana povećanom ekspresijom SOX14 proteina, je dalje dovela do promene odnosa ekspresije pro-apoptotskog gena *BAX* i anti-apoptotskog gena *Bcl-2*, do povećane ekspresije oslobođenog PARP-a, kao i do promena na morfološkom nivou u vidu fragmentisanih jedara (Slike 51, 52 i 53) (Stanisavljevic et al. 2017). Pokretanje apoptoze nakon povećane ekspresije SOX14 proteina u HeLa ćelijama je rezultiralo povećanjem broja ćelija koje su ušle u process apoptoze, bilo rane ili kasne faze apoptoze (Slika 50).

Poznato je da u toku procesa apoptoze dolazi do stabilizacije p53 proteina koji deluje kao transkripcioni regulator i dovodi do povećanja transkripcije pro-apoptotskog gena *BAX*, dok, sa druge strane, dolazi do represije anti-apoptoskih gena iz *Bcl-2* familije. Promena odnosa ekspresije pomenutih gena uvodi ćelije u završnu fazu inicijacije apoptoze, koja se karakteriše pokretanjem složene kaskade kaspaza (Rudel 1999). Aktivacija kaspaze 3 predstavlja ključni korak u pokretanju apoptotskog

dogadaja, koji dovodi do aktivacije PARP proteina usled oštećenja molekula DNK (Boulares et al. 1999). Takođe, dešavaju se i karakteristične promene na ćeliji u vidu smanjenja ćelije i fragmentacije membrane u apoptotska tela. Rezultati dobijeni u ovoj doktorskoj disertaciji ukazuju da SOX14 pokreće proces apoptoze stabilizacijom p53 proteina. Aktivacija gena *BAX* i PARP proteina nakon povećane ekspresije SOX14 proteina, ukazuje da SOX14 svoju ulogu u apoptozi ostvaruje i aktivacijom kaspaza u HeLa ćelijama. Dobijeni rezultati ukazuju na bitnu ulogu SOX14 proteina u regulaciji procesa apoptoze u HeLa ćelijama, što je potvrđeno kako na morfološkom tako i na molekularnom nivou.

### **5.2.5. SOX14 stabilizuje p53 protein**

*In silico* analiza promotora gena *TP53* je pokazala prisustvo dva potencijalna vezivna mesta za SOX14 transkripcioni regulator (Slika 54). Analiza aktivnosti delecionih konstrukata promotora gena *TP53* u luciferaznim esejima, pokazala je da SOX14 ima aktivatorsko svojstvo na promoter gena *TP53* (Slika 55). U literaturi je već opisano da neki članovi SOX familije transkripciono regulišu ekspresiju gena *TP53*. Studija na ćelijama poreklom od karcinoma pluća je pokazala da u ovim ćelijama SOX30 ostvaruje ulogu tumor supresora indukcijom ekspresije gena *TP53* i aktivacijom promotora ovog gena (Han et al. 2015), dok u ćelijama poreklom od hepatocelularnog karcinoma SOX4 interaguje sa p53 dovodeći do inhibicije apoptoze (Hur et al. 2010). Dalja analiza uticaja SOX14 proteina na *TP53* je pokazala da na nivou iRNK, usled povećane ekspresije SOX14 proteina, nema promene u ekspresiji gena *TP53* (Slika 53) (Stanisavljevic et al. 2017). Iako u promotoru gena *TP53* postoje dva vezivna mesta koja prepoznaje SOX14 transkripcioni regulator, dalja analiza nije ukazala da postoji regulacija ekspresiju gena *TP53* od strane SOX14 u HeLa ćelijama. U literaturi je pokazano da u neuralnim matičnim ćelijama SOX21 ne utiče na ekspresiju gena *TP53*, iako dovodi do represije ekspresije p53 na nivou proteina (Idha Kurtsdotter, 2017). S obzirom da u okviru promotora gena *TP53* postoji i DNK vezujuće mesto za p53 (Deffie et al. 1993) aktivnost promotora gena *TP53* u luciferaznom esejima može se objasniti i prisustvom autoregulacije p53 proteina. Moguće je da povećana ekspresija

SOX14 proteina indukuje ekspresiju p53 proteina koji zatim reguliše ekspresiju gena *TP53*.

Mehanizmi koji regulišu nivo ekspresije gena *TP53* mogu biti na transkripcionom, translacionom i post-translacionom nivou. Rezultati Western blot metode i imunocitohemijskog bojenja su pokazali da povećana ekspresija SOX14 dovodi do značajnog povećanja nivoa endogenog p53 proteina (Slike 56 i 57), kao i do povećanja fosforilisanog p53 proteina na poziciji Ser 15 (Slika 59) (Stanisavljevic et al. 2017). Fosforilacija p53 proteina na poziciji Ser15 jedan od najčešćih mehanizama stabilizacije p53 proteina (Meek and Anderson 2009) i može dovesti do dodatnih fosforilacija p53 proteina, što dalje doprinosi stabilizaciji i aktivaciji p53 proteina (Loughery et al. 2014). Fosforilisani p53 postaje stabilan protein koji ostvaruje funkcije tumor supresora, koje su ključne za sprečavanje maligne transformacije ćelija. U literaturi je poznato da je poluživot p53 proteina u HeLa ćelijama kratak i iznosi svega 3 sata (Zhang et al. 1998). Činjenica da je SOX14 znatno povećao nivo p53 proteina 24h nakon transfekcije ukazuje da SOX14 učestvuje u stabilizaciji p53 proteina (Stanisavljevic et al. 2017). Rezultati prikazani u ovoj doktorskoj disertaciji pokazuju da SOX14 svoj efekat na nivo p53 proteina u HeLa ćelijama ostvaruje uticajem na njegovu fosforilaciju, odnosno na nivo fosforilisanog p53 proteina. U literaturi je već pokazano da SOX4 i SOX6 utiču na stabilizaciju p53 proteina. Zapravo, SOX4 stabilise p53 blokirajući MDM2 posredovanu ubikvitinaciju i povećavajući acetilovanu formu p53 proteina (Pan et al. 2009), dok SOX6 stabilise p53 protein sprečavanjem nuklearnog eksporta ovog proteina (Wang et al. 2016a). Imajući literaturne podatke u vidu, očekivano je da još jedan gen iz *SOX* familije, gen *SOX14*, utiče na stabilizaciju p53 proteina. Zanimljivo je da je ovo jedini član *SOXB* grupe za koji je do sada poznato da učestvuje u stabilizaciji p53 proteina. Imajući u vidu homologiju i slične funkcije među članovima *SOXB* grupe gena, dobijeni rezultati daju osnov za ispitivanje uloge ostalih članova *SOXB* grupe u stabilizaciji p53 tumor supresora.

Mehanizam kojim SOX14 dovodi do stabilizacije p53 proteina nije poznat. Neophodna su dalja istraživanja koja bi pokazala na koji način SOX14 dovodi do stabilizacije p53 proteina u HeLa ćelijama. Naime, pokazano je da nekoliko kinaza, kao što su DNA-PK, ATM, ATR i ERK, učestvuje u regulaciji fosforilacije p53 protina (She et al. 2000; Tibbetts et al. 1999). Sa druge strane, poznato je da karcinom grlića

materice u više od 90% slučajeva nastaje kao posledica prisustva virusne HPV infekcije (Walboomers et al. 1999). Jedan od mehanizama delovanja HPV virusa kojim se indukuje nastanak kancera grlića materice uključuje virusni protein E6 (Scheffner et al. 1993). Ovaj protein ima svojstvo onkoproteina jer se vezuje za p53, čime promovira njegovu degradaciju, što dalje dovodi do gubitka funkcija p53 tumor supresora u ćeliji (Scheffner et al. 1993). Svoju ulogu u degradaciji p53 proteina E6 ostvaruje pomoću E6 asociranog proteina (E6-AP), koji funkcioniše kao E3 ubikvitin ligaza (Scheffner et al. 1993). Da bi se desila degradacija p53 proteina posredstvom E6 onkoproteina, potrebno je da E6 napravi kompleks sa E6-AP (Waddell and Jenkins 1998). Ovako formiran kompleks degraduje p53 protein, što vodi do genomske nestabilnosti, odsustva apoptoze, nekontrolisane proliferacije i formiranja karcinoma. Sprečavanjem ove interakcije može se izbeći degradacija p53 proteina. Neophodna su dalja istraživanja koja bi pokazala da li SOX14 dovodi do stabilizacije p53 proteina regulacijom kinaza koje učestvuju u regulaciji fosforilacije p53 proteina ili postoji mogućnost da SOX14 dovodi do stabilizacije p53 proteina tako što inhibira aktivnost E6 virusnog proteina. S obzirom da je stabilizacija i aktivacija p53 proteina važna strategija u lečenju brojnih tumora, a naročito tumora koji su izazvani virusom, neophodna su dalja istraživanja koja bi rasvetlila mehanizam regulacije stabilizacije p53 proteina u koji je SOX14 uključen.

### **5.2.6. SOX14 aktivira p53 signalni put**

p53 je glavni regulator p53 signalnog puta koji doprinosi pravilnom odvijanju ćelijskih procesa i očuvanju genoma u uslovima stresa. Gubitak funkcionalnog p53 proteina dovodi do genomske nestabilnosti, akumulacije mutacija i inicijacije nastanka tumora. p53 ostvaruje ulogu tumor supresora kao transkripcioni regulator, vezujući se za ciljane gene koji imaju bitnu ulogu u regulaciji ćelijskog ciklusa i/ili apoptoze (Oren 2003). *CDKN1A/p21<sup>Waf1/Cip1</sup>* pripada familiji ciklin zavisnih kinaza i jedan je od p53 ciljanih gena uključen u regulaciju ćelijskog ciklusa, dok je pro-apoptotski gen *BAX* ciljni gen p53 proteina uključen u regulaciju apoptoze. Stabilizovan p53 vezuje se za promotor gena *CDKN1A*, indukuje ekspresiju p21<sup>Waf1/Cip1</sup> proteina, koji dovodi do



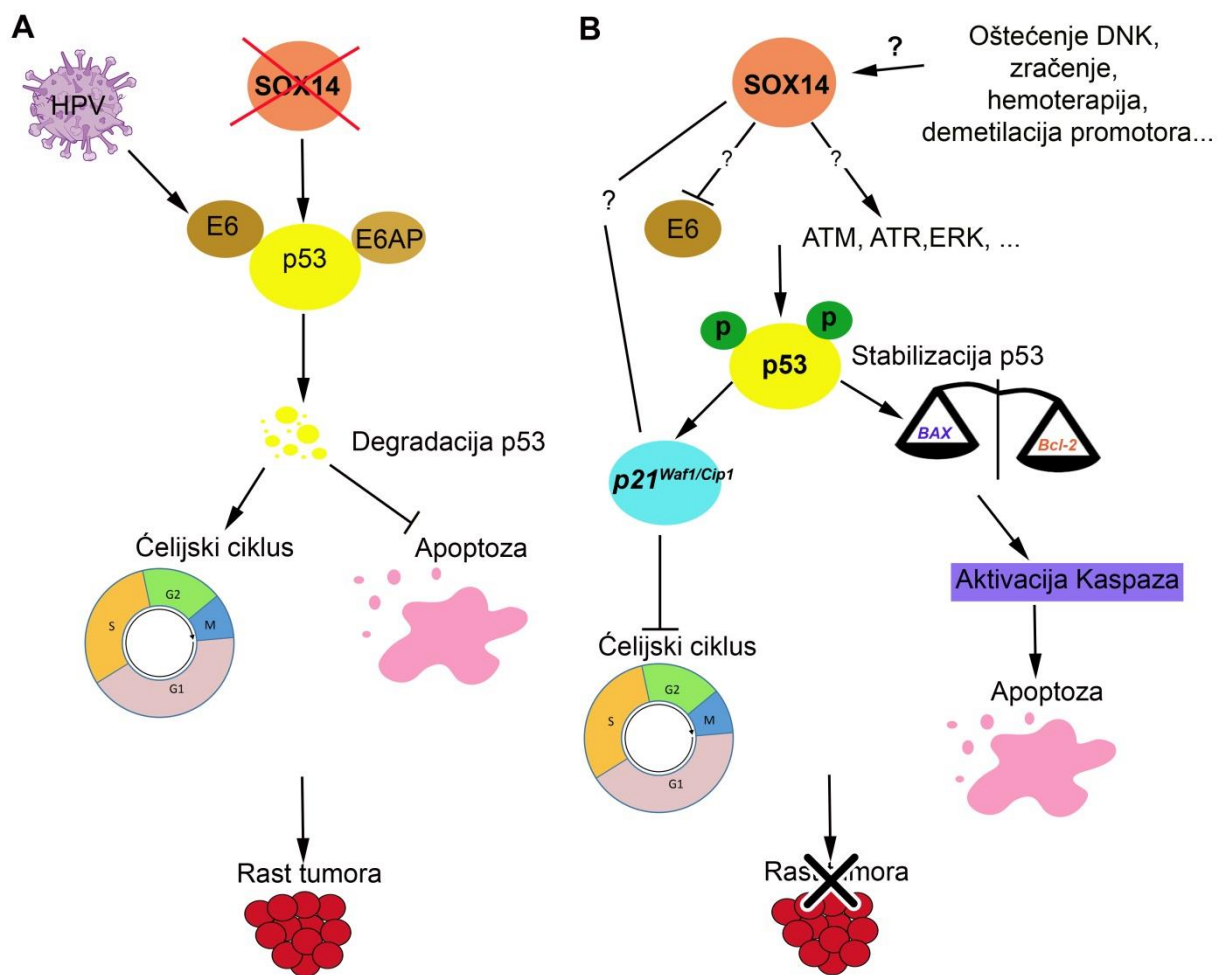
inhibicije CDK proteina, inhibirajući na taj način G1/S i G2/M tranziciju u ćelijskom ciklusu (Rožan and El-Deiry 2007). Sa druge strane, vezivanjem za promotor pro-apoptotskog gena *BAX*, dovodi do promene odnosa pro- i anti-apoptotskih gena i uvodi ćelije u završnu fazu pokretanja apoptoze, koja se karakteriše aktiviranjem složene kaspazne kaskade (Rudel 1999).

Rezultati prikazani u ovoj doktorskoj disertaciji su pokazali da povećana ekspresija SOX14 proteina indukuje ekspresiju *CDKN1A/p21<sup>Waf1/Cip1</sup>*, kako na iRNK (Slika 60B), tako i na proteinskom nivou (Slika 61) (Stanisavljević et al. 2017). Rezultati luciferaznog eseja prikazani u ovom radu su pokazali da je povećana ekspresija SOX14 proteina dovela do transkripcione aktivacije promotora gena *CDKN1A*, pri čemu je ovaj efekat bio jači u odnosu na aktivaciju promotora gena *CDKN1A* od strane p53 proteina (Slika 60A) (Stanisavljević et al. 2017). Ovi rezultati ukazuju da može postojati sinergistički efekat koji SOX14 i p53 ostvaruju na aktivnost promotora gena *CDKN1A*. Analizom ćelijskog ciklusa nakon povećanja ekspresije SOX14 proteina u HeLa ćelijama, pokazano je da SOX14 dovodi do blagog zastoja ćelija u ćelijskom ciklusu (Slika 49).

Rezultati analize ekspresije pro-apoptotskog gena *BAX* nakon povećane ekspresije SOX14 proteina su pokazali da SOX14 indukuje ekspresiju ovog gena (Slika 52A). Finalno, analizom osnovnih apoptotskih karakteristika ćelija, kao što su izmenjen odnos pro-apoptotskih i anti-apoptotskih gena, ekspresije PARP proteina, detekcija fragmentisanih jedara i brojanje apoptotskih ćelija na protočnom citometru, pokazano je da je povećana ekspresija SOX14 proteina indukovala apoptozu u HeLa ćelijama (Slike 50, 51, 52C i 53).

Povećana ekspresija *CDKN1A/p21<sup>Waf1/Cip1</sup>* i pro-apoptotskog gena *BAX*, kao i indukcija zastoja u ćelijskom ciklusu i apoptoze, ukazuje na to da SOX14 protein učestvuje ne samo u regulaciji stabilizacije p53 proteina, već i u aktivaciji p53 signalnog puta, što može biti ključni mehanizam kojim ovaj protein ostvaruje funkciju tumor supresora u HeLa ćelijama. Zapravo, stabilizacijom p53 tumor supresora, SOX14 protein dalje povećava ekspresiju p53 ciljnih gena, kao što su pro-apoptotski gen *BAX* i ciklin zavisna kinaza *CDKN1A/p21<sup>Waf1/Cip1</sup>*. Na taj način dolazi do inhibicije proliferacije, kao i do indukcije apoptoze i zastoja ćelijskog ciklusa, pri čemu se sprečava dalja maligna transformacija ćelije. Shematski prikaz uloge SOX14 u p53

signalnom putu u HeLa ćelijskoj liniji prikazan je na Slici 63. Rezultati prikazani u ovoj doktorskoj disertaciji koji govore o ulozi SOX14 proteina u regulaciji p53 signalnog puta, ukazuju da odsustvo aktivnosti SOX14 proteina usled metilacije ili mutacije u ćelijama poreklom od karcinoma grlića materice može dovesti do odsustva kontrole ćelijskog ciklusa i inhibicije apoptoze, što za posledicu dovodi do rasta tumora. Navedeni rezultati ukazuju da SOX14 protein ima funkciju tumor supresora.



**Slika 63: Shematski prikaz uloge SOX14 transkripcionog regulatora u aktivaciji p53 signalnog puta u HeLa ćelijama. A- Kada SOX14 nije aktivan (npr. metilovan), dolazi do degradacije p53 proteina od**

strane E6 onkoproteina. Na taj način p53 ne ostvaruje ulogu tumor supresora, što za posledicu ima odsustvo kontrole ćelijskog ciklusa i inhibiciju apoptoze i rast tumora. **B-** Kada je nivo SOX14 proteina povećan u HeLa ćelijama, (za sada nije poznat stimulans koji dovodi do povećanja nivoa SOX14, to mogu biti oštećenje DNK, zračenje, hemoterapija, demetilacija promotora ili nešto drugo), dolazi do fosforilacije p53 proteina i njegove stabilizacije. Mehanizam delovanja SOX14 na fosforilaciju p53 proteina je za sada nepoznat. Stabilisan p53 deluje kao transkripcioni regulator, dolazi do aktivacije pro-apoptotskog gena *BAX*, menja se odnos ekspresije *BAX/Bcl-2*, aktivira se kaskada kaspaza i dolazi do indukcije apoptoze. Sa druge strane p53 sam ili zajedno sa SOX14 aktivira i ciklin zavisnu kinazu p21<sup>Waf1/Cip1</sup>, što za posledicu ima zaustavljanje ćelijskog ciklusa. Na ovaj način sprečava se rast tumora.

Rezultati dobijeni istraživanjem na model sistemu karcinoma grlića materice ukazuju na izuzetno važnu ulogu SOX14 u regulaciji osnovnih ćelijskih procesa u ovim ćelijama. Na osnovu svega navedenog može se zaključiti da SOX14 ima značajnu ulogu u supresiji karcinoma grlića materice i da povećana ekspresije SOX14 proteina u ćelijama poreklom od grlića materice može imati dijagnostički značaj. Neophodna su dalja istraživanja koja bi doprinela novim saznanjima i koja bi svrstala SOX14 protein u terapeutske targete.

## 6. ZAKLJUČCI

Na osnovu prikazanih rezultata u ovom radu mogu se izvesti sledeći zaključci:

1. Ekspresija gena *SOX14/Sox14* raste tokom neuralne diferencijacije embrionalnih karcinomskih ćelija NT2/D1 i P19 *in vitro*.
2. SOX14 i SOXB1 proteini imaju preklapajući profil ekspresije tokom neuralne diferencijacije NT2/D1 i P19 ćelija *in vitro*.
3. Izlaskom ćelija iz stanja pluripotentnosti i ulaskom u proces neuralne diferencijacije, dolazi do povećanja ekspresije SOX14 proteina, što ukazuje da ovaj protein potencijalno ima važnu ulogu u navedenom procesu i da nivo ekspresije SOX14 može uticati na prelazak ćelija iz pluripotentnog u diferencirano stanje.
4. SOX14 se eksprimira u pluripotentnim ćelijama, neuronima, kao i u drugim tipovima ćelija koje se dobijaju tokom neuralne diferencijacije NT2/D1 i P19 ćelija *in vitro*.
5. Ekspresija gena *SOX14* je potencijalno regulisana na post-transkripcionom nivou, za sada nepoznatim mehanizmom, u pluripotentnim NT2/D1 i P19 ćelijama.
6. SOX14 ima nizak nivo ekspresije u ćelijama poreklom od karcinoma grlića materice.
7. Promotor gena *SOX14* je metilovan u ćelijama poreklom od karcinomagrlića materice.
8. Povećana ekspresija SOX14 proteina nema efekta na migraciju i invaziju HeLa ćelija.
9. Povećana ekspresija SOX14 proteina smanjuje proliferaciju i indukuje zastoje u ćelijskom ciklusu i proces apoptoze u HeLa ćelijama.
10. SOX14 dovodi do aktivacije promotora gena *TP53* u HeLa ćelijama, ali ne utiče na nivo ekspresije ovog gena.
11. SOX14 dovodi do povećanja nivoa endogenog p53 i njegove fosforilisane forme u HeLa ćelijama, što ukazuje da SOX14 dovodi do stabilizacije p53 proteina.

12. Povećana ekspresija SOX14 proteina indukuje ekspresiju p53 ciljnih gena čime je potvrđeno da je SOX14 deo p53 signalnog puta u HeLa ćelijama.
13. SOX14 ostvaruje ulogu tumor supresora u ćelijama poreklom od karcinoma grlića materice.
14. Imajući u vidu da je p53 signalni put kompromitovan prisustvom HPV virusa i da je povećana ekspresija SOX14 dovela do aktivacije ovog važnog signalnog puta, indukcija ekspresije SOX14 proteina u ćelijama poreklom od grlića materice može imati terapijski značaj.

## LITERATURA

- Abbas T, Jha S, Sherman NE, and Dutta A. 2007. Autocatalytic phosphorylation of CDK2 at the activating Thr160. *Cell cycle* 6(7):843-852.
- Anderson MW, Reynolds SH, You M, and Maronpot RM. 1992. Role of proto-oncogene activation in carcinogenesis. *Environmental health perspectives* 98:13-24.
- Andrews PW. 1984. Retinoic acid induces neuronal differentiation of a cloned human embryonal carcinoma cell line in vitro. *Developmental biology* 103(2):285-293.
- Andrews PW. 1988. Human teratocarcinomas. *Biochimica et biophysica acta* 948(1):17-36.
- Andrews PW. 1998. Teratocarcinomas and human embryology: pluripotent human EC cell lines. Review article. *APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica* 106(1):158-167; discussion 167-158.
- Andrews PW. 2002. From teratocarcinomas to embryonic stem cells. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences* 357(1420):405-417.
- Arsic N, Rajic T, Stanojcic S, Goodfellow PN, and Stevanovic M. 1998. Characterisation and mapping of the human SOX14 gene. *Cytogenetics and cell genetics* 83(1-2):139-146.
- Ashcroft M, Kubbutat MH, and Vousden KH. 1999. Regulation of p53 function and stability by phosphorylation. *Molecular and cellular biology* 19(3):1751-1758.
- Avilion AA, Nicolis SK, Pevny LH, Perez L, Vivian N, and Lovell-Badge R. 2003. Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. *Genes & development* 17(1):126-140.
- Azzarelli R, Oleari R, Lettieri A, Andre V, and Cariboni A. 2017. In Vitro, Ex Vivo and In Vivo Techniques to Study Neuronal Migration in the Developing Cerebral Cortex. *Brain sciences* 7(5).
- Barrionuevo FJ, Hurtado A, Kim GJ, Real FM, Bakkali M, Kopp JL, Sander M, Scherer G, Burgos M, and Jimenez R. 2016. Sox9 and Sox8 protect the adult testis from male-to-female genetic reprogramming and complete degeneration. *eLife* 5.
- Bayer SA, Altman J, Russo RJ, and Zhang X. 1993. Timetables of neurogenesis in the human brain based on experimentally determined patterns in the rat. *Neurotoxicology* 14(1):83-144.
- Belliveau DJ, Bechberger JF, Rogers KA, and Naus CC. 1997. Differential expression of gap junctions in neurons and astrocytes derived from P19 embryonal carcinoma cells. *Developmental genetics* 21(3):187-200.
- Bergsland M, Werme M, Malewicz M, Perlmann T, and Muhr J. 2006. The establishment of neuronal properties is controlled by Sox4 and Sox11. *Genes & development* 20(24):3475-3486.
- Bernard P, and Harley VR. 2010. Acquisition of SOX transcription factor specificity through protein-protein interaction, modulation of Wnt signalling and post-translational modification. *The international journal of biochemistry & cell biology* 42(3):400-410.
- Bertrand N, Castro DS, and Guillemot F. 2002. Proneural genes and the specification of neural cell types. *Nature reviews Neuroscience* 3(7):517-530.

- Bielle F, Griveau A, Narboux-Neme N, Vigneau S, Sigrist M, Arber S, Wassef M, and Pierani A. 2005. Multiple origins of Cajal-Retzius cells at the borders of the developing pallium. *Nature neuroscience* 8(8):1002-1012.
- Bird AP. 1986. CpG-rich islands and the function of DNA methylation. *Nature* 321(6067):209-213.
- Bommer GT, Gerin I, Feng Y, Kaczorowski AJ, Kuick R, Love RE, Zhai Y, Giordano TJ, Qin ZS, Moore BB et al. . 2007. p53-mediated activation of miRNA34 candidate tumor-suppressor genes. *Current biology : CB* 17(15):1298-1307.
- Borek C. 1993. Molecular mechanisms in cancer induction and prevention. *Environmental health perspectives* 101 Suppl 3:237-245.
- Boulares AH, Yakovlev AG, Ivanova V, Stoica BA, Wang G, Iyer S, and Smulson M. 1999. Role of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) cleavage in apoptosis. Caspase 3-resistant PARP mutant increases rates of apoptosis in transfected cells. *The Journal of biological chemistry* 274(33):22932-22940.
- Bowles J, Schepers G, and Koopman P. 2000. Phylogeny of the SOX family of developmental transcription factors based on sequence and structural indicators. *Developmental biology* 227(2):239-255.
- Boyer LA, Lee TI, Cole MF, Johnstone SE, Levine SS, Zucker JP, Guenther MG, Kumar RM, Murray HL, Jenner RG et al. . 2005. Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell* 122(6):947-956.
- Bronner ME. 2012. Formation and migration of neural crest cells in the vertebrate embryo. *Histochemistry and cell biology* 138(2):179-186.
- Brooks CL, and Gu W. 2006. p53 ubiquitination: Mdm2 and beyond. *Molecular cell* 21(3):307-315.
- Butts JC, McCreedy DA, Martinez-Vargas JA, Mendoza-Camacho FN, Hookway TA, Gifford CA, Taneja P, Noble-Haesslein L, and McDevitt TC. 2017. Differentiation of V2a interneurons from human pluripotent stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 114(19):4969-4974.
- Bylund M, Andersson E, Novitsch BG, and Muhr J. 2003. Vertebrate neurogenesis is counteracted by Sox1-3 activity. *Nature neuroscience* 6(11):1162-1168.
- Caglayan D, Lundin E, Kastemar M, Westermark B, and Ferletta M. 2013. Sox21 inhibits glioma progression in vivo by forming complexes with Sox2 and stimulating aberrant differentiation. *International journal of cancer* 133(6):1345-1356.
- Campos-Ortega JA. 1998. The genetics of the *Drosophila* achaete-scute gene complex: a historical appraisal. *The International journal of developmental biology* 42(3):291-297.
- Castillo SD, and Sanchez-Cespedes M. 2012. The SOX family of genes in cancer development: biological relevance and opportunities for therapy. *Expert opinion on therapeutic targets* 16(9):903-919.
- Cermenati S, Moleri S, Cimbro S, Corti P, Del Giacco L, Amodeo R, Dejana E, Koopman P, Cotelli F, and Beltrame M. 2008. Sox18 and Sox7 play redundant roles in vascular development. *Blood* 111(5):2657-2666.
- Chang X, Zhang J, Huang C, Pang X, Luo Q, Zhang H, and Zhang S. 2015. Sex-determining region Y-related high mobility group box (SOX)-2 is overexpressed in cervical squamous cell carcinoma and contributes cervical cancer cell

- migration and invasion in vitro. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* 36(10):7725-7733.
- Chen J, Zheng L, Hua L, Zhang J, Wang C, Yao K, and Ren X. 2016. SOX1 suppresses cell growth and induces apoptosis by regulating Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway in gastric cancer. *International journal of clinical and experimental pathology* 9(11):11658-11663.
- Chen S, Li X, Lu D, Xu Y, Mou W, Wang L, Chen Y, Liu Y, Li X, Li LY et al. . 2014. SOX2 regulates apoptosis through MAP4K4-survivin signaling pathway in human lung cancer cells. *Carcinogenesis* 35(3):613-623.
- Chen WY, and Baylin SB. 2005. Inactivation of tumor suppressor genes: choice between genetic and epigenetic routes. *Cell cycle* 4(1):10-12.
- Cheung WM, Fu WY, Hui WS, and Ip NY. 1999. Production of human CNS neurons from embryonal carcinoma cells using a cell aggregation method. *BioTechniques* 26(5):946-948, 950-942, 954.
- Chew LJ, and Gallo V. 2009. The Yin and Yang of Sox proteins: Activation and repression in development and disease. *Journal of neuroscience research* 87(15):3277-3287.
- Chuai M, and Weijer CJ. 2008. The mechanisms underlying primitive streak formation in the chick embryo. *Current topics in developmental biology* 81:135-156.
- Clancy B, Darlington RB, and Finlay BL. 2001. Translating developmental time across mammalian species. *Neuroscience* 105(1):7-17.
- Clark SJ, Harrison J, Paul CL, and Frommer M. 1994. High sensitivity mapping of methylated cytosines. *Nucleic acids research* 22(15):2990-2997.
- Clovis YM, Seo SY, Kwon JS, Rhee JC, Yeo S, Lee JW, Lee S, and Lee SK. 2016. Chx10 Consolidates V2a Interneuron Identity through Two Distinct Gene Repression Modes. *Cell reports* 16(6):1642-1652.
- Collignon J, Sockanathan S, Hacker A, Cohen-Tannoudji M, Norris D, Rastan S, Stevanovic M, Goodfellow PN, and Lovell-Badge R. 1996. A comparison of the properties of Sox-3 with Sry and two related genes, Sox-1 and Sox-2. *Development* 122(2):509-520.
- Cooper JA. 2008. A mechanism for inside-out lamination in the neocortex. *Trends in neurosciences* 31(3):113-119.
- Coyle DE, Li J, and Baccei M. 2011. Regional differentiation of retinoic acid-induced human pluripotent embryonic carcinoma stem cell neurons. *PloS one* 6(1):e16174.
- Cunningham DD, Meng Z, Fritsch B, and Casey ES. 2008. Cloning and developmental expression of the soxB2 genes, sox14 and sox21, during *Xenopus laevis* embryogenesis. *The International journal of developmental biology* 52(7):999-1004.
- Deffie A, Wu H, Reinke V, and Lozano G. 1993. The tumor suppressor p53 regulates its own transcription. *Molecular and cellular biology* 13(6):3415-3423.
- DeLeo AB, Jay G, Appella E, Dubois GC, Law LW, and Old LJ. 1979. Detection of a transformation-related antigen in chemically induced sarcomas and other transformed cells of the mouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76(5):2420-2424.



- Delogu A, Sellers K, Zagoraiou L, Bocianowska-Zbrog A, Mandal S, Guimera J, Rubenstein JL, Sugden D, Jessell T, and Lumsden A. 2012. Subcortical visual shell nuclei targeted by ipRGCs develop from a Sox14<sup>+</sup>-GABAergic progenitor and require Sox14 to regulate daily activity rhythms. *Neuron* 75(4):648-662.
- Desai AR, and McConnell SK. 2000. Progressive restriction in fate potential by neural progenitors during cerebral cortical development. *Development* 127(13):2863-2872.
- Djurovic J, and Stevanovic M. 2004. Structural and functional characterization of the human SOX14 promoter. *Biochimica et biophysica acta* 1680(1):53-59.
- Dong C, Wilhelm D, and Koopman P. 2004. Sox genes and cancer. *Cytogenetic and genome research* 105(2-4):442-447.
- Doorbar J, Egawa N, Griffin H, Kranjec C, and Murakami I. 2015. Human papillomavirus molecular biology and disease association. *Reviews in medical virology* 25 Suppl 1:2-23.
- Drakulic D, Krstic A, and Stevanovic M. 2012. Establishment and initial characterization of SOX2-overexpressing NT2/D1 cell clones. *Genetics and molecular research : GMR* 11(2):1385-1400.
- Drakulic D, Vicentic JM, Schwirtlich M, Tomic J, Krstic A, Klajn A, and Stevanovic M. 2015. The overexpression of SOX2 affects the migration of human teratocarcinoma cell line NT2/D1. *Anais da Academia Brasileira de Ciencias* 87(1):389-404.
- Duska LR. 2016. Cervical Cancer: The Next Generation of Prevention, Detection, and Treatment. *Clinical therapeutics* 38(3):446-448.
- el-Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE, Levy DB, Parsons R, Trent JM, Lin D, Mercer WE, Kinzler KW, and Vogelstein B. 1993. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* 75(4):817-825.
- el-Deiry WS, Tokino T, Waldman T, Oliner JD, Velculescu VE, Burrell M, Hill DE, Healy E, Rees JL, Hamilton SR et al. . 1995. Topological control of p21WAF1/CIP1 expression in normal and neoplastic tissues. *Cancer research* 55(13):2910-2919.
- Eliyahu D, Michalovitz D, Eliyahu S, Pinhasi-Kimhi O, and Oren M. 1989. Wild-type p53 can inhibit oncogene-mediated focus formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86(22):8763-8767.
- Esteller M. 2002. CpG island hypermethylation and tumor suppressor genes: a booming present, a brighter future. *Oncogene* 21(35):5427-5440.
- Fang S, Jensen JP, Ludwig RL, Vousden KH, and Weissman AM. 2000. Mdm2 is a RING finger-dependent ubiquitin protein ligase for itself and p53. *The Journal of biological chemistry* 275(12):8945-8951.
- Favaro R, Valotta M, Ferri AL, Latorre E, Mariani J, Giachino C, Lancini C, Tosetti V, Ottolenghi S, Taylor V et al. . 2009. Hippocampal development and neural stem cell maintenance require Sox2-dependent regulation of Shh. *Nature neuroscience* 12(10):1248-1256.
- Fearon ER, and Vogelstein B. 1990. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 61(5):759-767.
- Feng Z, and Levine AJ. 2010. The regulation of energy metabolism and the IGF-1/mTOR pathways by the p53 protein. *Trends in cell biology* 20(7):427-434.
- Ferri AL, Cavallaro M, Braidà D, Di Cristofano A, Canta A, Vezzani A, Ottolenghi S, Pandolfi PP, Sala M, DeBiasi S et al. . 2004. Sox2 deficiency causes

- neurodegeneration and impaired neurogenesis in the adult mouse brain. *Development* 131(15):3805-3819.
- Finlay CA, Hinds PW, and Levine AJ. 1989. The p53 proto-oncogene can act as a suppressor of transformation. *Cell* 57(7):1083-1093.
- Fischer M. 2017. Census and evaluation of p53 target genes. *Oncogene* 36(28):3943-3956.
- Flora A, Klisch TJ, Schuster G, and Zoghbi HY. 2009. Deletion of *Atoh1* disrupts Sonic Hedgehog signaling in the developing cerebellum and prevents medulloblastoma. *Science* 326(5958):1424-1427.
- Fode C, Ma Q, Casarosa S, Ang SL, Anderson DJ, and Guillemot F. 2000. A role for neural determination genes in specifying the dorsoventral identity of telencephalic neurons. *Genes & development* 14(1):67-80.
- Frantz GD, and McConnell SK. 1996. Restriction of late cerebral cortical progenitors to an upper-layer fate. *Neuron* 17(1):55-61.
- Freedman DA, Wu L, and Levine AJ. 1999. Functions of the MDM2 oncoprotein. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 55(1):96-107.
- Garcia I, Aldaregia J, Marjanovic Vicentic J, Aldaz P, Moreno-Cugnon L, Torres-Bayona S, Carrasco-Garcia E, Garros-Regulez L, Egana L, Rubio A et al. . 2017. Oncogenic activity of SOX1 in glioblastoma. *Scientific reports* 7:46575.
- Gardiner-Garden M, and Frommer M. 1987. CpG islands in vertebrate genomes. *Journal of molecular biology* 196(2):261-282.
- Gleeson JG, and Walsh CA. 2000. Neuronal migration disorders: from genetic diseases to developmental mechanisms. *Trends in neurosciences* 23(8):352-359.
- Gonzalez-Burguera I, Ricobaraza A, Aretxabala X, Barrondo S, Garcia del Cano G, Lopez de Jesus M, and Salles J. 2016. Highly efficient generation of glutamatergic/cholinergic NT2-derived postmitotic human neurons by short-term treatment with the nucleoside analogue cytosine beta-D-arabinofuranoside. *Stem cell research* 16(2):541-551.
- Gonzalez-Recio O. 2011. Epigenetics: a new challenge in the post-genomic era of livestock. *Frontiers in genetics* 2:106.
- Graham V, Khudyakov J, Ellis P, and Pevny L. 2003. SOX2 functions to maintain neural progenitor identity. *Neuron* 39(5):749-765.
- Greber B, Lehrach H, and Adjaye J. 2007. Silencing of core transcription factors in human EC cells highlights the importance of autocrine FGF signaling for self-renewal. *BMC developmental biology* 7:46.
- Gredic M. 2015. Konstruisanje i funkcionalna analiza mutiranih formi humanog proteina SOX14 [Master rad]. Beograd: Univerzitet u Beogradu.
- Gubbay J, Collignon J, Koopman P, Capel B, Economou A, Munsterberg A, Vivian N, Goodfellow P, and Lovell-Badge R. 1990. A gene mapping to the sex-determining region of the mouse Y chromosome is a member of a novel family of embryonically expressed genes. *Nature* 346(6281):245-250.
- Guillemain I, Alonso G, Patey G, Privat A, and Chaudieu I. 2000. Human NT2 neurons express a large variety of neurotransmission phenotypes in vitro. *The Journal of comparative neurology* 422(3):380-395.
- Guth SI, and Wegner M. 2008. Having it both ways: Sox protein function between conservation and innovation. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 65(19):3000-3018.

- Haag J, Gebhard PM, and Aigner T. 2008. SOX gene expression in human osteoarthritic cartilage. *Pathobiology : journal of immunopathology, molecular and cellular biology* 75(3):195-199.
- Hacker A, Capel B, Goodfellow P, and Lovell-Badge R. 1995. Expression of Sry, the mouse sex determining gene. *Development* 121(6):1603-1614.
- Halazonetis TD, and Kandil AN. 1993. Conformational shifts propagate from the oligomerization domain of p53 to its tetrameric DNA binding domain and restore DNA binding to select p53 mutants. *The EMBO journal* 12(13):5057-5064.
- Halder D, Lee CH, Hyun JY, Chang GE, Cheong E, and Shin I. 2017. Suppression of Sin3A activity promotes differentiation of pluripotent cells into functional neurons. *Scientific reports* 7:44818.
- Han F, Liu W, Jiang X, Shi X, Yin L, Ao L, Cui Z, Li Y, Huang C, Cao J et al. . 2015. SOX30, a novel epigenetic silenced tumor suppressor, promotes tumor cell apoptosis by transcriptional activating p53 in lung cancer. *Oncogene* 34(33):4391-4402.
- Hanahan D, and Weinberg RA. 2000. The hallmarks of cancer. *Cell* 100(1):57-70.
- Hand R, Bortone D, Mattar P, Nguyen L, Heng JI, Guerrier S, Boutt E, Peters E, Barnes AP, Parras C et al. . 2005. Phosphorylation of Neurogenin2 specifies the migration properties and the dendritic morphology of pyramidal neurons in the neocortex. *Neuron* 48(1):45-62.
- Harada A, Teng J, Takei Y, Oguchi K, and Hirokawa N. 2002. MAP2 is required for dendrite elongation, PKA anchoring in dendrites, and proper PKA signal transduction. *The Journal of cell biology* 158(3):541-549.
- Hargrave M, James K, Nield K, Toomes C, Georgas K, Sullivan T, Verzijl HT, Oley CA, Little M, De Jonghe P et al. . 2000a. Fine mapping of the neurally expressed gene SOX14 to human 3q23, relative to three congenital diseases. *Human genetics* 106(4):432-439.
- Hargrave M, Karunaratne A, Cox L, Wood S, Koopman P, and Yamada T. 2000b. The HMG box transcription factor gene Sox14 marks a novel subset of ventral interneurons and is regulated by sonic hedgehog. *Developmental biology* 219(1):142-153.
- Harley VR, Lovell-Badge R, and Goodfellow PN. 1994. Definition of a consensus DNA binding site for SRY. *Nucleic acids research* 22(8):1500-1501.
- Hashimoto-Torii K, Motoyama J, Hui CC, Kuroiwa A, Nakafuku M, and Shimamura K. 2003. Differential activities of Sonic hedgehog mediated by Gli transcription factors define distinct neuronal subtypes in the dorsal thalamus. *Mechanisms of development* 120(10):1097-1111.
- Hassan BA, Bermingham NA, He Y, Sun Y, Jan YN, Zoghbi HY, and Bellen HJ. 2000. atonal regulates neurite arborization but does not act as a proneural gene in the *Drosophila* brain. *Neuron* 25(3):549-561.
- Haston KM, Tung JY, and Reijo Pera RA. 2009. Dazl functions in maintenance of pluripotency and genetic and epigenetic programs of differentiation in mouse primordial germ cells in vivo and in vitro. *PloS one* 4(5):e5654.
- Herman JG, Graff JR, Myohanen S, Nelkin BD, and Baylin SB. 1996. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93(18):9821-9826.

- Hoefflin S, and Carter DA. 2014. Neuronal expression of SOX2 is enriched in specific hypothalamic cell groups. *Journal of chemical neuroanatomy* 61-62:153-160.
- Hollstein M, Rice K, Greenblatt MS, Soussi T, Fuchs R, Sorlie T, Hovig E, Smith-Sorensen B, Montesano R, and Harris CC. 1994. Database of p53 gene somatic mutations in human tumors and cell lines. *Nucleic acids research* 22(17):3551-3555.
- Holmberg J, Hansson E, Malewicz M, Sandberg M, Perlmann T, Lendahl U, and Muhr J. 2008. SoxB1 transcription factors and Notch signaling use distinct mechanisms to regulate proneural gene function and neural progenitor differentiation. *Development* 135(10):1843-1851.
- Huang Z. 2009. Molecular regulation of neuronal migration during neocortical development. *Molecular and cellular neurosciences* 42(1):11-22.
- Hur W, Rhim H, Jung CK, Kim JD, Bae SH, Jang JW, Yang JM, Oh ST, Kim DG, Wang HJ et al. . 2010. SOX4 overexpression regulates the p53-mediated apoptosis in hepatocellular carcinoma: clinical implication and functional analysis in vitro. *Carcinogenesis* 31(7):1298-1307.
- Iacovitti L, Stull ND, and Jin H. 2001. Differentiation of human dopamine neurons from an embryonic carcinomal stem cell line. *Brain research* 912(1):99-104.
- Jager P, Ye Z, Yu X, Zagoraïou L, Prekop HT, Partanen J, Jessell TM, Wisden W, Brickley SG, and Delogu A. 2016. Tectal-derived interneurons contribute to phasic and tonic inhibition in the visual thalamus. *Nature communications* 7:13579.
- Jeske YW, Bowles J, Greenfield A, and Koopman P. 1995. Expression of a linear Sry transcript in the mouse genital ridge. *Nature genetics* 10(4):480-482.
- Jia X, Li X, Xu Y, Zhang S, Mou W, Liu Y, Liu Y, Lv D, Liu CH, Tan X et al. . 2011. SOX2 promotes tumorigenesis and increases the anti-apoptotic property of human prostate cancer cell. *Journal of molecular cell biology* 3(4):230-238.
- Johnson JE, Zimmerman K, Saito T, and Anderson DJ. 1992. Induction and repression of mammalian achaete-scute homologue (MASH) gene expression during neuronal differentiation of P19 embryonal carcinoma cells. *Development* 114(1):75-87.
- Jones-Villeneuve EM, McBurney MW, Rogers KA, and Kalnins VI. 1982. Retinoic acid induces embryonal carcinoma cells to differentiate into neurons and glial cells. *The Journal of cell biology* 94(2):253-262.
- Jones DL, and Munger K. 1996. Interactions of the human papillomavirus E7 protein with cell cycle regulators. *Seminars in cancer biology* 7(6):327-337.
- Jones JR, and Zhang SC. 2016. Engineering human cells and tissues through pluripotent stem cells. *Current opinion in biotechnology* 40:133-138.
- Jones RG, and Thompson CB. 2009. Tumor suppressors and cell metabolism: a recipe for cancer growth. *Genes & development* 23(5):537-548.
- Jones SN, Roe AE, Donehower LA, and Bradley A. 1995. Rescue of embryonic lethality in Mdm2-deficient mice by absence of p53. *Nature* 378(6553):206-208.
- Juven T, Barak Y, Zauberman A, George DL, and Oren M. 1993. Wild type p53 can mediate sequence-specific transactivation of an internal promoter within the mdm2 gene. *Oncogene* 8(12):3411-3416.
- Kamachi Y, and Kondoh H. 2013. Sox proteins: regulators of cell fate specification and differentiation. *Development* 140(20):4129-4144.

- Kamachi Y, Sockanathan S, Liu Q, Breitman M, Lovell-Badge R, and Kondoh H. 1995. Involvement of SOX proteins in lens-specific activation of crystallin genes. *The EMBO journal* 14(14):3510-3519.
- Kamachi Y, Uchikawa M, Collignon J, Lovell-Badge R, and Kondoh H. 1998. Involvement of Sox1, 2 and 3 in the early and subsequent molecular events of lens induction. *Development* 125(13):2521-2532.
- Kamachi Y, Uchikawa M, and Kondoh H. 2000. Pairing SOX off: with partners in the regulation of embryonic development. *Trends in genetics : TIG* 16(4):182-187.
- Kan L, Israsena N, Zhang Z, Hu M, Zhao LR, Jalali A, Sahni V, and Kessler JA. 2004. Sox1 acts through multiple independent pathways to promote neurogenesis. *Developmental biology* 269(2):580-594.
- Karnavas T, Mandalos N, Malas S, and Remboutsika E. 2013. SoxB, cell cycle and neurogenesis. *Frontiers in physiology* 4:298.
- Karsten SL, Kudo LC, Jackson R, Sabatti C, Kornblum HI, and Geschwind DH. 2003. Global analysis of gene expression in neural progenitors reveals specific cell-cycle, signaling, and metabolic networks. *Developmental biology* 261(1):165-182.
- Kastan MB, Zhan Q, el-Deiry WS, Carrier F, Jacks T, Walsh WV, Plunkett BS, Vogelstein B, and Fornace AJ, Jr. 1992. A mammalian cell cycle checkpoint pathway utilizing p53 and GADD45 is defective in ataxia-telangiectasia. *Cell* 71(4):587-597.
- Kawaguchi A, Miyata T, Sawamoto K, Takashita N, Murayama A, Akamatsu W, Ogawa M, Okabe M, Tano Y, Goldman SA et al. . 2001. Nestin-EGFP transgenic mice: visualization of the self-renewal and multipotency of CNS stem cells. *Molecular and cellular neurosciences* 17(2):259-273.
- Kawauchi T. 2015. Cellular insights into cerebral cortical development: focusing on the locomotion mode of neuronal migration. *Frontiers in cellular neuroscience* 9:394.
- Kevenaar JT, and Hoogenraad CC. 2015. The axonal cytoskeleton: from organization to function. *Frontiers in molecular neuroscience* 8:44.
- Kiecker C, Bates T, and Bell E. 2016. Molecular specification of germ layers in vertebrate embryos. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 73(5):923-947.
- Kiecker C, and Lumsden A. 2004. Hedgehog signaling from the ZLI regulates diencephalic regional identity. *Nature neuroscience* 7(11):1242-1249.
- Kim R, Trubetskoy A, Suzuki T, Jenkins NA, Copeland NG, and Lenz J. 2003. Genome-based identification of cancer genes by proviral tagging in mouse retrovirus-induced T-cell lymphomas. *Journal of virology* 77(3):2056-2062.
- Kishi M, Mizuseki K, Sasai N, Yamazaki H, Shiota K, Nakanishi S, and Sasai Y. 2000. Requirement of Sox2-mediated signaling for differentiation of early Xenopus neuroectoderm. *Development* 127(4):791-800.
- Klajn A, Drakulic D, Tosic M, Pavkovic Z, Schwirtlich M, and Stevanovic M. 2014. SOX2 overexpression affects neural differentiation of human pluripotent NT2/D1 cells. *Biochemistry Biokhimiia* 79(11):1172-1182.
- Kolle G, Shepherd JL, Gardiner B, Kassahn KS, Cloonan N, Wood DL, Nourbakhsh E, Taylor DF, Wani S, Chy HS et al. . 2011. Deep-transcriptome and ribonome sequencing redefines the molecular networks of pluripotency and the extracellular space in human embryonic stem cells. *Genome research* 21(12):2014-2025.

- Koopman P, Munsterberg A, Capel B, Vivian N, and Lovell-Badge R. 1990. Expression of a candidate sex-determining gene during mouse testis differentiation. *Nature* 348(6300):450-452.
- Kopp JL, Ormsbee BD, Desler M, and Rizzino A. 2008. Small increases in the level of Sox2 trigger the differentiation of mouse embryonic stem cells. *Stem cells* 26(4):903-911.
- Kress M, May E, Cassingena R, and May P. 1979. Simian virus 40-transformed cells express new species of proteins precipitable by anti-simian virus 40 tumor serum. *Journal of virology* 31(2):472-483.
- Kruse JP, and Gu W. 2009. Modes of p53 regulation. *Cell* 137(4):609-622.
- Kuhlbrodt K, Herbarth B, Sock E, Enderich J, Hermans-Borgmeyer I, and Wegner M. 1998. Cooperative function of POU proteins and SOX proteins in glial cells. *The Journal of biological chemistry* 273(26):16050-16057.
- Kurtsdotter I, Topcic D, Karlen A, Singla B, Hagey DW, Bergsland M, Siesjo P, Nister M, Carlson JW, Lefebvre V et al. . 2017. SOX5/6/21 Prevent Oncogene-Driven Transformation of Brain Stem Cells. *Cancer research* 77(18):4985-4997.
- Lambert PF, Kashanchi F, Radonovich MF, Shiekhattar R, and Brady JN. 1998. Phosphorylation of p53 serine 15 increases interaction with CBP. *The Journal of biological chemistry* 273(49):33048-33053.
- Lane DP. 1992. Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature* 358(6381):15-16.
- Lane DP, and Crawford LV. 1979. T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. *Nature* 278(5701):261-263.
- Laudet V, Stehelin D, and Clevers H. 1993. Ancestry and diversity of the HMG box superfamily. *Nucleic acids research* 21(10):2493-2501.
- Lee SI, Yun J, Baek JY, Jeong YJ, Kim JA, Kang JS, Park SH, Kim SK, and Park SK. 2015. NgR1 Expressed in P19 Embryonal Carcinoma Cells Differentiated by Retinoic Acid Can Activate STAT3. *The Korean journal of physiology & pharmacology : official journal of the Korean Physiological Society and the Korean Society of Pharmacology* 19(2):105-109.
- Lee VM, and Andrews PW. 1986. Differentiation of NTERA-2 clonal human embryonal carcinoma cells into neurons involves the induction of all three neurofilament proteins. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 6(2):514-521.
- Lee YJ, Ramakrishna S, Chauhan H, Park WS, Hong SH, and Kim KS. 2016. Dissecting microRNA-mediated regulation of stemness, reprogramming, and pluripotency. *Cell regeneration* 5:2.
- Lefebvre V, Dumitriu B, Penzo-Mendez A, Han Y, and Pallavi B. 2007. Control of cell fate and differentiation by Sry-related high-mobility-group box (Sox) transcription factors. *The international journal of biochemistry & cell biology* 39(12):2195-2214.
- Levine AJ, Hu W, and Feng Z. 2006. The P53 pathway: what questions remain to be explored? *Cell death and differentiation* 13(6):1027-1036.
- Levine AJ, and Oren M. 2009. The first 30 years of p53: growing ever more complex. *Nature reviews Cancer* 9(10):749-758.
- Li F, Wang T, and Tang S. 2015. SOX14 promotes proliferation and invasion of cervical cancer cells through Wnt/beta-catenin pathway. *International journal of clinical and experimental pathology* 8(2):1698-1704.

- Li J, Pan G, Cui K, Liu Y, Xu S, and Pei D. 2007. A dominant-negative form of mouse SOX2 induces trophectoderm differentiation and progressive polyploidy in mouse embryonic stem cells. *The Journal of biological chemistry* 282(27):19481-19492.
- Li J, and Yuan J. 2008. Caspases in apoptosis and beyond. *Oncogene* 27(48):6194-6206.
- Li K, Wang RW, Jiang YG, Zou YB, and Guo W. 2013. Overexpression of Sox3 is associated with diminished prognosis in esophageal squamous cell carcinoma. *Annals of surgical oncology* 20 Suppl 3:S459-466.
- Li LC, and Dahiya R. 2002. MethPrimer: designing primers for methylation PCRs. *Bioinformatics* 18(11):1427-1431.
- Li M, He Y, Dubois W, Wu X, Shi J, and Huang J. 2012. Distinct regulatory mechanisms and functions for p53-activated and p53-repressed DNA damage response genes in embryonic stem cells. *Molecular cell* 46(1):30-42.
- Li YJ, Wei ZM, Meng YX, and Ji XR. 2005. Beta-catenin up-regulates the expression of cyclinD1, c-myc and MMP-7 in human pancreatic cancer: relationships with carcinogenesis and metastasis. *World journal of gastroenterology* 11(14):2117-2123.
- Lin YW, Tsao CM, Yu PN, Shih YL, Lin CH, and Yan MD. 2013. SOX1 suppresses cell growth and invasion in cervical cancer. *Gynecologic oncology* 131(1):174-181.
- Linzer DI, and Levine AJ. 1979. Characterization of a 54K dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. *Cell* 17(1):43-52.
- Liu YR, Laghari ZA, Novoa CA, Hughes J, Webster JR, Goodwin PE, Wheatley SP, and Scotting PJ. 2014. Sox2 acts as a transcriptional repressor in neural stem cells. *BMC neuroscience* 15:95.
- Loeb LA, Loeb KR, and Anderson JP. 2003. Multiple mutations and cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100(3):776-781.
- Loughery J, Cox M, Smith LM, and Meek DW. 2014. Critical role for p53-serine 15 phosphorylation in stimulating transactivation at p53-responsive promoters. *Nucleic acids research* 42(12):7666-7680.
- Lu H, and Levine AJ. 1995. Human TAFII31 protein is a transcriptional coactivator of the p53 protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92(11):5154-5158.
- Lundberg IV, Edin S, Eklof V, Oberg A, Palmqvist R, and Wikberg ML. 2016. SOX2 expression is associated with a cancer stem cell state and down-regulation of CDX2 in colorectal cancer. *BMC cancer* 16:471.
- MacPherson PA, and McBurney MW. 1995. P19 Embryonal Carcinoma Cells: A Source of Cultured Neurons Amenable to Genetic Manipulation. *Methods* 7(3):238-252.
- Mandal M, Bandyopadhyay D, Goepfert TM, and Kumar R. 1998. Interferon-induces expression of cyclin-dependent kinase-inhibitors p21WAF1 and p27Kip1 that prevent activation of cyclin-dependent kinase by CDK-activating kinase (CAK). *Oncogene* 16(2):217-225.

- Marine JC, Francoz S, Maetens M, Wahl G, Toledo F, and Lozano G. 2006. Keeping p53 in check: essential and synergistic functions of Mdm2 and Mdm4. *Cell death and differentiation* 13(6):927-934.
- Masui S, Nakatake Y, Toyooka Y, Shimosato D, Yagi R, Takahashi K, Okochi H, Okuda A, Matoba R, Sharov AA et al. . 2007. Pluripotency governed by Sox2 via regulation of Oct3/4 expression in mouse embryonic stem cells. *Nature cell biology* 9(6):625-635.
- Mathelier A, Fornes O, Arenillas DJ, Chen CY, Denay G, Lee J, Shi W, Shyr C, Tan G, Worsley-Hunt R et al. . 2016. JASPAR 2016: a major expansion and update of the open-access database of transcription factor binding profiles. *Nucleic acids research* 44(D1):D110-115.
- Matsuda S, Kuwako K, Okano HJ, Tsutsumi S, Aburatani H, Saga Y, Matsuzaki Y, Akaike A, Sugimoto H, and Okano H. 2012. Sox21 promotes hippocampal adult neurogenesis via the transcriptional repression of the Hes5 gene. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 32(36):12543-12557.
- McBurney MW. 1993. P19 embryonal carcinoma cells. *The International journal of developmental biology* 37(1):135-140.
- McBurney MW, Reuhl KR, Ally AI, Nasipuri S, Bell JC, and Craig J. 1988. Differentiation and maturation of embryonal carcinoma-derived neurons in cell culture. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 8(3):1063-1073.
- McBurney MW, and Rogers BJ. 1982. Isolation of male embryonal carcinoma cells and their chromosome replication patterns. *Developmental biology* 89(2):503-508.
- McConnell SK, and Kaznowski CE. 1991. Cell cycle dependence of laminar determination in developing neocortex. *Science* 254(5029):282-285.
- Meek DW, and Anderson CW. 2009. Posttranslational modification of p53: cooperative integrators of function. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 1(6):a000950.
- Melero JA, Stitt DT, Mangel WF, and Carroll RB. 1979. Identification of new polypeptide species (48-55K) immunoprecipitable by antiserum to purified large T antigen and present in SV40-infected and -transformed cells. *Virology* 93(2):466-480.
- Menendez D, Inga A, and Resnick MA. 2009. The expanding universe of p53 targets. *Nature reviews Cancer* 9(10):724-737.
- Mertens J, Marchetto MC, Bardy C, and Gage FH. 2016. Evaluating cell reprogramming, differentiation and conversion technologies in neuroscience. *Nature reviews Neuroscience* 17(7):424-437.
- Milivojevic M, Petrovic I, Kovacevic-Grujicic N, Popovic J, Mojsin M, and Stevanovic M. 2013. Construction and functional analysis of novel dominant-negative mutant of human SOX18 protein. *Biochemistry Biokhimiia* 78(11):1287-1292.
- Miyagi S, Masui S, Niwa H, Saito T, Shimazaki T, Okano H, Nishimoto M, Muramatsu M, Iwama A, and Okuda A. 2008. Consequence of the loss of Sox2 in the developing brain of the mouse. *FEBS letters* 582(18):2811-2815.
- Miyashita T, Krajewski S, Krajewska M, Wang HG, Lin HK, Liebermann DA, Hoffman B, and Reed JC. 1994. Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression in vitro and in vivo. *Oncogene* 9(6):1799-1805.



- Miyashita T, and Reed JC. 1995. Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell* 80(2):293-299.
- Modolell J. 1997. Patterning of the adult peripheral nervous system of *Drosophila*. *Perspectives on developmental neurobiology* 4(4):285-296.
- Momand J, Wu HH, and Dasgupta G. 2000. MDM2--master regulator of the p53 tumor suppressor protein. *Gene* 242(1-2):15-29.
- Monzo HJ, Park TI, Montgomery JM, Faull RL, Dragunow M, and Curtis MA. 2012. A method for generating high-yield enriched neuronal cultures from P19 embryonal carcinoma cells. *Journal of neuroscience methods* 204(1):87-103.
- Morgani S, Nichols J, and Hadjantonakis AK. 2017. The many faces of Pluripotency: in vitro adaptations of a continuum of in vivo states. *BMC developmental biology* 17(1):7.
- Mu L, Berti L, Masserdotti G, Covic M, Michaelidis TM, Doberauer K, Merz K, Rehfeld F, Haslinger A, Wegner M et al. . 2012. SoxC transcription factors are required for neuronal differentiation in adult hippocampal neurogenesis. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 32(9):3067-3080.
- Munno DW, and Syed NI. 2003. Synaptogenesis in the CNS: an odyssey from wiring together to firing together. *The Journal of physiology* 552(Pt 1):1-11.
- Negraes PD, Schwindt TT, Trujillo CA, and Ulrich H. 2012. Neural differentiation of P19 carcinoma cells and primary neurospheres: cell morphology, proliferation, viability, and functionality. *Current protocols in stem cell biology* Chapter 2:Unit 2D 9.
- Nicot C. 2015. Tumor Suppressor Inactivation in the Pathogenesis of Adult T-Cell Leukemia. *Journal of oncology* 2015:183590.
- Ohba H, Chiyoda T, Endo E, Yano M, Hayakawa Y, Sakaguchi M, Darnell RB, Okano HJ, and Okano H. 2004. Sox21 is a repressor of neuronal differentiation and is antagonized by YB-1. *Neuroscience letters* 358(3):157-160.
- Oliver FJ, de la Rubia G, Rolli V, Ruiz-Ruiz MC, de Murcia G, and Murcia JM. 1998. Importance of poly(ADP-ribose) polymerase and its cleavage in apoptosis. Lesson from an uncleavable mutant. *The Journal of biological chemistry* 273(50):33533-33539.
- Oliveto S, Mancino M, Manfrini N, and Biffo S. 2017. Role of microRNAs in translation regulation and cancer. *World journal of biological chemistry* 8(1):45-56.
- Oosterveen T, Kurdija S, Enstero M, Uhde CW, Bergsland M, Sandberg M, Sandberg R, Muhr J, and Ericson J. 2013. SoxB1-driven transcriptional network underlies neural-specific interpretation of morphogen signals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110(18):7330-7335.
- Oren M. 2003. Decision making by p53: life, death and cancer. *Cell death and differentiation* 10(4):431-442.
- Otsubo T, Akiyama Y, Yanagihara K, and Yuasa Y. 2008. SOX2 is frequently downregulated in gastric cancers and inhibits cell growth through cell-cycle arrest and apoptosis. *British journal of cancer* 98(4):824-831.
- Pacary E, Heng J, Azzarelli R, Riou P, Castro D, Lebel-Potter M, Parras C, Bell DM, Ridley AJ, Parsons M et al. . 2011. Proneural transcription factors regulate different steps of cortical neuron migration through Rnd-mediated inhibition of RhoA signaling. *Neuron* 69(6):1069-1084.

- Pan X, Zhao J, Zhang WN, Li HY, Mu R, Zhou T, Zhang HY, Gong WL, Yu M, Man JH et al. . 2009. Induction of SOX4 by DNA damage is critical for p53 stabilization and function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106(10):3788-3793.
- Panda DK, Miao D, Lefebvre V, Hendy GN, and Goltzman D. 2001. The transcription factor SOX9 regulates cell cycle and differentiation genes in chondrocytic CFK2 cells. *The Journal of biological chemistry* 276(44):41229-41236.
- Paquet-Durand F, and Bicker G. 2007. Human model neurons in studies of brain cell damage and neural repair. *Current molecular medicine* 7(6):541-554.
- Parras CM, Schuurmans C, Scardigli R, Kim J, Anderson DJ, and Guillemot F. 2002. Divergent functions of the proneural genes Mash1 and Ngn2 in the specification of neuronal subtype identity. *Genes & development* 16(3):324-338.
- Patterson K, Molloy L, Qu W, and Clark S. 2011. DNA methylation: bisulphite modification and analysis. *Journal of visualized experiments : JoVE*(56).
- Perisic Z, Plesinac-Karapandzic V, Dzinic M, Zamurovic M, and Perisic N. 2013. Cervical cancer screening in Serbia. *Vojnosanitetski preglod* 70(1):86-89.
- Petrovic I, Milivojevic M, Popovic J, Schwirtlich M, Rankovic B, and Stevanovic M. 2015. SOX18 Is a Novel Target Gene of Hedgehog Signaling in Cervical Carcinoma Cell Lines. *PloS one* 10(11):e0143591.
- Pevny L, and Placzek M. 2005. SOX genes and neural progenitor identity. *Current opinion in neurobiology* 15(1):7-13.
- Pevny LH, and Lovell-Badge R. 1997. Sox genes find their feet. *Current opinion in genetics & development* 7(3):338-344.
- Pevny LH, Sockanathan S, Placzek M, and Lovell-Badge R. 1998. A role for SOX1 in neural determination. *Development* 125(10):1967-1978.
- Pim D, Storey A, Thomas M, Massimi P, and Banks L. 1994. Mutational analysis of HPV-18 E6 identifies domains required for p53 degradation in vitro, abolition of p53 transactivation in vivo and immortalisation of primary BMK cells. *Oncogene* 9(7):1869-1876.
- Pleasure SJ, and Lee VM. 1993. NTera 2 cells: a human cell line which displays characteristics expected of a human committed neuronal progenitor cell. *Journal of neuroscience research* 35(6):585-602.
- Pleasure SJ, Page C, and Lee VM. 1992. Pure, postmitotic, polarized human neurons derived from NTera 2 cells provide a system for expressing exogenous proteins in terminally differentiated neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 12(5):1802-1815.
- Popovic J, Klajn A, Petrovic I, and Stevanovic M. 2010. Tissue-specific Forkhead protein FOXA2 up-regulates SOX14 gene expression. *Biochimica et biophysica acta* 1799(5-6):411-418.
- Popovic J, Stanisavljevic D, Schwirtlich M, Klajn A, Marjanovic J, and Stevanovic M. 2014. Expression analysis of SOX14 during retinoic acid induced neural differentiation of embryonal carcinoma cells and assessment of the effect of its ectopic expression on SOXB members in HeLa cells. *PloS one* 9(3):e91852.
- Popovic J, and Stevanovic M. 2009. Remarkable evolutionary conservation of SOX14 orthologues. *Journal of genetics* 88(1):15-24.
- Przyborski SA, Christie VB, Hayman MW, Stewart R, and Horrocks GM. 2004. Human embryonal carcinoma stem cells: models of embryonic development in humans. *Stem cells and development* 13(4):400-408.

- Przyborski SA, Morton IE, Wood A, and Andrews PW. 2000. Developmental regulation of neurogenesis in the pluripotent human embryonal carcinoma cell line NTERA-2. *The European journal of neuroscience* 12(10):3521-3528.
- Przyborski SA, Smith S, and Wood A. 2003. Transcriptional profiling of neuronal differentiation by human embryonal carcinoma stem cells in vitro. *Stem cells* 21(4):459-471.
- Qian Y, and Chen X. 2013. Senescence Regulation by the p53 Protein Family. *Methods in molecular biology* 37-61.
- Qiu M, Chen D, Shen C, Shen J, Zhao H, and He Y. 2017. Sex-determining region Y-box protein 3 induces epithelial-mesenchymal transition in osteosarcoma cells via transcriptional activation of Snail1. *Journal of experimental & clinical cancer research : CR* 36(1):46.
- Qu Q, and Shi Y. 2009. Neural stem cells in the developing and adult brains. *Journal of cellular physiology* 221(1):5-9.
- Ragge NK, Lorenz B, Schneider A, Bushby K, de Sanctis L, de Sanctis U, Salt A, Collin JR, Vivian AJ, Free SL et al. . 2005. SOX2 anophthalmia syndrome. *American journal of medical genetics Part A* 135(1):1-7; discussion 8.
- Rakic P. 1990. Principles of neural cell migration. *Experientia* 46(9):882-891.
- Reeves N, and Posakony JW. 2005. Genetic programs activated by proneural proteins in the developing Drosophila PNS. *Developmental cell* 8(3):413-425.
- Reis LM, Tyler RC, Schneider A, Bardakjian T, and Semina EV. 2010. Examination of SOX2 in variable ocular conditions identifies a recurrent deletion in microphthalmia and lack of mutations in other phenotypes. *Molecular vision* 16:768-773.
- Rendt J, Erulkar S, and Andrews PW. 1989. Presumptive neurons derived by differentiation of a human embryonal carcinoma cell line exhibit tetrodotoxin-sensitive sodium currents and the capacity for regenerative responses. *Experimental cell research* 180(2):580-584.
- Rizzino A. 2009. Sox2 and Oct-3/4: a versatile pair of master regulators that orchestrate the self-renewal and pluripotency of embryonic stem cells. *Wiley interdisciplinary reviews Systems biology and medicine* 1(2):228-236.
- Rogers CD, Harafuji N, Archer T, Cunningham DD, and Casey ES. 2009. Xenopus Sox3 activates sox2 and geminin and indirectly represses Xvent2 expression to induce neural progenitor formation at the expense of non-neural ectodermal derivatives. *Mechanisms of development* 126(1-2):42-55.
- Rozan LM, and El-Deiry WS. 2007. p53 downstream target genes and tumor suppression: a classical view in evolution. *Cell death and differentiation* 14(1):3-9.
- Rudel T. 1999. Caspase inhibitors in prevention of apoptosis. *Herz* 24(3):236-241.
- Rudin CM, Durinck S, Stawiski EW, Poirier JT, Modrusan Z, Shames DS, Bergbower EA, Guan Y, Shin J, Guillory J et al. . 2012. Comprehensive genomic analysis identifies SOX2 as a frequently amplified gene in small-cell lung cancer. *Nature genetics* 44(10):1111-1116.
- Rudnicki MA, Ruben M, and McBurney MW. 1988. Regulated expression of a transfected human cardiac actin gene during differentiation of multipotential murine embryonal carcinoma cells. *Molecular and cellular biology* 8(1):406-417.

- Sadler TW. 2005. Embryology of neural tube development. *American journal of medical genetics Part C, Seminars in medical genetics* 135C(1):2-8.
- Salakou S, Kardamakis D, Tsamandas AC, Zolota V, Apostolakis E, Tzelepi V, Papathanasopoulos P, Bonikos DS, Papapetropoulos T, Petsas T et al. . 2007. Increased Bax/Bcl-2 ratio up-regulates caspase-3 and increases apoptosis in the thymus of patients with myasthenia gravis. *In vivo* 21(1):123-132.
- Saldana-Meyer R, and Recillas-Targa F. 2011. Transcriptional and epigenetic regulation of the p53 tumor suppressor gene. *Epigenetics* 6(9):1068-1077.
- Sampath P, Pritchard DK, Pabon L, Reinecke H, Schwartz SM, Morris DR, and Murry CE. 2008. A hierarchical network controls protein translation during murine embryonic stem cell self-renewal and differentiation. *Cell stem cell* 2(5):448-460.
- Sandberg M, Kallstrom M, and Muhr J. 2005. Sox21 promotes the progression of vertebrate neurogenesis. *Nature neuroscience* 8(8):995-1001.
- Sandhu JK, Sikorska M, and Walker PR. 2002. Characterization of astrocytes derived from human NTera-2/D1 embryonal carcinoma cells. *Journal of neuroscience research* 68(5):604-614.
- Saraste A, and Pulkki K. 2000. Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. *Cardiovascular research* 45(3):528-537.
- Sarkar A, and Hochedlinger K. 2013. The sox family of transcription factors: versatile regulators of stem and progenitor cell fate. *Cell stem cell* 12(1):15-30.
- Savelyeva L, and Schwab M. 2001. Amplification of oncogenes revisited: from expression profiling to clinical application. *Cancer letters* 167(2):115-123.
- Saxonov S, Berg P, and Brutlag DL. 2006. A genome-wide analysis of CpG dinucleotides in the human genome distinguishes two distinct classes of promoters. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103(5):1412-1417.
- Scheffner M, Huijbregtse JM, Vierstra RD, and Howley PM. 1993. The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. *Cell* 75(3):495-505.
- Schepers GE, Teasdale RD, and Koopman P. 2002. Twenty pairs of sox: extent, homology, and nomenclature of the mouse and human sox transcription factor gene families. *Developmental cell* 3(2):167-170.
- Scholpp S, and Lumsden A. 2010. Building a bridal chamber: development of the thalamus. *Trends in neurosciences* 33(8):373-380.
- Schreiber J, Sock E, and Wegner M. 1997. The regulator of early gliogenesis glial cells missing is a transcription factor with a novel type of DNA-binding domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94(9):4739-4744.
- Schwartz CM, Spivak CE, Baker SC, McDaniel TK, Loring JF, Nguyen C, Chrest FJ, Wersto R, Arenas E, Zeng X et al. . 2005. NTera2: a model system to study dopaminergic differentiation of human embryonic stem cells. *Stem cells and development* 14(5):517-534.
- Sellers K, Zyka V, Lumsden AG, and Delogu A. 2014. Transcriptional control of GABAergic neuronal subtype identity in the thalamus. *Neural development* 9:14.
- Senchenko VN, Kisseljova NP, Ivanova TA, Dmitriev AA, Krasnov GS, Kudryavtseva AV, Panasenkov GV, Tsitrin EB, Lerman MI, Kisseljov FL et al. . 2013. Novel

- tumor suppressor candidates on chromosome 3 revealed by NotI-microarrays in cervical cancer. *Epigenetics* 8(4):409-420.
- Sharpless NE, and DePinho RA. 2002. p53: good cop/bad cop. *Cell* 110(1):9-12.
- She QB, Chen N, and Dong Z. 2000. ERKs and p38 kinase phosphorylate p53 protein at serine 15 in response to UV radiation. *The Journal of biological chemistry* 275(27):20444-20449.
- Shi D, and Gu W. 2012. Dual Roles of MDM2 in the Regulation of p53: Ubiquitination Dependent and Ubiquitination Independent Mechanisms of MDM2 Repression of p53 Activity. *Genes & cancer* 3(3-4):240-248.
- Shih YH, Kuo CL, Hirst CS, Dee CT, Liu YR, Laghari ZA, and Scotting PJ. 2010. SoxB1 transcription factors restrict organizer gene expression by repressing multiple events downstream of Wnt signalling. *Development* 137(16):2671-2681.
- Shyamala K, Yanduri S, Girish HC, and Murgod S. 2015. Neural crest: The fourth germ layer. *Journal of oral and maxillofacial pathology : JOMFP* 19(2):221-229.
- Sinclair AH, Berta P, Palmer MS, Hawkins JR, Griffiths BL, Smith MJ, Foster JW, Frischauf AM, Lovell-Badge R, and Goodfellow PN. 1990. A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature* 346(6281):240-244.
- Smith AE, Smith R, and Paucha E. 1979. Characterization of different tumor antigens present in cells transformed by simian virus 40. *Cell* 18(2):335-346.
- Smits VA, Klompmaker R, Vallenius T, Rijksen G, Makela TP, and Medema RH. 2000. p21 inhibits Thr161 phosphorylation of Cdc2 to enforce the G2 DNA damage checkpoint. *The Journal of biological chemistry* 275(39):30638-30643.
- Sofroniew MV, and Vinters HV. 2010. Astrocytes: biology and pathology. *Acta neuropathologica* 119(1):7-35.
- Song L, Liu D, He J, Wang X, Dai Z, Zhao Y, Kang H, and Wang B. 2016. SOX1 inhibits breast cancer cell growth and invasion through suppressing the Wnt/beta-catenin signaling pathway. *APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica* 124(7):547-555.
- Soussi T, and Wiman KG. 2007. Shaping genetic alterations in human cancer: the p53 mutation paradigm. *Cancer cell* 12(4):303-312.
- Squires PE, Wakeman JA, Chapman H, Kumpf S, Fidock MD, Andrews PW, and Dunne MJ. 1996. Regulation of intracellular Ca<sup>2+</sup> in response to muscarinic and glutamate receptor agonists during the differentiation of NTERA2 human embryonal carcinoma cells into neurons. *The European journal of neuroscience* 8(4):783-793.
- Staines WA, Craig J, Reuhl K, and McBurney MW. 1996. Retinoic acid treated P19 embryonal carcinoma cells differentiate into oligodendrocytes capable of myelination. *Neuroscience* 71(3):845-853.
- Stanisavljevic D, Petrovic I, Vukovic V, Schwirtlich M, Gredic M, Stevanovic M, and Popovic J. 2017. SOX14 activates the p53 signaling pathway and induces apoptosis in a cervical carcinoma cell line. *PloS one* 12(9):e0184686.
- Stiles J, and Jernigan TL. 2010. The basics of brain development. *Neuropsychology review* 20(4):327-348.
- Stovall DB, Cao P, and Sui G. 2014. SOX7: from a developmental regulator to an emerging tumor suppressor. *Histology and histopathology* 29(4):439-445.

- Sun R, Jiang B, Qi H, Zhang X, Yang J, Duan J, Li Y, and Li G. 2015. SOX4 contributes to the progression of cervical cancer and the resistance to the chemotherapeutic drug through ABCG2. *Cell death & disease* 6:e1990.
- Szostak E, and Gebauer F. 2013. Translational control by 3'-UTR-binding proteins. *Briefings in functional genomics* 12(1):58-65.
- Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, and Yamanaka S. 2007. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131(5):861-872.
- Takahashi K, and Yamanaka S. 2006. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126(4):663-676.
- Takayama Y, Saito A, Moriguchi H, Kotani K, and Jimbo Y. 2011. Ensemble recording of electrical activity in neurons derived from P19 embryonal carcinoma cells *Electronics and communications in Japan* 94(4):9–19.
- Taketo M, Gilboa E, and Sherman MI. 1985. Isolation of embryonal carcinoma cell lines that express integrated recombinant genes flanked by the Moloney murine leukemia virus long terminal repeat. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 82(8):2422-2426.
- Tanaka S, Kamachi Y, Tanouchi A, Hamada H, Jing N, and Kondoh H. 2004. Interplay of SOX and POU factors in regulation of the Nestin gene in neural primordial cells. *Molecular and cellular biology* 24(20):8834-8846.
- Thu KL, Becker-Santos DD, Radulovich N, Pikor LA, Lam WL, and Tsao MS. 2014a. SOX15 and other SOX family members are important mediators of tumorigenesis in multiple cancer types. *Oncoscience* 1(5):326-335.
- Thu KL, Radulovich N, Becker-Santos DD, Pikor LA, Pusic A, Lockwood WW, Lam WL, and Tsao MS. 2014b. SOX15 is a candidate tumor suppressor in pancreatic cancer with a potential role in Wnt/beta-catenin signaling. *Oncogene* 33(3):279-288.
- Thut CJ, Chen JL, Klemm R, and Tjian R. 1995. p53 transcriptional activation mediated by coactivators TAFII40 and TAFII60. *Science* 267(5194):100-104.
- Tibbetts RS, Brumbaugh KM, Williams JM, Sarkaria JN, Cliby WA, Shieh SY, Taya Y, Prives C, and Abraham RT. 1999. A role for ATR in the DNA damage-induced phosphorylation of p53. *Genes & development* 13(2):152-157.
- Tiedemann H, Asashima M, Grunz H, and Knochel W. 2001. Pluripotent cells (stem cells) and their determination and differentiation in early vertebrate embryogenesis. *Development, growth & differentiation* 43(5):469-502.
- Tong WG, Wierda WG, Lin E, Kuang SQ, Bekele BN, Estrov Z, Wei Y, Yang H, Keating MJ, and Garcia-Manero G. 2010. Genome-wide DNA methylation profiling of chronic lymphocytic leukemia allows identification of epigenetically repressed molecular pathways with clinical impact. *Epigenetics* 5(6):499-508.
- Tsao CM, Yan MD, Shih YL, Yu PN, Kuo CC, Lin WC, Li HJ, and Lin YW. 2012. SOX1 functions as a tumor suppressor by antagonizing the WNT/beta-catenin signaling pathway in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 56(6):2277-2287.
- Tuck SP, and Crawford L. 1989. Characterization of the human p53 gene promoter. *Molecular and cellular biology* 9(5):2163-2172.
- Uchikawa M, Kamachi Y, and Kondoh H. 1999. Two distinct subgroups of Group B Sox genes for transcriptional activators and repressors: their expression during

- embryonic organogenesis of the chicken. *Mechanisms of development* 84(1-2):103-120.
- Valiente M, and Marin O. 2010. Neuronal migration mechanisms in development and disease. *Current opinion in neurobiology* 20(1):68-78.
- Venere M, Han YG, Bell R, Song JS, Alvarez-Buylla A, and Belloch R. 2012. Sox1 marks an activated neural stem/progenitor cell in the hippocampus. *Development* 139(21):3938-3949.
- Verhoven B, Schlegel RA, and Williamson P. 1995. Mechanisms of phosphatidylserine exposure, a phagocyte recognition signal, on apoptotic T lymphocytes. *The Journal of experimental medicine* 182(5):1597-1601.
- Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, and Reutelingsperger C. 1995. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *Journal of immunological methods* 184(1):39-51.
- Vogelstein B, and Kinzler KW. 1993. The multistep nature of cancer. *Trends in genetics* : TIG 9(4):138-141.
- Vogelstein B, Lane D, and Levine AJ. 2000. Surfing the p53 network. *Nature* 408(6810):307-310.
- Vousden KH, and Lu X. 2002. Live or let die: the cell's response to p53. *Nature reviews Cancer* 2(8):594-604.
- Vousden KH, and Prives C. 2009. Blinded by the Light: The Growing Complexity of p53. *Cell* 137(3):413-431.
- Waddell S, and Jenkins JR. 1998. Defining the minimal requirements for papilloma viral E6-mediated inhibition of human p53 activity in fission yeast. *Oncogene* 16(13):1759-1765.
- Wade M, Wang YV, and Wahl GM. 2010. The p53 orchestra: Mdm2 and Mdmx set the tone. *Trends in cell biology* 20(5):299-309.
- Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, Snijders PJ, Peto J, Meijer CJ, and Munoz N. 1999. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *The Journal of pathology* 189(1):12-19.
- Wang J, Ding S, Duan Z, Xie Q, Zhang T, Zhang X, Wang Y, Chen X, Zhuang H, and Lu F. 2016a. Role of p14ARF-HDM2-p53 axis in SOX6-mediated tumor suppression. *Oncogene* 35(13):1692-1702.
- Wang P, Yu J, and Zhang L. 2007. The nuclear function of p53 is required for PUMA-mediated apoptosis induced by DNA damage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104(10):4054-4059.
- Wang R, van Leeuwen RW, Boers A, Klip HG, de Meyer T, Steenbergen RD, van Criekinge W, van der Zee AG, Schuurin E, and Wisman GB. 2016b. Genome-wide methylome analysis using MethylCap-seq uncovers 4 hypermethylated markers with high sensitivity for both adeno- and squamous-cell cervical carcinoma. *Oncotarget* 7(49):80735-80750.
- Wang TW, Stromberg GP, Whitney JT, Brower NW, Klymkowsky MW, and Parent JM. 2006. Sox3 expression identifies neural progenitors in persistent neonatal and adult mouse forebrain germinative zones. *The Journal of comparative neurology* 497(1):88-100.

- Wang X, Ji X, Chen J, Yan D, Zhang Z, Wang Q, Xi X, and Feng Y. 2014. SOX2 enhances the migration and invasion of ovarian cancer cells via Src kinase. *PLoS one* 9(6):e99594.
- Wegner M. 1999. From head to toes: the multiple facets of Sox proteins. *Nucleic acids research* 27(6):1409-1420.
- Wegner M. 2010. All purpose Sox: The many roles of Sox proteins in gene expression. *The international journal of biochemistry & cell biology* 42(3):381-390.
- Wegner M. 2011. SOX after SOX: SOXession regulates neurogenesis. *Genes & development* 25(23):2423-2428.
- Weina K, and Utikal J. 2014. SOX2 and cancer: current research and its implications in the clinic. *Clinical and translational medicine* 3:19.
- Weinberg RA. 1995. The molecular basis of oncogenes and tumor suppressor genes. *Annals of the New York Academy of Sciences* 758:331-338.
- Weiss MA. 2001. Floppy SOX: mutual induced fit in hmg (high-mobility group) box-DNA recognition. *Molecular endocrinology* 15(3):353-362.
- Wen S, Li H, and Liu J. 2009. Dynamic signaling for neural stem cell fate determination. *Cell adhesion & migration* 3(1):107-117.
- Wilmore HP, Smith MJ, Wilcox SA, Bell KM, and Sinclair AH. 2000. SOX14 is a candidate gene for limb defects associated with BPES and Mobius syndrome. *Human genetics* 106(3):269-276.
- Wood HB, and Episkopou V. 1999. Comparative expression of the mouse Sox1, Sox2 and Sox3 genes from pre-gastrulation to early somite stages. *Mechanisms of development* 86(1-2):197-201.
- Wright EM, Snopce B, and Koopman P. 1993. Seven new members of the Sox gene family expressed during mouse development. *Nucleic acids research* 21(3):744.
- Wu F, Ye X, Wang P, Jung K, Wu C, Douglas D, Kneteman N, Bigras G, Ma Y, and Lai R. 2013. Sox2 suppresses the invasiveness of breast cancer cells via a mechanism that is dependent on Twist1 and the status of Sox2 transcription activity. *BMC cancer* 13:317.
- Wu X, Bayle JH, Olson D, and Levine AJ. 1993. The p53-mdm-2 autoregulatory feedback loop. *Genes & development* 7(7A):1126-1132.
- Xia C, Wang C, Zhang K, Qian C, and Jing N. 2007. Induction of a high population of neural stem cells with anterior neuroectoderm characters from epiblast-like P19 embryonic carcinoma cells. *Differentiation; research in biological diversity* 75(10):912-927.
- Xia Y, Papalopulu N, Vogt PK, and Li J. 2000. The oncogenic potential of the high mobility group box protein Sox3. *Cancer research* 60(22):6303-6306.
- Xiuju C, Zhen W, and Yanchao S. 2016. SOX7 inhibits tumor progression of glioblastoma and is regulated by miRNA-24. *Open medicine* 11(1):133-137.
- Xu N, Papagiannakopoulos T, Pan G, Thomson JA, and Kosik KS. 2009. MicroRNA-145 regulates OCT4, SOX2, and KLF4 and represses pluripotency in human embryonic stem cells. *Cell* 137(4):647-658.
- Yamawaki K, Ishiguro T, Mori Y, Yoshihara K, Suda K, Tamura R, Yamaguchi M, Sekine M, Kashima K, Higuchi M et al. . 2017. Sox2-dependent inhibition of p21 is associated with poor prognosis of endometrial cancer. *Cancer science* 108(4):632-640.
- Yan Q, Wang F, Miao Y, Wu X, Bai M, Xi X, and Feng Y. 2016. Sex-determining region Y-box3 (SOX3) functions as an oncogene in promoting epithelial ovarian



- cancer by targeting Src kinase. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* 37(9):12263-12271.
- Yang HJ. 2013. Aberrant DNA methylation in cervical carcinogenesis. *Chinese journal of cancer* 32(1):42-48.
- Yim EK, and Park JS. 2005. The role of HPV E6 and E7 oncoproteins in HPV-associated cervical carcinogenesis. *Cancer research and treatment : official journal of Korean Cancer Association* 37(6):319-324.
- Yoshioka A, Yudkoff M, and Pleasure D. 1997. Expression of glutamic acid decarboxylase during human neuronal differentiation: studies using the NTera-2 culture system. *Brain research* 767(2):333-339.
- Yu J, and Thomson JA. 2008. Pluripotent stem cell lines. *Genes & development* 22(15):1987-1997.
- Zeller M, and Strauss WL. 1995. Retinoic acid induces cholinergic differentiation of NTera 2 human embryonal carcinoma cells. *International journal of developmental neuroscience : the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience* 13(5):437-445.
- Zhang J, Jiang H, Shao J, Mao R, Liu J, Ma Y, Fang X, Zhao N, Zheng S, and Lin B. 2014. SOX4 inhibits GBM cell growth and induces G0/G1 cell cycle arrest through Akt-p53 axis. *BMC neurology* 14:207.
- Zhang S, and Cui W. 2014. Sox2, a key factor in the regulation of pluripotency and neural differentiation. *World journal of stem cells* 6(3):305-311.
- Zhang Y, and Xiong Y. 2001. Control of p53 ubiquitination and nuclear export by MDM2 and ARF. *Cell growth & differentiation : the molecular biology journal of the American Association for Cancer Research* 12(4):175-186.
- Zhang Y, Xiong Y, and Yarbrough WG. 1998. ARF promotes MDM2 degradation and stabilizes p53: ARF-INK4a locus deletion impairs both the Rb and p53 tumor suppression pathways. *Cell* 92(6):725-734.
- Zhong WD, Qin GQ, Dai QS, Han ZD, Chen SM, Ling XH, Fu X, Cai C, Chen JH, Chen XB et al. . 2012. SOXs in human prostate cancer: implication as progression and prognosis factors. *BMC cancer* 12:248.
- Zhu Y, Li Y, Jun Wei JW, and Liu X. 2012. The role of Sox genes in lung morphogenesis and cancer. *International journal of molecular sciences* 13(12):15767-15783.

Прилог 1.

## Изјава о ауторству

Потписани-а Danijela Stanisavljević

број индекса Б3026/2011

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Analiza ekspresije i uloge humanog gena SOX14 u neuralnoj diferencijaciji *in vitro* i regulaciji malignog fenotipa

---

---

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

**Потпис докторанда**

У Београду, \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Прилог 2.

## Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора \_Danijela  
Stanisavljević\_\_\_\_\_

Број индекса  
\_\_\_Б3026/2011\_\_\_\_\_

Студијски програм \_\_\_Molekularna  
biologija\_\_\_\_\_

Наслов рада \_\_\_ Analiza ekspresije i uloge humanog gena SOX14 u neuralnoj  
diferencijaciji *in vitro* i regulaciji malignog  
fenotipa\_\_\_\_\_

Ментор \_\_\_dr Jelena  
Popović\_\_\_\_\_

Потписани/а \_\_\_\_\_Danijela Stanisavljević\_\_\_\_\_

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

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

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

**Потпис докторанда**

У Београду, \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

### Прилог 3.

## Изјава о коришћењу

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

*Analiza ekspresije i uloge humanog gena SOX14 u neuralnoj diferencijaciji in vitro i regulaciji malignog fenotipa*

---

---

која је моје ауторско дело.

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

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

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

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

**Потпис докторанда**

У Београду, \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

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

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

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

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

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

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