

Univerzitet u Beogradu
Biološki fakultet

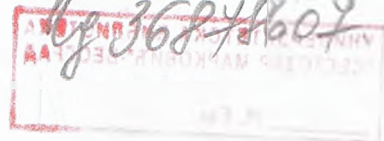
Mariša Novačević Grujić

KARAKTERIZACIJA BAZALNOG PROMOTORA HUMANOGENOG *SOX3*
GENA I IDENTIFIKACIJA REGULATORNIH ELEMANATA
ODGOVORNIM ZA INDUKCIJU *SOX3* GENA RETINGIČNOM
KISELINOM

Doktorska disertacija

Beograd, 2009.

20661



Univerzitet u Beogradu
Biološki fakultet

Nataša Kovačević Grujičić

**KARAKTERIZACIJA BAZALNOG PROMOTORA HUMANOG *SOX3*
GENA I IDENTIFIKACIJA REGULATORNIH ELEMENATA
ODGOVORNIH ZA INDUKCIJU *SOX3* GENA RETINOIČNOM
KISELINOM**


Doktorska disertacija

Beograd, 2009

УНИВЕРЗИТЕТ
'СВЕТОЗАР МАРКОВИЋ'-БЕОГРАД
И. Бр. 160991



ČLANOVI KOMISIJE:

dr Milena Stevanović, naučni savetnik,
Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo,
Univerzitet u Beogradu

dr Stanka Romac, redovni profesor,
Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

dr Svetlana Radović, vanredni profesor,
Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

Ovaj rad je realizovan u Laboratoriji za humanu molekularnu genetiku, Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo u Beogradu, pod rukovodstvom dr Milene Stevanović.

Dr Mileni Stevanović se zahvaljujem što mi je pružila šansu da radim u Laboratoriji za humanu molekularnu genetiku, kao i na ukazanom poverenju i kritičkoj analizi ovog rada. Zahvaljujem se i za spremnost da svoje znanje i iskustvo podeli sa mnom.

Prof. dr Svetlana Radović je bila član komisije za odbranu moje magistarske teze i sada je član komisije za odbranu ovog rada. Želim da joj se zahvalim za sve ove trenutke, pažnju, pomoć, kao i za strpljenje u pregledanju i oceni ove teze.

Prof. dr Stanki Romac se zahvaljujem na ukazanom strpljenju u pregledanju i oceni ove teze.

Najviše zahvalnosti dugujem svojoj "laboratorijskoj porodici" sa kojom sam delila sve dobre i loše trenutke ovoga sveta – Mariji, Isidori, Aci, Djuri, Goci, Danijeli, Mileni i Kiki. Posebno mesto u mom srcu uvek će imati Tijana koju smo izgubili prerano...

Svim ostalim bivšim i sadašnjim koleginicama i kolegama Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo zahvaljujem se na korisnim savetima, pomoći i prijateljskoj atmosferi. Naročito se zahvaljujem Sandrini na nesebičnoj pomoći koju mi je pružala tokom izrade ove teze.

Posebno želim da se zahvalim svojoj porodici na podršci i ljubavi koje su mi pružali svih ovih godina kao i na strpljenju koje su pokazali tokom izrade ove teze. Ovaj rad posvećujem njima i sećanju na Tijanu.

APSTRAKT

SOX3/Sox3 gen je jedan od najranijih neuralnih markera kod kičmenjaka, koji determiniše neuronalni tip ćelijske diferencijacije. Iako je *SOX3* gen ključni regulator ranih faza embrionalnog razvića, do skora je u literaturi postojalo malo podataka o mehanizmima regulacije aktivnosti ovog gena. U ovoj tezi su, po prvi put, analizirani molekularni mehanizmi uključeni u transkripcionu regulaciju ekspresije *SOX3* gena.

Metodom elongacije reverznog oligonukleotida određen je start transkripcije ovog gena, 252 nukleotida uzvodno od ATG kodona. Funkcionalnom analizom definisan je minimalni promotorski region (-219/+67) neophodan za bazalnu transkripcionu aktivnost *SOX3* gena u NT2/D1 ćelijama. Delecijom analizom minimalnog promotora identifikovana su dva *cis* regulatorna regiona, -219/-100 i +27/+67, koja su neophodna za aktivnost *SOX3* promotora. Takođe, identifikovana su i dva regiona (-427/-219 i +67/+286) koji sadrže pozitivne *cis* regulatorne elemente neophodne, kako za optimalnu aktivnost, tako i za indukciju *SOX3* promotora retinoičnom kiselinom. Dodatna funkcionalna analiza je ukazala da je fragment -427/-293 neophodan za inducibilnost promotora ovog gena.

Takođe, poređenje sekvenci je pokazalo da su mesta za vezivanje Sp1, USF, NF-Y i CREB proteina, kao i TATA boks, očuvani i po nukleotidnom sastavu i po poziciji u minimalnim promotorskim regionima kod svih analiziranih *SOX3* ortologa sisara. Funkcionalna analiza je po prvi put pokazala da su transkripcioni faktori Sp1, USF1, NF-Y, CREB i MAZ transkripcioni aktivatori ekspresije *SOX3* gena. S druge strane, rezultati prikazani u ovoj tezi su ukazali da transkripcioni faktor ZBP-89 inhibira odgovor *SOX3* promotora na indukciju retinoičnom kiselinom.

Ova teza predstavlja prvu funkcionalnu karakterizaciju promotorskog regiona *SOX3* gena čoveka, kao i identifikaciju transkripcionih faktora uključenih u regulaciju ekspresije ovog gena. Posebno treba istaći da rezultati prikazani u ovoj tezi ukazuju na kompleksnu, modularnu prirodu *cis* regulatornih elemenata odgovornih za transkripcionu regulaciju *SOX3* gena.

Ključne reči: minimalni promotor, *SOX3*, Sp1, USF1, NF-Y, CREB, MAZ, ZBP-89;

ABSTRACT

SOX3/Sox3 gene represents one of the earliest neural markers in vertebrates, playing a role in specifying neuronal fate. Despite the mounting evidence that *SOX3* is the key player in early developmental gene regulation, little is known about the transcriptional regulation of the *Sox3* gene itself. In this thesis, for the first time, we have performed analysis of the molecular mechanisms underlying the transcriptional regulation of *SOX3* gene expression.

Using primer extension, we have identified the transcription start point of this gene, 252 nt upstream of the ATG codone. Using promoter–reporter constructs, we have determined the minimal *SOX3* promoter region (-219/+67) that confers the basal promoter activity in NT2/D1 cells. Deletion analysis of the minimal promoter revealed two *cis* regulatory regions (-219/-100 and +27/+67) that are necessary for *SOX3* promoter activity. Also, in this study we have identified two regions, -427/-219 and +67/+286, that harbor positive *cis* regulatory elements necessary for both, optimal and retinoic acid (RA)-inducible promoter activity of the *SOX3* gene. By additional functional analysis we have narrowed down the region required for RA induction of this gene to fragment -427/-293.

Comparative analysis of the promoter sequences of *SOX3* orthologues showed that binding sites for transcription factors Sp1, USF, NF-Y and CREB, as well as, TATA box are conserved in both position and sequence among all analysed mammalian orthologues. Data presented in this thesis, for the first time, suggest that transcription factors Sp1, USF1, NF-Y, CREB and MAZ function as transcriptional activators of the *SOX3* gene expression. On the other hand, the presented results indicate that ZBP-89 transcription factor inhibits the response of *SOX3* promoter upon retinoic acid induction.

In this study, we have performed the first characterization of the human *SOX3* promoter and identified transcription factors involved in regulation of its expression. Results presented in this thesis suggest that transcriptional regulation of the *SOX3* gene depends on the combined action of distinct regulatory modules within the promoter region of this gene.

Keywords: minimal promoter, *SOX3*, Sp1, USF1, NF-Y, CREB, MAZ, ZBP-89;

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1 Regulacije genske ekspresije kod eukariota	1
1.1.1 Strukturna organizacija promotora kod eukariota	6
1.1.2 Transkripcioni faktori	9
1.2 SOX/Sox geni	13
1.2.1 Karakteristike SOX proteina	16
1.2.2 Interakcije SOX proteina sa drugim transkripcionim faktorima	17
1.2.3 SOX proteini – transkripcioni aktivatori i represori	19
1.2.4 Homodimerizacija SOX proteina	20
1.2.5 Posttranslacione modifikacije SOX proteina	20
1.3 Funkcije Sox gena	21
1.4 Sox3 gen	23
1.4.1 Oboljenja povezana sa mutacijama u SOX3 genu	25
1.4.2 Ekspresija Sox3 gena tokom razvića centralnog nervnog sistema	28
1.4.3 Geni regulisani SOX3 transkripcionim faktorom	30
1.4.4 Literaturni podaci o regulaciji ekspresije Sox3 gena kičmenjaka	32
1.5 NT2/D1 ćelije kao model sistem za izučavanje neuralne diferencijacije	35

2. CILJ RADA	37
3. MATERIJAL I METODE	38
3.1 EKSPERIMENTALNI MATERIJAL	38
3.1.1 Bakterijski sojevi korišćeni u radu	38
3.1.2 Vektori korišćeni u ovom radu	38
3.1.3 Plazmidni konstrukti korišćeni u ovom radu	39
3.1.4 NT2/D1 ćelijska linija	41
3.1.5 Antitela korišćena u ovom radu	41
3.1.6 Oligonukleotidi korišćeni u ovom radu	42
3.1.7 Komercijalni kitovi	44
3.2 EKSPERIMENTALNE METODE	44
3.2.1 Određivanje starta transkripcije metodom elongacije reverznog oligonukleotida ("primer extension")	44
3.2.2 <i>In silico</i> analiza 5' nekodirajućeg regiona <i>SOX3</i> gena i poređenje sa ortolozima sisara	45
3.2.3 Generisanje CAT reporter konstrukata	45
3.2.4 Mesto-specifična mutageneza	46
3.2.5 Tranzijentna transfekcija NT2/D1 ćelija kalcijum fosfatnom precipitacijom	47
3.2.5.1 Priprema ćelijskih ekstrakata	48
3.2.5.2 β -galaktozidazni esej	48
3.2.5.3 CAT esej	49
3.2.6 Izolovanje jedarnih proteina iz NT2/D1 ćelija	50

3.2.7 Izolovanje bakterijski eksprimiranih rekombinantnih proteina	50
3.2.8 Esej smanjene elektroforetske pokretljivosti (EMSA-electrophoretic mobility shift assay)	51
4. REZULTATI	53
4.1 Predikcija promotorskog regiona i određivanje starta transkripcije humanog <i>SOX3</i> gena	53
4.2 Funkcionalna karakterizacija humanog <i>SOX3</i> promotora	55
4.2.1 Definisane minimalnog promotora i pozitivnih <i>cis</i> regulatornih regiona neophodnih za optimalnu aktivnost <i>SOX3</i> gena	55
4.2.2 Identifikacija <i>cis</i> regulatornih elemenata uključenih u modulaciju transkripcije <i>SOX3</i> gena retinoičnom kiselinom	57
4.3. Analiza minimalnog promotorskog regiona humanog <i>SOX3</i> gena	61
4.3.1 <i>In silico</i> analiza minimalnog promotorskog regiona <i>SOX3</i> gena i poređenje sa ortolozima sisara	61
4.3.2 Analiza uticaja mutacije TATA boksa na bazalnu transkripcionu aktivnost <i>SOX3</i> promotora	63
4.3.3 Interakcije Sp1, USF i NF-Y vezivnih mesta sa jedarnim proteinima NT2/D1 ćelija	64
4.3.4 Analiza uticaja mutacija vezivnih mesta za Sp1, USF i NF-Y na bazalnu transkripcionu aktivnost <i>SOX3</i> promotora	66
4.3.5 Uloga CREB transkripcionog faktora u transkripcionoj regulaciji <i>SOX3</i> gena	67
4.3.5.1 Interakcije potencijalnog vezivnog polumesta za CREB u okviru minimalnog promotora <i>SOX3</i> gena sa jedarnim proteinima NT2/D1 ćelija	67
4.3.5.2 Analiza uticaja mutacije CREB vezivnog polumesta na bazalnu transkripcionu aktivnost <i>SOX3</i> promotora	70

4.3.5.3 Efekat povećane ekspresije transkripcionog faktora CREB na aktivnost <i>SOX3</i> promotora u NT2/D1 ćelijama	71
4.3.5.4 Analiza efekta dominantno negativnog inhibitora CREB proteina na aktivnost <i>SOX3</i> promotora	72
4.4 Analiza <i>cis</i> regulatornog regiona na poziciji -427/-293 u humanom <i>SOX3</i> promotoru	72
4.4.1 Interakcije CT regiona 1 i 2 u okviru -427/-293 regiona <i>SOX3</i> promotora sa proteinima	75
4.4.2 Mutaciona analiza potencijalnog vezivnog mesta za ZBP-89 u okviru CT regiona 1	77
4.4.3 Mutaciona analiza potencijalnih vezivnih mesta za ZBP-89 u okviru CT regiona 2	79
4.4.4 Analiza uticaja mutacija vezivnih mesta za ZBP-89 u okviru CT regiona 1 i 2 na aktivnost <i>SOX3</i> promotora	82
4.4.5 Efekat povećane ekspresije transkripcionog faktora ZBP-89 na aktivnost <i>SOX3</i> promotora u NT2/D1 ćelijama	84
4.4.6 Uloga MAZ transkripcionog faktora u transkripcionoj regulaciji ekspresije <i>SOX3</i> gena	85
4.4.7 Interakcija MAZ proteina sa potencijalnim vezivnim mestom/mestima u okviru CT regiona 2 <i>SOX3</i> promotora	87
4.4.8 Efekat povećane ekspresije transkripcionog faktora MAZ na aktivnost <i>SOX3</i> promotora u NT2/D1 ćelijama	91
5. DISKUSIJA	93
5.1 Određivanje starta transkripcije <i>SOX3</i> gena	94
5.2 Funkcionalna analiza <i>SOX3</i> promotora	95

5.2.1 Karakterizacija bazalnog promotorskog regiona <i>SOX3</i> gena i identifikacija pozitivnih <i>cis</i> regulatornih regiona neophodnih za optimalnu aktivnost <i>SOX3</i> promotora	95
5.2.2 Uloga TATA boksa u transkripcionoj regulaciji <i>SOX3</i> gena	96
5.2.3 Uloga vezivnih mesta za Sp1, USF, NF-Y i CREB u okviru minimalnog promotorskog regiona <i>SOX3</i> gena u njegovoj transkripcionoj regulaciji	97
5.2.4 Identifikacija pozitivnih <i>cis</i> regulatornih regiona uključenih u indukciju <i>SOX3</i> promotora retinoičnom kiselinom	100
5.2.5 Uloga CT regiona u okviru -427/-293 regiona <i>SOX3</i> promotora	101
5.2.5.1 Uloga CT regiona i vezivnih mesta za ZBP-89 u transkripcionoj regulaciji <i>SOX3</i> gena	103
5.2.5.2 Efekat povećane ekspresije ZBP-89 u transkripcionoj regulaciji <i>SOX3</i> gena	104
5.2.5.3 Uloga MAZ transkripcionog faktora u transkripcionoj regulaciji <i>SOX3</i> gena	107
5.2.5.4 Efekat povećane ekspresije MAZ proteina u transkripcionoj regulaciji <i>SOX3</i> gena	107
5.3 Mehanizmi transkripcione regulacije ekspresije <i>SOX3</i> gena kao odgovor na indukciju retinoičnom kiselinom	108
6. ZAKLJUČCI	113
7. LITERATURA	116

1. UVOD

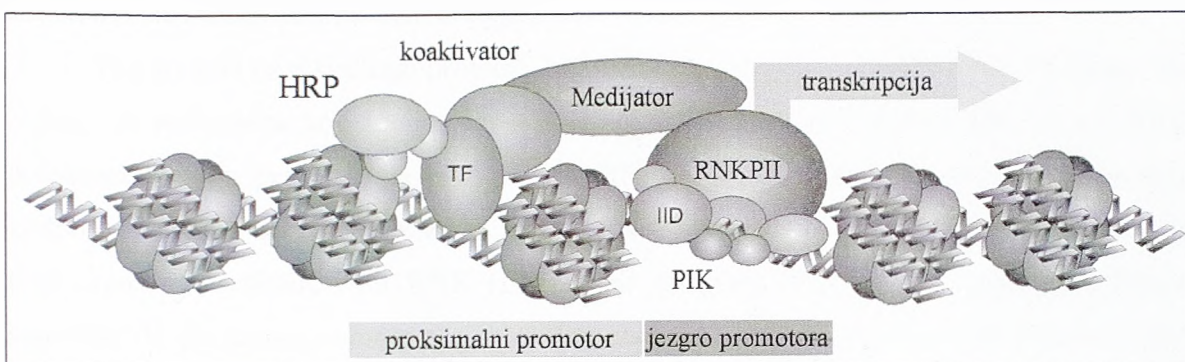
Rasvetljavanje molekularnih mehanizama koji leže u osnovi procesa regulacije genske ekspresije kod eukariota, već duži niz godina, predstavlja predmet intenzivnih istraživanja. Interesantna je činjenica da razlika u broju gena između nižih i viših organizama nije linearno zavisna od složenosti funkcija koje ti organizmi poseduju. Danas se zna da evolucija kompleksnih bioloških sistema nije išla samo u pravcu stvaranja većeg broja novih gena, već je došlo i do razvića složenijih i raznovrsnijih mehanizama regulacije ekspresije postojećih gena.

Kod višecelijskih organizama, tokom razvića ili kao odgovor na široki spektar ekstraćelijskih signala, hiljade protein-kodirajućih gena bivaju diferencijalno eksprimirani, a rezultat toga je formiranje specifičnih ćelijskih tipova, tkiva i organa. Regulacija genske ekspresije kod eukariota zahteva precizne prostorne i vremenski koordinisane interakcije između opštih ili specifičnih transkripcionih faktora i *cis* regulatornih elemenata kao što su promotori, pojačivači (enhenser), prigušivači (silencer) i insulatori (*Orphanides and Reinberg, 2002; Smale and Kadonaga, 2003; West and Fraser, 2005*). Takođe, dinamičke strukturne promene hromatina, u okviru kojeg se dešavaju specifična prepoznavanja i vezivanja transkripcionih faktora za njihova vezivna mesta, igraju bitnu ulogu u regulaciji genske ekspresije (*Mellor, 2005*). Zbog značaja transkripcione kontrole genske ekspresije u biološkim procesima, u ovom radu opisani su različiti mehanizmi kojima se postiže kompleksnost regulacije transkripcije gena kod eukariota.

1.1 Regulacije genske ekspresije kod eukariota

Regulacija ekspresije gena i sinteza proteina kod eukariota su složeni procesi koji su kontrolisani na više nivoa. Ti procesi obuhvataju transkripcionu kontrolu, posttranskripcionu regulaciju (kontrola obrade pre-iRNK i transporta iz jedra), kontrolu degradacije iRNK, translacionu i posttranslacionu kontrolu (aktivacija proteina kroz razne modifikacije) (*Darnell, 1982*). Za ekspresiju većine gena najvažnija je transkripciona kontrola (*Alberts, 1994*). Na taj način sprečava se sinteza nepotrebnih intermedijera i štede ćelijski resursi (*Darnell, 1982*). Transkripciji eukariotskih gena koji kodiraju proteine prethodi veliki broj događaja u ćeliji, kao što su dekondezacija i remodelovanje hromatina na ciljnom lokusu,

modifikacije histona, vezivanje transkripcionih aktivatora i koaktivatora za enhancerske i promotorske elemente i regrutovanje bazalne transkripcione mašinerije na jezgro promotora (Smale and Kadonaga, 2003) (Slika 1).



Slika 1. Tipična struktura u okviru aktivnog eukariotskog promotora. Promotor se sastoji iz jezgra promotora i proksimalnog promotorskog regiona. RNK polimeraza II (RNKPII) i opšti transkripcioni faktori, kao na primer TFIID (IID) formiraju preinicijacioni kompleks (PIK). Predstavljani su i drugi regulatorni proteini koji imaju ulogu u transkripcionoj regulaciji, uključujući Medijatorni kompleks (Medijator), hromatin remodelujuće proteine (HRP), sekvencno-specifične transkripcione faktore (TF) i koaktivatore. Svi procesi vezani za transkripciju se dešavaju u kontekstu hromatina koji se sastoji od DNK umotane oko histonskih oktamera. Preuzeto iz *Heintzman and Ren, 2007*.

Transkripcija gena se ostvaruje u kontekstu hromatina (Slika 1). Hromatin je visoko organizovana i gusto pakovana struktura koja je sačinjena od DNK i histonskih proteina. Više strukture hromatina predstavljaju prvu barijeru za aktivaciju transkripcije. Za ostvarivanje transkripcije neophodno je otvaranje upakovanog, kondenzovanog hromatina u regionima koji obuhvataju promotor gena, pa i sam gen. Prvo se dekondenzuju veliki hromatinski domeni (25 - 100 kb), a zatim dolazi do remodelovanja hromatina u okviru promotorskog regiona što je praćeno i kovalentnim modifikacijama histona u okviru nukleozoma (Wallrath *et al.*, 1994). Acetilacijom ili metilacijom slobodnih amino grupa na N- terminalnom delu histonskih molekula, dolazi do oslobađanja DNK iz forme u kojoj se nalazi (Turner *et al.*, 1992). Ovakva modifikacija uslovlja gubitak pozitivne šarže molekula histona, čime se smanjuje njihov afinitet za fosfatne grupe DNK (Wolffe and Pruss, 1996). Mnogi transkripcioni faktori, poseduju specijalizovane domene preko kojih mogu da prepoznaju acetilovane i metilovane lizine u okviru histona, što za posledicu može da ima inicijaciju i stabilizaciju interakcija između ovih transkripcionih faktora i promotorskih regiona (Daniel *et al.*, 2005; de la Cruz *et*

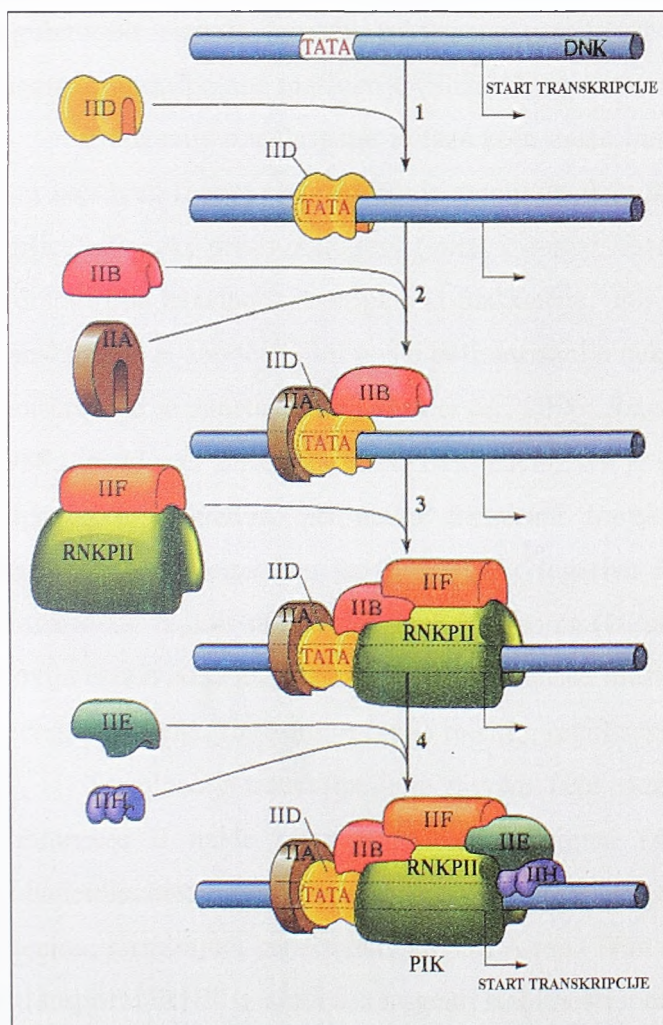
al., 2005). Kao rezultat modifikacija, dolazi do promena u strukturi i poziciji nukleozoma na transkripciono aktivnim promotorima. Takođe, istraživanja na genomskoj skali kod različitih organizama, od kvasca do čoveka, ukazuju da su nedostatak nukleozoma, hiperacetilacija lizinskih ostataka H3 i H4 histona, kao i trimetilovani H3 protein generalne epigenetske karakteristike transkripciono aktivnih gena (*Heintzman and Ren, 2007*).

Eukariotski geni kodiraju proteine, kao i transportne i ribozomalne RNK molekule. Za razliku od prokariota, koji imaju jednu RNK polimerazu, kod eukariota postoje tri: RNK polimeraza I koja prepisuje gene za rRNK, RNK polimeraza II koja prepisuje gene koji kodiraju proteine i neke jedarne RNK, dok je RNK polimeraza III uključena u sintezu malih RNK kao što su tRNK i 5S RNK (*Lewis and Burgess, 1982*). RNK polimeraza II nije sposobna da prepozna promotorske sekvence, već su joj neophodni dodatni proteini, opšti transkripcioni faktori, koji je regrutuju na mesto od kojeg će započeti transkripcija (*Lewis and Burgess, 1982*).

Promotorska sekvenca je pozicionirana uzvodno od gena koji se transkribuje. Tipično, termin "promotor" se odnosi na "jezgro" promotora i sekvence uzvodno od njega. Jezgro promotora okružuje mesto inicijacije transkripcije (oko 35 bp uzvodno i nizvodno) i sadrži sve regulatorne sekvence potrebne za prepoznavanje od strane bazalne transkripcione mašinerije i inicijaciju transkripcije. Mesto inicijacije transkripcije predstavlja prvi nukleotid od kojeg započinje transkripcija. "Proksimalni" promotor ("proximal promoter") uključuje region koji se uobičajeno proteže oko 250 bp uzvodno i nizvodno od starta transkripcije (transcription start point- *tsp*) (*Butler and Kadonaga, 2002*), ali ta granica nije strogo određena. Proksimalni promotori sadrže vezivna mesta za sveprisutne i tkivno-specifične transkripcione faktore koji mogu imati aktivatorsku ili represorsku ulogu u procesu transkripcije datog gena. Inicijaciji transkripcije prethodi vezivanje sekvencno-specifičnih transkripcionih faktora za njihove regulatorne motive u okviru promotora i enhensera i regrutovanje koaktivatora koji dovode do remodelovanja hromatina i modifikacije histona što za posledicu ima promenu strukture i pozicije nukleozoma (Slike 1 i 2). Na ovaj način regulisana reorganizacija hromatinske strukture u okviru promotora omogućava i stabilizuje vezivanje bazalne transkripcione mašinerije, koju sačinjavaju RNK polimeraza II, i brojni opšti transkripcioni faktori neophodni za pravilno pozicioniranje polimeraze i interakcije sa drugim specifičnim regulatornim proteinima.

Proces transkripcije je podeljen na nekoliko faza. Prva faza obuhvata preinicijaciju i inicijaciju koje su, kao što je pomenuto, rezultat velikog broja proteinskih interakcija koje omogućavaju razmotavanje hromatina i olakšavaju interakciju DNK i transkripcione

mašinerije (Ghosh and Van Duyne, 1996). Preinicijacioni kompleks omogućava vezivanje RNK polimeraze II, tako što TATA vezujući protein (TATA binding protein- TBP) naleže svojom unutrašnjom površinom u vidu sedla na TATAAA sekvencu, ostavljajući spoljašne površine za interakciju sa oko 13 TAF proteina (TBP asociranih proteina) (Sanders and Weil, 2000) (Slika 2). Zajedno, oni sačinjavaju TFIID kompleks (transkripcioni faktor D RNK polimeraze II) (Ghosh and Van Duyne, 1996). TBP se vezuje za manji žleb DNK spirale pri čemu dovodi do njenog krivljenja (Lodish, 2000). Sledeći faktor koji se direktno vezuje za TFIID je TFIIA, čime se stabilizuje interakcija između TFIID i DNK (Maldonado et al., 1990) (Slika 2). Nakon vezivanja TFIIA, vezuje se TFIIIB koji, takođe, stabilizuje vezivanje TBP za DNK (Imbalzano et al., 1994) (Slika 2). TFIIIB omogućava vezivanje RNK polimeraze II za preinicijacioni kompleks i postavlja je pravilno u odnosu na start transkripcije (Li et al., 1994) (Slika 2).



Slika 2. Shematski prikaz formiranja preinicijacionog kompleksa (PIK) na jezgri promotora koje sadži TATA boks. Preuzeto iz Zawel and Reinberg, 1992.

Sledeći korak u formiranju preinicijacionog kompleksa je vezivanje TFIIF za RNK polimerazu II koja bez njega ne može da se uključi u preinicijacioni kompleks (Slika 2). Preinicijacioni kompleks se definitivno formira vezivanjem preostalih faktora, TFIIE i TFIIH, koji čine holoenzim mase blizu 2 MDa (Dvir *et al.*, 2001) (Slika 2). TFIIH ima helikaznu, ATP-aznu i protein-kinaznu aktivnost (Flores *et al.*, 1992; Zawel and Reinberg, 1992). Njegovo vezivanje dovodi do razmotavanja DNK u regionu starta transkripcije u prisustvu ATP-a (Roy *et al.*, 1994) i fosforilacije TBP-a, TFIIE, TFIIF i same RNK polimeraze II što rezultira oslobađanjem RNK polimeraze II iz inicijacionog kompleksa pošto se prepíše RNK dužine oko 30-40 nukleotida. Oslobađanje polimeraze je neophodan korak za odvijanje procesa elongacije u okviru koje ovaj enzim katalizuje DNK-zavisnu polimerizaciju nukleozid-monofosfata u oligoribonukleotidni transkript, odnosno primarni transkript. Inače, preinicijacioni kompleks stupa u interakcije sa velikim brojem regulatornih proteina, uključujući i Medijatorni kompleks (Lewis and Reinberg, 2003), koji ima ulogu u prenosu regulatornih signala između sekvencno-specifičnih transkripcionih faktora i komponenti bazalne transkripcione mašinerije (Slika 1).

Elongacija transkripcije je faza koja može biti strogo kontrolisana. Naime, inducibilni geni koji brzo reaguju na spoljašnje stimulse, kao što su geni toplotnog šoka (*Hsp70* vinske mušice) ili neki proto-onkogeni (*junB* i *c-myc* sisara) se odlikuju time da je na njihovim promotorima bazalna transkripciona mašinerija, uključujući RNK polimerazu II, postavljena, transkripcija je započeta, ali posle polimerizacije nekoliko desetina ribonukleotida elongacija transkripcije je zaustavljena (Aida *et al.*, 2006; Rasmussen and Lis, 1993; Rougvie and Lis, 1988; Strobl and Eick, 1992). Na ovaj način, sve je spremno za brzu reakciju elongacije kao odgovor na stimulus, pri čemu formirani transkripcioni kompleks pomoću određenih regulatornih proteina kao što je NELF (Negative Elongation Factor) održava proksimalni promotorski region slobodnim od nukleozoma (Gilchrist *et al.*, 2008; Mavrich *et al.*, 2008). Novija istraživanja na nivou genoma kod vinske mušice su pokazala da je transkripcija mnogo većeg broja gena, nego što se ranije mislilo, regulisana na ovaj način (Muse *et al.*, 2007).

Terminacija transkripcije je završna faza transkripcije gena koja se dešava kada RNK polimeraza II naiđe na poliadenilacioni signal (AATAA) na kodirajućem lancu DNK. Poliadenilacioni signal prepoznaje poli A polimeraza koja na iRNK molekul dodaje oko 250 adenina, formirajući karakterističan poli A rep (Tran *et al.*, 2001). Poli A rep ima važnu ulogu u transportu iRNK iz nukleusa i njenoj stabilnosti u citoplazmi.

Pokazalo se da bazalna transkripciona mašinerija koja se sklapa na jezgru promotora nije univerzalna za sve promotore. Literaturni podaci pokazuju da i ona ima ulogu u

postizanju ćelijske- i tkivno-specifične ekspresije gena. Naime, otkriveni su TAF proteini koji su specifični samo za određene tipove ćelija i ulaze u sastav alternativnih TFIID kompleksa koji su od esencijalne važnosti za ćelijsku diferencijaciju i razviće određenih tkiva (*Falender et al.*, 2005; *Freiman et al.*, 2001; *Pointud et al.*, 2003). Takođe, *Deato* i *Tjian* su utvrdili da je terminalna diferencijacija mioblasta u miotube praćena zamenom celog TFIID kompleksa sa alternativnim kompleksom koji sadrži TAF3 i TRF (TBP related protein) (*Deato and Tjian*, 2007). Pretpostavka je da se na taj način postiže gašenje određenih transkripcionih programa vezanih za ćelijsku proliferaciju i istovremeno aktiviranje drugog seta gena odgovornog za proces terminalne diferencijacije (*Deato and Tjian*, 2007).

U slučaju promotora koji ne sadrže TATA motiv, u inicijaciji transkripcije učestvuju drugi promotorski elementi o kojima će biti više reči u sledećem odeljku Uvoda.

1.1.1 Strukturna organizacija promotora kod eukariota

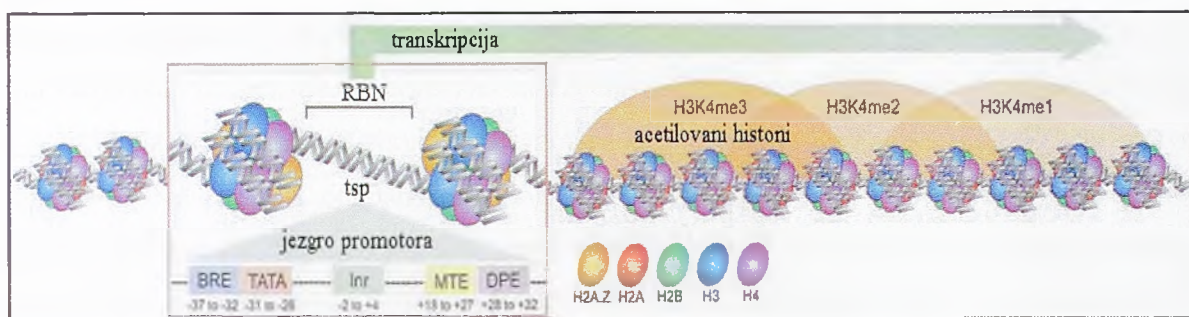
Jedan od nivoa na kojem se usložnjavaju mehanizmi transkripcione regulacije i postiže diferencijalna ekspresija gena kod eukariota je strukturna organizacija promotora.

Kao što je već pomenuto, eukariotski promotor se sastoji iz "jezgra" promotora ("core" promoter) koje okružuje mesto inicijacije transkripcije i proksimalnog regiona uzvodno od njega (proximal promoter). Promotorsko jezgro, koje predstavlja minimalni region neophodan za vezivanje transkripcione mašinerije i inicijaciju bazalne transkripcije, bilo je predmet velikog broja istraživanja koja su za rezultat imala otkriće više *cis* regulatornih sekvenci koje su evolutivno očuvane između vrsta.

Prvi identifikovani promotorski element bio je TATA boks (TATAWAAR; W- A/T, R- A/G) (*Breathnach and Chambon*, 1981) koji je uobičajeno lociran 25 do 30 baznih parova (bp) uzvodno od starta transkripcije (Slika 3). Ovaj motiv najčešće prepoznaje i vezuje TATA vezujući protein (TATA binding protein- TBP), subjedinica opšteg transkripcionog faktora TFIID (*Burley and Roeder*, 1996), mada su i drugi, TBP-u slični proteini (TBP related factors-TRF) sposobni da vezuju ovaj element (*Berk*, 2000). TBP se vezuje za mali žljeb DNK i izaziva savijanje DNK uzvodno i nizvodno u odnosu na TATA boks, delimično odvijajući DNK dupleks na mestu kontakta, zahvaljujući inserciji fenilalanina.

Veliki broj promotora ne sadrži TATA motiv. Ovakvi promotori sadrže druge konsenzusne elemente kao što je inicijatorski element (Inr, YYANWYY; Y- C/T, N- A/C/G/T) koji okružuje *tsp*, odnosno nalazi se na poziciji od -2 do +4 u odnosu na *tsp* (*Smale*

and Baltimore, 1989) (Slika 3). Inr element mogu posedovati i promotori sa TATA motivom. Dok Inr može da stimuliše transkripciju nezavisno od TATA boksa, oba elementa deluju sinergistički kada se nađu zajedno u promotoru (Smale et al., 1990). Inr element specifično prepoznaje i vezuje kompleks dva TBP asocirana faktora – TAFII250 i TAFII150 [TAF1 i TAF2 po novoj nomenklaturi, (Tora, 2002)] koji predstavljaju subjedinice TFIID kompleksa (Chalkley and Verrijzer, 1999).



Slika 3. Karakteristike transkripciono aktivnog promotora. Oko starta transkripcije (tsp) u okviru jezgra promotora je region bez nukleozoma (RBN). Shematski su predstavljeni promotorski elementi koje može sadržati jezgro promotora kao i njihove relativne pozicije u odnosu na start transkripcije (BRE, TATA, Inr, MTE, DPE). Acetilacija histona je najintenzivnija odmah nizvodno od promotora. Shematski je prikazan i gradijent metilacije lizina na poziciji 4 histona 3 (H3K4). Trimetilovani H3 protein (H3K4me3) je prisutan na promotoru, dok su nizvodno sa povećanjem razdaljine prisutni najpre dimetilovani (H3K4me2), a zatim i monometilovani H4 (H3K4me1). Ovaj dijagram je napravljen na osnovu rezultata dobijenih u kvascu, vinskoj mušci i sisarskim sistemima. Preuzeto iz Heintzman and Ren, 2007.

Nizvodni promotorski element (Downstream promoter element - DPE, RGWYV; R-A/G, W- A/T, Y- C/T, V- A/C/G) (Kadonaga, 2002) je tipičan za promotore koji nemaju TATA motiv, i on funkcioniše u sadejstvu sa Inr elementom (Burke and Kadonaga, 1996). Relativna pozicija ovog promotorskog elementa je kritična za optimalnu transkripciju, i on je lociran od +28 do +32 u odnosu na tsp (Kutach and Kadonaga, 2000) (Slika 3). Kao i u slučaju TATA motiva i Inr elementa, DPE prepoznaje i vezuje TFIID, verovatno preko subjedinica TAFII60 i TAFII40 (TAF6 i TAF9 po novoj nomenklaturi) (Burke and Kadonaga, 1997). Kod vinske mušice je otkriven multifunkcionalni faktor, dNC2 (Dr1-Drap1) (negative cofactor 2), koji u zavisnosti od toga da li promotor sadrži TATA boks ili DPE ima ulogu transkripcionog represora, odnosno aktivatora, što ukazuje na postojanje više različitih regulatornih mehanizama na nivou samog jezgra promotora (Willy et al., 2000).

BRE element koji prepoznaje TFIIB (TFIIB recognition element – BRE, SSRCGCC; S- G/C, R- A/G) je promotorski element koji se nalazi odmah uzvodno od TATA boksa i koji vezuje TFIIB transkripcijski faktor (*Lagrange et al.*, 1998) (Slika 3). Za ovaj element je pokazano da može i da stimulira i da reprimira transkripciju (*Evans et al.*, 2001).

MTE (Motif ten element, CSARCSSAACGS; S- G/C, R- A/G) je identifikovan pri kompjuterskoj analizi promotora vinske mušice (*Ohler et al.*, 2002) i do sada nije detektovan kod promotora vertebrata. Ovaj promotorski element je pozicioniran od 18 do 29 bp nizvodno od *tsp*, delimično se preklapajući sa 5' krajem DPE motiva (Slika 3). MTE zahteva prisustvo Inr elementa i funkcioniše sinergistički sa TATA boksom ili DPE motivom (*Lim et al.*, 2004).

Opšta karakteristika sisarskih promotora koji ne sadrže TATA boks i DPE je prisustvo nizova CG nukleotida, odnosno prisustvo CpG ostrva (*Blake et al.*, 1990). Ovi promotori sadrže mnoštvo GC boks motiva koja prepoznaju Sp1 i srodni transkripcijski faktori (*Brandeis et al.*, 1994; *Macleod et al.*, 1994). Prema literaturnim podacima, CpG ostrva su najčešće prisutna klasa promotorskih elemenata, s obzirom da je procenjeno da su prisutna kod 79-88% promotora čoveka i kod 71% promotora miša (*Bajic et al.*, 2006; *Kim et al.*, 2005).

Potruga za novim, do sada neokarakterisanim promotorskim elementima, se nastavlja pri čemu su kompjuterske analize sekvenci na genomskoj skali i kao i filogenetske analize dovele do otkrića novih potencijalnih regulatornih motiva (*Xie et al.*, 2005). Veliki broj studija ukazuje da promotorska jezgra ne poseduju univerzalne elemente. Naime, svaki od navedenih promotorskih elemenata se može naći u određenom setu promotora, pri čemu se njihova relativna zastupljenost razlikuje kod različitih vrsta. Početna istraživanja promotorskih sekvenci su ukazivala da je TATA boks opšta karakteristika promotora. Međutim analize na genomskoj skali su pokazale da je ovaj motiv prisutan kod 33-43% promotora vinske mušice (*Kutach and Kadonaga*, 2000; *Ohler et al.*, 2002) i kod samo 10-16% promotora miša i čoveka (*Bajic et al.*, 2004; *Bajic et al.*, 2006; *Cooper et al.*, 2006; *Kim et al.*, 2005). Takođe, dok 69% promotora vinske mušice sadrži Inr element (*Kutach and Kadonaga*, 2000; *Ohler et al.*, 2002), samo oko 55% promotora čoveka poseduje ovaj element (*Kim et al.*, 2005). S druge strane, DPE motiv je češći kod promotora čoveka (48%) nego kod vinske mušice (40%) (*Bajic et al.*, 2006; *Kutach and Kadonaga*, 2000). Naravno, ovi regulatorni motivi su u promotorima prisutni u različitim kombinacijama, i ta varijabilnost, kako između različitih promotora iste vrste, tako i između vrsta ukazuje na značajnu ulogu diverziteta sekvenci jezgra promotora u transkripcijskoj regulaciji kod eukariota.

1.1.2 Transkripcioni faktori

Transkripcioni faktori su proteini koji se vezuju za regulatorne regione gena i regulišu transkripciju. U osnovi, svi transkripcioni faktori se mogu podeliti na: opšte transkripcione faktore koji su direktno uključeni u formiranje preinicijacionog i inicijacionog kompleksa i koji su odgovorni za otpočinjanje transkripcije i specifične transkripcione faktore koji se vezuju za odgovarajuće DNK motive i imaju ulogu aktivatora ili represora transkripcije. Svoju ulogu mogu ostvarivati ili direktnom interakcijom sa komponentama bazalne transkripcione mašinerije ili indirektno, regrutujući koaktivatore ili korepresore (*Conkright et al.*, 2003; *Gill et al.*, 1994; *Hahn*, 1993; *Hoey et al.*, 1993; *Ryu et al.*, 1999).

Transkripcioni faktori imaju modularnu strukturu i sadrže nekoliko domena uključujući DNK vezujući domen, domen preko koga ostvaruju aktivatorsku ili represorsku funkciju i domen za protein-protein interakcije koji može da služi ili za formiranje homo/hetero-dimera ili za interakcije sa drugim regulatornim proteinima uključenim u transkripciju (*Alberts*, 1994; *Tjian and Maniatis*, 1994). DNK vezujući domeni transkripcionih faktora su klasifikovani u više tipova uključujući HTH (helix-turn-helix), homeodomen, cinkani prstići (zinc finger), "leucinski rajsferšlus" (leucine zipper), bHLH (basic helix-loop-helix), WH (winged helix) i winged HTH (winged helix-turn-helix) (*Locker*, 2001).

bHLH motiv i leucinski rajsferšlus imaju dve funkcije: pored specifičnog vezivanja za odgovarajuće DNK sekvence služe i za formiranje dimera. Formiranje homo- i hetero-dimera od strane transkripcionih faktora je još jedan način kojim se povećava raznovrsnost i specifičnost vezivanja za DNK (*Lamb and McKnight*, 1991). Utvrđeno je da mnogi transkripcioni faktori međusobno stupaju u interakcije preko svojih cinkanih prstića (*Merika and Orkin*, 1995) ili preko svojih aktivacionih domena (*Mitchell and Tjian*, 1989).

Dok kod prokariota regulatorni proteini aktiviraju ili reprimiraju gene uglavnom pojedinačno, kod eukariota uglavnom funkcionišu u određenim kombinacijama, specifičnim za stupanj razvića i ćelijski tip. Po jednom modelu vezivna mesta za transkripcione faktore u tkivno-specifičnim enhenserima i promotorima služe kao matrica za regrutovanje odgovarajuće kombinacije ovih proteina iz čitavog "pula" faktora prisutnih u datom tipu ćelije (*Arnone and Davidson*, 1997). Prema drugom modelu, baziranom na istraživanjima procesa hematopoeze, transkripcioni faktori su sposobni da obrazuju multimerne komplekse nezavisno od DNK matrice (enhensera), odnosno pre vezivanja za specifične DNK sekvence (*Sieweke and Graf*, 1998). Ovako formirani kompleksi mogu imati različit uticaj na različite

enhensere. Tokom diferencijacije dolazi do sukcesivnih promena u sastavu multimernih kompleksa. Naime, pojedini transkripcioni faktori bivaju zamenjeni drugim što za posledicu ima promenu afiniteta kompleksa za pojedine enhenserske sekvence. Ovako izmenjeni kompleksi, ne samo da stižu sposobnost aktivacije novih enhensera, već takođe mogu da reprimiraju enhensere koji više nisu potrebni za dati program genske ekspresije.

U daljem tekstu biće prikazane opšte karakteristike odabranih transkripcionih faktora, čija je uloga u regulaciji ekspresije *SOX3* gena ispitivana u ovoj tezi.

Sp1 (specificity protein 1) je jedan od najbolje okarakterisanih sekvencno-specifičnih transkripcionih faktora koji učestvuje u regulaciji bazalne i inducibilne transkripcije mnogih ćelijskih i virusnih gena preko GC bogatih domena u njihovim promotorima ili enhenserima. Vezivna mesta za ovaj transkripcioni faktor su karakteristična za promotore bez TATA boksa, ali su prisutni i u promotorima koji poseduju ovaj element. Sp1 pripada Sp-multigenskoj familiji proteina (*Bouwman and Philipsen, 2002; Kaczynski et al., 2003; Suske, 1999*) čiji su članovi evolutivno srodni i poseduju visoko konzerviran C₂H₂ tip cinkanih prstića kao DNK vezujući domen ("Krüppel-like" superfamilija). Sp1 najčešće funkcioniše kao transkripcioni aktivator, ali postoje podaci koji ukazuju i na njegovu represorsku funkciju (*Doetzlhofer et al., 1999*). Ovaj transkripcioni faktor ostvaruje svoju funkciju kroz direktne interakcije sa komponentama bazalne transkripcione mašinerije, kao što su TBP, hTAFII130 i hTAFII55 (*Chiang and Roeder, 1995; Emili et al., 1994; Tanese et al., 1996*). Takođe, Sp1 interaguje sa bazalnom transkripcionom mašinerijom i indirektno preko koaktivatora ka što je CRSP (cofactor required for Sp1 activation) (*Ryu et al., 1999*), ali i sa drugim transkripcionim faktorima. Vezivna mesta za Sp1 se često nalaze pored, ili se delimično, ili u potpunosti preklapaju sa vezivnim mestima za druge transkripcione faktore sa cinkanim prstićima kao što su ZBP-89 i MAZ, sa kojima Sp1 najčešće kompetira za vezivanje (*Her et al., 2003; Keates et al., 2001; Law et al., 1998; Merchant et al., 1996; Song et al., 2001*).

ZBP-89 (89-kDa zinc finger binding protein), zajedno sa ZBP-99, čini ZBP familiju transkripcionih faktora koji kao DNK vezujući domen poseduju po četiri cinkana prstića tipa C₂H₂ (*Law et al., 1999*). Ovaj transkripcioni faktor može da ima ulogu i transkripcionog aktivatora i represora zavisno od promotorskog konteksta, pozicionog efekta ZBP-89 vezivnog mesta, kompeticije sa različitim transkripcionim faktorima za vezivanje za DNK ili interferencije sa aktivatorima transkripcije (*Keates et al., 2001; Malo et al., 2006; Merchant et al., 2003; Merchant et al., 1996; Ye et al., 1999; Zhang X. et al., 2003*). Svoju represorsku funkciju ZBP-89 najčešće ostvaruje kompeticijom za ista ili preklapajuća vezivna mesta sa Sp1, Sp3, Sp4, WT1 (Wilms tumor 1) i cKrox (collagen-Krüppel box) transkripcionim

faktorima (*Hasegawa et al.*, 1997; *Law et al.*, 1998; *Merchant et al.*, 1996; *Moshier et al.*, 1996). Nešto drugačiji mehanizam represije je uočen pri ispitivanju regulacije ekspresije gena za vimentin, gde je pokazano da ZBP-89 direktno interaguje sa Sp1 transkripcionim faktorom, iako su vezivna mesta ova dva faktora međusobno udaljena 235 bp (*Zhang X. et al.*, 2003). Na taj način onemogućena je interakcija Sp1 sa transkripcionom mašinerijom čime je inhibirana transkripcija gena za vimentin. Za razliku od represije, malo se zna o mehanizmima transkripcione aktivacije posredovane ZBP-89 transkripcionim faktorom. Ovaj protein ima ulogu aktivatora u butiratom indukovanoj aktivaciji transkripcije p21^{waf1} gena, gde ZBP-89 stupa u interakciju sa koaktivatorom p300 što je praćeno regrutovanjem Sp1 u transkripcioni kompleks (*Bai and Merchant*, 2000). p300 je transkripcioni koaktivator koji poseduje histon acetiltransferazni domen zahvaljujući kome smanjuje afinitet vezivanja histonskih proteina za DNK i na taj način omogućuje lakši pristup drugim transkripcionim faktorima (*Ogryzko et al.*, 1996).

MAZ (*Myc-associated zinc finger protein*) je transkripcioni faktor koji kao DNK vezujući domen poseduje šest cinkanih prstića tipa C₂H₂ koji specifično prepoznaju GA motiv (GGGAGGG) (*Bossone et al.*, 1992). Ovaj transkripcioni faktor ima ulogu i u inicijaciji i u terminaciji transkripcije velikog broja gena (*Ashfield et al.*, 1994; *Duncan et al.*, 1995; *Parks and Shenk*, 1996). Ekspresija ovog transkripcionog faktora je zavisna od faza ćelijskog ciklusa i regulisana od strane samog MAZ proteina (*Song et al.*, 1998). Kao što je već pomenuto MAZ transkripcioni faktor kompetira sa Sp1 za vezivanje za ista ili preklapajuća mesta u ciljnim promotorima (*Her et al.*, 2003; *Song et al.*, 2001).

USF1 (upstream stimulatory factor 1), zajedno sa USF2, pripada klasi bHLH-zip transkripcionih faktora (basic helix-loop-helix-leucine zipper) koji se specifično vezuju za E-boks motive (5' CANNTG 3') u vidu homo- ili hetero-dimera (*Sirito et al.*, 1992; *Viollet et al.*, 1996). Ovi faktori poseduju USF-specifičan region koji je neophodan za transkripcionu aktivaciju promotora koji poseduju TATA boks i Inr element (*Sawadogo et al.*, 1999). Pokazano je da ovi faktori stupaju u kooperativne, protein-protein interakcije sa transkripcionim faktorima kao što su Sp1 (*Liu et al.*, 2004), PEA3 (*Firlej et al.*, 2005) i MTF1 (*Andrews et al.*, 2001) omogućavajući na taj način transkripcionu regulaciju ciljnih gena. Takođe, u slučaju promotora koji sadrže TATA boks, USF1 direktno interaguje sa komponentama bazalne transkripcione mašinerije kao što su TFIID i neki od TAF proteina (*Chiang and Roeder*, 1995). U slučaju promotora sa Inr elementom, USF-1 je sposoban da direktno interaguje sa ovim promotorskim elementom, ili indirektno preko TFII-I faktora. Konačno, USF proteini imaju sposobnost da regrutuju histonske acetiltransferaze i metilaze

(CAF i SET7/9) omogućavajući otvaranje hromatina i pristup transkripcionoj mašineriji (*West et al.*, 2004).

NF-Y (nuclear factor Y) je sveprisutni transkripcioni faktor koji se vezuje za specifični DNK motiv nazvan CCAAT boks. Ovaj protein se sastoji od tri subjedinice NF-YA, NF-YB i NF-YC, pri čemu se za CCAAT motiv (Y boks), kao i okolne sekvence, vezuje samo u formi heterotrimeru (*Mantovani*, 1998). Subjedinica NF-YA je odgovorna za specifično prepoznavanje i vezivanje za DNK. NF-Y pripada grupi malobrojnih proteina, među kojima su i SOX proteini, koji se vezuju za manji žljeb DNK (*Ronchi et al.*, 1995). Ovaj transkripcioni faktor je značajan i za regulaciju ekspresije gena čija je funkcija zavisna od signala ćelijskog ciklusa ili je indukovana spoljašnjim stimulusima (*Bolognese et al.*, 1999; *Mantovani*, 1998). Pokazano je da NF-Y reguliše transkripciju ciljnih gena u kooperaciji sa transkripcionim faktorima kao što su Sp1 (*Roder et al.*, 1999; *Roder et al.*, 1997), GATA (*Huang et al.*, 2004) i SREBP (*Jump et al.*, 2001). NF-Y može imati ulogu aktivatora transkripcije (*Reed et al.*, 1995; *Zhu et al.*, 2003), ili represora (*Gowri et al.*, 2003), dok kod nekih gena NF-Y ima bifunkcionalnu ulogu, i aktivatora i represora (*Bernadt et al.*, 2005).

CREB (cAMP response element binding protein) spada u bZIP superfamiliju transkripcionih faktora koji specifično prepoznaje i vezuje se za konsenzusnu palindromsku sekvencu TGACGTCA (CRE element) kao i za polumesto CGTCA, aktivirajući na taj način ciljne gene (*Mayr and Montminy*, 2001; *Nichols et al.*, 1992). Kao odgovor na različite fiziološke stimule, koji povećavaju intracelularnu koncentraciju cAMP-a ili Ca^{2+} , dolazi do aktivacije CREB proteina preko fosforilacije serina na poziciji 133 i/ili translokacije TORC koaktivatora (transducer of regulated CREB activity) u jedro (*Conkright et al.*, 2003; *Iourgenko et al.*, 2003; *Mayr and Montminy*, 2001; *Shaywitz and Greenberg*, 1999). Aktivirani CREB stimuliše transkripciju ciljnih gena kroz asocijaciju sa koaktivatorima, uključujući CBP/p300 (*Arias et al.*, 1994; *Kwok et al.*, 1994), TORC (*Conkright et al.*, 2003) kao i sa TAFII110 (*Felinski and Quinn*, 1999). CREB ima ulogu u regulaciji velikog broja gena koji su uključeni u kontrolu ćelijskog ciklusa, ćelijskog rasta i opstanka, metabolizma, kao i neuronalnih aktivnosti kao što su memorija i učenje (*Desdouets et al.*, 1995; *Lonze and Ginty*, 2002; *Mayr and Montminy*, 2001; *White et al.*, 2006)

1.2 SOX/Sox geni

U ovom poglavlju Uvoda biće predstavljene podaci vezani za strukturu i funkciju familije SOX gena kao i dosadašnja saznanja o ulozi ovih gena u različitim procesima tokom embrionalnog razvića kičmenjaka. Posebna pažnja biće posvećena profilu ekspresije i funkciji SOX3/Sox3 gena tokom embrionalnog razvića kičmenjaka, zatim, genima regulisanim ovim transkripcionim faktorom kao i regulaciji ekspresije Sox3 gena kod kičmenjaka.

Familija SOX/Sox gena, koja je prvi put identifikovana kod sisara 1990. godine, kodira SOX proteine koji pripadaju HMG (**h**igh **m**obility **g**roup) boks superfamiliji DNK vezujućih proteina (Wegner, 1999). Zajednička osobina ovih proteina, je da kao DNK vezujući domen poseduju HMG boks domen, dužine 79 aminokiselina (Laudet et al., 1993). Ovaj domen omogućava SOX proteinima da specifično prepoznaju i vežu se za heksamernu DNK sekvencu - 5' WWCAAW 3' (W- A/T) (Denny et al., 1992; Harley et al., 1994; Mertin et al., 1999; van de Wetering et al., 1993).

Sry (Sex-determining region Y) je prvi otkriveni Sox gen (Gubbay et al., 1990; Sinclair et al., 1990). Njegovim otkrićem okončana je potraga za genom odgovornim za determinaciju muškog pola koji je lociran na Y hromozomu. Ostali članovi ove genske familije otkriveni su na osnovu homologije sa Sry genom u okviru HMG boks domena i na osnovu ove karakteristike nastao je akronim Sox (**S**ry-related **H**MG **b**ox) (Denny et al., 1992; Gubbay et al., 1990; Wright et al., 1993). Brojevi su Sox genima dodeljivani na osnovu redosleda otkrivanja. Schepers i saradnici su 2002. godine pretraživanjem sekvenci kompletnih genoma čoveka i miša izvršili ponovnu numeraciju i klasifikaciju, što je finalno rezultiralo identifikacijom dvadesetak različitih Sox gena prisutnih kod obe vrste (Schepers et al., 2002). Na osnovu poređenja proteinskih sekvenci unutar i van HMG boks domena, Sox geni su svrstani u 10 grupa (A-J), pri čemu je grupa B podeljena na podgrupe B1 i B2, dok grupe I i J imaju po jednog člana koji nemaju ortologe među Sox genima kičmenjaka (I- *Xenopus laevis* Sox3I; J- *Caenorhabditis elegans* SoxJ) (Bowles et al., 2000). Na Tabeli 1., prikazano je 8 grupa Sox gena (A-H) koje su prisutne kod miša i čoveka.

SOX proteini u okviru iste grupe pokazuju visok nivo homologije (70-90%) kako u okviru HMG boks domena tako i van njega, dok proteini iz različitih grupa pokazuju homologiju samo u okviru HMG boks domena ($\geq 46\%$). Većina Sox gena ima 1-3 egzona i jednu varijantu primarnog RNK transkripta, dok Sox geni grupa D i H sadrže više egzona koji mogu dati primarne transkripte različitih dužina i izmenjenih karakteristika (Hiraoka et al.,

1998; Lefebvre et al., 1998; Osaki et al., 1999; Wunderle et al., 1996). SOX/Sox geni grupe A, B, C i G ne poseduju introne.

GRUPA	GEN	LOKUS		SHEMATSKI PRIKAZ GENA	REFERENCE
		MIŠ	ČOVEK		
A	Sry	YC3	Yp11.3		Gubbay et al., 1992 Dubin et al., 1995
B1	Sox1	8 A1-A2	13q34		Collignon et al., 1998 Kamachi et al., 1999
	Sox2	3 A2-B	3q26.3-q27		Collignon et al., 1998 Kamachi et al., 1999
	Sox3	X A7.3-B	Xq26.3		Collignon et al., 1998
B2	Sox14	9 E3.3	3q22-q23		Hergrave et al., 2000
	Sox27	14 E4	13q31-q32		Uchikawa et al., 1999
C	Sox4	13 A3-A5	6p22.3		van de Watering et al., 1993
	Sox11	12 A3	2p25		Kühnbrodt et al., 1998
	Sox12	2 G3	20p13		NCBI - CAM3207
D	Sox5	6 G3	12p12.1		Denny et al., 1992 Lefebvre et al., 1998
	L-Sox5	6 G3			Lefebvre et al., 1998 Hiroaka et al., 1998
	Sox6	7 F1	11p15.3		Lefebvre et al., 1998 Takamatsu et al., 1995 Connor et al., 1995
	Sox13	1 E4	1q32		Kido et al., 1998
E	Sox8	17 A3	16pter-p13.3		Schepers et al., 2000
	Sox9	11 E2	17q24.3q25.1		Sudbeck et al., 1996 Wright et al., 1995
	Sox10	15 E1	22q13		Pusch et al., 1998 Kühnbrodt et al., 1998
F	Sox7	14 C3	8p22		Taniguchi et al., 1999 Takeshita et al., 2001
	Sox17	1 A1	8q11.23		Kanal et al., 1998
	Sox18	2 H4	20q13.33		Dunn et al., 1995 Hosking et al., 2001
G	Sox15	11 B3	17p13		Beranger et al., 2000
H	Sox30	11 B1.1	5q33		Osaki et al., 1999

Tabela 1. Klasifikacija Sox gena miša i čoveka, sa oznakom grupe, hromozomske pozicije kod miša i čoveka (lokus) i strukturnom organizacijom gena. Na shemi organizacije gena blokovi označavaju funkcionalne domene: crni-HMG boks domen, uzdužne pruge-transaktivacioni domen, poprečne pruge-transrepresorski domen, dijagonalne pruge-dimerizacioni domen. Preuzeto iz Lefebvre et al., 2007.

Do nedavno se mislilo da su *Sox* geni karakteristika višćelijskih organizama (Metazoa). Međutim, analizom genomske sekvence jednoćelijskog organizma *Monosiga brevicollis* (Protozoa, red Choanoflagellata) otkrivene su dve *Sox* genima slične sekvence čije predviđene HMG domene odlikuje 49 – 50% identičnosti u aminokiselinskoj sekvenci sa HMG domenima *Sry/SRY* gena miša i čoveka (King *et al.*, 2008). S obzirom da su ovi jednoćelijski organizmi najbliži poznati srodnici višćelijskih organizama, pretpostavka je da je pojava predačkog *Sox* gena prethodila pojavi Metazoa (Guth and Wegner, 2008). Najniži oblik višćelijskih organizama kod kojeg su detektovani *Sox* geni su sunđer, gde je kod tri različite vrste detektovano od 3 do 4 gena (Jager *et al.*, 2006; Larroux *et al.*, 2008). Ovi *Sox* geni pripadaju ili SoxB ili SoxF grupi, dok neki ne mogu lako biti svrstani ni u jednu od postojećih grupa. Kod dupljara je broj identifikovanih *Sox* gena mnogo veći i kreće se od 10 do 14, zavisno od vrste (Jager *et al.*, 2006; Magie *et al.*, 2005). *Sox* geni dupljara mogu biti svrstani u tri grupe: SoxB, SoxF i SoxE, ali postoje i oni koji se ne mogu klasifikovati na osnovu postojeće podele. Ovi podaci ukazuju da se prva ekspanzija *Sox* gena odigrala kod prvih Metazoa pre divergencije sunđera i dupljara, kao i da su SoxB, SoxF i SoxE grupe filogenetski veoma stare (Guth and Wegner, 2008). S obzirom da su ovi organizmi vrlo jednostavne građe, bez kompleksnih tkiva i bilateralne simetrije, verovatno *Sox* geni kod njih obavljaju neke osnovne funkcije vezane za multicelularnost, što se veoma razlikuje od složenih funkcija koje ovi geni obavljaju kod vertebrata. SoxC i SoxD grupa gena se pojavljuju kod organizama sa bilateralnom simetrijom, gde se može primetiti drastična razlika u broju *Sox* gena između protostomija i deuterostomija. Insekti (*Drosophila melanogaster*) i nematode (*Caenorhabditis elegans*) poseduju po osam, odnosno pet *Sox* gena, a svi ovi geni imaju odgovarajuće ortologe u pomenutim grupama *Sox* gena vertebrata (Bowles *et al.*, 2000). Najverovatnije je veoma rano tokom evolucije vertebrata, došlo do duplikacije originalnog seta *Sox* gena dva puta a zatim i do njihove divergencije (Hokamp *et al.*, 2003). Neki od dupliranih gena su podelili postojeće funkcije koju je obavljao gen pre duplikacije, dok su neke kopije stekle nove funkcije tokom evolucije (subfunkcionalizacija i neofunkcionalizacija gena) (Lynch and Force, 2000; McClintock *et al.*, 2001). Tokom procesa subfunkcionalizacije i neofunkcionalizacije gena postoji period kada se obe kopije gena koeksprimiraju i dele iste funkcije. Time se mogu objasniti preklapajući obrasci ekspresije i slične funkcije različitih članova iste grupe *Sox* gena, gde jedan član grupe može zameniti drugog u obavljanju neke funkcije.

1.2.1 Karakteristike SOX proteina

Većina SOX proteina ima više funkcionalnih domena (*Collignon et al.*, 1996; *Connor et al.*, 1995; *Dunn et al.*, 1995; *Hargrave et al.*, 2000; *Kanai et al.*, 1996; *Kuhlbrodt et al.*, 1998; *Schepers et al.*, 2000; *Wright et al.*, 1995). Najznačajniji je HMG boks domen koji obezbeđuje ostvarivanje veoma značajnih funkcija, kao što su vezivanje proteina za DNK, konformacione promene DNK, interakcije sa drugim proteinima i transport proteina unutar i van jedra (*Lefebvre et al.*, 2007). Ove funkcije ostvaruju se preko sekvenci HMG boks domena koje su evolutivno visoko očuvane kod svih SOX proteina. Pošto je HMG boks domen visoko očuvan kod SOX proteina iste grupe, a proteini različitih grupa pokazuju oko 50% homologije ovog regiona, pretpostavlja se da je evolucija ovog domena išla u pravcu ostvarivanja jedinstvenih funkcija SOX proteina pojedinih grupa. Domeni SOX proteina izvan HMG boks domena visoko su evolutivno očuvani kod ortologa i članova iste grupe, a potpuno različiti kod pripadnika različitih grupa (*Lefebvre et al.*, 2007). Ovi domeni uključuju transaktivacione, transrepresorske i domene odgovorne za dimerizaciju proteina (*Lefebvre et al.*, 2007).

Sry gen je zanimljiv izuzetak od ovog pravila. Njegovi ortolozi ne pokazuju homologiju izvan HMG boks domena (*Lefebvre et al.*, 2007). Postoje dva pristupa u objašnjenju ovog fenomena. Po prvom *SRY* protein nema drugih funkcionalnih domena osim HMG boksa (*Lefebvre et al.*, 2007). Ovu hipotezu podržava činjenica da većina mutacija u humanom *Sry* genu koje dovode do reverzije pola pogađaju upravo HMG boks domen (*Cameron and Sinclair*, 1997). Po drugoj hipotezi, nepostojanje homologije izvan HMG boks domena objašnjava se brzim promenama regiona izvan ovog domena izazvanih adaptivnim pritiskom specifičnim za određenu vrstu (*Lefebvre et al.*, 2007). Potencijalni transaktivacioni domeni izvan HMG boks-a *SRY* proteina su opisani kod pojedinih vrsta, ali njihova funkcija nije potvrđena *in vivo* (*Dubin et al.*, 1995).

Kao što je ranije pomenuto HMG boks domen omogućava SOX proteinima da specifično prepoznaju i vežu se za heksamernu DNK sekvencu - 5' WWCAAW 3' (W- A/T). Na afinitet vezivanja SOX proteina utiču i nukleotidi koji okružuju heksamernu sekvencu, ali zahtevi za prisustvom određenih susednih nukleotida variraju među različitim SOX proteinima (*Mertin et al.*, 1999). Na primer, SOX9 i SOX17 zahtevaju prisustvo 5'AG nukleotida, ali im se zahtevi za nukleotide na 3' kraju razlikuju: u slučaju SOX9 to je 3'GG, a za SOX17 3'G (*Mertin et al.*, 1999). Afinitet za određene nukleotide direktno zavisi od strukture HMG boks domena, što SOX proteinima iz iste grupe obezbeđuje regulisanje

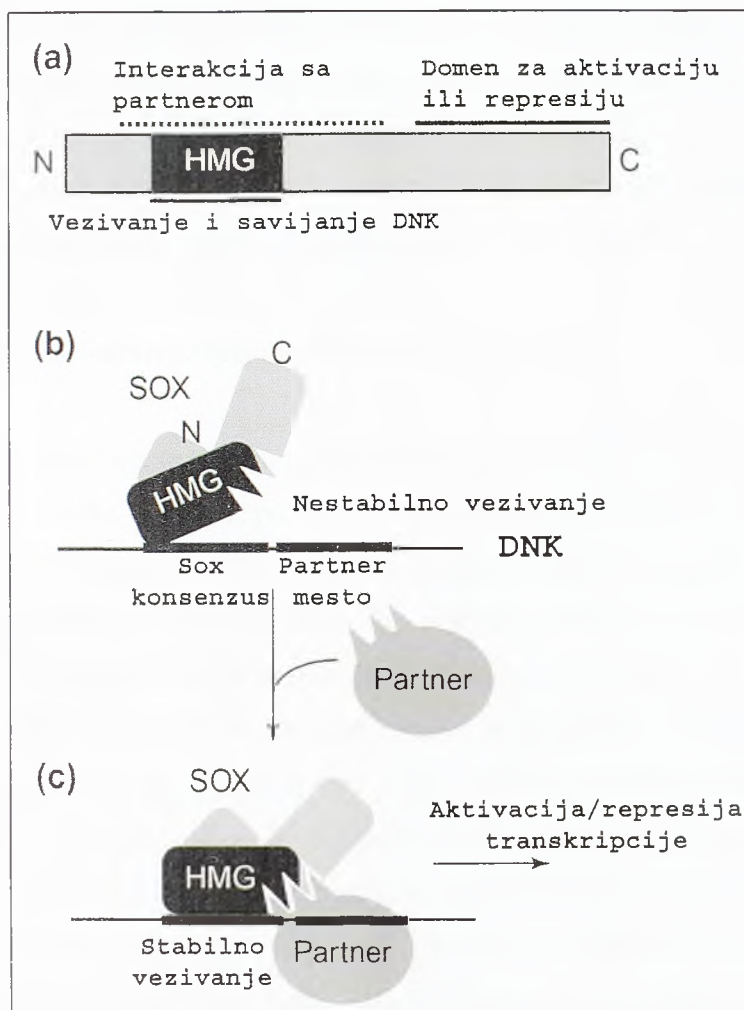
ekspresije istih ciljnih gena, dok proteini iz drugih grupa mogu da kompetiraju za ista mesta ili da preko izmenjenih sekvenci regulišu druge ciljne gene (*Lefebvre et al.*, 1998). Važno je naglasiti da je otkriveno više slučajeva u kojima se SOX proteini vezuju za sekvence DNK koje samo delimično odgovaraju konsenzusnoj sekvenci identifikovanoj u *in vitro* eksperimentima (*Mertin et al.*, 1999). Sekvence slične konsenzusnoj veoma su zastupljene u genomu, pa je jasno da specifičnost DNK sekvence nije jedini kriterijum za vezivanje SOX proteina u regulatornim regionima ciljnih gena *in vivo*. Konformacija DNK u regionima gde se nalaze nekonsenzusne sekvence može da bude jedan od kriterijuma po kojima SOX proteini vrše selekciju mesta za vezivanje.

Za razliku od većine drugih proteina, SOX proteini se vezuju za manji žljeb DNK i izazivaju savijanje DNK zavojnice, pri čemu ugao savijanja može da varira između 30° i 110° (*Weiss*, 2001). Ovakav raspon savijanja obezbeđen je fleksibilnom strukturom HMG boks domena koja postaje rigidna prilikom vezivanja za DNK, izazivajući savijanje zavojnice. Istovremeno, interakcija sa DNK obezbeđuje kompletno savijanje proteina i zauzimanje tercijarne strukture. S obzirom da se SOX proteini vezuju za manji žljeb DNK, sterički je omogućeno njihovo vezivanje u neposrednoj blizini drugih transkripcionih faktora, koji se vezuju za veći žljeb DNK (*Wegner*, 1999). Postavljena je hipoteza da SOX proteini organizuju hromatin i omogućavaju vezivanje drugih transkripcionih faktora i formiranje aktivnih transkripcionih kompleksa (enhensozoma) (*Wegner*, 1999).

1.2.2 Interakcije SOX proteina sa drugim transkripcionim faktorima

Još jedna važna karakteristika SOX proteina je njihova sposobnost da interaguju sa različitim transkripcionim faktorima (*Kamachi et al.*, 2000; *Wilson and Koopman*, 2002) (Slika 10). Ova osobina SOX proteina prvi put je otkrivena, i do sada najbolje okarakterisana, na enhenseru *Fgf4* gena koji je specifično aktiviran u embrionalnim matičnim ćelijama i embrionalnim karcinoma ćelijama (*Yuan et al.*, 1995). Ovaj enhenser sadrži blisko postavljena vezivna mesta za SOX proteine i POU domenske proteine. SOX2 i OCT3/4 (pripada familiji POU domenskih proteina) su koeksprimirani u ovim ćelijama i sinergistički aktiviraju enhenser *Fgf4* gena formirajući heterodimere preko svojih domena za vezivanje za DNK (*Remenyi et al.*, 2003). Sinergističko delovanje ova dva proteina potvrđeno je i u slučaju aktivacije samog *SOX2* gena, kao jednog od gena specifično eksprimiranih u matičnim ćelijama (*Tomioka et al.*, 2002). Transkripcioni faktori sa kojima SOX2 ostvaruje interakcije

u drugim ćelijskim tipovima su Pax6 u ćelijama sočiva oka (Kamachi *et al.*, 1998; Kamachi *et al.*, 2001) i Brn2 u neuralnom primordijumu (Tanaka *et al.*, 2004).



Slika 4. Vezivanje SOX proteina za partnerski protein i DNK. (a) Tipičan SOX protein ima tri funkcionalna domena: aktivacioni ili represorski domen blizu C-terminusa, HMG boks za vezivanje za DNK i domen koji obuhvata i HMG boks, koji je odgovoran za interakciju sa partnerskim faktorom. (b) Kada se SOX protein vezuje samo preko HMG boks domena, vezivanje je nestabilno. (c) Kada je partnerski faktor vezan za SOX protein i susednu sekvencu istovremeno, onda je vezivanje SOX proteina za ciljnu DNK sekvencu stabilizovano i može doći do aktivacije ili represije transkripcije. Preuzeto iz Kamachi *et al.*, 2000.

Interakcije SOX proteina sa drugim transkripcionim faktorima odvijaju se preko njihovih DNK vezujućih domena (Slika 4). Intezitet ovih proteinskih interakcija na DNK verovatno je povezan sa činjenicom da se SOX proteini vezuju za mali, a većina ostalih transkripcionih faktora za veliki žljeb DNK zavojnice (Wegner, 1999).

In vitro je pokazano da SOX proteini ostvaruju interakcije sa različitim transkripcionim faktorima: homeodomenskim proteinima, proteinima koji poseduju cinkane prstiće, HLH proteinima i proteinima sa strukturom leucinskog rajsferšlusa (*Remenyi et al.*, 2003; *Wissmuller et al.*, 2006). U svim slučajevima heterodimerizacija se ostvaruje preko C-terminalnog kraja HMG boks domena SOX proteina i domena za vezivanje za DNK drugog proteina (*Remenyi et al.*, 2003). Na ovaj način, HMG boks učestvuje u formiranje aktivnih transkripcionih kompleksa, ne samo promenom konformacije DNK, već i direktnom interakcijom sa različitim tipovima transkripcionih faktora (Slika 4).

1.2.3 SOX proteini – transkripcioni aktivatori i represori

SOX proteini koji pripadaju grupama B1, C, E i F, koji čine 12 od ukupno dvadeset SOX proteina čoveka i miša, poseduju potentan transaktivacioni domen na svom C-terminusu. Ovaj domen SOX2 i SOX9 proteina fizički interaguje sa transkripcionim koaktivatorima CBP/p300 i na taj način ovi proteini stupaju u kontakt sa komponentama transkripcione mašinerije (*Nowling et al.*, 2003; *Tsuda et al.*, 2003).

U tumačenju mehanizama transaktivacije i transrepresije od posebnog interesa je B grupa *Sox* gena koja je evoluirala u dve podgrupe: B1 koju čine transkripcioni aktivatori SOX1, SOX2 i SOX3 i B2 koja obuhvata transkripcione represore SOX14 i SOX21 (*Uchikawa et al.*, 1999). Pet SOX proteina B grupe pokazuju visoku homologiju u okviru HMG boks domena i preklapajući profil ekspresije. Represori B2 podgrupe *in vivo* reprimiraju aktivnost *Sox* gena podgrupe B1 (*Uchikawa et al.*, 1999). Domen odgovoran za represiju nalazi se van HMG boks-a, na C-terminusu, što ukazuje da ovi proteini deluju, ne samo kao kompetitori SOXB1 proteina za vezivanje za DNK, već i direktnim interakcijama preko C-terminalnog domena (*Uchikawa et al.*, 1999).

SOX15, jedini član G grupe SOX proteina, ostvaruje svoju represorsku funkciju, takođe preko domena lokalizovanog na C-terminusu (*Beranger et al.*, 2000). Zanimljivo je da SOX proteini D grupe (SOX5, 6 i 13) mogu regulisati transkripciju i kao koaktivatori i kao represori. SOX proteini ove grupe u sadejstvu sa SOX9 kooperativno aktiviraju specifične gene uključene u proces hondrogeneze, iako nemaju transaktivacioni domen, niti direktno reaguju sa SOX9 (*Lefebvre et al.*, 1998). Ovakav mehanizam aktivacije može se objasniti njihovom ulogom arhitektonskih faktora ili/i interakcijama sa drugim proteinima. Mehanizmi preko kojih ovi proteini ostvaruju represiju, potpuno su drugačiji i veoma raznovrsni. U ćelijama ušnog mehura, SOX6 reaguje sa transkripcionim korepresorom CtBP2 preko kratkog

motiva PLNLSS koji se nalazi van HMG boks domena (*Lefebvre et al.*, 2007), dok u beta ćelijama pankreasa interaguju sa Pdx1 proteinim preko HMG boks domena. U oligodendrocitima SOX5 i SOX6 kompetiraju sa SOX proteinima E grupe (SOX8, 9 i 10) za vezivanje za DNK (*Stolt et al.*, 2006). SOX13 vrši represiju gena specifičnih za T limfocite direktnim vezivanjem za DNK i istiskivanjem TCF1 proteina, ali domen odgovoran za ovu aktivnost još uvek nije identifikovan (*Melichar et al.*, 2007).

1.2.4 Homodimerizacija SOX proteina

Homodimerizacija SOX proteina do sada je opisana kod članova SOXD i SOXE grupe (*Lefebvre et al.*, 2007). Proteini SOXD grupe poseduju dva evolutivno očuvana domena (leucine zipper - coiled coil) koji obezbeđuju homodimerizaciju u prisustvu ili u odsustvu DNK i omogućavaju visoko efikasno vezivanje dimera za susedna konsenzusna mesta (*Lefebvre et al.*, 1998). Takođe, ovi proteini interaguju sa drugim transkripcionim faktorima preko HMG boks domena. SOXE proteini takođe formiraju homodimere, ali nakon vezivanja za DNK, i to preko evolutivno očuvanih regiona koji se nalazi na N-terminusu proteina (*Peirano and Wegner*, 2000; *Schlierf et al.*, 2002). Zanimljivo je da mutacija ovog regiona u humanom SOX9 genu dovodi do sindroma kampomelične displazije ali ne i do XY reverzije pola, što ukazuje da je homodimerizacija kao mehanizam regulacije aktivnosti proteina specifična za određene ćelijske tipove (*Bernard et al.*, 2003).

1.2.5 Posttranslacione modifikacije SOX proteina

Kao i u slučaju drugih regulatornih faktora, aktivnost SOX proteina je modulirana različitim tipovima posttranslacionih modifikacija. Mnogi SOX proteini poseduju potencijalna mesta za fosforilaciju, ali je do sada eksperimentalno potvrđena fosforilacija SOX9 proteina kinazom A na dva mesta u regionima koji okružuju HMG boks (*Huang et al.*, 2000). Ova modifikacija SOX9 proteina događa se u hrskavici (*Huang et al.*, 2001) i tokom razvića muških gonada, čime je omogućena translokacija proteina u jedro (*Malki et al.*, 2005).

SOX3, SOX4, SOX6 i SOXE proteini mogu biti modifikovani sumoilacijom ili ubikvitinacijom *in vitro*, čime se menjaju karakteristike ovih proteina kao što su stabilnost, ćelijska lokalizacija, transaktivacioni potencijal i afinitet za vezivanje za DNK (*Girard and Goossens*, 2006; *Hattori et al.*, 2006; *Pan et al.*, 2006; *Savare et al.*, 2005). Posttranslacione

modifikacije SOX proteina su potencijalno veoma važan vid regulacije ovih proteina koji je široko raspostranjen.

1.3 Funkcije *Sox* gena

Sox geni pokazuju dinamične obrasce ekspresije i smatraju se ključnim regulatorima embriogeneze i razvića što je i prikazano u Tabeli 2. Analize ekspresije *Sox* gena su pokazale da su ovi geni aktivni u skoro svim embrionalnim tkivima, dok neka embrionalna tkiva ekspimiraju istovremeno i više *Sox* gena. Takođe, *Sox* geni imaju značajnu ulogu u ključnim fiziološkim procesima tokom adultnog života kičmenjaka. U Tabeli 2. dat je sažet pregled funkcija *Sox* gena miša.

Grupa	Gen	Uloga
A	<i>Sry</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Determinacija pola (Polanco and Koopman, 2007) • Regulacija dopaminergičnih neurona nigrostriatalnog sistema (Dewing et al., 2006)
B1	<i>Sox1</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Razviće oka (Kondoh et al., 2004) • Neurogeneza (Bylund et al., 2003; Pevny and Placzek, 2005)
	<i>Sox2</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Održavanje pluripotentnosti embrionalnih matičnih ćelija (Avilion et al., 2003) • Neurogeneza (Pevny and Placzek, 2005; Wegner and Stolt, 2005) • Razviće oka (Kamachi et al., 1998; Kondoh et al., 2004) • Razviće hipofize (Kelberman et al. 2006) • Razviće čulnih kvržica (Okubo et al., 2006)
	<i>Sox3</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Neurogeneza (Bylund et al., 2003; Pevny and Placzek, 2005) • Razviće oka (Kamachi et al., 1998; Kondoh et al., 2004) • Razviće hipofize (Rizzoti et al., 2004) • Razviće gonada (Weiss et al., 2003)
B2	<i>Sox14</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Neurogeneza (Sandberg et al., 2005)
	<i>Sox21</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Neurogeneza (Sandberg et al., 2005)
C	<i>Sox4</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Kardiogeneza (Schilham et al., 1996) • Limfopoeza (Schilham et al., 1997) • Razviće pankreasa (Wilson et al., 2005) • Neurogeneza (Bergsland et al., 2006)
	<i>Sox11</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Kardiogeneza (Sock et al., 2004) • Razviće oka, pluća, pankreasa, skeleta i slezine (Sock et al., 2004) • Neurogeneza (Bergsland et al., 2006)
	<i>Sox12</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Nepoznata

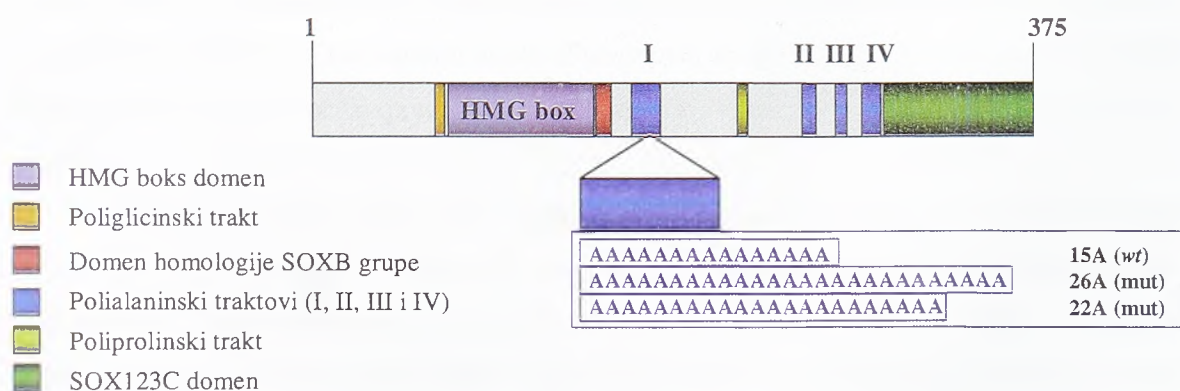
Grupa	Gen	Uloga
D	<i>Sox5</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Razviće skeleta (Smits et al., 2001) • Razviće nervne kreste (Perez-Alcala et al., 2004) • Gliogeneza (Stolt et al., 2006)
	<i>Sox6</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Provodljivost srčanog mišića (Hagiwara et al., 2000) • Razviće skeleta (Smits et al., 2001) • Gliogeneza (Stolt et al., 2006) • Eritropoeza (Dumitriu et al., 2006; Yi et al., 2006)
	<i>Sox13</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Limfopoeza (Melichar et al., 2007)
E	<i>Sox8</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Gliogeneza (Stolt et al., 2004 and 2005) • Razviće testisa (Chaboissier et al., 2004) • Osteogeneza (Schmidt et al., 2005) • Formiranje nervne kreste (Maka et al., 2005; O'Donnell et al., 2006)
	<i>Sox9</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Determinacija pola (Barrionuevo et al., 2006a; Kobayashi et al., 2005) • Hondrogeneza (Bi et al., 1999; Akiyama et al., 2002) • Razviće nervne kreste (Cheung et al., 2005) • Gliogeneza (Stolt et al., 2003; Wegner and Stolt, 2005) • Održavanje ćelija notohorda (Barrionuevo et al., 2006) • Kardiogeneza (Akiyama et al., 2004) • Formiranje unutrašnjeg uha (Taylor and LaBonne, 2005) • Formiranje folikula dlake (Vidal et al., 2005) • Razviće pankreasa (Seymour et al., 2007) • Razviće epitela creva (Moniot et al., 2004)
	<i>Sox10</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Razviće nervne kreste (Wegner and Stolt, 2005; Kelsh et al., 2006) • Formiranje unutrašnjeg uha (Taylor and LaBonne, 2005)
F	<i>Sox7</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Kardiogeneza (Zhang et al., 2005)
	<i>Sox17</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Formiranje endoderma (Kanai-Azuma et al., 2002) • Angiogeneza (Matsui et al., 2006)
	<i>Sox18</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Kardiogeneza (Pennisi et al., 2000; Zhang et al., 2005) • Angiogeneza (Downes & Koopman, 2001; Matsui et al., 2006) • Razviće folikula dlake (Pennisi et al., 2000)
G	<i>Sox15</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Regeneracija skeletne mišićne mase (Lee et al., 2004; Meeson et al., 2007)
H	<i>Sox30</i>	<ul style="list-style-type: none"> • nepoznata

Tabela 2. Pregled funkcija *Sox* gena miša. Preuzeto iz *Lefebvre et al., 2007.*

1.4 Sox3 gen

Sox3 gen, zajedno sa *Sox1* i *Sox2* genima, pripada grupi SoxB, podgrupi B1 transkripcionih aktivatora (Stevanovic et al., 1993; Uchikawa et al., 1999). Pojedine karakteristike *Sox3* gena evolutivno ga povezuju za *Sry*. HMG domen *Sox3* gena pokazuje najveću homologiju sa HMG boks domenom *Sry* gena (Wegner, 1999). Takođe, ova dva gena su jedini članovi Sox familije koji su locirani na polnim hromozomima (Yp11.3 za *SRY* i Xq27.1 za *SOX3*) (Goodfellow and Lovell-Badge, 1993; Stevanovic et al., 1993). Pojedine evolutivne studije ukazuju da *Sry* gen vodi poreklo upravo od *Sox3* gena (Graves, 1998; Weiss et al., 2003).

Humani *SOX3* gen kodira protein koji se sastoji od 375 aminokiselina i karakteriše ga prisustvo domena karakterističnih za članove SOX familije (Stevanovic et al., 1993). To su, pre svega, HMG boks domen dužine 79 aminokiselina, region visoke homologije između proteina SOXB grupe (Group B homology) i SOX123C domen (region visoke homologije između članova SOXB1 podgrupe) koji se nalazi na C-terminusu ovog proteina (Kato and Kato, 2005; Uchikawa et al., 1999) (Slika 5). Takođe, u okviru SOX3 proteina su detektovani NLS (nuclear localization signal) motivi koji omogućavaju transport ovog proteina u jedro (Stevanovic et al., 1993). Naime, ovi motivi omogućavaju SOX proteinima da se vežu za proteine iz familije importina i da budu uvedeni u jedro.



Slika 5. Shematski prikaz strukture SOX3 proteina. Odgovarajućom bojom prikazani su funkcionalni i strukturni domeni, uključujući aminokiselinske homopolimerne traktove u okviru SOX3 proteina. Takođe, shematski su prikazane dve ekspanzije prvog polialaninskog trakta koje izazivaju patološka stanja kod čoveka (Laumonnier et al., 2002; Woods et al., 2005).

Humani SOX3 protein se odlikuje i prisustvom homopolimernih nizova: poliglicinski niz na N-terminusu i poliprolinski i 4 polialaninska niza u C-terminalnom transaktivacionom domenu (Stevanovic *et al.*, 1993) (Slika 5). Interesantno je da su sva 4 polialaninska niza prisutna samo kod SOX3 ortologa sisara. Lavoie i saradnici su pokazali da se polialaninski traktovi pojavljuju samo kod sisara i u slučaju članova HOX i GATA familije proteina koji, takođe, imaju važne uloge u razviću (Lavoie *et al.*, 2003). Prvi i najduži polialaninski niz SOX3 proteina, koji sadrži 15 alanina, je karakterističan samo za euterije i ekspanzije ovog niza su povezane sa patološkim stanjima kod čoveka (Laumonnier *et al.*, 2002; Woods *et al.*, 2005) (Slika 5). O poremećajima funkcije SOX3 gena izazvanim promenama na nivou ovog polialaninskog trakta biće više reči u narednom poglavlju koje se bavi mutacijama SOX3 gena. Pored toga što ovaj polialaninski trakt ima važnu ulogu u funkcionisanju SOX3 proteina, pretpostavlja se da je njegova pojava tokom evolucije kod euterija, delimično odgovorna za sticanje novih funkcija SOX3 proteina kao što je razviće kognitivnih funkcija mozga (neobjavljeni rezultati).

Savare i saradnici su pokazali da SOXNeuro, SOXB1 ortolog vinske mušice, i SOX3 protein čoveka sadrže *bona fide* mesta za sumoilaciju, ukazujući da je SUMO modifikacija SOXB1 faktora evolutivno očuvana (Savare *et al.*, 2005). U njihovoj studiji, sumoilacija humanog SOX3 je povezana sa smanjenjem njegove transaktivacione sposobnosti.

Ekspresija humanog SOX3 gena je, primenom RT-PCR-a, detektovana u fetalnim i adultnim tkivima, i to u: fetalnom mozgu, kičmenoj moždini, nadbubrežnim žlezdama, jetri, timusu, slezini, pankreasu, kao i adultnim testisima, jetri, slezini i srcu, dok je najviši nivo ekspresije detektovan u moždanom tkivu (Stevanovic *et al.*, 1993). SAGE analiza (SAGE-Serial Analysis of Gene Expression) pokazuje vrlo visok nivo ekspresije SOX3 gena u pankreasu.

Funkcije humanog SOX3 gena uglavnom su izučavane praćenjem patoloških stanja koji se javljaju kao posledica mutacija ovog gena. Radi ispitivanja regulacije ekspresije i funkcije SOX3 gena, stvorena je potreba za korišćenjem različitih model sistema kao što su permanentne ćelijske linije koje predstavljaju model sistem neurogeneze i transgene životinje u kojima je analizirana aktivnost ortologa SOX3 gena tokom embrionalnog razvića kičmenjaka. Pregled rezultata dobijenih ovakvim analizama biće dat u narednim poglavljima.

1.4.1 Oboljenja povezana sa mutacijama u *SOX3* genu

Poremećaji funkcije *SOX3* gena proučavani su praćenjem efekata mutacija u okviru ovog gena kod čoveka i ispitivanjima na transgenim miševima. U skladu sa profilom ekspresije *SOX3* gena u embrionalnim i adultnim tkivima, posledice mutacija ovog gena najdramatičnije se uočavaju na nivou morfoloških i funkcionalnih promena CNS-a i reproduktivnog sistema kičmenjaka (*Rizzoti and Lovell-Badge, 2007*).

Brojni slučajevi X-vezanog hipopituitarizma povezani su sa duplikacijom regiona Xq26-27 (*Rizzoti et al., 2004*). Pokušaji da se preciznije definiše gen odgovoran za fenotipske efekte ove mutacije, mentalnu retardaciju i nedostatak hormona rasta, urodile su brojnim studijama koje su kritični region suzile najpre na 3,9 Mb (Xq26.1 i Xq27.3) (*Hamel et al., 1996; Solomon et al., 2002; Solomon et al., 2004*), a zatim na region od 685,6 kb (*Woods et al., 2005*). Proučavani region daje samo tri transkripta, *SOX3* i dva nepoznata gena, od kojih se kod miša samo *Sox3* eksprimira u infundibulumu (*Woods et al., 2005*). Ovo nedvosmisleno potvrđuje da je duplikacija *SOX3* gena povezana sa fenotipom hipopituitarizma i hipoplazijom infundibuluma (*Woods et al., 2005*). Takođe je pokazano da je ekspanzija od 7 alanina u okviru prvog polialaninskog trakta *SOX3* proteina, koja dovodi do gubitka funkcionalnosti proteina usled promenjene lokalizacije, povezana sa hipopituitarizmom, hipoplazijom adenohipofize i odsustvom infundibuluma (*Woods et al., 2005*) (Slika 5). Ovi podaci ukazuju da svaka promena nivoa *SOX3* proteina (smanjenje ili povećanje, usled polialaninske ekspanzije, odnosno duplikacije) dovodi do poremećaja u razviću hipotalamo-hipofizne ose što rezultuje hipopituitarizmom i hipoplazijom infundibuluma (*Woods et al., 2005*). Zanimljivo je da u opisanom slučaju ekspanzije polialaninskog niza nije zabeležena mentalna retardacija kod analiziranih pacijenata (*Woods et al., 2005*).

Analiza 17 familija sa X-vezanim sindromom nedostatka hormona rasta i mentalnom retardacijom pokazala je prisustvo mutacija u *SOX3* genu kod članova 2 ispitivane familije (*Laumonnier et al., 2002*). U obe familije mutacijama je pogođen prvi od 4 polialaninska trakta *SOX3* proteina. Kod jedne familije duplikacija 33 bazna para, koja ne menja okvir čitanja, dovodi do ekspanzije polialaninskog trakta za 11 aminokiselina (*Laumonnier et al., 2002*) (Slika 5). Nosioци ove mutacije su niskog rasta usled potpunog odsustva hormona rasta i poseduju mentalnu retardaciju različitog nivoa. U slučaju druge familije, dva mentalno retardirana dečaka imaju deleciju dugu 27 bp u okviru polialaninskog trakta koji je narušen i kod prethodne familije (*Laumonnier et al., 2002*). Zanimljivo je da je deda ovih dečaka po

majci, koji je nosilac iste mutacije, zdrav pri čemu svi pomenuti nosioci ove mutacije imaju normalan nivo hormona rasta (*Laumonnier et al.*, 2002).

Fenotipske posledice mutacija u prvom i najdužem polialaninskim traktu SOX3 proteina ukazuju na njegov značaj za funkcionalnu aktivnost ovog proteina. Korelacija ekspanzije polialaninskih traktova i kongenitalnih poremećaja opisana je kod još osam različitih gena od kojih većina kodiraju transkripcione faktore (*Amiel et al.*, 2004). Poznato je da ekspanzije homopolimernih nizova alanina dovode do formiranja nesolubilnih proteinskih agregata koji mogu da budu lokalizovani ili u citoplazmi (HOXD13), ili u jedru (ARX) ili u jedru i u citoplazmi (FOXL2) (*Albrecht et al.*, 2004; *Caburet et al.*, 2004; *Nasrallah et al.*, 2004). *Wong* i saradnici su analizirali funkcionalne karakteristike mutiranih SOX3 proteina koji nose, već opisane, patološke ekspanzije od 7 i 11 alanina (*Wong et al.*, 2007). Pokazano je da oba mutantna proteina formiraju agregate u citoplazmi i perijedarnom prostoru, pri čemu dolazi i do smanjene transaktivacione sposobnosti ovih proteina, što je pokazano u funkcionalnim esejima. Kao posledica toga, smanjen je i njihov kapacitet inhibicije β -katenina (*Wong et al.*, 2007) čime se remeti normalan Wnt signalni put u neuralnim progenitorima, što može dovesti do disfunkcije hipotalamo-hipofizne ose CNS-a, odnosno do pojave neuroendokrinih defekata (*Wong et al.*, 2007).

Eksperimenti na transgenim miševima omogućili su detaljniju analizu funkcije *Sox3* gena tokom razvića nervnog sistema. Analize miševa koji nose deleciju *Sox3* gena ukazuju da je ovaj protein neophodan za morfogenezu hipotalamusa i hipofize i da obezbeđuje normalne funkcije duž hipotalamo-hipofizne ose (*Rizzoti et al.*, 2004). Mužjaci kojima je deletiran *Sox3* gen imaju patuljasti rast, smanjenu količinu hormona hipofize i patološke promene u morfologiji hipotalamusa i hipofize (*Rizzoti et al.*, 2004). Ovi defekti su posledica poremećenog razvića ventralnog diencefalona koji pokazuje hipoplastičnost i nepravilnu organizaciju. Pored toga, ovi mutanti pokazuju niz drugih nepravilnosti u razviću CNS-a što potvrđuje ključnu ulogu *Sox3* gena u neurogenezi (*Rizzoti et al.*, 2004). Interesantno je da ovi miševi ne pokazuju značajne promene u ponašanju u odnosu na normalne jedinke (*Rizzoti and Lovell-Badge*, 2007). Odsustvo *Sox3* kod miša dovodi do poremećaja u rastu zuba i njihovoj organizaciji (*Weiss et al.*, 2003), što je u skladu sa nepravilnostima u morfologiji zuba i lica kod nekih pacijenata koji su nosioci *SOX3* mutacija (*Hamel et al.*, 1996).

Sox3 se eksprimira u urogenitalnoj brazdi (*Collignon et al.*, 1996) od koje tokom razvića nastaju gonade, a njegova ekspresija je detektovana i u adultnim gonadama oba pola (*Shen and Ingraham*, 2002; *Weiss et al.*, 2003). *SOX3* je detektovan i u gonadama kod kojih ne postoje germinativne ćelije (*Collignon et al.*, 1996), što ukazuje na ekspresiju ovog gena u

somatskim ćelijama. Međutim, kod pileta je *Sox3* detektovan u primordijalnim germinativnim ćelijama oba pola (*Uchikawa et al.*, 1999), pa se ne može isključiti potencijalna ekspresija ovog gena u germinativnim ćelijama. Miševi kod kojih je deletiran *Sox3* razvijaju genetički određen pol, tj. nije detektovana reverzija pola. Međutim, ženske jedinke imaju folikularnu atreziju i smanjenu fertilitet (*Weiss et al.*, 2003), dok mužjaci pokazuju disfunkciju Sertolijevih ćelija sa veoma izraženom vakuolizacijom, gubitak germinativnih ćelija i redukciju broja spermatozoida (*Weiss et al.*, 2003). Iz svega navedenog jasno je da *SOX3* nije neophodan za determinaciju pola, ali je važan za normalno razviće oocita i diferencijaciju testisa kao i za gametogenezu kod jedinki oba pola. *Raverot* i saradnici su pokazali da se *Sox3* eksprimira u populaciji proliferišućih germinativnih ćelija i da je neophodan za normalnu spermatogenezu u postnatalnom periodu razvića miša, koja je posredovana neurogeninom 3 (*Ngn3*) (*Raverot et al.*, 2005). Kod čoveka velika delecija regiona X hromozoma koji sadrži i *SOX3* gen kod nekih pacijenata dovodi do smanjenja veličine testisa, ali nije potvrđena veza između mutacija *SOX3* gena i idiopatskog steriliteta muškaraca (*Raverot et al.*, 2004).

Proučavanje efekata mutacija *SOX3* gena otežano je iz više razloga. *SRY*, *SOX1*, *SOX2*, i *SOX3* proteini mogu da se vežu za isti motiv na DNK sekvenci, ali sa različitim afinitetom (*Collignon et al.*, 1996). Sva četiri proteina su tokom razvića ekspimirana u mozgu i urogenitalnoj brazdi (*Collignon et al.*, 1996). Sa izuzetkom *SRY*, funkcije navedenih proteina nisu jasno definisane pa je teško utvrditi pojedinačne uloge ovih faktora usled njihove funkcionalne redudantnosti (*Bergstrom et al.*, 2000) i smrti embriona na ranim stadijumima razvića kod pojedinih delecionih mutanata

Kod žabe je pokazano da se *SOX3* vezuje za β -katenin i na taj način inhibira TCF/ β -katenin zavisnu transaktivaciju (*Zorn et al.*, 1999). Ovaj mehanizam je deo Wnt signalnog puta u kojem akumulacija β -katenina u jedru dovodi do njegove interakcije sa proteinima LEF/TCF familije i do aktivacije ciljnih gena (*Zorn et al.*, 1999). Studija *Wong* i saradnika ukazuje da je i *SOX3* protein čoveka sposoban da inhibira β -katenin/TCF zavisnu transkripciju, ukazujući na mogućnost da *SOX3 in vivo* vezuje β -katenin i inhibira kanonski Wnt signalni put (*Wong et al.*, 2007). Eksperimenti sa transgenim miševima su pokazali da se aktivnost Wnt signalnog puta u CNS-u preklapa sa profilom ekspresije *Sox3* gena, uključujući diencefalon i infundubulum (*Maretto et al.*, 2003). Takođe, povećana ekspresija β -katenina tokom razvića CNS-a rezultuje poremećenom morfogenezom kore velikog mozga (*Chenn and Walsh*, 2002) što ukazuje na potrebu za kontrolisanim nivoom β -katenina neophodnog za

normalno odvijanje procesa neurogeneze. Svi ovi podaci ukazuju da bi SOX3 protein mogao imati ulogu u kanonskom putu Wnt signalne transdukcije.

1.4.2 Ekspresija *Sox3* gena tokom razvića centralnog nervnog sistema

Ekspresija *Sox3* gena prati razviće centralnog nervnog sistema (CNS) od početnih stadijuma, pa su prvi transkripti ovog gena prisutni već u anteriornom ektodermu od kog će nastati neuroektoderm, da bi kasnije, njegova ekspresija bila detektovana u regionima mozga i kičmene moždine, uglavnom u slojevima ćelija koje predstavljaju populacije neuralnih progenitora (*Brunelli et al.*, 2003). U daljem tekstu biće dat kratak pregled ranih faza razvića CNS-a kičmenjaka, sa osvrtom na profil ekspresije *Sox3* tokom ovih procesa.

Pravilan razvoj organizma kičmenjaka duž anteriorno-posteriorne (AP) i dorzo-ventralne (DV) ose podrazumeva precizno definisanu ekspresiju regulatornih gena specifičnih za određenu fazu razvića (*Brunelli et al.*, 2003). Ovo je naročito evidentno tokom razvića centralnog nervnog sistema (CNS) (*Brunelli et al.*, 2003). CNS nastaje od stanjenog dela anteriornog ektoderma, označenog kao nervna ploča, koji se savija oko antero-posteriorne ose formirajući nervnu cev. Anteriorni delovi će se podeliti na prednji i zadnji mozak dok će posteriorni formirati kičmenu moždinu (*Brunelli et al.*, 2003). Ovi rani morfološki događaji praćeni su mesto-specifičnom ekspresijom gena koji regulišu razviće i obezbeđuju regionalizaciju i organizaciju CNS-a. Brojni signalni putevi uključeni su u regulaciju ovih događaja. Sekretorni molekuli, poput retinoične kiseline (RA-retinoic acid) i faktora rasta fibroblasta (FGF-fibroblast growth factors), kao i transkripcioni faktori, posebno HOX proteini, uključeni su u antero-posteriornu organizaciju nervne cevi (*Lumsden and Krumlauf*, 1996). Drugi signalni molekuli, poput Shh (Sonic Hedgehog) i BMP (Bone Morphogenetic Factors) određuju dorzo-ventralno pozicioniranje (*Tanabe and Jessell*, 1996).

Regionalizaciju nervne cevi prati nastanak brojnih tipova nervnih ćelija. Diferencijacija ćelija neuroepitela u različite ćelijske tipove praćena je gubitkom proliferativne aktivnosti i specijalizacijom u dati ćelijski tip. Odluka o ulasku pluripotentnih neuroepitelijalnih ćelija u proces diferencijacije za dati ćelijski tip donosi se na osnovu pozicije ćelija u odnosu na dve glavne ose nervne cevi, a uslovljena je specifičnom ekspresijom gena uključenih u rane faze razvića CNS-a (*Brunelli et al.*, 2003). Otuda je vremenski- i mesto-specifična ekspresija pojedinih regulatornih gena ključna za rane faze razvića CNS-a. *Sox* geni pripadaju ovoj grupi gena i označeni su kao rani markeri razvića nervnog sistema (*Brunelli et al.*, 2003).

Članovi familije *Sox* gena koji pripadaju B grupi, *Sox1*, *Sox2*, *Sox3*, *Sox14* i *Sox21*, ekspimiraju se tokom regionalizacije nervne cevi, a profili njihove ekspresije ukazuju da ovi geni učestvuju u kontroli populacije neuroepitelijalnih ćelija (Avilion et al., 2003; Bylund et al., 2003; Pevny and Placzek, 2005). Ekspresija *Sox1* gena poklapa se sa pojavom neuroepitela i ova ekspresija predstavlja marker neopredeljenih, proliferativno aktivnih ćelija u ventrikularnim slojevima (Pevny et al., 1998). Ekspresijom ovog gena započinje neuralna diferencijacija P19 ćelija, koje su *in vitro* model sistem za neurogenezu (Pevny et al., 1998). Ekspresija *Sox2* je detektovana znatno ranije, u ćelijama unutrašnje mase blastocista i, kasnije, u epiblastu, da bi u kasnijim fazama bila ograničena na neuroepitel, slično ekspresiji *Sox1* (Avilion et al., 2003). Ekspresija ovih gena koristi se za izolaciju prečišćene populacije neuralnih progenitora iz mešovite populacije ES ćelija ili embriona (Li M. et al., 1998; Zappone et al., 2000). *Sox14* i *Sox21* su takođe ekspimirani tokom razvića nervne cevi, pri čemu je aktivnost *Sox14* gena u ventralnim interneuronima dozno zavisna od Sonic Hedgehog (Shh) signalnog molekula (Hargrave et al., 2000).

Ekspresija *Sox3* gena započinje tokom formiranja nervne brazde, u ekstraembrionalnom ektodermu i epiblastu (Wood and Episkopou, 1999). Kasnije se ekspresija gubi u ekstraembrionalnim tkivima i postaje ograničena na epiblast u anteriorom regionu i posteriorne domene pored primitivne brazde (Wood and Episkopou, 1999). U kasnijim fazama razvića, ekspresija *Sox3* se detektuje u neuroktodermu, kao u slučaju *Sox1* i *Sox2* gena, uglavnom u populaciji neuralnih progenitora (Collignon et al., 1996; Wood and Episkopou, 1999). Analize ekspresije *Sox3* u CNS-u pileta i žabe pokazuju da je profil ekspresije ovog gena tokom neuralnog razvića evolutivno očuvan i da se *Sox3* može označiti kao marker ranih faza neuralnog razvića kod ovih vrsta (Penzel et al., 1997; Rex et al., 1997).

Mehanizam indukcije neurogeneze kičmenjaka, tj. ulazak ćelija ektoderma u proces neuralne diferencijacije, nije u potpunosti razjašnjen, i postoje dva aktuelna modela kojima se objašnjava početak neurogeneze. Po modelu "neuralnog nedostatka" (neural default model) indukcija neurogeneze uzrokovana je odsustvom faktora indukcije ektoderma BMP (bone morphogenetic protein) (Hawley et al., 1995). Model je potvrđen rezultatima dobijenim izučavanjem neurogeneze vodozemaca. Međutim neurogeneza viših kičmenjaka podržava drugi model (instructive signaling model) (Tropepe et al., 2001) koji, ne odbacujući značaj inhibicije BMP u indukciji, postulira da ovaj mehanizam nije dovoljan za indukciju ovog procesa (Linker and Stern, 2004). Prema ovom modelu, signalni putevi koji, uz BMP, mogu biti uključeni u inicijaciju neurogeneze su Wnt i FGF (Rogers et al., 2008). Ekperimentalni podaci ukazuju da oba signalna puta dovode do represije BMP i da, nezavisno od ovog

mehanizma, mogu da indukuju neurogenezu. Iako je uloga Wnt i FGF signalnog puta u ovom procesu još uvek nejasna, rezultati pokazuju da su transkripcioni faktori koji su u njih uključeni neophodni za neuralnu diferencijaciju (Rogers *et al.*, 2008).

Budući da su *Sox* geni B grupe eksprimirani u najranijim fazama neuralne diferencijacije, *Sox2* i *Sox3* geni predstavljaju dobar model sistem za izučavanje mehanizama uključenih u indukciju neurogeneze (Rogers *et al.*, 2008). Visoka evolutivna očuvanost njihovih sekvenci i sličan, širok profil ekspresije, čini ih pogodnim za ispitivanje mehanizama uključenih u regulaciju neurogeneze (Bowles *et al.*, 2000; Mizuseki *et al.*, 1998; Pevny *et al.*, 1998; Uchikawa *et al.*, 1999; Wood and Episkopou, 1999). Međutim, iako su u pitanju paralogni geni, dosadašnji rezultati ukazuju da regulatorni mehanizmi koji kontrolišu njihovu ekspresiju tokom neurogeneze nisu evolutivno očuvani (Rogers *et al.*, 2008). Paralelna istraživanja na *Sox2* i *Sox3* genima kod žabe pokazala su da FGF ne indukuje njihovu ekspresiju, ali je ovaj faktor neophodan za održavanje zadatog profila ekspresije (Rogers *et al.*, 2008). Inhibicija BMP dovodi do aktivacije oba gena ali preko različitih regulatornih mehanizama (Rogers *et al.*, 2008).

Važno je pomenuti da *SoxB1* geni imaju ulogu u održavanju populacije neuralnih progenitora, što se postiže blokiranjem aktivnosti proneuralnih proteina koji promovišu izlazak progenitora iz ćelijskog ciklusa i neuralnu diferencijaciju (Bylund *et al.*, 2003; Graham *et al.*, 2003; Pevny *et al.*, 1998; Uwanogho *et al.*, 1995). Izgleda da ravnoteža između represivne aktivnosti SOX21 proteina i aktivatora SOXB1 grupe determiniše da li će neuralna ćelija zadržati osobine progenitora ili krenuti u diferencijaciju (Sandberg *et al.*, 2005). Moguće je da u ovom procesu važnu ulogu imaju proneuralni proteini, odnosno njihova sposobnost da stimulišu ekspresiju *Sox21*.

Zbog svega navedenog proizilazi da je analiza transkripcione regulacije *Sox3* gena veoma važna za utvrđivanje mehanizama regulacije neurogeneze i identifikaciju signalnih molekula i transkripcionih faktora uključenih u kontrolu populacije neuralnih progenitora.

1.4.3 Geni regulisani SOX3 transkripcionim faktorom

Iako se dosta zna o profilu ekspresije *Sox3* gena kao i o njegovoj ulozi u razviću nervnog sistema tokom embriogeneze kičmenjaka, postoji vrlo mali broj podataka o genima koji su regulisani ovim transkripcionim faktorom. Svi do sada dostupni podaci odnose se na ciljne gene SOX3 proteina vodozemaca.

Prvi gen za koji je pokazano da je direktno regulisan od strane SOX3 proteina je *Xnr5* gen (*Xenopus nodal-related 5*) koji pripada TGF β (tumor growth factor β) familiji sekretornih signalnih molekula (Yang et al., 2002; Zhang C. et al., 2003). Interesantno je da iako su SOXB1 proteini okarakterisani kao transkripcioni aktivatori, maternalni SOX3 protein žabe (*Xenopus laevis*) ima ulogu represora *Xnr5* gena u intaktnim embrionima. U promotorskom regionu *Xnr5* gena detektovana su Sox vezivna mesta za koja je pokazano da vezuju SOX3 protein žabe. Korišćenjem morfolino oligonukleotida koji sprečavaju prepisivanje *Sox3* iRNK kao i primenom antitela na SOX3 protein u embrionima žabe, pokazano je da smanjenje količine SOX3 dovodi do povećane ekspresije *Xnr5* gena (Zhang C. et al., 2003). Takođe, korišćenje konstitutivno aktivne i represorne himerne forme SOX3 proteina dovelo je do povećanja, odnosno smanjenja ekspresije *Xnr5* gena što je dodatno potvrdilo da maternalni SOX3 protein direktno reprimira *Xnr5* u ranim fazama embrionalnog razvića žabe.

Nedavno su Rogers i saradnici pokazali da su *Sox2* i *geminin* ciljni geni SOX3 proteina tokom primarne neurogeneze kod žabe (*Xenopus laevis*) (Rogers et al., 2009). Injeciranjem odgovarajućih RNK u embrione žabe pokazano je da SOX3 funkcioniše kao aktivator, indukujući ekspresiju ranih neuralnih gena *Sox2* i *geminin-a* u odsustvu sinteze proteina (Rogers et al., 2009). S druge strane, SOX2 nije sposoban da indukuje ekspresiju *Sox3* na isti način (Rogers et al., 2009). Takođe, SOX3 indirektno inhibira *Vent2*, a samim tim i BMP signalni put i razviće epidermisa (Rogers et al., 2009). Rezultati ove studije su pokazali i da je SOX3 potreban za neuralnu indukciju posredovanu Noggin proteinom, što je zatim praćeno i indukcijom ekspresije *Sox2* gena (Rogers et al., 2009). Očigledno je da kod žabe SOX3 protein igra više uloga: s jedne strane maternalni SOX3 inhibira formiranje mezendoderma (Zhang C. et al., 2003) da bi olakšao pravilno formiranje germinativnih slojeva, zatim je uključen u neuralnu indukciju i ekspresiju *Sox2* i *geminin-a* (Rogers et al., 2009), što za rezultat ima povećanu ćelijsku proliferaciju i širenje nervne ploče, dok istovremeno SOX3 sprečava formiranje epidermisa i nervne kreste indirektnom inhibicijom *Vent2* i BMP signalnog puta (Rogers et al., 2009).

Cyp19 gen (P450 aromatase) je takođe direktno regulisan od strane SOX3 proteina kod žabe *Rana rugosa* (Oshima et al., 2009). Ovaj gen je visoko eksprimiran u gonadama ženskih punoglavaca tokom determinacije pola. Analiza promotorskog regiona ovog gena je otkrila prisustvo vezivnog mesta za SOX transkripcione faktore. Funkcionalna i mutaciona analiza, kao i eksperimenti hromatinske imunoprecipitacije (ChIP) su pokazali da SOX3 aktivira transkripciju *Cyp19* gena direktno se vezujući za svoje vezivno mesto u okviru

promotora ovog gena. Moguće je da je SOX3 kritičan faktor u razviću ovarijuma kod žabe *Rana rugosa* (Oshima et al., 2009).

1.4.4 Literaturni podaci o regulaciji ekspresije *Sox3* gena kičmenjaka

Jedine dve studije regulacije ekspresije *Sox3* gena kičmenjaka urađene su na mišu i žabi, gde je analizirana ekspresija transgena pod kontrolom većih genomskih regiona tokom embrionalnog razvića ovih organizama.

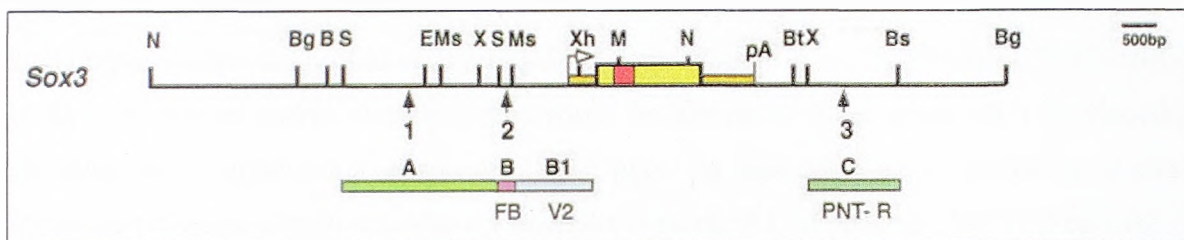
Analiza regulatornih regiona odgovornih za normalnu ekspresiju *Sox3* gena miša tokom embrionalnog razvića rađena je korišćenjem transgenih reporterskih eseja gde su poređeni profili ekspresije transgena i endogenog *Sox3* gena (Brunelli et al., 2003). Genomski region, dužine 8.3 kb, koji sadrži 3.5 kb uzvodno i 3.5 kb nizvodno od kodirajućeg regiona *Sox3* gena, se pokazao dovoljnim da u transgenom mišu reprodukuje profil ekspresije endogenog *Sox3* gena tokom ranih faza neurogeneze. U okviru ovog genomskog regiona definisano je nekoliko diskretnih elemenata, od kojih je svaki odgovoran za ekspresiju *Sox3* gena u specifičnim domenima centralnog nervnog sistema (CNS) tokom embrionalnog razvića (Brunelli et al., 2003) (Slika 6).

Širok profil ekspresije *Sox3* gena duž nervne cevi postiže se aktivnošću dve različite kategorije regulatornih elemenata: jedne koja definiše ekspresiju u različitim regionima duž anteriorno-posteriorne (A-P) ose i druge koja je odgovorna za specifičnu ekspresiju u neuralnim progenitorima u okviru dorzo-ventralne (D-V) ose (Brunelli et al., 2003). Sličan, uniforman profil ekspresije duž nervne cevi ima i *Sox2*, međutim do sada nisu otkriveni zajednički evolutivno očuvani regulatorni elementi u nekodirajućim regionima ovih gena.

Istom studijom je utvrđeno da su regulatorni elementi nizvodno od kodirajućeg regiona *Sox3* gena, neophodni za ekspresiju ovog gena u posteriornim regionima nervne cevi i u rombomerama (PNT-R, Slika 6) (Brunelli et al., 2003).

Sekvence u regionu uzvodno od kodirajućeg regiona *Sox3* gena miša neophodne su za ekspresiju ovog gena u mozgu i ventralnim regionima nervne cevi (FB i V2, Slika 6) (Brunelli et al., 2003). Naime, identifikovana su dva regulatorna regiona, jedan koji je važan za ekspresiju *Sox3* u prednjem i srednjem mozgu kao i na granici srednjeg i zadnjeg mozga (FB, Slika 6) i drugi region, koji je odgovoran za ekspresiju ovog gena duž dorzo-ventralne ose kičmene moždine i specifičnu ekspresiju u V2 interneuronima (V2, Slika 6). U V2 regionu su identifikovana potencijalna mesta za vezivanje transkripcionih faktora PAX6 i NKX2.5, koji

su već opisani kao regulatorni proteini uključeni u ekspresiju gena u ventralnim delovima nervne cevi (*Brunelli et al.*, 2003).



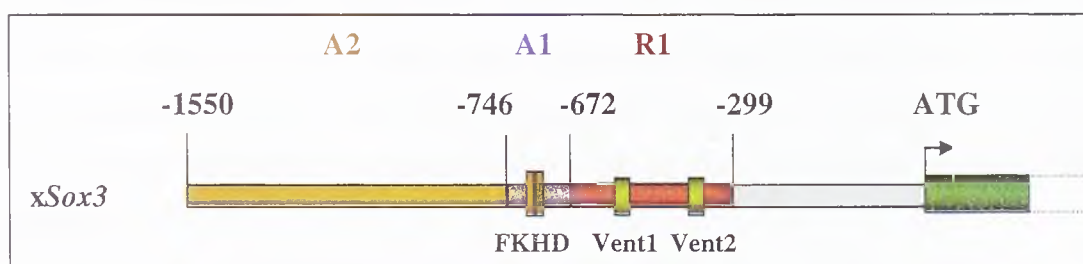
Slika 6. Shematski prikaz lokusa *Sox3* gena miša i *cis* regulatornih regiona koji kontrolišu njegovu ekspresiju tokom razvića. Genomska organizacija *Sox3* gena je prikazana na gornjem delu sheme. Žuti pravougaonici - kodirajući region; crveni kvadrat - HMG boks; narandžasti pravougaonici - 5' i 3' netranslirajući region; crne strelice ukazuju na tri regiona visoke evolutivne očuvanosti između čoveka i miša; Obojeni pravougaonici ispod *Sox3* lokusa predstavljaju genomske regione koji su važni za ekspresiju u specifičnim regionima CNS-a: FB-prednji i srednji mozak i granica sa zadnjim delom mozga, V2-V2 interneuroni, PNT-R-posteriorni deo nervne cevi i rombomere; Restrikciona mesta: B-*Bam*HI, Bg-*Bg*II, Bs-*Bss*HIII, Bt-*Bst*98I, E-*Eco*RV, M-*Mlu*I, Ms-*Msc*I, N-*Not*I, S-*Sal*I, X-*Xba*I, Xh-*Xho*I. A, B, B1 i C su oznake deletiranih regiona čiji je uticaj analiziran. Preuzeto iz *Brunelli et al.*, 2003.

U ovoj studiji, najveći analizirani genomski region od 8.3 kb, koji sadrži *Sox3* gen miša, kao transgen u žabi, sadrži skoro sve elemente neophodne za ekspresiju koja odgovara endogenoj ekspresiji u najranijim fazama razvića žabe (od stadijuma neurule) (*Brunelli et al.*, 2003). Ovi rezultati ukazuju da je regulacija ekspresije *Sox3* gena tokom razvića CNS-a, u nekim aspektima evolutivno očuvana i pored toga što se procesi neuralnog razvića miša i žabe razlikuju (*Harland*, 2000; *Streit and Stern*, 1999). Takođe, poređenje sekvenci nekodirajućih regiona *Sox3* gena miša i žabe nije pokazalo postojanje većih evolutivno očuvanih regiona. Ovo je u suprotnosti sa uobičajenim mišljenjem da konzervisani mehanizmi regulacije podrazumevaju postojanje dugih, evolutivno očuvanih sekvenci. Jedino objašnjenje ovog fenomena je postojanje nekoliko kratkih, evolutivno očuvanih DNK sekvenci, koje nisu uočene poređenjem dužih regiona.

Bitno je napomenuti da nijedan od transgenih konstrukata nije bio sposoban da imitira ekspresiju endogenog *Sox3* gena tokom rane i srednje faze gastrulacije ni kod miša ni kod žabe. Ovaj podatak ukazuje da su elementi odgovorni za ekspresiju *Sox3* gena tokom procesa gastrulacije raspoređeni u distalnim regionima na većoj udaljenosti od njegovog kodirajućeg

regiona, kao što je već pokazano za *Sox1*, *Sox2* i *Sox9* (Brunelli et al., 2003; Zappone et al., 2000).

U drugoj studiji, korišćenjem transgenih embriona žabe, pokazano je da uzvodni region *Sox3* gena žabe, dužine 1.5 kb, obezbeđuje ekspresiju ovog gena u neuroektodermu koja potpuno odgovara profilu endogenog *Sox3* gena (Rogers et al., 2008) (Slika 7). Utvrđeno je da ovaj region sadrži elemente odgovorne za aktivaciju *Sox3* gena, ali i represorske elemente koji ograničavaju ekspresiju *Sox3* gena na neuroektoderm. Deleciona analiza transgena pokazala je prisustvo dva enhenserska regiona, A1 na poziciji -746/-672 bp i A2 (-1550 /-746), kao i jednog represorskog regiona R1 na poziciji -672/-299 u odnosu na ATG (Rogers et al., 2008) (Slika 7). Analiza ovih regiona na prisustvo potencijalnih vezivnih mesta za transkripcione faktore nije otkrila potencijalne aktivatore u A1, ali su u A2 enhenseru detektovana dva mesta za FKHD (forkhead) protein od kojih je distalno mesto neophodno za ekspresiju *Sox3* transgena u CNS-u (Slika 7). U R1 detektovano je po jedno funkcionalno vezivno mesto za Vent1 i Vent2 proteine koji su deo BMP signalnog puta (Friedle and Knochel, 2002; Peiffer et al., 2005; Rastegar et al., 1999) (Slika 7), i koji se eksprimiraju u delovima ektoderma koji ne pripadaju neuroektodermu. Prisustvo ovih vezivnih mesta u represorskom regionu sprečava ekspresiju *Sox3* gena u ektodermu i ograničava je na neuroektoderm.



Slika 7. Shematski prikaz 1.5 kb uzvodne sekvence *Sox3* gena žabe (*Xenopus laevis*). Prikazani su enhenserski regioni A1 i A2, represorski region R1, kao i vezivna mesta za transkripcione faktore FKHD i Vent1 i 2. Brojevi označavaju pozicije regiona u odnosu na ATG kodon *Sox3* gena žabe.

Međutim, poređenja sekvenci ovog regiona žabe, miša i čoveka nisu pokazala značajnu homologiju, tako da regulatorni elementi ranije opisani u genomskom regionu od 8.3 kb *Sox3* gena miša nisu identifikovani kod žabe (Rogers et al., 2008). Zanimljivo je da regulatorni regioni *Sox2* i *Sox3* gena koji obezbeđuju veoma slične profile ekspresije i interaguju sa molekulima istih signalnih puteva (BMP, FGF, Wnt) ne pokazuju značajnu

homologiju (Rogers *et al.*, 2008). Pokazano je da indukcija oba gena preko inhibicije BMP signalnog puta ne zahteva Wnt i FGF signale, ali je FGF neophodan za održavanje ekspresije ovih gena (Rogers *et al.*, 2008).

Sox2 i *Sox3* gen nemaju iste mehanizme regulacije pri indukciji neurogeneze: ekspresija *Sox3* je indukovana mehanizmom inhibicije BMP signalnog puta, dok *Sox2* ekspresija zahteva instruktivne mehanizme različitih signalnih puteva (Rogers *et al.*, 2008).

Prikazani literaturni rezultati pokazuju da je regulacija ekspresije *Sox3* gena veoma složena i da uključuje brojne enhancerske i represorne module koji mogu biti smešteni na velikoj udaljenosti od kodirajućeg regiona ovog gena. Za razliku od *Sox2* gena kičmenjaka, koji poseduje veliku evolutivnu očuvanost regulatornih elemenata, u slučaju *Sox3* gena je jasno da regulatorni mehanizmi njegove aktivacije nisu evolutivno očuvani.

1.5 NT2/D1 ćelije kao model sistem za izučavanje neuralne diferencijacije

Poređenja humanih embrionalnih matičnih ćelija (ES-embrional stem) i ćelija humanog embrionalnog karcinoma (EC) pokazala su da ova dva ćelijska tipa dele brojne morfološke i fenotipske karakteristike (Pera *et al.*, 2000; Thomson *et al.*, 1998). Pluripotentne humane EC ćelije predstavljaju veoma važan model sistem za proučavanje razvića čoveka (Andrews, 1998). One predstavljaju rane embrionalne matične ćelije kako po morfološkim karakteristikama, tako i po profilu ekspresije antigenih determinanti, biohemijskim osobenostima, potencijalu za diferencijaciju tokom razvića i regulaciji ekspresije gena (Andrews, 1998).

Ntera2/D1 su ćelije humanog embrionalnog karcinoma (EC-embrional carcinoma) poreklom iz tumora germinativnih ćelija testisa (TGCT-testicular germ cell tumors) (Andrews, 1998). S obzirom da su NT2/D1 ćelije dobro okarakterisane, da su standardizovani uslovi njihove propagacije i transfekcije u *in vitro* uslovima, ove ćelije su prihvaćene kao model sistem za proučavanje embrionalnog razvića čoveka (Freemantle *et al.*, 2002). Pluripotentne NT2/D1 ćelije nakon indukcije retinoičnom kiselinom (RA-retinoic acid) ulaze u proces neuralne diferencijacije koji se završava na stadijumu koji morfološki i imunofenotipski odgovara stadijumu zrelih neurona CNS-a (Freemantle *et al.*, 2002). Proces neuralne diferencijacije praćen je gubitkom proliferativne sposobnosti i tumorogenog potencijala (Freemantle *et al.*, 2002). Na ovom stadijumu diferencijacije ćelije ekspimiraju proteine

neurofilamenata, funkcionalne glutamatne receptore i natrijumske jonske kanale (*Freemantle et al.*, 2002). Takođe, formiraju funkcionalne sinapse i poseduju elektrohemijiska svojstva neurona CNS-a (*Freemantle et al.*, 2002).

Rane faze neuralne diferencijacije NT2/D1 ćelija, 48h nakon indukcije retinoičnom kiselinom, praćene su tranzijentnim povećanjem ekspresije *SOX3* gena (*Stevanovic*, 2003). Povećanje nivoa ekspresije *SOX3* nakon indukcije retinoičnom kiselinom potvrđeno je RT-PCR-om i Northern blot analizom (*Krstic et al.*, 2007; *Stevanovic*, 2003), dok je Western blot analiza potvrdila povećanje ekspresije *SOX3* proteina (*Mojsin et al.*, 2006). Navedeni rezultati ukazuju da su NT2/D1 ćelije pogodan model sistem za izučavanje uloge *SOX3* gena u ranim fazama neuralne diferencijacije.

Retinoidi su prirodni ili sintetički derivati vitamina A koji utiču na rast i diferencijaciju normalnih, embrionalnih i neoplastičnih ćelija (*Gudas*, 1994). Vitamin A (retinol) je neophodan za normalan vid, reproduktivne funkcije, embrionalno razviće i rast i diferencijaciju različitih ćelijskih tipova u adultnim tkivima (*Gudas*, 1994; *Zile*, 2001). Pored toga postoje dokazi o povoljnom uticaju retinoida u prevenciji i tretmanima kliničkih tumora (*Nason-Burchenal et al.*, 1998).

Signalni put all-*trans* retinoične kiseline uključuje retinoidne receptore: RAR (retinoic acid receptors) i RXR (retinoid-X-recepros) (*Chambon*, 1996; *Mangelsdorf et al.*, 1995). Vezivanje retinoične kiseline za retinoidne receptore dovodi do njihove hetero- ili homodimerizacije i vezivanja ovih kompleksa za konsenzusna mesta (RARE) u regulatornim regionima ciljnih gena (*Mangelsdorf et al.*, 1995). Različita ekspresija izoformi RAR-a ($RAR\alpha$, $RAR\beta$, $RAR\gamma$) i RXR-a ($RXR\alpha$, $RXR\beta$, $RXR\gamma$) retinoidnih receptora obezbeđuje vremensku i tkivnu specifičnost delovanja retinoida tokom različitih faza razvića (*Mark et al.*, 1999). Složena mreža biohemijjskih puteva u koje su retinoidi uključeni nije potpuno razjašnjena, ali eksperimentalni podaci ukazuju da oni regulišu veći broj ciljnih gena i da retinoidi učestvuju u većini do sada opisanih signalnih puteva (*Freemantle et al.*, 2002).

2. CILJ RADA

Istraživanja regulacije ekspresije *Sox3* gena kičmenjaka ukazale su na složene mehanizme koji obezbeđuju preciznu tkivno- i vremenski- specifičnu ekspresiju ovog gena (*Brunelli et al.*, 2003; *Rogers et al.*, 2008). Do sada su objavljene samo dve studije koje su pokazale ulogu većih genomskih regiona u prostornoj i vremenskoj regulaciji ekspresije *Sox3* gena tokom embrionalnog razvića miša, odnosno žabe (*Brunelli et al.*, 2003; *Rogers et al.*, 2008). Međutim, uprkos činjenici da je *SOX3* gen ključni regulator ranih faza embrionalnog razvića, do skora je u literaturi postojalo malo podataka o mehanizmima transkripcione regulacije ovog gena.

Zbog toga je predmet ovog rada bilo rasvetljavanje mehanizama transkripcione regulacije ekspresije *SOX3* gena koji bi trebalo da pruže odgovore na pitanja na koji način ovaj gen ostvaruje svoju visoko specifičnu ulogu tokom razvića i diferencijacije. Iz tih razloga ciljevi ovog rada su bili:

1. Određivanje starta transkripcije humanog *SOX3* gena
2. Identifikacija minimalnog promotorskog regiona neophodnog za bazalnu transkripcionu aktivnost humanog *SOX3* gena
3. Identifikacija pozitivnih i(ili) negativnih *cis* regulatornih elemenata uključenih u modulaciju transkripcije *SOX3* gena
4. Funkcionalna analiza *cis* regulatornih elemenata neophodnih za bazalnu transkripcionu aktivnost *SOX3* promotora
5. Identifikacija transkripcionih faktora uključenih u regulaciju aktivnosti *SOX3* gena.

3. MATERIJAL I METODE

3.1 EKSPERIMENTALNI MATERIJAL

3.1.1 Bakterijski sojevi korišćeni u radu

Soj	Karakteristike -genotip	Referenca
XL1Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F' <i>proAB lacI^qZDM15 Tn10</i> (Tet ^r)]	Stratagene®
BL21(DE3)pLysS	F' <i>ompT gal dcm lon hsdS_B(r_B⁻ m_B⁻) λ(DE3)</i> <i>pLysS(cm^R)</i>	Stratagene®

3.1.2 Vektori korišćeni u ovom radu

Plazmid	Veličina	Karakteristike	Referenca
pBLCAT6	4.25 kb	Vektor za analizu promotora u ćelijama sisara, koji poseduje reporterski gen za hloramfenikol-acetiltransferazu (CAT)	(Boshart <i>et al.</i> , 1992)
pBLCAT5	4.4 kb	Vektor za analizu enhensera u ćelijama sisara, poseduje timidin kinazni promotor ispred CAT reporterskog gena	(Boshart <i>et al.</i> , 1992)
pBS II KS+	2.96 kb	Prokariotski fagemidni vektor sa <i>amp</i> rezistencijom	Stratagene®
pcDNA3	5.4 kb	Eukariotski ekspresioni vektor koji poseduje <i>amp</i> i <i>neo</i> rezistenciju	Invitrogen®
pRC/CMV500	5.5 kb	Derivat pRC/CMV eukariotskog ekspresionog vektora (Invitrogen®) koji poseduje <i>amp</i> i <i>neo</i> rezistenciju i kojem je dodat FLAG epitop i novi polilinker,	Poklon dr Davida Ginty-ija, Department of Neuroscience, The Johns Hopkins University School of Medicine (Ahn <i>et al.</i> , 1998)

pCH110	7.1 kb	Eukariotski vektor koji eksprimira β -galaktozidazu i služi kao marker za praćenje i normalizaciju ekspresije,	Amersham Pharmacia Biotech®
--------	--------	----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----------------------------

3.1.3 Plazmidni konstrukti korišćeni u ovom radu

Plazmid	Veličina	Karakteristike	Referenca
F19R30	4.96 kb	Sadrži 713 bp 5' regulatornog regiona <i>SOX3</i> gena (-427/+286)	ovaj rad i (Kovacevic Grujicic et al., 2005)
F19R24	4.75 kb	Sadrži 494 bp 5' regulatornog regiona <i>SOX3</i> gena (-427/+67)	ovaj rad i (Kovacevic Grujicic et al., 2005)
F17R30	4.76 kb	Sadrži 505 bp 5' regulatornog regiona <i>SOX3</i> gena (-219/+286)	ovaj rad i (Kovacevic Grujicic et al., 2005)
F17R24	4.54 kb	Sadrži 286 bp 5' regulatornog regiona <i>SOX3</i> gena (-219/+67)	ovaj rad i (Kovacevic Grujicic et al., 2005)
F17R22	4.50 kb	Sadrži 246 bp 5' regulatornog regiona <i>SOX3</i> gena (-219/+27)	ovaj rad i (Kovacevic Grujicic et al., 2005)
F17SmaI	4.44 kb	Sadrži 191 bp 5' regulatornog regiona <i>SOX3</i> gena (-219/-28)	ovaj rad i (Kovacevic Grujicic et al., 2005)
MscIR30	4.64 kb	Sadrži 386 bp 5' regulatornog regiona <i>SOX3</i> gena (-100/+286)	ovaj rad i (Kovacevic Grujicic et al., 2005)
MscIR24	4.42 kb	Sadrži 167 bp 5' regulatornog regiona <i>SOX3</i> gena (-100/+67)	ovaj rad i (Kovacevic Grujicic et al., 2005)
F19SmaI	4.80 kb	Sadrži 399 bp 5' regulatornog regiona <i>SOX3</i> gen (-427/-28)	ovaj rad i (Mojsin et al., 2006)
F17R12	4.60 kb	Sadrži 198 bp 5' regulatornog regiona <i>SOX3</i> gen (-219/-21)	ovaj rad i (Mojsin et al., 2006)
F18R12	4.67 kb	Sadrži 272 bp 5' regulatornog regiona <i>SOX3</i> gen (-293/-21)	ovaj rad
F19R30 TATAmut	4.96 kb	Sadrži mutiran TATA boks na poziciji -9/-5 bp u okviru F19R30 konstrukta	ovaj rad i (Kovacevic Grujicic et al., 2005)
F19R30 Sp1mut	4.96 kb	Sadrži mutiran Sp1 motiv na poziciji -48/-45 bp u okviru F19R30 konstrukta	ovaj rad i (Kovacevic Grujicic et al., 2005)
F19R30 USFmut	4.96 kb	Sadrži mutiran E boks na poziciji -71/-68 bp u okviru F19R30	ovaj rad i (Kovacevic Grujicic et al., 2005)

		konstrukta	
F19R30 NF-Ymut	4.96 kb	Sadrži mutiran CCAAT boks na poziciji -105/-101 bp u okviru F19R30 konstrukta	ovaj rad i (<i>Kovacevic Grujicic et al., 2005</i>)
F19R30 CREBmut	4.96 kb	Sadrži mutirano CREB polumesto na poziciji -195/-191 bp u okviru F19R30 konstrukta	ovaj rad
MUT1	4.96 kb	Sadrži mutirano potencijalno vezivno mesto za ZBP-89 na poziciji -334/-331 bp u okviru F19R30 konstrukta	ovaj rad
MUT2/3	4.96 kb	Sadrži mutirana potencijalna vezivna mesta za ZBP-89 na pozicijama -308/-305 i -301/-298 bp u okviru F19R30 konstrukta	ovaj rad
pcDNA3 ZBP-89	8.1 kb	Eukariotski ekspresioni vektor; korišćen za ekspresiju ZBP-89 proteina	Poklon prof. Juanite Merchant, Division of Gastroenterology, University of Michigan Health System, (<i>Bai and Merchant, 2000</i>)
pcDNA3 MAZ	7.24 kb	Eukariotski ekspresioni vektor; korišćen za ekspresiju MAZ proteina	poklon dr Kazunarija Yokoyame, RIKEN BioResource Center
pcDNA3 CREB	6.4 kb	Eukariotski ekspresioni vektor; korišćen za ekspresiju CREB proteina	Poklon dr Davida Ginty-ija, Department of Neuroscience, The Johns Hopkins University School of Medicine
A-CREB	5.7 kb	Eukariotski ekspresioni vektor; korišćen za ekspresiju A-ZIP proteina, selektivnog, dominantnog inhibitora CREB proteina	Poklon dr Davida Ginty-ija, Department of Neuroscience, The Johns Hopkins University School of Medicine (<i>Ahn et al., 1998</i>)
pGEX-KG-ZBP-89	8.5 kb	Prokariotski ekspresioni vektor; korišćen za ekspresiju ZBP-89 proteina vezanog za glutation S transferazu (GST-ZBP-89)	Poklon prof. Juanite Merchant, Division of Gastroenterology, University of Michigan

			Health System, (Merchant et al., 1996)
pGEX-4T-2-MAZ	4.97 kb	Prokariotski ekspresioni vektor; korišćen za ekspresiju MAZ proteina vezanog za glutation S transferazu (GST-MAZ)	poklon dr Kazunarija Yokoyame, RIKEN BioResource Center

3.1.4 NT2/D1 ćelijska linija

U ovom radu je korišćena permanentna ćelijska linija NT2/D1 poreklom iz humanog embrionalnog teratokarcinoma koja je komercijalno dostupna (American Type Culture collection, Manassas, VA 20108, USA - ATCC br. CRL-1973) (Andrews, 1984; Andrews, 1988; Andrews et al., 1984). NT2/D1 ćelije su gajene u standardnim uslovima, u DMEM-u sa visokim sadržajem glukoze, 10% FBS-a i 2mM L-glutaminom (Gibco BRL) na 37°C i 10% CO₂ (Andrews, 1984). Za ispitivanje uticaja retinoične kiseline na ekspresiju *SOX3* gena, NT2/D1 ćelije su indukovane 10 μM all-*trans* retinoičnom kiselinom (Sigma), (Andrews, 1984), a efekat indukcije je praćen nakon 48h.

3.1.5 Antitela korišćena u ovom radu

U „superšift“ eksperimentima korišćena su sledeća antitela:

- na USF1 i USF2 (ljubazan poklon dr Benoit Violleta, Institut Cochin de Génétique Moléculaire),
- na Sp1 (sc-59, Santa Cruz Biotechnology)
- na NF-Y (sc-7711, Santa Cruz Biotechnology)
- na MAZ protein (ljubazan poklon dr Kena Marcu-a, Departments of Biochemistry and Cell Biology, Microbiology & Pathology, State University of New York at Stony Brook)
- na CREB protein (sc-271x, Santa Cruz Biotechnology)
- na PAX-2/6 (sc-7751x, Santa Cruz Biotechnology)

3.1.6 Oligonukleotidi korišćeni u ovom radu

Oligonukleotidi u ovom radu su korišćeni za potrebe određivanja starta transkripcije ("primer extension"), generisanje promotor- i enhenser-zavisnih reporter konstrukata, mesto-specifičnu mutagenezu i generisanje oligonukleotidnih ili PCR proba (*wt* i mutiranih) za EMSA eksperimente.

Spisak oligonukleotida sa odgovarajućim sekvencama:

Naziv	Sekvenca i pozicija 5' kraja u odnosu na <i>tsp</i>
Oligonukleotidi korišćeni za "primer extension"	
PE5	5' GCCCTGGGACTCCGTCGGAGCGGAGCTTGGGGG 3'(+174)
PE17	5' CTGTGGGCCAGCGAGTCCGGCGGGAA 3'(+140)
R17ORF	5' AGCTTGGGGGCCTGTGGGCCAG 3' (+150)
Oligonukleotidi korišćeni za generisanje reporter konstrukata	
F19	5' ct <u>AAGCTTT</u> GCGGCTGGCCGGGGGATGGGGCG 3' (-427) * #
F17	5' ct <u>aagctt</u> CCCGCCTCCTAAGTAACTCTTA 3' (-219)
R30	5' gat <u>ctaga</u> GGTTCTTGAGTTCAGTCTCCA 3' (+286)
R24	5' gat <u>ctaga</u> GGCTTCTCGCACCTGATGAGTT 3' (+67)
R22	5' gat <u>ctaga</u> TCACAGTCTGCCTGGGCTCTA 3' (+27)
F18	5' ct <u>aagctt</u> CACCTCCTCAGGTTTCG 3' (-293)
R12	5' gat <u>ctaga</u> ATTCCCCGGGGTTGGGGCTTGGT 3' (-21)
Oligonukleotidi korišćeni za mutagenezu	
TATAmut F	5' GAATCCGAGCAGGTAC <u>CACA</u> AAGGGGCCAGCTAG 3' (-24) **
Sp1mut F	5' CCTCCGGGTTGCGAGGAGAGGACCAAGCCCCAAC 3' (-64)
USFmut F	5' GAACCTGTCAACGTGGGGTCCCTCCGGGTTGC 3' (-83)
NF-Ymut F	5' GGGCTCGGTAATGATTTCCAGGGCGCATCACTG 3' (-118)
CREBmut F	5'TAACTCTTACCAGTTA <u>ACT</u> AGGCCAAAGAGGGGCGTG 3' (-207)
MUT1 F	5' GCGCCCTCTGCCCCAGGAC <u>CCA</u> ATCTGCTTGCGTG 3' (-350)
MUT2/3 F	5' TTGCGTGCCCCCTTCTCCCTCTTCCCGTCACCTC3' (-321)
Oligonukleotidi korišćeni za EMSA eksperimente	
Sp1 F	5' CTCCGGGTTGCGAGGGGCGGACCAAGC 3' (-63)
Sp1 R	5' gggGCTTGGTCCGCCCTCGCAACCCGGAG 3' (-37) ***
USF F	5' GAACCTGTCAATCACGGGTCCCTCCGGGTTGC 3' (-83)

USF F	5' GAACCTGTCAATCACGGGTCCTCCGGGTGTC 3' (-83)
NF-Y F	5' CGGTAATGATTGGCCAGGGCG 3' (-113)
NF-Y R	5' CGCCCTGGCCAATCATTACCG 3' (-93)
F6	5' GCGCCCTCTGCCCCCTCCCCCAATCTGCTTGCGTG 3' (-350)
R6	5'ggCACGCAAGCAGATTGGGGGGAGGGGGCAGAGGGCGC3'(-313)
MUT1 F	5' GCGCCCTCTGCCCC <u>AGGAC</u> CCAATCTGCTTGCGTG 3' (-350) **
MUT1 R	5'ggCACGCAAGCAGATTGGGT <u>CCT</u> GGGGGCAGAGGGCGC3' (-313)
F7	5' TTGCGTGCCCCCTCCCCCTCCCCCGTCACCTC 3' (-321)
R7	5' gGAGGTGACGGGGGGAGGGGGGAGGGGGCACGCAA 3' (-287)
MUT2 F	5' TTGCGTGCCCCCT <u>TCT</u> CCCTCCCCCGTCACCTC 3' (-321)
MUT2 R	5' gGAGGTGACGGGGGGAGGG <u>GAG</u> AAGGGGGCACGCAA 3' (-287)
MUT3 F	5' TTGCGTGCCCCCTCCCCCT <u>TCT</u> CCCGTCACCTC 3' (-321)
MUT3 R	5' gGAGGTGACGGGA <u>AAG</u> AGGGGGGAGGGGGCACGCAA 3' (-287)
MUT2/3 F	5' TTGCGTGCCCCCT <u>TCT</u> CCCT <u>TCT</u> CCCGTCACCTC 3' (-321)
MUT2/3 R	5' gGAGGTGACGGGA <u>AAG</u> AGGG <u>GAG</u> AAGGGGGCACGCAA 3' (-287)
F3	5' gTAACTCTTACCACGTCAGTACTAGGCCAAAGAGG 3' (-208)
R3	5' CCTCTTTGGCCTAGTGACGTGGTAAGAGTTA 3' (-177)
CREBmut F	5' gTAACTCTTACCAGT <u>TAA</u> CTAGGCCAAAGAGG 3' (-208)
CREBmut R	5' CCTCTTTGGCCTAGT <u>TAA</u> CTGGTAAGAGTTA 3' (-177)
CREB konsF	5'AGAGATTGCCTGACGTCAGAGAGCTAG 3'
CREB konsR	5' gCTAGCTCTCTGACGTCAGGCAATCTCT 3'

* Podvučenim nukleotidima predstavljenim podebljanim slovima generisana su restrikciona mesta korišćena pri kloniranju promotor- i enhenser-zavisnih reporter konstrukata *SOX3* gena

Sekvenca F19 oligonukleotida sadrži dva umesto tri G nukleotida na 5'kraju (obeleženi italic formom) u odnosu na javno dostupnu sekvencu (AL121875)

** Podvučeni nukleotidi predstavljaju mutacije uvedene u odgovarajuće ispitivane regulatorne motive

*** U oligonukleotidima koji su korišćeni u EMSA reakcijama, malim slovima su u predstavljeni nespareni guanozini koji su služili za obeležavanje proba

3.1.7 Komercijalni kitovi

Totalna RNK iz NT2/D1 ćelija je izolovana korišćenjem "Rneasy Mini Kit"-a proizvođača Qiagen. Plazmidna DNK je izolovana i prečišćena upotrebom "Endofree plasmid Maxi Kit"-a i "Endofree plasmid Giga Kit"-a, proizvođača Qiagen. Merenje β -gal aktivnosti je rađeno pomoću " β -galactosidase Enzyme Assay System", proizvođača Promega. CAT aktivnost je određena "CAT ELISA" kitom, proizvođača Roche Pharmaceuticals. Sekvenciranje za "primer extension" je rađeno pomoću "T7 Sequencing" kita, proizvođača USB.

3.2 EKSPERIMENTALNE METODE

3.2.1 Određivanje starta transkripcije metodom elongacije reverznog oligonukleotida ("primer extension")

Totalna RNK iz retinoičnom kiselinom indukovanih NT2/D1 ćelija izolovana je pomoću Rneasy Mini Kit-a (Qiagen). Izolovana RNK je poslužila kao matrica u reakciji reverzne transkripcije pri čemu su korišćena tri različita reverzna oligonukleotida (PE5, PE17 i R17ORF). Oligonukleotidi (10 pmol) su obeleženi na 5' krajevima sa [γ - 32 P] ATP, upotrebom enzima T4 Polynucleotide Kinase (New England Biolabs). 20 μ g totalne RNK je pomešano sa obeleženim oligonukleotidom (10^5 cpm) i smeša je inkubirana 5 min na 65 °C. Hibridizaciona smeša je potom odmah stavljena na led. Oligonukleotidi su elongirani upotrebom 200 U SuperScriptTM Rnase H⁻ reverzne transkriptaze (Invitrogen) 1 h na 37°C, u reakciji koja je sadržavala 30 U RNAGuardTM (Amersham Pharmacia Biotech), 2 mM dNTP miks, 10 mM DTT, 50 mM Tris-HCl (pH 8.3), 75 mM KCl i 3 mM MgCl₂. Kao negativna kontrola ista reakcija je rađena sa 10 μ g tRNK kvasca. Po završenoj inkubaciji, reakciji je dodavano 3 volumena hladnog, apsolutnog etanola i precipitacija je vršena preko noći. Talog je resuspendovan u 5 μ l vode i 5 μ l boje (0.3% bromfenol plavo, 0.3% ksilencijanolo, 10 mM EDTA i 97.5% formamid). Pre nanošenja na 6% poliakrilamidni denaturišući gel, reakcije su denaturisane 2 min na 95°C, a zatim naglo ohlađene na ledu. Dužine "primer extension" produkata su određene poređenjem sa reakcijama sekvenciranja koje su rađene sa istim oligonukleotidima sa kojima su rađene i "primer extension" reakcije, a pomoću T7 Sequencing kit-a (USB). Takođe, u određivanju dužine produkata korišćen je radioaktivno obeleženi DNK marker dobijen digestijom *PhiX* enzimom *HinfIII*. Elektroforeza se odvijala pod sledećim uslovima: napon 1500 V, struja 40 mA, snaga 40 W (konstantna), oko 75 min.

Po sušenju gela (30 min na 75°C), reakcije su vizualizovane pomoću rentgen filmova koji su eksponirani preko noći na -70°C u “intensifying screen” kasetama.

3.2.2 *In silico* analiza 5' nekodirajućeg regiona *SOX3* gena i poređenje sa ortolozima sisara

U cilju definisanja promotorskog regiona humanog *SOX3* gena i mapiranja njegovog starta transkripcije genomska sekvenca dužine 1.25 kb uzvodno od ATG kodona je analizirana korišćenjem dva programa za predikciju promotora - Neural Network Promoter Prediction Version 2.2 (http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.pl) i PromoterInspector Release 1.0 (<http://www.genomatix.de>).

Pretraživanje baza podataka dostupnih sekvenci i njihovo međusobno poređenje urađeno je korišćenjem NCBI (National Center for Biotechnology Informations) i ClustalW programa (EMBL-EBI). Sekvenca promotora humanog *SOX3* gena (ekstrahovana iz genomske sekvence prijavljene pod brojem AL121875.10) poređena je sa sekvencama ortologih promotora šimpanze, rezus majmuna, pacova i miša (pronađene u genomskim sekvencama AC149044.1, NW_001218193.1, NW_048052.2, odnosno NT_039706.6).

MatInspector program (*Cartharius et al.*, 2005) je korišćen za identifikaciju potencijalnih mesta za vezivanje poznatih transkripcionih faktora u okviru optimalnih promotora *SOX3* ortologa. Prilikom ove analize korišćeni su sledeći kriterijumi: verovatnoća vezivanja za konsenzusnu sekvencu vezivnog mesta (core similarity)-1.0 i odgovarajući kontekst nukleotida u sekvencama koje okružuju vezivno mesto (matrix similarity)-0.9.

3.2.3 Generisanje CAT reporter konstrukata

PCR metod je korišćen za generisanje promotor- i enhenser-zavisnih reporter konstrukata – F19R30, F19R24, F17R30, F17R24, F17R22, F17R12 i F18R12. Serija međusobno preklapajućih fragmenata je amplifikovana PCR-om korišćenjem F i R oligonukleotida koji sadrže *HindIII*, odnosno *XbaI* restrikciona mesta (spisak oligonukleotida je naveden u sekciji 3.1.6.). Kao matrica za sintezu korišćen je genomski klon X2.1H33 (*Stevanovic et al.*, 1993). Uslovi PCR-a su bili sledeći:

Početna denaturacija	Denaturacija	Renaturacija	Elongacija	Završna elongacija	Hlađenje
98°C	98°C	51°C	72°C	72°C	4°C
60 sec	60 sec	60 sec	60 sec	10 min	∞
1 ciklus	35 ciklusa			1 ciklus	

Po digestiji, odgovarajući PCR produkti su klonirani u *HindIII* i *XbaI* restrikciona mesta unutar polilinkera pBLCAT6 (koji nema promotor) ili pBLCAT5 vektora (koji sadrži timidin kinazni promotor ispred *cat* gena) (Boshart *et al.*, 1992). Delecioni konstrukt F17*SmaI* je generisan duplom digestijom F17R30 konstrukta sa *HindIII* i *SmaI*. Dobijeni fragment je subkloniran u pBLCAT6 vektor u *HindIII* i *XbaI* mesto koje je prethodno pretvoreno u mesto sa ravnim krajem. Delecioni konstrukti *MscIR30* i *MscIR24* su generisani duplom digestijom F17R30, odnosno F19R24 konstrukta sa *MscI* i *XbaI*. Dobijeni inserti su subklonirani u *HindIII* mesto koje je prethodno pretvoreno u mesto sa ravnim krajem i *XbaI* mesto u pBLCAT6 vektoru. F19*SmaI* konstrukt je restrikciono kloniran u pBLCAT5 vektor (*HindIII/SmaI*).

3.2.4 Mesto-specifična mutageneza

Za generisanje promotorskih konstrukata *SOX3* gena koji nose mutacije u konsenzusnim sekvencama za vezivanje Sp1, USF1, NF-Y, CREB i ZBP-89 proteina, kao i u TATA boksu (F19R30Sp1mut, F19R30USFmut, F19R30NF-Ymut, F19R30CREBmut, MUT1, MUT2/3 i F19R30TATAmut) korišćen je QuickChange Multi Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene). Ovom metodom PCR reakcijama su uvedene mutacije u *SOX3 wt* promotorski konstrukt (F19R30) korišćenjem odgovarajućih oligonukleotida čije su sekvence navedene u tabeli u odeljku 3.1.6. (podvučeni nukleotidi su mutirani):

Navedeni oligonukleotidi su fosforilisani u reakciji u kojoj je 1 nmol oligonukleotida dodat u reakciju sa 1 μ l 10 mM ATP, 2 μ l T4 Polynucleotide Kinase (20U) (New England Biolabs), 2,5 μ l 10x PNK pufera (70 mM Tris-HCl pH 7.6, 10 mM MgCl₂, 5mM DTT) i ddH₂O do 25 μ l. Nakon inkubacije reakcione smeše 45 min na 37°C, enzim je inaktiviran 5 min na 65°C. U reakciju je dodato 25 μ l ddH₂O, a zatim su slobodni nukleotidi iz reakcione smeše odstranjeni propuštanjem kroz G-50 kolonu (Amersham Pharmacia).

Reakciona smeša za PCR je sastavljena od 100 ng plazmidne matrice (F19R30), 5 μ l reakcionog pufera 10x Muta Buffer (200 mM Tris-HCl pH 8.8, 100 mM amonijum-sulfat, 100 mM KCl, 1% Triton X-100, 1 mg/ml BSA, 20 mM MgSO₄; Stratagene), 100 ng 5'OH fosforilisanog oligonukleotida, 1 μ l 25mM dNTP miksa, 0,5 μ l (1,25 U) *PfuI* Polymerase (Fermentas) i 0,5 μ l Vent Polymerase (1 U) (New England Biolabs), kao i ddH₂O do 50 μ l.

Za uvođenje mutacija PCR-om, korišćen je sledeći program:

Početna denaturacija	Denaturacija	Renaturacija	Elongacija	Završna elongacija	Hlađenje
95°C	95°C	55°C	65°C	65°C	4°C
60 sec	60 sec	60 sec	120 sec / kb plazmida	60 sec	∞
1 ciklus	30 ciklusa			1 ciklus	

Nakon PCR reakcije, u reakcionu smešu je dodat 1 μ l restrikcionog enzima *DpnI* (10 U/ μ l) koji specifično prepoznaje metilovani adenzin motiva GATC tj. isključivo adenzin iz plazmidne matrice, a ne PCR produkta. Inkubacija enzimske reakcije je trajala 5 h na 37°C, nakon čega je rađena etanolna precipitacija. 10 μ l mutirane DNK je iskorišćeno za transformaciju bakterijskog soja *E.Coli* XL1Blue. Nakon selekcije i propagacije bakterijskih kolonija izolovana je plazmidna DNK i mutirani konstrukti su sekvencirani čime je potvrđeno prisustvo uvedenih mutacija i pokazano da PCR amplifikacijom nije uvedena nijedna dodatna mutacija.

3.2.5 Tranzijentna transfekcija NT2/D1 ćelija kalcijum fosfatnom precipitacijom

U eksperimentima tranzijentne transfekcije 1.2×10^6 ćelija je zasejavano u Petri šolje prečnika 10 cm. Nakon 24 h rasta, ćelije su oprane dva puta HEPES rastvorom (6.7 mM KCl, 142 mM NaCl, 10mM HEPES) i gajene još 2h u svežem medijumu.

Po isteku ovog vremena na ćelije je dodat kalcijum-fosfatni precipitat DNK koji je napravljen na sledeći način. Rastvoru DNK u 1 ml 2 x HEBS rastvora (HEPES buffered saline; 274 mM NaCl, 42 mM HEPES, 9.6 mM KCl, 1.5 mM Na₂HPO₄; pH 7.15 - 7.30), koji je neprekidno aerisan, nakapavanjem je dodavan 1 ml 250 mM rastvora CaCl₂. Ovako formiran kalcijum-fosfatni precipitat dodavan je na ćelije i inkubiran 3 - 4h u standardnim uslovima za gajenje NT2/D1 ćelija. Nakon inkubacije precipitati su uklonjeni sa ćelija pranjem 2 puta rastvorom HEPES-a. Sledećeg dana ćelijama je dodavan svež medijum u kojem su gajene narednih 48 h, pri čemu je u eksperimentima sa indukovanim ćelijama 10 μ M all-*trans* retinoična kiselina dodavana u medijum.

U eksperimentima tranzijentne transfekcije promotor- i enhenser-zavisnim reporterskim konstruktima (i u slučaju mutanata F19R30TATAmut, F19R30Sp1mut, F19R30USFmut i F19R30NF-Ymut), NT2/D1 ćelije su transfektovane sa 10 μ g različitih *SOX3* CAT6 ili CAT5 konstrukata (*wt* ili deletanata), 2 μ g pBS II KS+ i 2 μ g pCH110

vektora (Amersham Pharmacia) (Kovacevic Grujicic et al., 2005; Nikcevic et al., 2008). U mutacionim analizama, NT2/D1 ćelije su transfektovane sa 5 μg *wt* F19R30 ili mutiranih *SOX3* promotorskih konstrukata (MUT1, MUT2/3 i F19R30CREBmut), 5 μg pBS II KS+ i 3 μg pCH110 vektora.

Za ispitivanje uticaja povećane ekspresije ZBP-89, MAZ i CREB proteina na aktivnost *SOX3* promotora, NT2/D1 ćelije su kotransfektovane sa 5 μg F19R30, 5 μg ili praznog pcDNA3 ili odgovarajućeg ekspresionog vektora (pcDNA3-ZBP-89, pcDNA3-MAZ i pcDNA3-CREB) i 3 μg pCH110 vektora.

3.2.5.1 Priprema ćelijskih ekstrakata

Ćelijski ekstrakti su pripremani 48 h nakon transfekcije. Ćelije su oprane hladnim PBS-om, struganjem odvojene od podloge u 1 ml TEN rastvora (Tris-EDTA-NaCl; 40 mM Tris-HCl pH 7.4, 1 mM EDTA, 150 mM NaCl) i istaložene centrifugiranjem na 13000 rpm, 2 min na +4°C. Talog ćelija je resuspendovan u 100 μl 0.25 M Tris-HCl (pH 7.8 na 37°C). Liza ćelija je urađena kroz tri ciklusa zamrzavanja i odmrzavanja (3 min u tečnom azotu praćeno inkubacijom na 37°C do otapanja ćelijskih taloga). Ćelijski talog je uklonjen centrifugiranjem na 13200 rpm, 10 min na +4°C, a supernatant (ćelijski ekstrakt) je korišćen u β -galaktozidaznom i CAT esejju.

3.2.5.2 β -galaktozidazni esej

Za normalizaciju efikasnosti transfekcije korišćen je pCH110 vektor koji eksprimira gen za β -galaktozidazu, a aktivnost ovog enzima merena je pomoću eseja β -galaktozidazne aktivnosti (" β -galactosidase Enzyme Assay System"), proizvođača Promega.

β -galaktozidazni esej je uobičajen metod za određivanje aktivnosti enzima β -galaktozidaze u lizatima ćelija koje su transfektovane β -galaktozidaza reporterskim vektorom-pCH110. Standardni esej se izvodi tako što se uzorku razblaženom u Tris-HCl pH 7.8 doda jednaka količina 2X Assay Buffer-a koji sadrži 200 mM PBS, 2 mM MgCl_2 , 100 mM β -merkaptetanol i 1.33 mg/ml supstrata ONPG (*o*-nitrofenil- β -D-galaktopiranozid). Uzorci se inkubiraju na 37°C. Tokom inkubacije β -galaktozidaza hidrolizuje bezbojan supstrat u *o*-nitrofenil koji ima žutu boju. Absorbanca je merena na Microplate reader aparatu tipa Multiskan RC (Labsystems) na talasnoj dužini 420 nm.

Kao referentne vrednosti za konstrukciju standardne kalibracione krive i određivanje vrednosti β -galaktozidaze u ispitivanim ćelijskim lizatima korišćena su standardna razblaženja ovog enzima: 3,125 mU, 6,25 mU, 12,5 mU, 25 mU, 50 mU, 100 mU i 200 mU.

3.2.5.3 CAT esej

Aktivnosti CAT enzima (hloramfenikol-acetil-transferaza) su određivane "CAT ELIZA esejem" (CAT Enzyme Linked Immunosorbent Assay- ELISA), Roche.

CAT ELIZA esej je enzimski imunoesej za kvantifikaciju hloramfenikol-acetil-transferaze (CAT) iz *E. coli* u transfektovanim eukariotskim ćelijama. CAT ELIZA se koristi za kvantifikovanje ekspresije CAT-a u eukariotskim ćelijama koje su transfektovane plazmidima koji sadrže CAT reporterski gen.

Ovaj esej se zasniva na sendvič-ELIZA principu i izvodi se u mikrotitar pločama koje imaju antitela na CAT (anti-CAT) vezana za površinu bunarčića u kojima se sukcesivno odvijaju sledeće reakcije. Najpre se u bunarčiće dodaju ekstrakti transfektovanih ćelija i inkubiraju 60 min na 37°C. U ovom koraku dolazi do specifičnog vezivanja CAT enzima iz ćelijskih ekstrakata za anti-CAT antitela vezanih za dno bunarčića. U sledećem koraku dodaje se digoksinom obeleženo antitelo na CAT anti-CAT-DIG i događa se njegovo vezivanje za CAT. Sledi dodavanje antitela na digoksin koja su konjugovana sa peroksidazom, anti-DIG-POD, i koja se vezuju za digoksin. U završnom koraku ovog esejja dodaje se substrat ABTS, koji u prisustvu peroksidaze (POD) daje obojenu reakciju pri inkubaciji na 37°C.

Absorbanca je merena na Microplate reader aparatu tipa Multiskan RC (Labsystems) na talasnim dužinama 405/492 nm. Kao standardi za određivanje aktivnosti CAT-a u ispitivanim ćelijskim lizatima (za konstrukciju standardne kalibracione krive) korišćena su sledeća razblaženja CAT enzima *E. coli*: 3,125 pg, 6,25 pg, 12,5 pg, 25 pg, 50 pg, 100 pg, 200 pg. Vrednosti dobijenih CAT aktivnosti normalizovane su najpre prema efikasnosti transfekcije, odnosno prema izmerenoj β -gal aktivnosti za dati uzorak.

U slučaju promotor-zavisnih konstrukata, dobijene CAT aktivnosti korigovane na efikasnost transfekcije, izražene su u odnosu na aktivnost promotorskog konstrukta F19R30 kojoj je dodeljena vrednost 100% i predstavljene kao srednja vrednost \pm S.D. ili \pm S.E.M. (standard error mean) iz najmanje tri nezavisna eksperimenta. U slučaju enhenser-zavisnih konstrukata, CAT aktivnost svakog konstrukta (F19SmaI, F18R12 i F17R12) je normalizovana u odnosu na aktivnost praznog pBLCAT5 vektora kojoj je dodeljena vrednost 1 (i u neindukovanim i u indukovanim NT2/D1 ćelijama). Srednje vrednosti relativnih CAT

aktivnosti poređene su Studentovim *t*-testom, a statistička analiza je urađena programom SPSS. Kada je *p* vrednost manja od 0,05 rezultat se smatra statistički značajnim.

3.2.6 Izolovanje jedarnih proteina iz NT2/D1 ćelija

Jedarni proteini iz neindukovanih i retinoičnom kiselinom indukovanih NT2/D1 ćelija su izolovani po modifikovanoj proceduri *Dignama* i saradnika (*Dignam et al.*, 1983). NT2/D1 ćelije (10^9) su posle taloženja i pranja u PBS-u resuspendovane u puferu A (0.25 M saharoza, 10 mM HEPES pH 7.9, 10 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM EDTA) i inkubirane 10 minuta na ledu. Nakon taloženja centrifugiranjem (1300 rpm, 5 min) ćelije su resuspendovane u 2 volumena pufera A. Ćelije su lizirane homogenizacijom u staklenom homogenizeru uz dodavanje NP-40 (0.05%). Jedra su staložena centrifugiranjem (2000 rpm, 10 minuta, +4°C) i zatim resuspendovana i homogenizovana u puferu C (20 mM HEPES pH 7.9, 25% glicerol, 0.42 M NaCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM EDTA). Nakon mešanja 30 min na +4°C suspenzija je centrifugirana (20000 rpm, 30 min, +4°C). Supernatant je dijaliziran u puferu D (20 mM HEPES pH 7.9, 20% glicerol, 0.1 M KCl, 0.2 mM EDTA) 4-5 h na +4°C. Nakon dijalize rastvor je centrifugiran (20,000 rpm, 20 min, +4°C). Dobijeni supernatant koji sadrži jedarne proteine je alikvotiran i čuvan u tečnom azotu. Puferi A i C sadrže inhibitore proteaza u sledećim koncentracijama: 0.5 mM DTT, 0.5 mM PMSF, 1µg/ml leupeptina, 1µg/ml pepstatina i 1µg/ml antipaina, a pufer D 0.5 mM DTT i 0.5 mM PMSF.

3.2.7 Izolovanje bakterijski eksprimiranih rekombinantnih proteina

Rekombinantni GST-ZBP-89 i GST-MAZ proteini su eksprimirani u BL21(DE3) pLysS bakterijskom soju. Ova dva proteina imaju za sebe vezanu glutation S transferazu (GST). Urađena je 2% inokulacija transformisanih bakterija iz prekonocne kulture. Bakterije su gajene na 25°C do postizanja OD₆₀₀ = 0.4. Tada su indukovane 0.4 mM IPTG-om u trajanju od 1 h na 25°C. Dalja izolacija i prečišćavanje rekombinantnih proteina je urađena po proceduri proizvođača Glutathione-S-transferase (GST) Gene Fusion System i Glutathione Sepharose[®] 4B (Amersham Pharmacia Biotech).

3.2.8 Esej smanjene elektroforetske pokretljivosti (EMSA-electrophoretic mobility shift assay)

Dvolančane probe su generisane reakcijama hibridizacije komplementarnih F i R oligonukleotida (2 nmol svakog oligonukleotida) u 1 x STE puferu (0.1 M NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA pH 8.0) nakon 10 min denaturacije na 98°C i postepenog hlađenja do sobne temperature. Dvolančane oligonukleotidne probe su istaložene etanolnom precipitacijom.

R ili F oligonukleotidi su dizajnirani tako da sadrže 1-3 nesparena guanozina na 5' kraju (izuzev NF-Y probe) koji obezbeđuju obeležavanje probe ugrađivanjem [α -³²P] dCTP-a na komplementarnom lancu u reakciji sa Klenow-im fragmentom. Reakcija obeležavanja je sadržala: 50 ng oligonukleotida, 0.5 μ l 40 mM dNTPmix, 2 μ l *Eco*Pol pufera (10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 5 mM MgCl₂, 7.5 mM DTT), 1 μ l Klenow fragmenta DNK polimeraze (New England Biolabs) (5U) i ddH₂O do 20 μ l. Nakon inkubacije od 60 min na 37°C i dodavanja 30 μ l ddH₂O, reakcija je propuštena kroz G-50 kolonu (Amersham Pharmacia Biotech).

NF-Y proba je obeležena kinaziranjem pomoću [γ -³²P] ATP-a i enzima T4 Polynucleotide Kinase. Reakcija obeležavanja je sadržala 300 ng oligonukleotidne probe, 5 μ l PNK pufera (New England Biolabs), 2.5 μ l [γ -³²P] ATP, 1 μ l T4 Polynucleotide Kinase enzima (5 U, New England Biolabs) i ddH₂O do 50 μ l. Nakon 30 min inkubacije na 37°C u vodenom kupatilu reakcija je zaustavljena i propuštena kroz G-50 kolonu (Amersham Pharmacia Biotech).

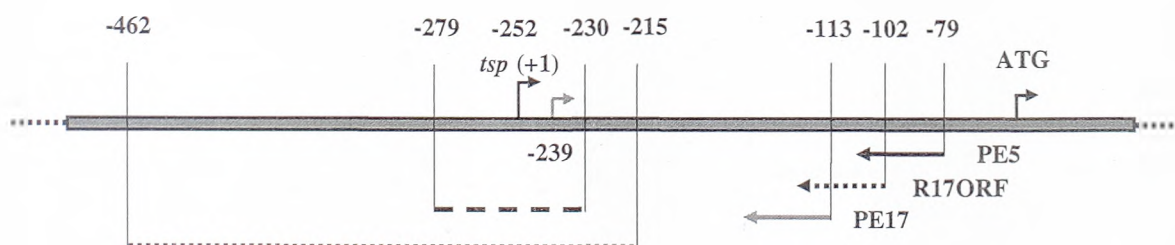
EMSA reakcije su rađene sa 2.5 μ g jedarnih proteina iz neindukovanih i retinoičnom kiselinom indukovanih NT2/D1 ćelija i 1 ng obeležene probe, u reakcionom puferu koji sadrži 10 mM HEPES pH 7.9, 15 mM KCl, 0.25 mM ZnSO₄, 0.25 mM EDTA, 3% glicerol, 0.25mM DTT i 50 ng/ μ l poly (dI-dC) u volumenu od 20 μ l, 30 minuta na 37°C. EMSA reakcije sa USF i Sp1 i NF-Y probom su rađene na isti način izuzev što je koncentracija poly (dI-dC) bila 40 ng/ μ l u volumenu od 25 μ l i nisu sadržavale 0.25 mM ZnSO₄. U EMSA reakcijama sa rekombinantnim proteinima korišćeno je 780 ng GST-ZBP-89 i 840 ng GST-MAZ proteina. Za kompeticiju ("hlađenje") su korišćeni neobeleženi oligonukleotidi u molarnom višku od 100 puta. U esejima smanjene elektroforetske pokretljivosti u prisustvu antitela ("superšift") proteini su inkubirani sa antitelima na USF1, USF2 i Sp1 na +4°C, a sa antitelima na MAZ, CREB i PAX-2/6 na sobnoj temperaturi, 30 minuta pre dodavanja obeležene probe.

Reakcije su elektroforetski razdvajane u 6% nativnom poliakrilamidnom gelu sa 0.5 X TBE puferom (Tris-borat-EDTA; 45 mM Tris-borat, 1 mM Na₂-EDTA).

4. Rezultati

4.1 Predikcija promotorskog regiona i određivanje starta transkripcije humanog *SOX3* gena

U cilju definisanja promotorskog regiona humanog *SOX3* gena i mapiranja njegovog starta transkripcije, genomski sekvenca dužine 1,25 kb uzvodno od ATG kodona je analizirana korišćenjem dva programa za predikciju promotora. Program Neural Network Promoter Prediction je ukazao na potencijalnu poziciju bazalnog promotora *SOX3* gena sa verovatnoćom od 100% u okviru regiona od 279 do 230 baznih parova (bp) uzvodno od ATG kodona (Slika 8). Takođe, isti program je kao potencijalni start transkripcije predvideo citozin na poziciji -239 bp u odnosu na start translacije *SOX3* gena (Slika 8). Korišćenje programa PromoterInspector ukazalo je na prisustvo potencijalnog promotora *SOX3* gena u regionu od -462 do -215 bp u odnosu na ATG kodon (Slika 8). Dobijene kompjuterske predikcije ukazale su na region koji bi trebalo analizirati i time usmerile eksperimente vezane za određivanje starta transkripcije.

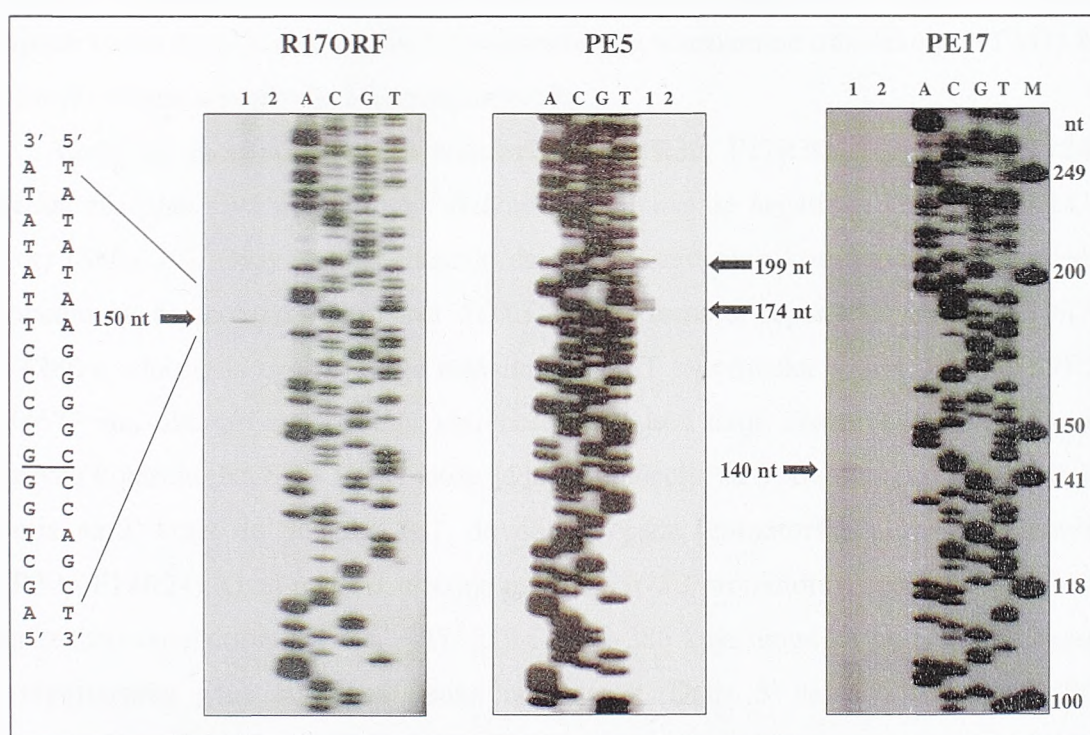


Slika 8. Shematski prikaz rezultata predikcije promotorskog regiona humanog *SOX3* gena. Program Neural Network Promoter Prediction je predvideo poziciju bazalnog promotorskog regiona koja je predstavljena isprekidanim crtama. Predikcija promotora od strane PromoterInspector programa je predstavljena istačkanom linijom. Start transkripcije određen primenom metode elongacije oligonukleotida označen je crnom strelicom i obeležen kao *tsp* (+1). Start transkripcije koji je predviđen kompjuterskom predikcijom označen je sivom strelicom. Sve pozicije su predstavljene u odnosu na start translacije *SOX3* gena (ATG). Obeležene su i pozicije reverznih oligonukleotida korišćenih u reakciji određivanja starta transkripcije.

Start transkripcije (*tsp*) *SOX3* gena određen je metodom elongacije oligonukleotida u reakciji reverzne transkripcije ("primer extension"). U reakciji reverzne transkripcije korišćena je kao matrica totalna RNK izolovana iz NT2/D1 ćelija indukovanih retinoidnom kiselinom, kao i tri radioaktivno obeležena, reverzna oligonukleotida R17ORF, PE5 i PE17

(Slike 8 i 9). Specifičnost reakcija je potvrđena korišćenjem tRNK kvasca kao kontrole (Slika 9). Korišćenjem oligonukleotida R17ORF i PE17, u reakciji elongacije oligonukleotida dobijeni su pojedinačni produkti dužina od 150, odnosno 140 nukleotida (nt) (Slika 9).

U slučaju oligonukleotida PE5, dobijena su dva produkta dužine od 199 i 174 nukleotida. Rezultati dobijeni korišćenjem PE5 oligonukleotida ukazuju na moguće postojanje dodatnog, uzvodnog alternativnog starta transkripcije, mada postoji i mogućnost da je dobijeni duži produkt od 199 nt artefakt (Slika 9). Poređenjem dobijenih produkata sa sekvencama koje su dobijene korišćenjem istih oligonukleotida, utvrđeno je da citozin na poziciji 252 nt uzvodno od ATG kodona predstavlja nukleotid od kojeg počinje transkripcija *SOX3* gena (Slika 9). Važno je napomenuti da je isti nukleotid određen za start transkripcije *SOX3* gena korišćenjem tri različita reverzna oligonukleotida (Slika 9).



Slika 9. Određivanje starta transkripcije *SOX3* gena metodom elongacije oligonukleotida. **Kolone 1** -reakcije na totalnoj RNK iz retinoičnom kiselinom indukovanih NT2/D1 ćelija sa odgovarajućim reverznim oligonukleotidima (R17ORF, PE5 i PE17). Produkti reakcija su označeni strelicama. **Kolone 2** - kontrolne reakcije sa tRNK kvasca, **M** – marker, veličine fragmenata su označene sa desne strane, **ACGT** – nukleotidne sekvence generisane sa odgovarajućim oligonukleotidima (R17ORF, PE5 i PE17). Sa leve strane prikazan je deo sekvence, a nukleotid od kojeg počinje transkripcija je podvučen.

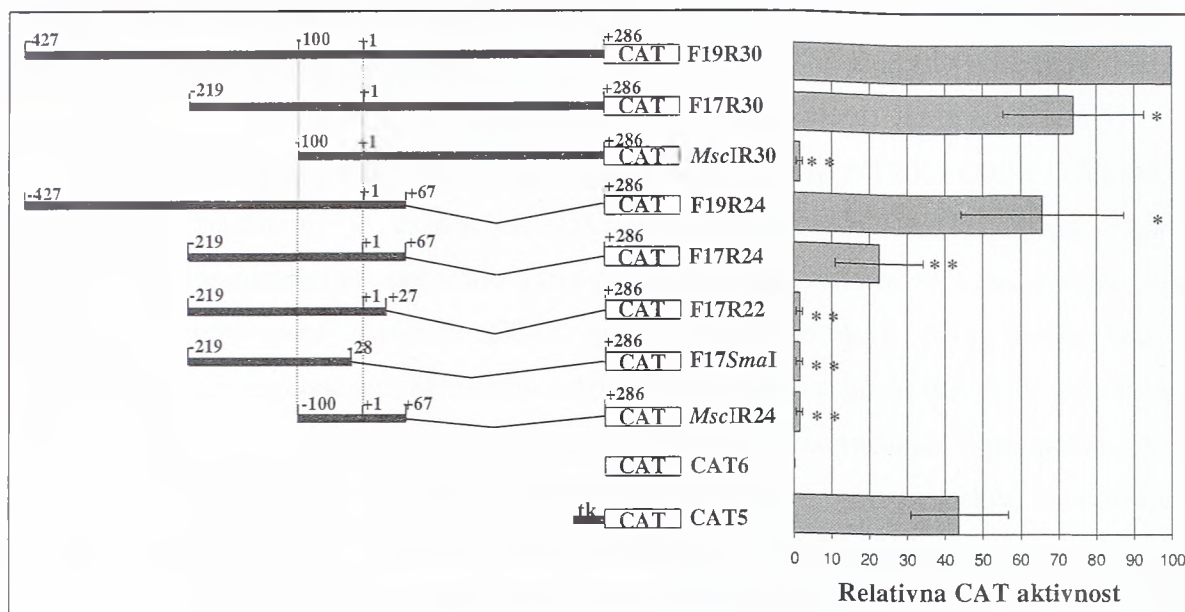
Dobijeni rezultat je u korelaciji sa dužinom informacione RNK za *SOX3* (Stevanovic, 2003) kao i sa kompjuterskom predikcijom starta transkripcije koji je samo 13 bp nizvodno od starta transkripcije utvrđenog u eksperimentima elongacije oligonukleotida.

4.2 Funkcionalna karakterizacija humanog *SOX3* promotora

4.2.1 Definisanje minimalnog promotora i pozitivnih *cis* regulatornih regiona neophodnih za optimalnu aktivnost *SOX3* gena

U cilju definisanja promotorskog regiona *SOX3* gena, generisana je serija konstrukata, gde je osam preklapajućih fragmenata iz 5' nekdirajućeg regiona *SOX3* gena klonirano uzvodno od *cat* reporter gena u okviru pBLCAT6 reporter vektora (Slika 10). CAT aktivnost dobijenih konstrukata je analizirana u eksperimentima tranzijentne transfekcije NT2/D1 ćelija kao što je opisano u poglavlju Materijal i metode.

Četiri od osam analiziranih konstrukata (F19R30, F17R30, F19R24 i F17R24) su pokazala značajan nivo promotorske aktivnosti u odnosu na negativnu kontrolu (pBLCAT6 vektor) (Slika 10). Ovaj rezultat ukazuje da se u okviru ovih konstrukata nalaze elementi neophodni za promotorsku aktivnost *SOX3* gena. Promotor-reporter konstrukt F19R30 (-427/+286 u odnosu na *tsp*) pokazuje maksimalnu CAT reportersku aktivnost, dok F17R24 (-219/+67) ima oko pet puta manju aktivnost, koja je i dalje značajno viša u odnosu na negativnu kontrolu. Na Slici 10. se može videti da delecija sa 5' kraja do pozicije -219, kao i delecija na 3' kraju do pozicije +67, dovode do pada promotorske aktivnosti (konstrukti F17R30 i F19R24). Ovaj rezultat ukazuje na to da *SOX3* promotorski region sadrži bar dva pozitivna *cis* regulatorna regiona -427/-219 i +67/+286 koja mogu da pojačavaju ekspresiju *cat* reporterskog gena nezavisno jedan od drugog. Dalja 5' delecija regiona -219/-100 (konstrukti *MscIR30* i *MscIR24*) dovodi do potpunog gubitka promotorske aktivnosti, ukazujući na prisustvo *cis* regulatornog elementa od esencijalne važnosti za transkripcionu aktivnost *SOX3* promotora. Takođe, 3' deleciona analiza ukazuje na prisustvo bitnog regulatornog elementa u okviru regiona od +27 do +67 *SOX3* promotora koji je neophodan za njegovu bazalnu aktivnost (Slika 10, uporediti konstrukte F17R24 i F17R22).



Slika 10. Funkcionalna analiza promotorskog regiona humanog *SOX3* gena. Promotor-reporterski konstrukti su predstavljeni sa leve strane. Brojevi prikazuju pozicije 5' i 3' krajeva ispitivanih promotorskih fragmenata u odnosu na *tsp* (označen kao +1). NT2/D1 ćelije su tranzijentno transfektovane ili sa praznim pBLCAT6 vektorom ili sa naznačenim *SOX3* promotor-reporterskim konstruktima. Vektor pBLCAT5 (koji sadrži timidin kinazni promotor uzvodno od *cat* gena) je služio kao pozitivna kontrola. Normalizovane CAT aktivnosti su predstavljene kao procenat aktivnosti F19R30 konstrukta kojoj je dodeljena vrednost 100%. Vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost \pm S.D. (standardna devijacija) iz najmanje tri nezavisne transfekcije. Vrednosti relativnih CAT aktivnosti su poređene u Studentovom *t*-testu. Vrednosti za koje je $p < 0.05$ su predstavljene jednom zvezdicom (*), a vrednosti za koje je $p < 0.001$ sa dve zvezdice (**).

Na osnovu izloženih rezultata može se primetiti da delecija F17R24 konstrukta i sa 5' kraja i sa 3' kraja (*MscIR24* i *F17R22*), dovodi do potpunog gubitka promotorske aktivnosti što nas navodi na zaključak da region -219/+67 sadrži regulatorne elemente neophodne za bazalnu transkripcionu aktivnost humanog *SOX3* gena te samim tim predstavlja njegov minimalni promotorski region. U skladu sa literaturnim podacima, minimalni promotorski region *SOX3* gena, obuhvata jezgro promotora kao i proksimalni promotorski region. Takođe, može se zaključiti da su regioni -427/-219 i +67/+286 koji sadrže pozitivne *cis* regulatorne elemente, mada neophodni za optimalnu, nisu od esencijalne važnosti za bazalnu promotorsku aktivnost *SOX3* gena.

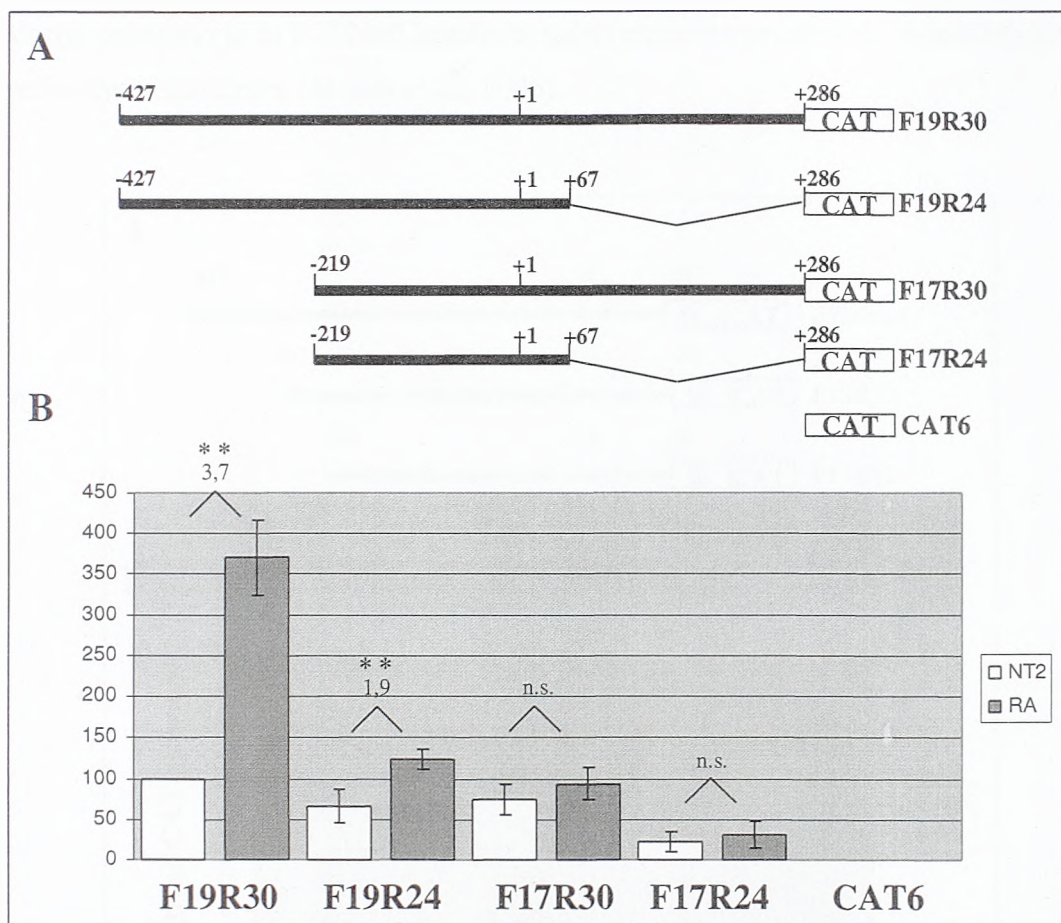
4.2.2 Identifikacija *cis* regulatornih elemenata uključenih u modulaciju transkripcije *SOX3* gena retinoičnom kiselinom

Jedna od karakteristika ranih faza neuralne diferencijacije NT2/D1 ćelija, indukovanih retinoičnom kiselinom, je aktivacija *SOX3* gena (Stevanovic, 2003). Nakon što su identifikovani minimalni promotor kao i dva pozitivna *cis* regulatorna regiona, neophodna za optimalnu promotorsku aktivnost *SOX3* gena, sledeći korak u ovoj analizi bila je identifikacija *cis* regulatornih elemenata odgovornih za aktivaciju *SOX3* gena retinoičnom kiselinom. U tu svrhu korišćene su dve vrste *SOX3* reporter konstrukata – promotor-zavisni reporter konstrukti koji su korišćeni za definisanje minimalnog promotorskog regiona kao i enhenser-zavisni reporter konstrukti, gde su fragmenti 5' nekodirajućeg regiona *SOX3* gena klonirani u pBLCAT5 vektor. Ovaj vektor sadrži promotor za timidin kinazu Herpes simplex virusa uzvodno od *cat* reporter gena i služi za analizu regiona koji potencijalno imaju enhensersku aktivnost (Boshart *et al.*, 1992).

Prvi korak u daljoj analizi bio je utvrđivanje efekta retinoične kiseline na aktivnost *SOX3* promotor-reporterskih konstrukata u NT2/D1 ćelijama. Korišćeni su konstrukti koji su u prethodnoj analizi pokazivali značajnu promotorsku aktivnost u neindukovanim NT2/D1 ćelijama (F19R30, F17R30, F19R24 i F17R24) (Slika 11A). Ovoga puta, aktivnost konstrukata praćena je, kako u neindukovanim, tako i u retinoičnom kiselinom indukovanim NT2/D1 ćelijama. Na Slici 11B se može videti da indukcija NT2/D1 ćelija retinoičnom kiselinom, dovodi do porasta CAT aktivnosti optimalnog promotorskog konstrukta (F19R30) od 3.7 puta. Takođe, delecije već okarakterisanih pozitivnih *cis* regulatornih regiona (-427/-219 i +67/+286) koje smanjuju promotorsku aktivnost u neindukovanim NT2/D1 ćelijama, smanjuju i odgovor *SOX3* promotora na retinoičnu kiselinu (Slika 11B).

Naime, delecija +67/+286 regiona (konstrukt F19R24) dovodi do pada u inducibilnosti sa 3.7 na 1.9 puta, što ukazuje da se u ovom pozitivnom *cis* regulatornom regionu nalaze regulatorni elementi koji doprinose inducibilnosti *SOX3* promotora. Ipak, i pored toga što odgovor F19R24 konstrukta na retinoičnu kiselinu pada 2 puta, njegova inducibilnost je i dalje značajna i iznosi skoro 2 puta. S druge strane, delecija -427/-219 regiona dovodi do gubitka inducibilnosti konstrukta F17R30, na osnovu čega bi se moglo zaključiti da se u ovom regionu nalaze *cis* regulatorni elementi neophodni za odgovor *SOX3* promotora na indukciju retinoičnom kiselinom. Drugo objašnjenje koje se nameće je da se elementi preko kojih retinoična kiselina ostvaruje svoju aktivatorsku ulogu nalaze raspoređeni duž *SOX3*

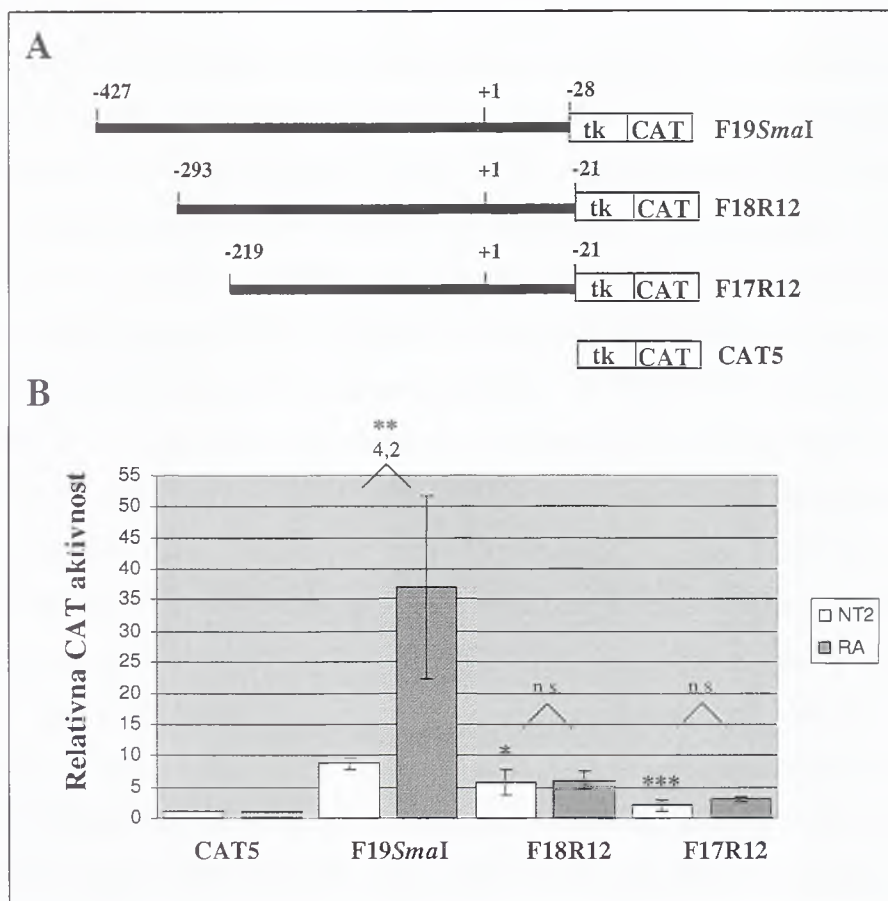
promotora. Naime, minimalnom promotorskom regionu *SOX3* gena (konstrukt F17R24) koji ne ispoljava inducibilnost, neophodna su oba regulatorna regiona, i -427/-219 i +67/+286, da bi ostvario pun odgovor na indukciju retinoičnom kiselinom (Slika 11B).



Slika 11. Identifikacija *cis* regulatornih regiona odgovornih za aktivaciju *SOX3* gena retinoičnom kiselinom. (A) Shematski prikaz promotora-reporterskih konstrukata korišćenih u funkcionalnoj analizi. (B) NT2/D1 ćelije su tranzijentno transfektovane ili sa F19R30 konstruktom ili sa naznačenim *SOX3* delecionim promotora-reporterskim konstruktima. Normalizovane CAT aktivnosti su predstavljene kao procenat aktivnosti F19R30 konstrukta kojoj je dodeljena vrednost 100% u neindukovanim ćelijama (NT2). Vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost \pm S.D. (standardna devijacija) iz najmanje tri nezavisna eksperimenta. Vrednosti relativnih CAT aktivnosti su poređene u Studentovom *t*-testu. Stepeni indukcije retinoičnom kiselinom (Δ) za koje je $p < 0.001$ su predstavljeni sa dve zvezdice (**). Rezultati koji nisu statistički značajni označeni su sa (n.s.).

Iako je bilo očigledno da je za inducibilnost *SOX3* gena odgovorno više elemenata raspoređenih duž promotora, region -427/-219 je bio predmet dalje analize s obzirom da je njegova delecija dovela do gubitka inducibilnosti *SOX3* reporter konstrukta pod dejstvom

retinoične kiseline. U cilju preciznijeg definisanja regiona odgovornog za inducibilnost *SOX3* promotora retinoičnom kiselinom korišćena su tri enhenser-zavisna reporter konstrukta F19*SmaI* (-427/-28), F18R12 (-293/-21) i F17R12 (-219/-21) gde su navedeni regioni *SOX3* promotora klonirani u pBLCAT5 vektor (Slika 12A). U prethodnoj studiji, urađenoj u našoj laboratoriji, pokazano je da F19*SmaI* konstrukt sadrži elemente neophodne za indukciju *SOX3* gena retinoičnom kiselinom (Mojsin *et al.*, 2006).

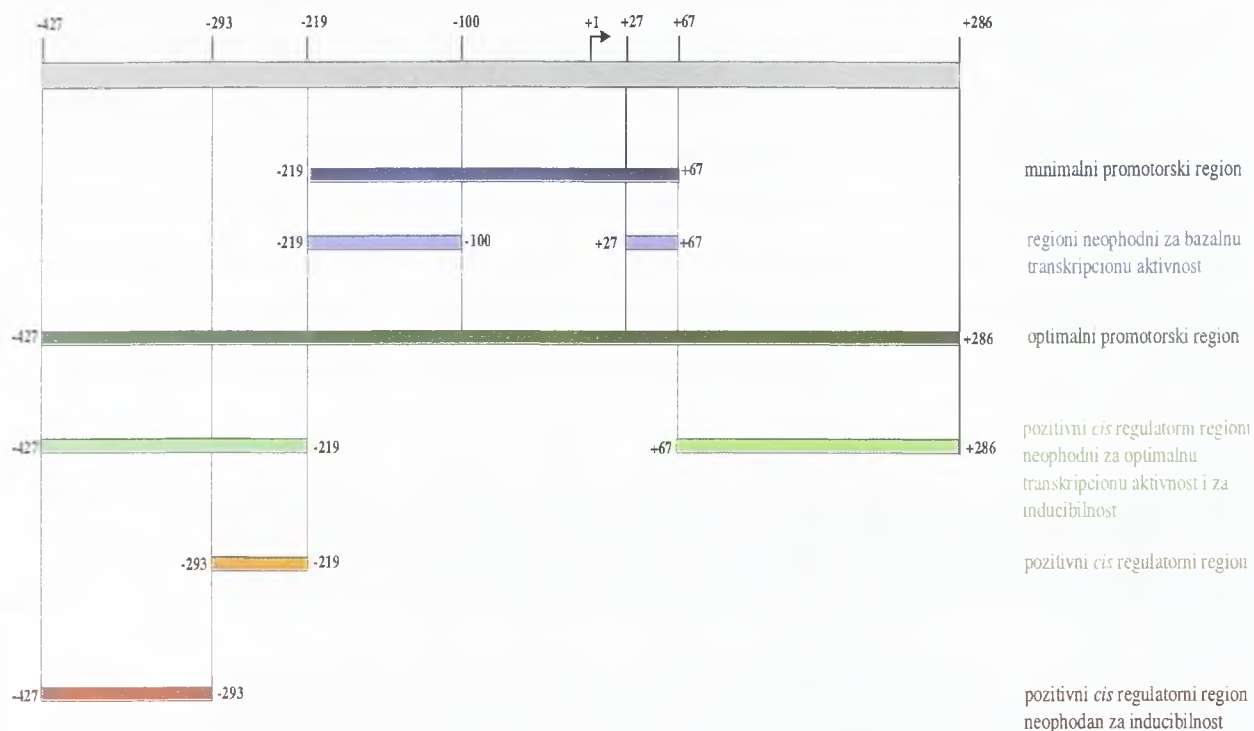


Slika 12. Deleciona analiza – identifikacija regiona odgovornog za inducibilnost *SOX3* gena. (A) Shematski prikaz enhenser-zavisnih reporterskih konstrukata korišćenih u funkcionalnoj analizi. (B) NT2/D1 ćelije su tranzijentno transfektovane ili sa praznim pBLCAT5 vektorom (koji je služio za normalizaciju) ili sa naznačenim *SOX3* enhenser-zavisnim reporterskim konstruktima. Vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost ± S.D. (standardna devijacija) iz četiri nezavisna eksperimenta. Vrednosti relativnih CAT aktivnosti su poređene u Studentovom *t*-testu. Vrednosti za koje je $p < 0.05$ su predstavljene jednom zvezdicom (*), a vrednosti za koje je $p < 0.001$ su predstavljene sa tri zvezdice (***). Stepen indukcije (Δ) retinoičnom kiselinom za koji je $p < 0.01$ je predstavljen sa dve zvezdice (**). Rezultati koji nisu statistički značajni označeni su sa (n.s.).

Kao što se sa Slike 12B može videti, u neindukovanim NT2/D1 ćelijama F19SmaI konstrukt dovodi do porasta CAT aktivnosti od preko 8 puta u odnosu na kontrolni pBLCAT5 vektor, a tokom indukcije retinoičnom kiselinom dolazi do dodatnog porasta *cat* reporterske aktivnosti od 4.2 puta. Kada je deletiran region -427/-219 (konstrukt F17R12) došlo je do pada reporterske aktivnosti na 22% u netretiranim (nediferenciranim) NT2/D1 ćelijama kao i do gubitka inducibilnosti konstrukta, što je u skladu sa prethodnim rezultatima dobijenim korišćenjem promotor-zavisnih reporter konstrukata (uporediti F17R24 sa Slike 11B i F17R12 sa Slike 12B).

Na Slici 12B se može videti da 5' delecija do pozicije -293 dovodi do pada reporterske aktivnosti na oko 60% u neindukovanim NT2/D1 ćelijama, ali i do gubitka inducibilnosti konstrukta. Dobijeni rezultati ukazuju na to da se u okviru -427/-293 regiona nalaze regulatorni elementi od esencijalne važnosti za indukciju *SOX3* promotora retinoičnom kiselinom. Takođe, može se zaključiti da je region -293/-219 važan za aktivnost *SOX3* promotora u neindukovanim NT2/D1 ćelijama, s obzirom da delecija ovog regiona dovodi do pada aktivnosti od tri puta (Slika 12B, uporediti F18R12 i F17R12 u NT2, $p < 0.05$).

Na Slici 13. su predstavljeni sumirani rezultati koji su dobijeni funkcionalnom analizom promotorskog regiona *SOX3* gena. Definisana je minimalan promotorski region neophodan za bazalnu transkripcionu aktivnost humanog *SOX3* gena (-219/+67). U okviru minimalnog promotora identifikovana su dva *cis* regulatorna regiona koja su od esencijalne važnosti za njegovu aktivnost (-219/-100 i +27/+67). Takođe, definisana su i dva regulatorna regiona, -427/-219 i +67/+286, koja su neophodna za optimalnu, ali nisu od esencijalne važnosti za bazalnu promotorsku aktivnost *SOX3* gena. Ova dva regiona su, takođe, bitna i za odgovor *SOX3* promotora na indukciju retinoičnom kiselinom. Dalja preciznija analiza je ukazala na to da fragment -293/-219 ima ulogu pozitivnog *cis* regulatornog regiona kao i da je -427/-293 region neophodan za inducibilnost *SOX3* promotora.



Slika 13. Shematski prikaz rezultata funkcionalne analize humanog *SOX3* promotora. Pozicije minimalnog i optimalnog promotorskog regiona kao i identifikovanih *cis* regulatornih regiona su obeležene u odnosu na *tsp SOX3* gena.

4.3. Analiza minimalnog promotorskog regiona humanog *SOX3* gena

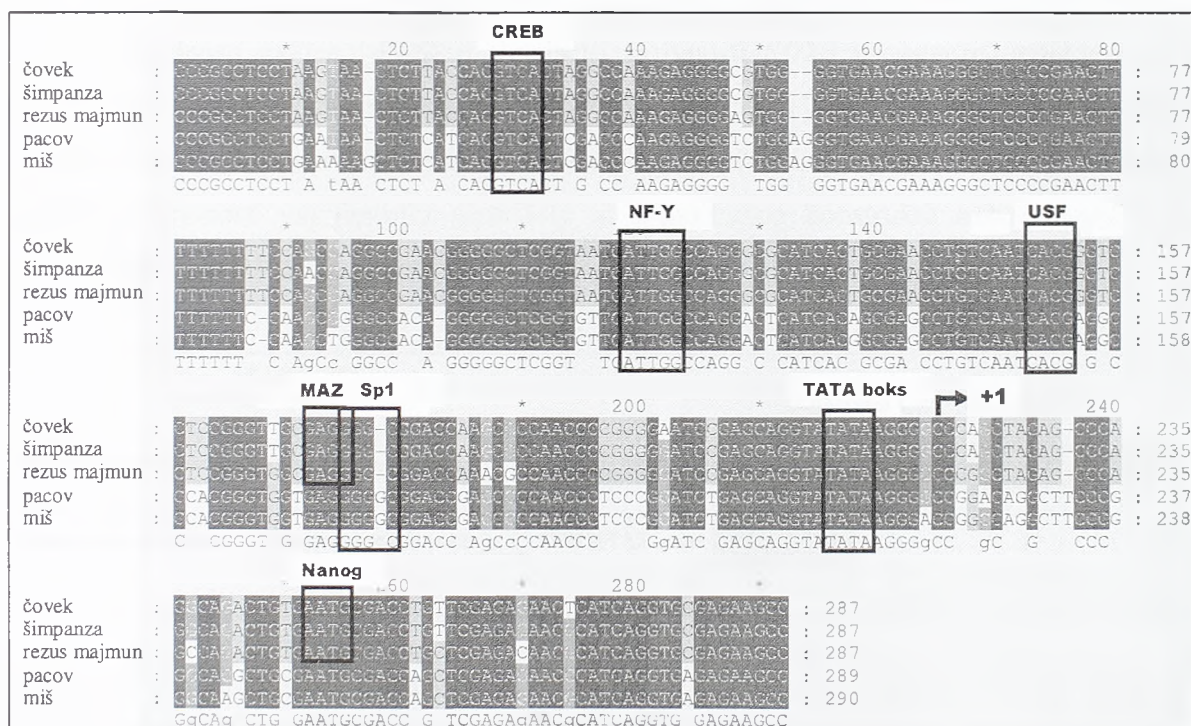
4.3.1 *In silico* analiza minimalnog promotorskog regiona *SOX3* gena i poređenje sa ortolozima sisara

Sledeći korak u ovom istraživanju bila je identifikacija transkripcionih faktora koji se vezuju za minimalni promotor *SOX3* gena i ispitivanje njihove uloge u regulaciji aktivnosti ovog promotora. U tu svrhu, korišćen je kompjuterski program MatInspector (*Cartharius et al.*, 2005) pomoću koga je analizirano prisustvo potencijalnih mesta za vezivanje transkripcionih faktora u minimalnom promotorskom regionu, uz kriterijum da verovatnoća vezivanja transkripcionog faktora za ispitivanu sekvencu bude 1.0.

Ovom analizom identifikovani su, kako opšti, tako i transkripcioni faktori koji su tkivno-specifični ili specifični za određene ćelijske procese. Na Slici 14. su shematski prikazana odabrana potencijalna vezivna mesta za opšte transkripcione faktore uključujući

USF (upstream stimulatory factor), Sp1 (specificity protein 1), NF-Y (nuclear factor Y), MAZ (*Myc*-associated zinc finger protein), CREB (cAMP response element binding protein) i Nanog.

Paralelno sa analizom prisustva potencijalnih regulatornih motiva, minimalni promotorski region *SOX3* gena upoređen je sa odgovarajućim sekvencama ortologa *Sox3* gena kod sisara (šimpanza, rezus majmun, miš i pacov). Poređenje sekvenci *SOX3* ortologa je ukazalo na izuzetno visok stepen identičnosti nukleotidne sekvence između čoveka i ostalih vrsta koja se kreće od 98% kod šimpanze do 81% kod miša.



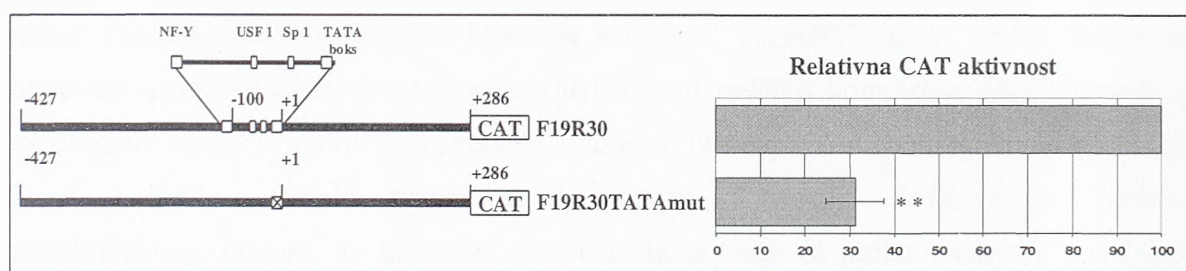
Slika 14. Nukleotidna sekvenca minimalnog promotorskog regiona humanog *SOX3* gena i poređenje sa ortolognim sekvencama šimpanze, rezus majmuna, pacova i miša. Pozicija starta transkripcije označena je kao +1. Zasenčena sekvenca označava nukleotide koji su identični za sve ortologe promotora. Konsenzusne sekvence odabranih potencijalnih mesta vezivanja transkripcionih faktora identifikovane programom MatInspector su obeležene nazivom transkripcionog faktora a njihova evolutivna očuvanost je označena pravougaonicima sa punom linijom.

Takođe, poređenje sekvenci čoveka, šimpanze, rezus majmuna, pacova i miša pokazalo je da su mesta za vezivanje Sp1, USF, NF-Y, TATA binding proteina (TBP) i CREB proteina, očuvana i po nukleotidnom sastavu i po poziciji u promotorskim regionima, kod svih analiziranih ortologa (Slika 14) (Kovacevic-Grujicic et al., 2008a). Ovi rezultati su

ukazali na potencijalni funkcionalni značaj mesta za vezivanje ovih opštih transkripcionih faktora, kao i TATA motiva u regulaciji ekspresije *SOX3* gena. Na osnovu dobijenih rezultata, dalji cilj je bio detaljnije ispitivanje uloge navedenih pet regulatornih motiva u transkripcionoj regulaciji *SOX3* gena.

4.3.2 Analiza uticaja mutacije TATA boksa na bazalnu transkripcionu aktivnost *SOX3* promotora

Da bi se ispitao funkcionalni značaj TATA boksa koji je detektovan na neuobičajenoj poziciji u odnosu na *tsp* (-9/-5) u regulaciji aktivnosti *SOX3* promotora, generisan je i analiziran promotor-reporterski konstrukt koji nosi mutaciju u TATA boks. Ova mutacija je uvedena u optimalni promotorski konstrukt F19R30 (-427/+286), a efekat mutacije je praćen analizom aktivnosti *cat* reporter gena kod *wt* i mutiranog konstrukta nakon tranzijentne transfekcije NT2/D1 ćelija (Slika 15).



Slika 15. Analiza uticaja mutacije TATA motiva na aktivnost *SOX3* promotora. NT2/D1 ćelije su transfektovane ili sa *wt* F19R30 ili sa mutiranim konstruktom, a efekat mutacije je praćen analizom aktivnosti *cat* reporter gena. Na shematičanom dijagramu sa leve strane mutirani TATA motiv je prikazan kao precrtni kvadrat. Normalizovana CAT aktivnost je predstavljena kao procenat aktivnosti *wt* F19R30 konstrukta kojoj je dodeljena vrednost 100%. Vrednost je predstavljena kao srednja vrednost \pm S.D. (standardna devijacija) iz najmanje tri nezavisna eksperimenta. Vrednosti relativnih CAT aktivnosti su poredene u Studentovom *t*-testu. Vrednost za koju je $p < 0.001$ je predstavljena sa dve zvezdice (**).

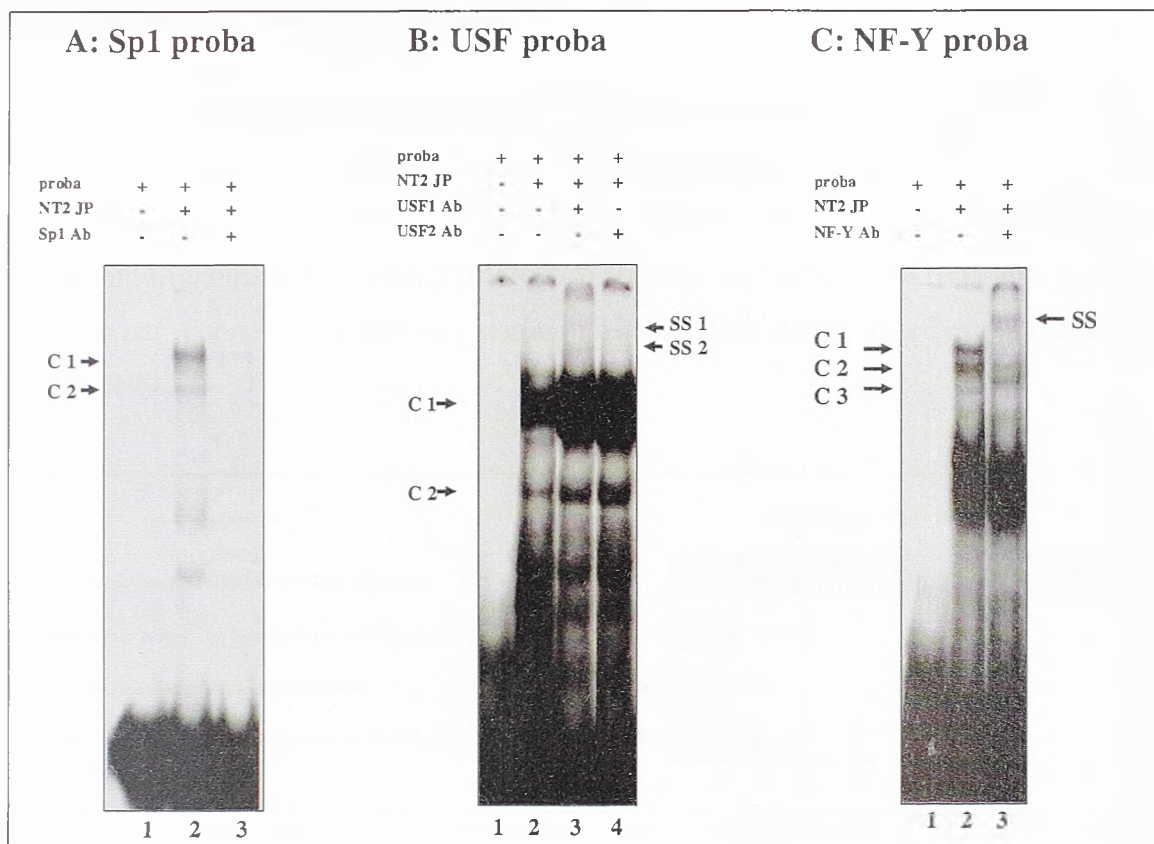
Kao što se može videti na Slici 15., mutacija TATA boksa dovela je do pada CAT aktivnosti na oko 30% u odnosu na *wt* F19R30 konstrukt. Ovaj rezultat potvrđuje funkcionalni značaj TATA boksa koji nije na uobičajenoj poziciji u odnosu na *tsp* *SOX3* gena.

4.3.3 Interakcije Sp1, USF i NF-Y vezivnih mesta sa jedarnim proteinima NT2/D1 ćelija

Dalja analiza potencijalnih vezivnih mesta za opšte transkripcione faktore Sp1, USF i NF-Y u okviru minimalnog *SOX3* promotora išla je u pravcu identifikacije proteina koji se za njih vezuju. Interakcije ovih mesta i jedarnih proteina iz NT2/D1 ćelija ispitivane su u esejima smanjene elektroforetske pokretljivosti, EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay). Generisane su dvolančane oligonukleotidne probe, označene kao Sp1, USF i NF-Y, koje su u sebi obuhvatale potencijalna vezivna mesta za ove faktore (sekvence proba su date u poglavlju Materijal i metode).

Interakcija Sp1 probe (sadrži GGCG sekvencu *SOX3* promotora na poziciji -48/-45) i jedarnih proteina poreklom iz NT2/D1 ćelija dovodi do pojave dva protein-DNK kompleksa označenih kao C1 i C2 (Slika 16A, kolona 2). U cilju identifikacije proteina prisutnih u formiranim kompleksima na Sp1 probi urađena je "superšift" analiza korišćenjem antitela na Sp1. "Superšift" reakcija je dovela do inhibicije formiranja, odnosno "hlađenja" oba kompleksa (Slika 16A, kolona 3) što ukazuje da se Sp1 specifično vezuje za GGCG motiv u okviru humanog *SOX3* promotora. Upotreba antitela u "superšift" analizi obično dovodi do dodatnog smanjenja elektroforetske pokretljivosti protein-DNK kompleksa, ali u literaturi su zabeleženi i slučajevi inhibicije formiranja, odnosno "hlađenja" kompleksa (*Won et al.*, 2002). Naime, ukoliko antitelo specifično prepoznaje i vezuje DNK-vezujući domen transkripcionog faktora, on neće biti sposoban da se veže za probu i izazove formiranje kompleksa sporije elektroforetske pokretljivoosti, već će doći do "hlađenja" kompleksa.

Inkubacija USF probe (sadrži modifikovan E-boks motiv – CACGGG u okviru *SOX3* promotora na poziciji -71/-68) sa jedarnim proteinima iz NT2/D1 ćelija dovodi do pojave dva protein-DNK kompleksa označena kao C1 i C2 (Slika 16B, kolona 2). S obzirom da postoje dva člana USF familije transkripcionih faktora, USF1 i USF2, u "superšift" analizi su korišćena antitela i na USF1 i na USF2 protein (Slika 16B, kolone 3 i 4). Kao što se na Slici 16B može videti, do pojave "superšifta" i to u vidu dva kompleksa (SS1 i SS2) dolazi samo u prisustvu antitela na USF1 protein. Paralelno, ova reakcija je praćena pojačanjem inteziteta DNK-protein kompleksa C1 i C2 u prisustvu antitela, što je pojava koja je već opisana u literaturi. Naime, vezivanje antitela može da indukuje takve konformacione promene ciljnih proteina tako da se dobijeni kompleks vezuje za ciljnu sekvencu sa većim afinitetom nego sam protein (*Carreira et al.*, 2000). Pojava "superšift" kompleksa u prisustvu antitela na USF1 ukazuje da se ovaj transkripcioni faktor specifično vezuje za E-boks u okviru *SOX3* promotora.

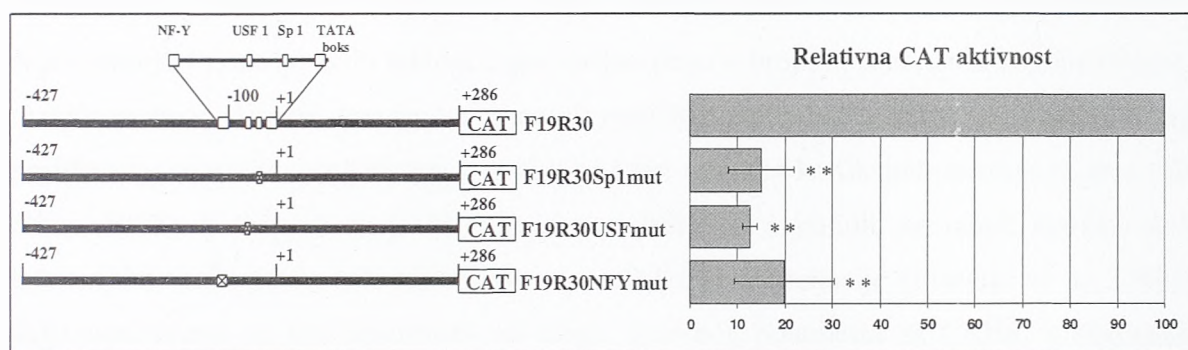


Slika 16. EMSA reakcije sa vezivnim mestima za Sp1, USF i NF-Y iz *SOX3* promotora. Oligonukleotidne probe za Sp1 (A), USF (B) i NF-Y (C) su inkubirane sa jedarnim proteinima NT2/D1ćelija (NT2 JP) (kolone 2). Za "superšift" reakcije korišćena su antitela na Sp1 (A, kolona 3), USF1 (B, kolona 3), USF2 (B, kolona 4) i NF-Y (C, kolona 3). DNK-protein kompleksi (C) su označeni strelicama dok su kompleksi dobijeni u reakcijama "superšifta" označeni strelicama i obeleženi sa SS.

S obzirom da se u okviru minimalnog promotora *SOX3* gena nalazi i potencijalno vezivno mesto za NF-Y (sekvenca CCAAT na nekodirajućem lancu, na poziciji -105/-101), ispitivane su interakcije jedarnih proteina iz NT2/D1 ćelija sa *SOX3* probom koja obuhvata ovo vezivno mesto (Slika 16C). EMSA reakcija je rezultovala formiranjem tri protein-DNK kompleksa označena kao C1, C2 i C3 (Slika 16C, kolona 2). Korišćenje antitela na NF-Y u EMSA reakciji dovelo je do pojave kompleksa sporije elektroforetske pokretljivosti - "superšifta" (SS) (Slika 16C, kolona 3), što ukazuje da se NF-Y specifično vezuje za CCAAT boks u okviru *SOX3* promotora na poziciji -105/-101.

4.3.4 Analiza uticaja mutacija vezivnih mesta za Sp1, USF i NF-Y na bazalnu transkripcionu aktivnost *SOX3* promotora

Da bi se ispitao funkcionalni značaj ispitivanih vezivnih mesta za Sp1, USF i NF-Y kao i TATA boksa u regulaciji aktivnosti *SOX3* promotora, generisani su i analizirani promotor-reporterski konstrukti koji nose mutacije u ovim mestima. Ove mutacije su uvedene u optimalni promotorski konstrukt F19R30 (-427/+286). Efekat mutacija praćen je analizom aktivnosti *cat* reporter gena kod *wt* i mutiranih konstrukata nakon tranzijentne transfekcije NT2/D1 ćelija.



Slika 17. Analiza uticaja mutacija Sp1, USF i NF-Y motiva na aktivnost *SOX3* promotora. NT2/D1 ćelije su transfektovane ili sa *wt* F19R30 ili sa konstruktima koji nose odgovarajuće mutacije a efekat mutacija je praćen analizom aktivnosti *cat* reporter gena. Na shematizovanom dijagramu sa leve strane mutirani motivi su prikazani kao precrtani pravougaonici. Normalizovane CAT aktivnosti su predstavljene kao procenat aktivnosti *wt* F19R30 konstrukta kojoj je dodeljena vrednost 100%. Vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost \pm S.D. (standardna devijacija) iz najmanje tri nezavisna eksperimenta. Vrednosti relativnih CAT aktivnosti su poređene u Studentovom *t*-testu. Vrednosti za koje je $p < 0.001$ su predstavljene sa dve zvezdice (**).

Kao što se može videti na Slici 17., mutagenezom vezivnih mesta za Sp1, USF1 i NF-Y utvrđeno je da sva tri regulatorna motiva igraju značajnu ulogu u transkripcionoj regulaciji *SOX3* gena. Naime, mutacije u okviru Sp1, USF1 i NF-Y mesta dovode do pada aktivnosti *cat* reporterskog gena na 15%, 12% odnosno 20% u odnosu na *wt* F19R30 konstrukt (Slika 17). Na osnovu ovih rezultata može se zaključiti da su sva tri analizirana motiva u minimalnom promotorskom regionu neophodna za bazalnu aktivnost *SOX3* promotora, i da su transkripcioni faktori, Sp1, USF1 i NF-Y uključeni u transkripcionu regulaciju ekspresije ovog gena.

4.3.5 Uloga CREB transkripcionog faktora u transkripcionoj regulaciji *SOX3* gena

Različite studije su pokazale da je transkripcioni faktor CREB važan za proliferaciju i diferencijaciju nervnih ćelija (*Dawson and Ginty, 2002; Lonze and Ginty, 2002; Sung et al., 2001*). Prethodnom *in silico* analizom minimalnog promotorskog regiona *SOX3* gena pokazano je prisustvo evolutivno očuvanog polumesta za vezivanje CREB transkripcionog faktora (5' CGTCA 3') na poziciji -195/-191 u odnosu na *tsp* (Slika 14). Podaci u literaturi ukazuju da je CREB protein sposoban da se veže kako za palindromsku sekvencu (5' TGACGTCA 3') tako i za polumesto (5' CGTCA 3') i na taj način aktivira ciljne gene (*Mayr and Montminy, 2001; Nichols et al., 1992*). CREB spada u bZIP (basic leucine zipper) superfamiliju transkripcionih faktora i igra važnu ulogu u brojnim procesima koji karakterišu razviće nervnog sistema, kao što su opstanak različitih subtipova neurona (neuroprotekcija), proliferacija neuralnih progenitora, rast aksona i rast dendrita kortikalnih neurona (*Lonze and Ginty, 2002*). S obzirom da je *SOX3/Sox3* gen jedan od najranijih neuralnih markera kod kičmenjaka, koji determiniše neuronalni tip ćelijske diferencijacije (*Brunelli et al., 2003*) dalja istraživanja su bila fokusirana na ulogu vezivnog polumesta za CREB, u regulaciji ekspresije *SOX3* gena u NT2/D1 ćelijskoj liniji.

4.3.5.1 Interakcije potencijalnog vezivnog polumesta za CREB u okviru minimalnog promotora *SOX3* gena sa jedarnim proteinima NT2/D1 ćelija

Prvi korak u karakterizaciji konsenzusne sekvence za vezivanje transkripcionog faktora CREB išla je u pravcu ispitivanja potencijalnih interakcija ovog mesta sa jedarnim proteinima NT2/D1 ćelija. U EMSA reakcijama korišćena je obeležena, dvolančana DNK proba F3R3 koja sadrži potencijalno vezivno polumesto za CREB na poziciji -195/-191, kao i proba CREBmut kojoj je narušeno ovo vezivno mesto (Slika 18A). Obe probe su inkubirane sa jedarnim proteinima neindukovanih NT2/D1 ćelija, a dobijeni rezultati su predstavljeni na Slici 18B.

EMSA reakcija sa probom F3R3 rezultovala je formiranjem jednog DNK-protein kompleksa (Slika 18B, kolona 2). Detektovani kompleks je rezultat specifičnog vezivanja proteina za F3R3 probu s obzirom da pri kompeticiji sa neobebeženom probom dolazi do gubitka ("hlađenja") kompleksa (kolona 3). Da bi se utvrdilo da li se za ispitivanu sekvencu vezuje CREB protein rađena je i kompeticija sa komercijalno dostupnim oligonukleotidom

koji sadrži konsenzusno mesto za CREB, kao i sa probom u kojoj je mutirano potencijalna vezivno polumesto na poziciji -195/-191 (CREBmut).

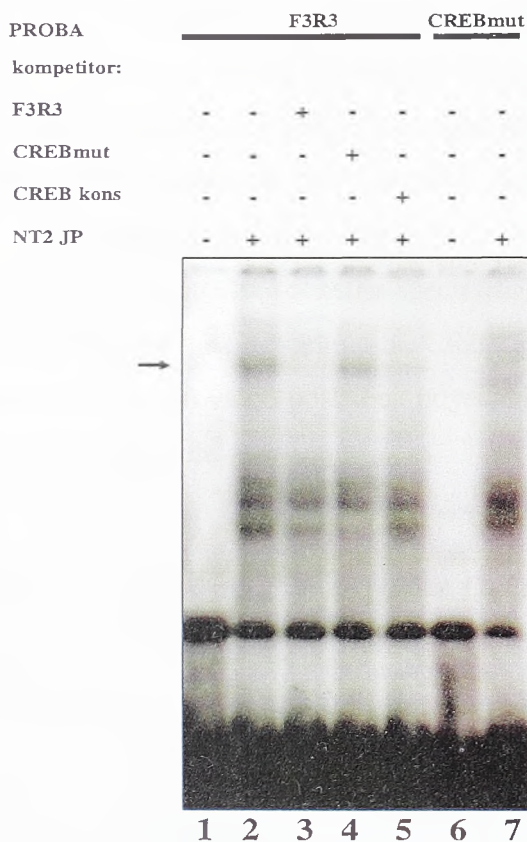
A

-208 CREB -177

5' G T A A C T C T T A C C A C G T C A C T A G G C C A A A G A G G 3' F3R3

5' G T A A C T C T T A C C A G T T A A C T A G G C C A A A G A G G 3' CREBmut

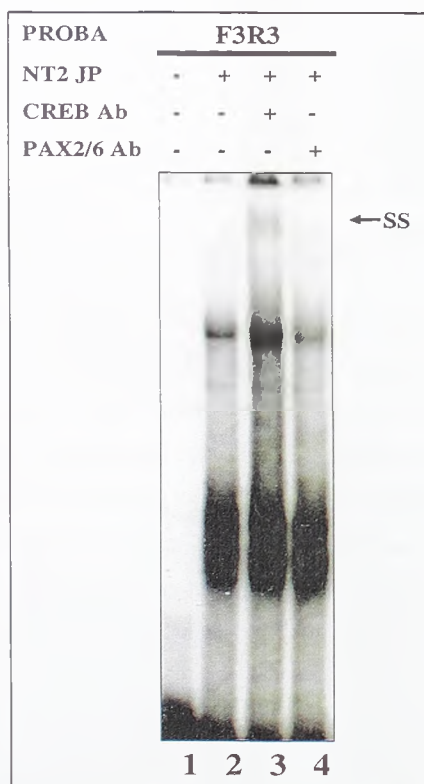
B



Slika 18. EMSA reakcije sa probom F3R3 koja sadrži potencijalno CREB vezivno polumesto. (A) Sekvence F3R3 probe i mutiranog oligonukleotida CREBmut. Vezivno polumesto za CREB (-195/-191) je zasenčeno, a mutirani nukleotidi su podvučeni i neosenčeni. (B) EMSA reakcije F3R3 i CREBmut probama i jedarnim proteinima iz neindukovanih NT2/D1 ćelija (kolone 2, 3, 4, 5, 7). Kompeticija je urađena preinkubacijom proteina sa naznačenim neobeležnim *w* ili mutiranim probama u 100 puta većem molarnom odnosu (kolone 3 – 5). Kompleks koji se formira sa probama je označen strelicom.

Kompeticija sa probom CREBmut nije dovela do "hlađenja" DNK-protein kompleksa, ukazujući na to da je mutacija u CREB polumestu dovela do gubitka afiniteta mutirane probe za vezivanje proteina (Slika 18, kolona 4). U skladu sa ovim rezultatima, konsenzusni oligonukleotid za CREB je uspešno kompetirao za vezivanje za jedarne proteine ukazujući da je u detektovanom proteinskom kompleksu prisutan CREB protein (kolona 5). U EMSA reakciji gde je kao proba korišćen CREBmut, dolazi do gubitka specifičnog DNK-protein kompleksa što dodatno potvrđuje da se za CREB polumesto u okviru *SOX3* promotora vezuje CREB protein (kolona 7).

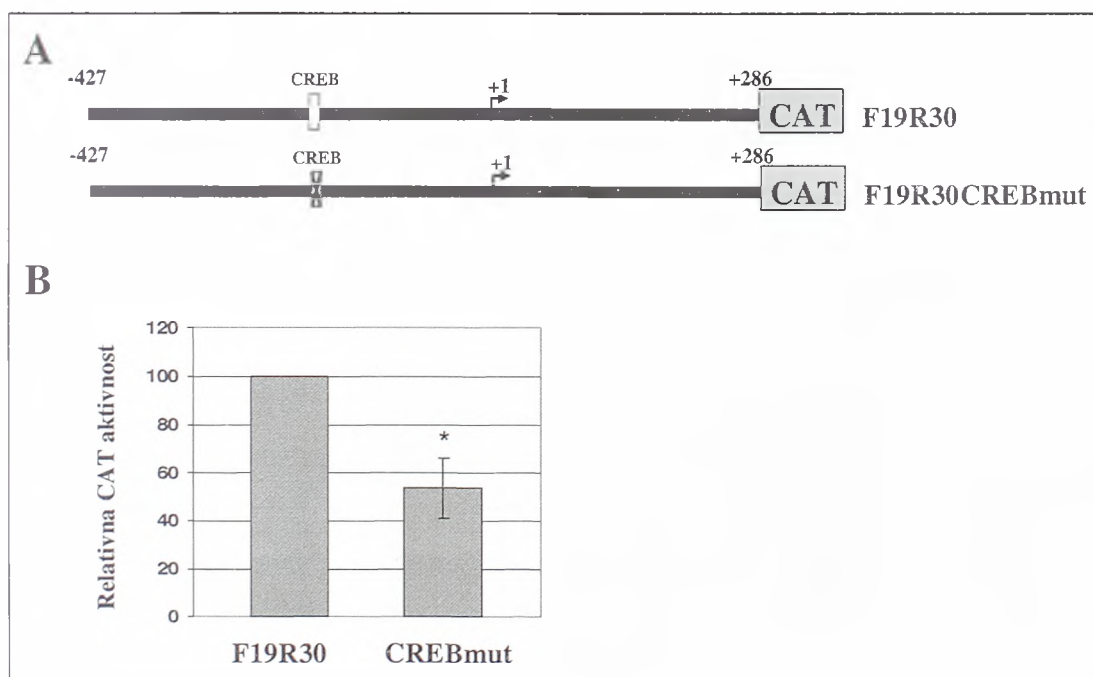
Da bi dalje potvrdili prisustvo CREB proteina u kompleksu formiranom sa F3R3 probom urađen je "superšift" eksperiment sa antitelima na CREB. Kao što se može videti na Slici 19., antitelo na CREB dovelo je do pojave kompleksa sporije elektroforetske pokretljivosti ("superšifta") ukazujući na specifično prisustvo CREB transkripcionog faktora u kompleksu formiranom sa probom F3R3 (kolona 3). Dodavanje kontrolnog antitela na PAX2/6 nije dovelo do promene elektroforetske pokretljivosti formiranih kompleksa (Slika 19, kolona 4) što je dodatno potvrdilo specifičnost vezivanja CREB proteina za F3R3 probu. U reakciji "superšifta" sa antitelima na CREB primetno je povećanje inteziteta formiranog kompleksa, koje je verovatno posledica povećanja afiniteta jedarnih proteina za vezivanje za DNK u prisustvu antitela.



Slika 19. EMSA i "superšift" reakcije sa F3R3 probom. F3R3 proba je inkubirana sa jedarnim proteinima iz NT2/D1 ćelija (kolone 2 - 4). Za "superšift" reakcije korišćena su antitela na CREB (kolona 3) a kao kontrola korišćena su antitela na PAX2/6 (kolona 4). Kompleks dobijen u reakciji "superšifta" je označen strelicom i obeležen sa SS.

4.3.5.2 Analiza uticaja mutacije CREB vezivnog polumesta na bazalnu transkripcionu aktivnost *SOX3* promotora

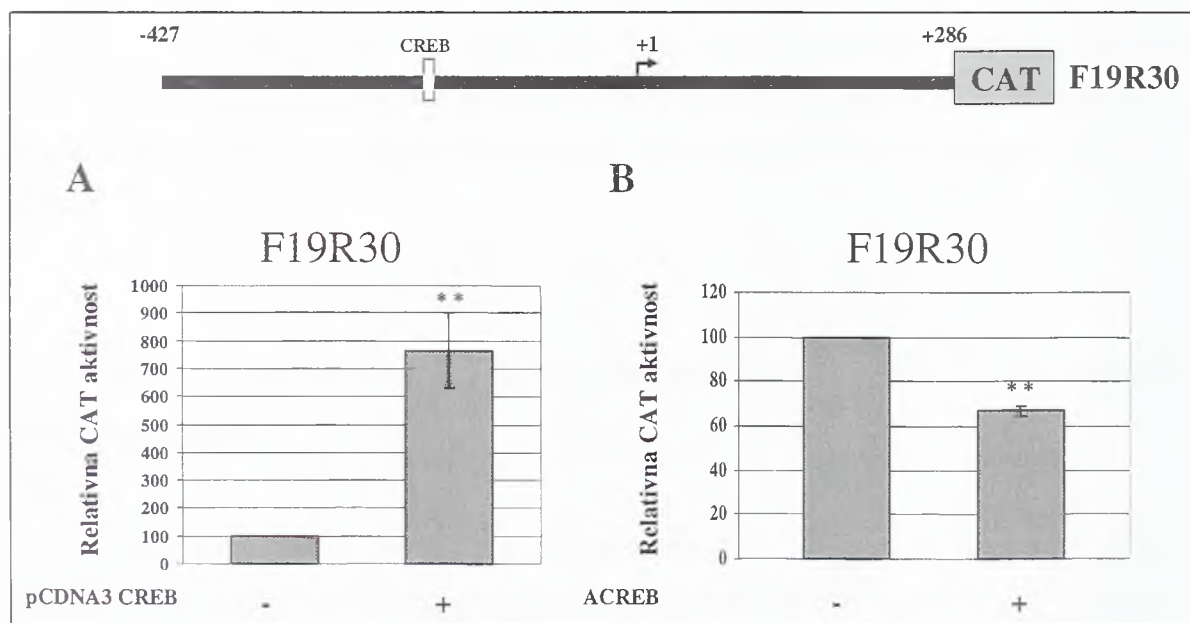
Da bi potvrdili funkcionalni značaj CREB vezivnog polumesta na poziciji -195/-191 u promotor-reporterski konstrukt F19R30 uvedena je mutacija koja narušava ovo vezivno mesto i dovodi do gubitka sposobnosti vezivanja CREB proteina (Slika 20A). Efekat mutacije praćen je analizom aktivnosti *cat* reporter gena kod *wt* i mutiranog konstrukta nakon tranzijentne transfekcije NT2/D1 ćelija. Na Slici 20B se može videti da je mutacija CREB polumesta (-195/-191) dovela do pada promotorske aktivnosti na 53% u odnosu na *wt* F19R30 konstrukt. Ovaj pad *cat* reporterske aktivnosti ukazuje na funkcionalni značaj CREB polumesta u regulaciji bazalne transkripcione aktivnosti *SOX3* gena u NT2/D1 ćelijama.



Slika 20. Analiza uticaja mutacije CREB polumesta na poziciji -195/-191 na aktivnost *SOX3* promotora. (A) Shematski prikaz *wt* F19R30 i mutiranog konstrukta kojem je narušeno mesto za vezivanje CREB proteina. (B) NT2/D1 ćelije su transfektovane ili sa *wt* F19R30 ili sa CREBmut konstruktom, a efekat mutacije je praćen analizom aktivnosti *cat* reporter gena. Normalizovana CAT aktivnost je predstavljene kao procenat aktivnosti *wt* F19R30 konstrukta kojoj je dodeljena vrednost 100%. Vrednost je predstavljena kao srednja vrednost \pm S.E.M. (standard error mean - standardna greška) iz četiri nezavisna eksperimenta. Vrednosti relativnih CAT aktivnosti su poređene u Studentovom *t*-testu. Vrednost za koju je $p < 0.05$ je predstavljena jednom zvezdicom (*).

4.3.5.3 Efekat povećane ekspresije transkripcionog faktora CREB na aktivnost *SOX3* promotora u NT2/D1 ćelijama

S obzirom da je utvrđeno da se CREB protein vezuje za evolutivno očuvano polumesto u okviru minimalnog *SOX3* promotora, kao i da mutacija tog motiva dovodi do pada bazalne promotorske aktivnosti *SOX3* gena, sledeći korak je bio da se dokaže aktivatorska uloga CREB proteina u regulaciji ekspresije *SOX3* gena. U tu svrhu, rađeni su eksperimenti tranzijentne kotransfekcije NT2/D1 ćelija uz korišćenje F19R30 promotor-reporterskog konstrukta i ekspresionog vektora za CREB. Na Slici 21A se može videti da je ekspresija egzogenog CREB proteina dovela do povećanja CAT aktivnosti reporterskog konstrukta od skoro 8 puta. Dobijeni rezultati pokazuju da je CREB snažan pozitivni regulator ekspresije *SOX3* gena.



Slika 21. CREB je pozitivni regulator bazalne transkripcione aktivnosti *SOX3* promotora. Efekat povećane ekspresije CREB proteina (A) i dominantno negativnog inhibitora CREB (A-CREB) (B) na aktivnost *SOX3* promotora. NT2/D1 ćelije su, pored F19R30 konstrukta, transfektovane ili odgovarajućim kontrolnim praznim ekspresionim vektorom ili ekspresionim vektorom za CREB (A) ili A-CREB (B). Normalizovane CAT aktivnosti su predstavljene kao procenat aktivnosti F19R30 konstrukta kotransfektovanog kontrolnim vektorom kojoj je dodeljena vrednost 100%. Vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost \pm S.E.M. (standard error mean- standardna greška) iz najmanje tri nezavisna eksperimenta. Vrednosti relativnih CAT aktivnosti su poređene u Studentovom *t*-testu. Vrednosti za koje je $p \leq 0.001$ su predstavljene sa dve zvezdice (**).

4.3.5.4 Analiza efekta dominantno negativnog inhibitora CREB proteina na aktivnost *SOX3* promotora

Da bi dodatno potvrdili da CREB direktno reguliše transkripciju *SOX3* gena, u eseju kotransfekcije je korišćen dominantno negativni inhibitor CREB proteina tj. ekspresioni vektor A-CREB (Ahn *et al.*, 1998). Ovaj dominantno negativni inhibitor, koji selektivno inhibira vezivanje CREB proteina za DNK, sadrži kiseli amfipatični polipeptid kojim je zamenjen endogeni bazni region CREB proteina i koji je fuzionisan sa njegovim dimerizacionim domenom (leucinskim rajsfešlusom). Kiseli amfipatični region A-CREB proteina, elektrostatički imitira DNK i formira "coiled-coil" strukturu sa baznim regionom endogenog CREB proteina onemogućavajući mu da se veže za konsenzusnu sekvencu i ostvari svoju funkciju (Ahn *et al.*, 1998). Rezultati ovog eksperimenta su prikazani na Slici 21B.

Ekspresija dominantno negativnog inhibitora A-CREB rezultovala je padom bazalne promotorske aktivnosti na oko 60% (Slika 21B). Ovaj rezultat potvrđuje prethodno dobijene rezultate da CREB igra ulogu pozitivnog regulatora i ukazuje na to da endogeni, konstitutivno prisutan CREB ima ulogu u regulaciji bazalne transkripcione aktivnosti *SOX3* gena u NT2/D1 ćelijama.

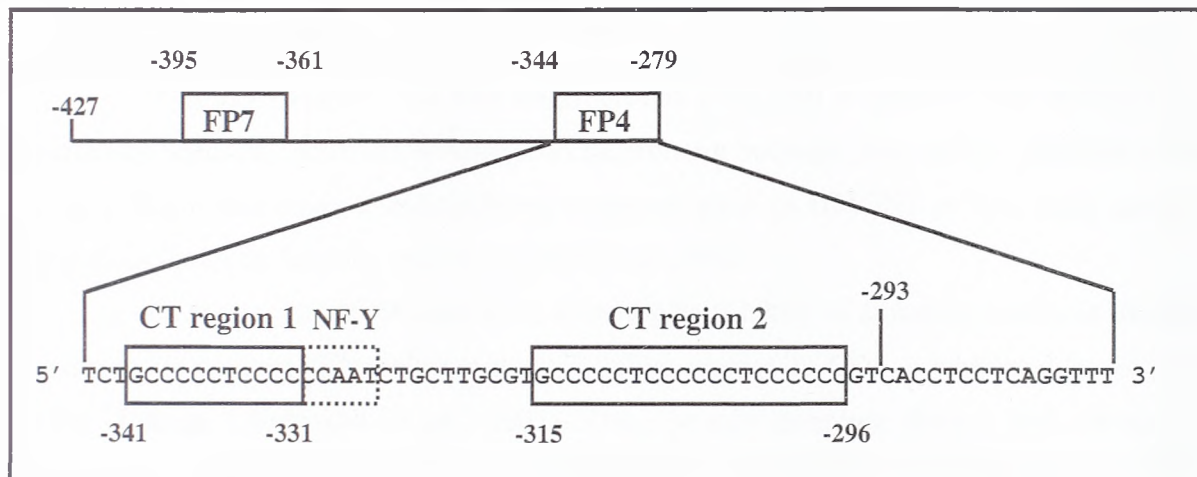
4.4 Analiza *cis* regulatornog regiona na poziciji -427/-293 u humanom *SOX3* promotoru

S obzirom da je u prethodnim eksperimentima u ovom radu definisan region odgovoran za indukciju *SOX3* gena retinoičnom kiselinom (-427/-293) (Slike 12 i 13), sledeći korak je bio da se identifikuju sekvence u okviru ovog regiona koje interaguju sa jedarnim proteinima NT2/D1 ćelija. U prethodnoj studiji u našoj laboratoriji, korišćenjem "DNase I footprinting" metode, praćena je interakcija jedarnih proteina iz neindukovanih i retinoičnom kiselinom indukovanih NT2/D1 ćelija i *SOX3* promotora (Mojsin, 2008). Ova analiza promotorskog regiona *SOX3* gena je ukazala na postojanje dva zaštićena regiona u okviru -427/-293 fragmenta (Slika 22) (Mojsin, 2008):

- FP4 (zaštićen na oba lanca DNK) i
- FP7 (zaštićen na nekdirajućem lancu DNK).

FP7 region je bio predmet prethodne analize i o njemu će biti više reči u odeljku Diskusije. Predmet ove analize bio je FP4 region (Slika 22). Detaljnim pregledom sekvence FP4 regiona, može se uočiti da su uzvodno i nizvodno od CCAAT boksa (o kojem će više reči biti kasnije) pozicionirana dva CT regiona (Slika 22):

- CT region 1 – 5' GCCCCCTCCCC 3' (-341/-331)
- CT region 2 – 5' GCCCCCTCCCCCCTCCCCC 3' (-315/-296).



Slika 22. Shematski prikaz pozicija FP7 i FP4 regiona i nukleotidna sekvenca FP4 regiona zaštićenog jedarnim proteinima iz NT2/D1 ćelija (Mojsin, 2008). CT regioni su obeleženi pravougaonicima sa punom linijom. Brojevi predstavljaju pozicije CT regiona u odnosu na *tsp SOX3* gena. Prethodno analizirani NF-Y motiv je obeležen pravougaonikom sa isprekidanom linijom (Krstic et al., 2007).

Ovi regioni su bili interesantni za dalju analizu iz više razloga. Prvo, "DNase I footprinting" analiza ukazuje da se za ove sekvence vezuju jedarni proteini iz NT2/D1 ćelija (Mojsin, 2008). Zatim, literaturni podaci ukazuju da su ovakve ili njima slične sekvence prisutne u regulatornim regionima mnogih gena i da često imaju značajnu ulogu u regulaciji njihove tkivno-specifične ekspresije (Abumiya et al., 2002; Bai and Merchant, 2000; Hasan and MacDonald, 2002; Husmann et al., 1996; Keates et al., 2001; Law et al., 1998). U najvećem broju slučajeva ove regulatorne motive prepoznaju transkripcioni faktori koji poseduju cinkane prstiće kao DNK vezujuće domene.

U potrazi za transkripcionim faktorima koji se vezuju za identifikovane CT regione urađena je *in silico* analiza FP4 regiona korišćenjem MatInspector programa. Ova analiza je pokazala da se u okviru oba CT regiona nalazi više potencijalnih vezivnih mesta za

transkripcione faktore sa cinkanim prstićima koja se delimično ili u potpunosti međusobno preklapaju. Konkretno, *in silico* analizom utvrđeno je prisustvo potencijalnih mesta za vezivanje sledećih transkripcionih faktora u okviru CT regiona:

- **ZBP-89** (zinc finger binding protein 89, ZNF148) i **MAZ** (*Myc*-associated zinc finger protein) su prethodno detaljnije opisani u odeljku Uvoda

- **MAZR** (MAZ-related factor), protein koji poseduje domen koji omogućuje formiranje homo- i hetero-dimerizacionih kompleksa; snažan aktivator *c-myc* promotora (*Kobayashi et al.*, 2000),

- **ZNF219** (Krüppel-like zinc finger protein 219), koji je konstitutivno eksprimiran u različitim fetalnim i adultnim tkivima, kao na primer u bubregu, jetri mozgu i plućima (*Sakai et al.*, 2000). Ima ulogu transkripcionog represora gena za HMGN1 protein (high mobility group nucleosomal binding protein 1) (*Sakai et al.*, 2003)

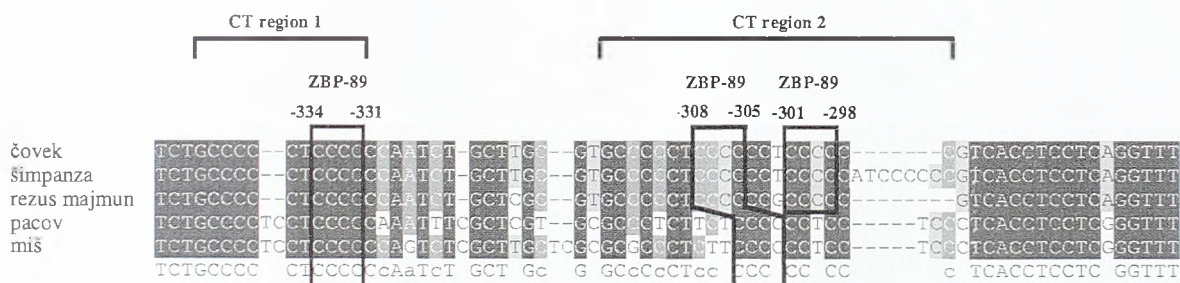
- **cKrox** (collagen-Krüppel box), transkripcioni faktor sa cinkanim prstićima uključen u regulaciju procesa diferencijacije mnogih ćelija; promovise CD4, a inhibira diferencijaciju CD8 T-ćelija (*Jenkinson et al.*, 2007). Ovaj protein poseduje domen koji omogućuje formiranje homo- i hetero-dimerizacionih kompleksa preko kojih ovaj transkripcioni faktor ostvaruje svoju represorsku ulogu (*Kypriotou et al.*, 2007)

- **MZF1** (myeloid zinc finger protein 1), transkripcioni faktor koji se eksprimira u hematopoetskim progenitorskim ćelijama koje se diferenciraju u ćelije mijeloidne loze (*Morris et al.*, 1994).

Pored ovih transkripcionih faktora koji poseduju cinkane prstiče, u okviru FP4 regiona detektovano je i vezivno mesto za NF-Y transkripcioni faktor (Slika 22). Naime, u paralelnoj studiji, analizirana je uloga sva tri NF-Y vezivna mesta detektovana u okviru optimalnog promotora *SOX3* gena (-427/+286) u regulaciji njegove aktivnosti (*Krstic et al.*, 2007). Za NF-Y vezivno mesto u okviru FP4 regiona (CCAAT, -330 do -326) je utvrđeno da je funkcionalno značajno, kako za promotorsku aktivnost u neindukovanim NT2/D1 ćelijama, tako i za inducibilnost *SOX3* promotora (*Krstic et al.*, 2007).

Za našu dalju analizu bio je interesantan ZBP-89 protein iz nekoliko razloga. Prvo, podaci u literaturi pokazuju da je ovaj transkripcioni faktor visoko eksprimiran u nervnoj cevi i gonadama oba pola tokom embrionalnog razvića miša (*Takeuchi et al.*, 2003) što se poklapa sa profilom ekspresije *Sox3* gena (*Brunelli et al.*, 2003; *Collignon et al.*, 1996; *Raverot et al.*, 2005; *Wood and Episkopou*, 1999). Takođe, ekspresija ZBP-89 transkripcionog faktora je stimulirana brojnim ekstraćelijskim signalima kao što su retinoična kiselina, butirac i TGFβ

(tumor growth factor β) (Bai *et al.*, 2002; Dawson *et al.*, 2001). Konačno, poređenjem odgovarajućih sekvenci *SOX3/Sox3* ortologa čoveka, šimpanze, rezus majmuna, pacova i miša pokazana je evolutivna očuvanost dva od tri vezivna mesta za ZBP-89 transkripcioni faktor kako po nukleotidnom sastavu (CCCC) tako i po poziciji kod svih ispitivanih sisarskih vrsta (Slika 23). Konkretno, u okviru CT regiona 1 detektovano je potencijalno ZBP-89 vezivno mesto na poziciji -334/-331 koje je očuvano kod svih ispitivanih vrsta dok se u CT regionu 2 nalaze dva blisko pozicionirana vezivna mesta (pozicije -308/-305 i -301/-298) od kojih je 3' mesto očuvano samo kod primata (Slika 23). Na osnovu svega navedenog sledeći cilj istraživanja bio je ispitivanje uloge CT regiona i vezivnih mesta za ZBP-89, detektovanih u okviru FP4 regiona, u regulaciji ekspresije *SOX3* gena u NT2/D1 ćelijskoj liniji.



Slika 23. Poređenje FP4 regiona *SOX3* ortologa sisara. Obeležene su pozicije CT regiona 1 i 2, kao i pozicije potencijalnih ZBP-89 vezivnih mesta (pravougaonici sa punom linijom) od kojih su dva mesta evolutivno očuvana među svim ispitivanim vrstama (pozicije -334/-331 i -308/-305), a jedno je prisutno samo kod primata (pozicija -301/-298).

4.4.1 Interakcije CT regiona 1 i 2 u okviru -427/-293 regiona *SOX3* promotora sa proteinima

Dalja analiza CT regiona 1 i 2 u okviru *SOX3* promotora išla je u pravcu identifikacije transkripcionih faktora koji se za njih vezuju. Interakcije ovih sekvenci i proteina ispitivane su u esejima smanjene elektroforetske pokretljivosti, EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay). U te svrhe generisane su dve međusobno preklapajuće oligonukleotidne probe od kojih jedna koja obuhvata CT region 1 (proba F6R6) a druga CT region 2 (proba F7R7) (Slika 24A).

A

CT region 1

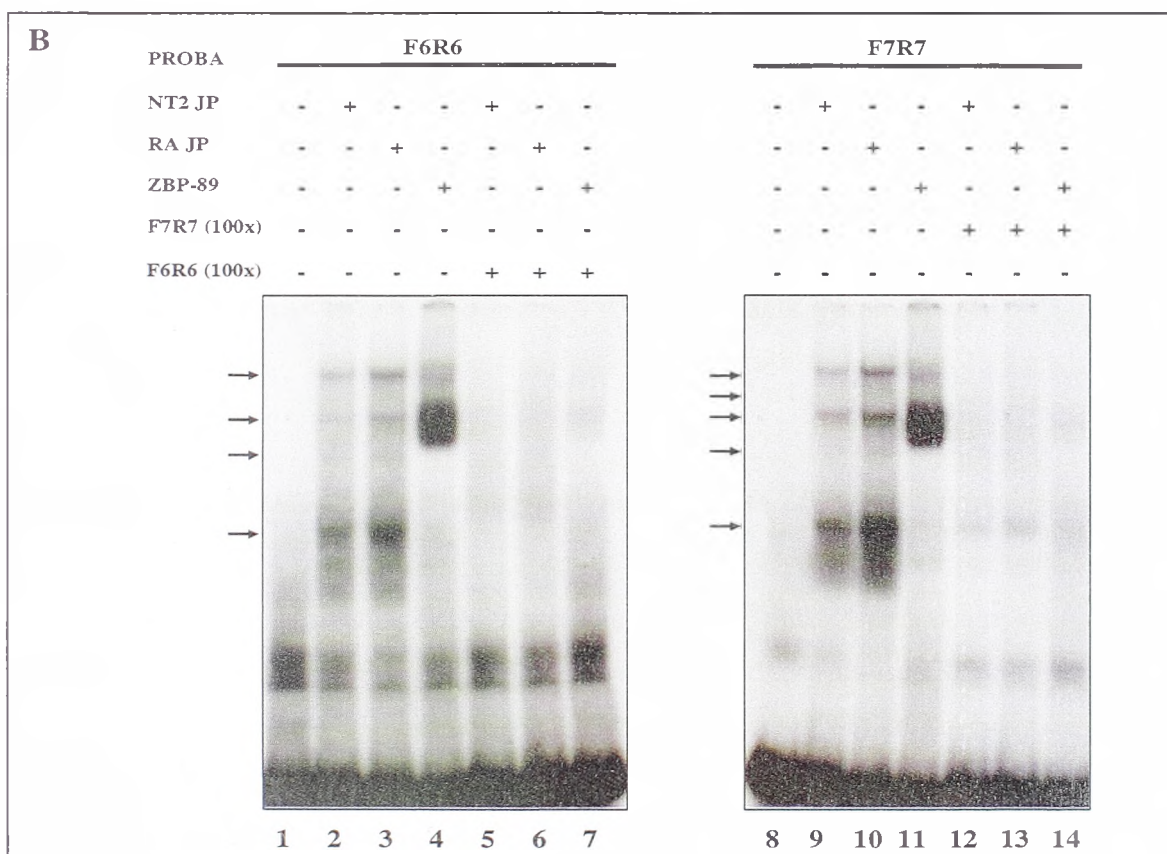
CT region 2

ZBP-89

ZBP-89 ZBP-89

5' TCTGCCCCCTCCCCCAATCTGCTTGCGTGCCCCCTCCCCCTCCCCCGTCACCTCCTCAGGTTT 3'
-344 -279

5' GCGCCCTCTGCCCCCTCCCCCAATCTGCTTGCGTGCC 3' F6R6
5' TTGCGTGCCCCCTCCCCCTCCCCCGTCACCTCC 3' F7R7



Silka 24. EMSA reakcije sa CT regionima 1 i 2. (A) Sekvenca FP4 regiona i dve oligonukleotidne probe od kojih jedna koja obuhvata CT region 1 (proba F6R6) a druga CT region 2 (proba F7R7). Vezivna mesta za ZBP-89 su zasenčena. (B) F6R6 i F7R7 probe su inkubirane sa jedarnim proteinima iz neindukovanih (kolone 2, 5, 9, 12) i retinoičnom kiselinom indukovanih NT2/D1 ćelija (kolone 3, 6, 10, 13) kao i sa rekombinantnim ZBP-89 proteinom (kolone 4, 7, 11, 14). DNK-protein kompleksi su označeni strelicama. Kompeticija je urađena preinkubacijom proteina sa odgovarajućom neobebeženom probom u 100 puta većem molarnom odnosu (kolone 5 - 7, 12 - 14).

EMSA reakcije sa probama F6R6 i F7R7 rezultovale su formiranjem nekoliko DNK-protein kompleksa. U slučaju obe probe, može se primetiti isti profil vezivanja jedarnih proteina neindukovanih i indukovanih NT2/D1 ćelija (Slika 24B, kolone 2, 3, 9 i 10).

Formirani DNK-protein kompleksi su izraženiji u reakcijama sa jedarnim proteinima indukovanih ćelija, ali se ne mogu uočiti kvalitativne razlike u vezivanju jedarnih proteina iz neindukovanih i indukovanih NT2/D1 ćelija za ispitivane probe.

Da bi se potvrdilo da su detektovani kompleksi rezultat specifičnog vezivanja jedarnih proteina za F6R6 i F7R7 probu, urađena je kompeticija ("hlađenje") sa odgovarajućim neobebeženim probama koje su u EMSA reakcije dodavane u 100 puta molarnom višku (Slika 24B, kolone 5, 6, 12, 13). Takođe, u cilju potvrde da ZBP-89 specifično prepoznaje i vezuje se za CT regione 1 i 2, koristili smo bakterijski eksprimiran rekombinantni protein u EMSA reakcijama. Na Slici 24B se može videti da su obe probe formirale specifičan kompleks sa rekombinantnim ZBP-89 proteinom (Slika 24B, kolone 4 i 11). S obzirom da je dodavanje neobebeženih proba dovelo do efekta "hlađenja" specifičnih kompleksa sa rekombinantnim ZBP-89 proteinom može se zaključiti da ZBP-89 prepoznaje i vezuje se za CT regione 1 i 2 u okviru *SOX3* promotora *in vitro* (Slika 24B, kolone 7 i 14).

4.4.2 Mutaciona analiza potencijalnog vezivnog mesta za ZBP-89 u okviru CT regiona 1

Specifičnost vezivanja ZBP-89 proteina za probu F6R6 ispitivana je uvođenjem mutacije u konsenzusno mesto na poziciji -334/-331 u odnosu na *tsp* (Slika 25A). *Wild type* (F6R6) i mutirana dvolančana oligonukleotidna proba (MUT1) korišćene su u EMSA esejima gde je praćena njihova interakcija kako sa jedarnim proteinima neindukovanih i retinoičnom kiselinom indukovanih NT2/D1 ćelija, tako i sa rekombinantnim ZBP-89 proteinom (Slika 25B).

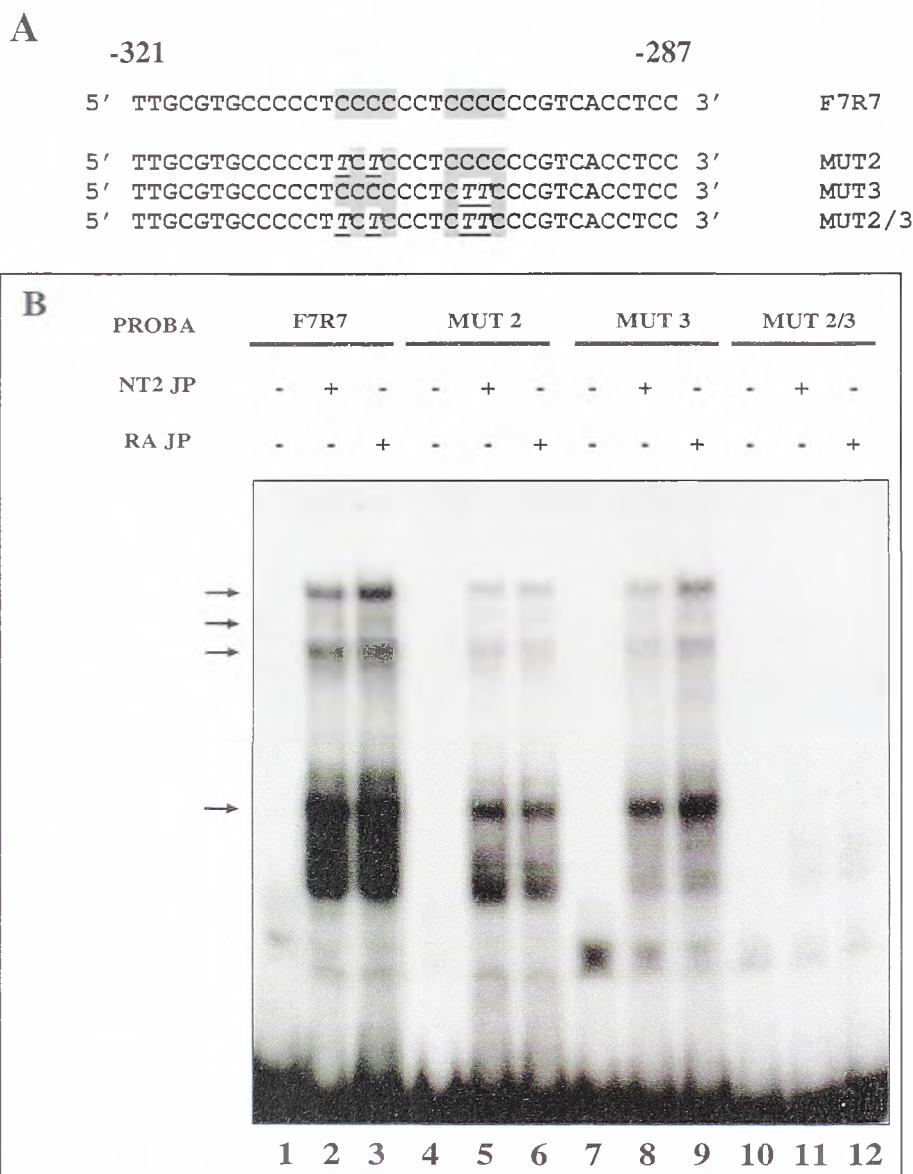
Kao što je već pokazano, jedarni proteini neindukovanih i indukovanih NT2/D1 ćelija formiraju nekoliko DNK-protein kompleksa sa F6R6 probom (Slika 25B, kolone 2 i 3). Uvođenje mutacije u konsenzusno mesto za ZBP-89 dovelo je do skoro potpunog gubitka kompleksa na probi MUT1 (Slika 25B, kolone 5 i 6). Ipak, može se primetiti postojanje dva vrlo slaba kompleksa koja su izraženija u reakciji sa jedarnim proteinima indukovanih ćelija (sive strelice). Ovi kompleksi mogu voditi poreklo od NF-Y proteina za koji je pokazano da se vezuje za istu probu (Krstić *et al.*, 2007), a čija konsenzus sekvenca nije narušena mutacijom.

8 i 10). Ovaj rezultat dodatno potvrđuje da se ZBP-89 vezuje za konsenzusno mesto u okviru CT regiona 1 *SOX3* promotora.

4.4.3 Mutaciona analiza potencijalnih vezivnih mesta za ZBP-89 u okviru CT regiona 2

S obzirom da se u CT regionu 2 nalaze dva blisko postavljena konsenzusna mesta za ZBP-89 protein (pozicije -308/-305 i -301/-298), bilo je potrebno ispitati da li se ovaj transkripcioni faktor može vezivati za ova mesta. U tu svrhu, pored *wild type* F7R7 probe, generisane su tri dvolančane oligonukleotidne probe (Slika 26A) gde su nukleotidi mutirani tako da naruše strukturu svakog pojedinačnog ZBP-89 vezivnog mesta (MUT2 i MUT3) ili oba mesta istovremeno (MUT2/3).

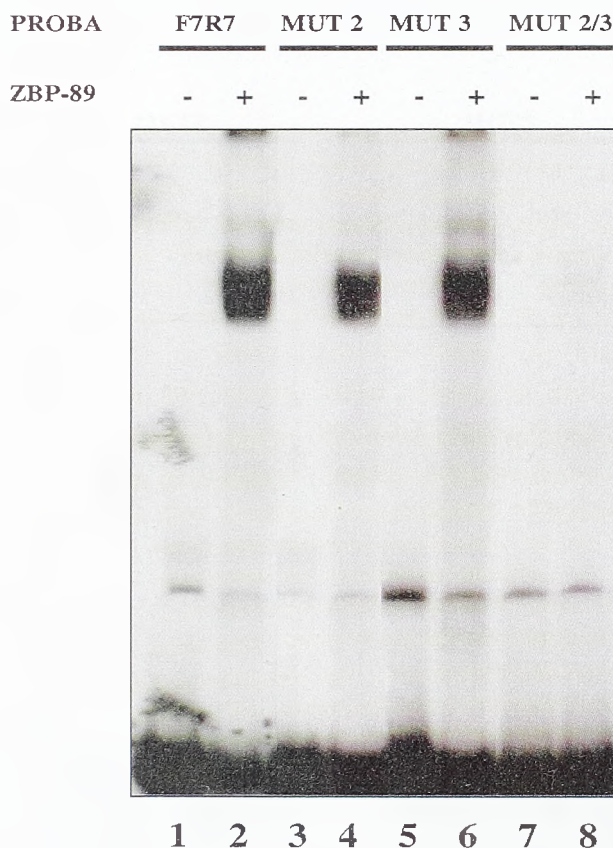
U interakciji sa jedarnim proteinima neindukovanih i retinoičnom kiselinom indukovanih NT2/D1 ćelija sve ispitivane probe osim mutanta MUT2/3 formiraju nekoliko DNK-protein kompleksa (Slika 26B, kolone 2, 3, 5, 6, 8, 9, 11, 12). Intezitet formiranih kompleksa je najjači u slučaju *wt* F7R7 probe (kolone 2 i 3), dok mutacije svakog pojedinačnog ZBP-89 mesta u većoj (MUT2, kolone 5 i 6) ili manjoj meri (MUT3, kolone 8 i 9) smanjuju afinitet za vezivanje jedarnih proteina. Samo u slučaju duplog mutanta dolazi do potpunog gubitka sposobnosti vezivanja jedarnih proteina (MUT2/3, kolone 11 i 12).



Slika 26. Mutaciona analiza potencijalnih vezivnih mesta za ZBP-89 u okviru CT regiona 2. (A) Sekvence F7R7 probe i mutiranih oligonukleotida. Vezivna mesta za ZBP-89 (-308/-305 i -301/-298) su zasenčena, a mutirani nukleotidi su podvučeni, neosenčeni i u italic formi. (B) EMSA reakcije sa F7R7 i mutiranim probama i jedanim proteinima iz neindukovanih (kolone 2, 5, 8, 11) i retinoičnom kiselinom indukovanih NT2/D1 ćelija (kolone 3, 6, 9, 12). Kompleksi koji se formiraju sa probama su označeni strelicama.

Da bi dalje dokazali da oba konsenzusna mesta u okviru CT regiona 2 vezuju ZBP-89 protein, testirana je sposobnost mutiranih proba da vezuju rekombinantni ZBP-89. Kao što se može videti sa Slike 27., i *wt* F7R7 proba i pojedinačni mutanti MUT2 i MUT3 vezuju rekombinantni protein (kolone 2, 4, 6), dok je dupli mutant MUT2/3 u potpunosti izgubio

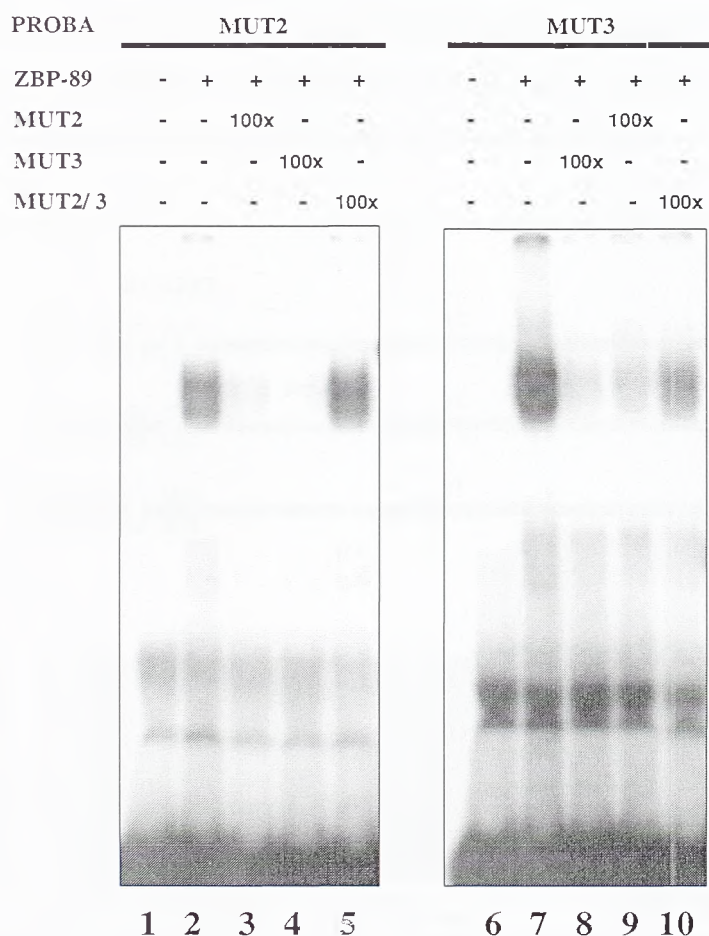
sposobnost vezivanja rekombinantnog ZBP-89 (kolona 8). Ovaj rezultat ukazuje da oba blisko pozicionirana ZBP-89 konsenzusna mesta vezuju ZBP-89 protein, jer tek kada su oba mutirana gubi se afinitet probe za vezivanje ovog proteina.



Slika 27. Vezivanje rekombinantnog ZBP-89 proteina za F7R7 i mutirane oligonukleotide. Rekombinantni ZBP-89 protein (780 ng) je inkubiran sa obeleženim F7R7 i mutiranim oligonukleotidima (kolone 2, 4, 6, 8).

Da bi dodatno potvrdili da se za obe konsenzusne sekvence u okviru CT regiona 2 vezuje ZBP-89, u EMSA esejima korišćeni su pojedinačni mutanti MUT2 i MUT3 kao probe i rađeni su eksperimenti kompeticije (Slika 28). Kao kompetitori korišćene su same neobeležene mutirane probe MUT2, MUT3 i MUT2/3. Kao što je i ranije pokazano, MUT2 i MUT3 vezuju rekombinantni ZBP-89 (Slika 28, kolone 2 i 7). U skladu sa vezivanjem jedarnih proteina (Slika 26B), može se uočiti da MUT2 ima i slabiji afinitet vezivanja za rekombinantni ZBP-89. Kao što se može videti na Slici 28., u oba slučaja, posle kompeticije MUT2 i MUT3 probe sa samom sobom dolazi do "hlađenja" kompleksa formiranog sa ZBP-89 proteinom (kolone 3 i 8). Takođe, u reakciji međusobne kompeticije pojedinačnih mutanata, u oba slučaja dolazi do "hlađenja" kompleksa, što ukazuje da očuvana konsenzusna

mesta u okviru oba pojedinačna mutanta zadržavaju sposobnost vezivanja rekombinantnog ZBP-89 proteina (kolone 4 i 9). Dodatna potvrda da oba konsenzusna mesta vezuju ZBP-89 je odsustvo kompeticije u prisustvu MUT2/3 mutanta kojem su narušena oba vezivna mesta za ZBP-89 zbog čega ova proba nije sposobna da vezuje ZBP-89 protein (kolone 5 i 10).



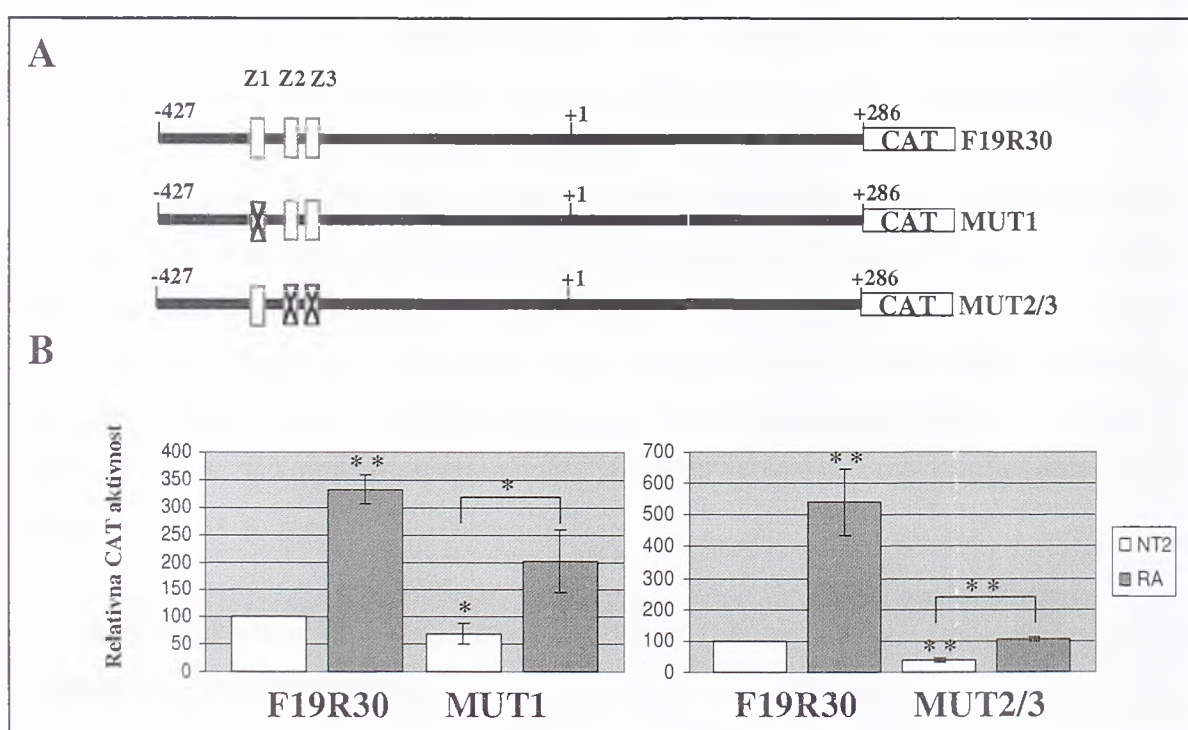
Slika 28. Vezivanje rekombinantnog ZBP-89 za mutirane oligonukleotide MUT2 i MUT3 i reakcije kompeticije. Neobeležene mutirane probe su dodavane u 100 puta većem molarnom odnosu (kolone 3 – 5 i 8 – 10).

4.4.4 Analiza uticaja mutacija vezivnih mesta za ZBP-89 u okviru CT regiona 1 i 2 na aktivnost *SOX3* promotora

Funkcionalni značaj ZBP-89 vezivnih mesta detektovanih u CT regionima 1 i 2 u okviru promotora *SOX3* gena ispitivan je u eksperimentima tranzijentne transfekcije neindukovanih i retinoičnom kiselinom indukovanih NT2/D1 ćelija. U te svrhe u promotor-reporterski konstrukt F19R30 uvedene su dve vrste mutacija. Primenom mesto-specifične

mutagenese i istih oligonukleotida, za koje je prethodno pokazano da skoro u potpunosti gube sposobnost vezivanja jedarnih proteina i rekombinantnog ZBP-89, generisani su MUT1 i MUT2/3 reporter konstrukti (Slika 29A). Mutirani konstrukti (MUT1 i MUT2/3) tranzijentno su transfektovani u NT2/D1 ćelije, a aktivnost reporterskog gena poređena je sa aktivnošću *wt* konstrukta F19R30. Dobijeni rezultati su prikazani na Slici 29B .

U slučaju kada je mutirano konsenzusno mesto za ZBP-89 (-334/-331) u CT regionu 1 (Slika 29B, MUT1), u neindukovanim NT2/D1 ćelijama dolazi do pada reporterske aktivnosti na oko 70% u odnosu na *wt* F19R30, što ukazuje na funkcionalni značaj ovog vezivnog mesta u regulaciji konstitutivne transkripcione aktivnosti *SOX3* gena.



Slika 29. Analiza uticaja mutacija vezivnih mesta za ZBP-89 u okviru CT regiona 1 i 2 na aktivnost *SOX3* promotora. (A) Shematski prikaz mutacija uvedenih u ZBP-89 vezivna mesta u F19R30 promotor-reporterskom konstruktu (mutirani motivi su prikazani kao precrtani kvadrati). (B) NT2/D1 ćelije su transfektovane ili sa *wt* F19R30 ili sa konstruktima koji nose odgovarajuće mutacije, a efekat mutacija je praćen analizom aktivnosti *cat* reporter gena. Normalizovane CAT aktivnosti su predstavljene kao procenat aktivnosti *wt* F19R30 konstrukta kojoj je dodeljena vrednost 100% u neindukovanim NT2/D1 ćelijama. Vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost \pm S.D. (standardna devijacija) iz najmanje tri nezavisna eksperimenta. Vrednosti relativnih CAT aktivnosti su poređene u Studentovom *t*-testu. Vrednosti za koje je $p < 0.05$ su predstavljene jednom zvezdicom (*), a vrednosti za koje je $p < 0.001$ sa dve zvezdice (**).

U cilju utvrđivanja uloge ovog vezivnog mesta u indukciji *SOX3* gena retinoičnom kiselinom, aktivnost *wt* i *MUT1* konstrukta ispitivana je i u NT2/D1 ćelijama indukovanim retinoičnom kiselinom. U ovom setu eksperimenata, tretman NT2/D1 ćelija retinoičnom kiselinom je doveo do indukcije promotorske aktivnosti *wt* F19R30 konstrukta od 3.3 puta. U slučaju mutiranog konstrukta detektovan je samo blagi pad u stepenu indukcije *SOX3* promotora sa 3.3 na 2.9 puta (Slika 29B). Ovaj rezultat ukazuje na to da ZBP-89 konsenzusno mesto na poziciji -334/-331 u okviru CT regiona 1, najverovatnije, nema ulogu u aktivaciji *SOX3* gena retinoičnom kiselinom.

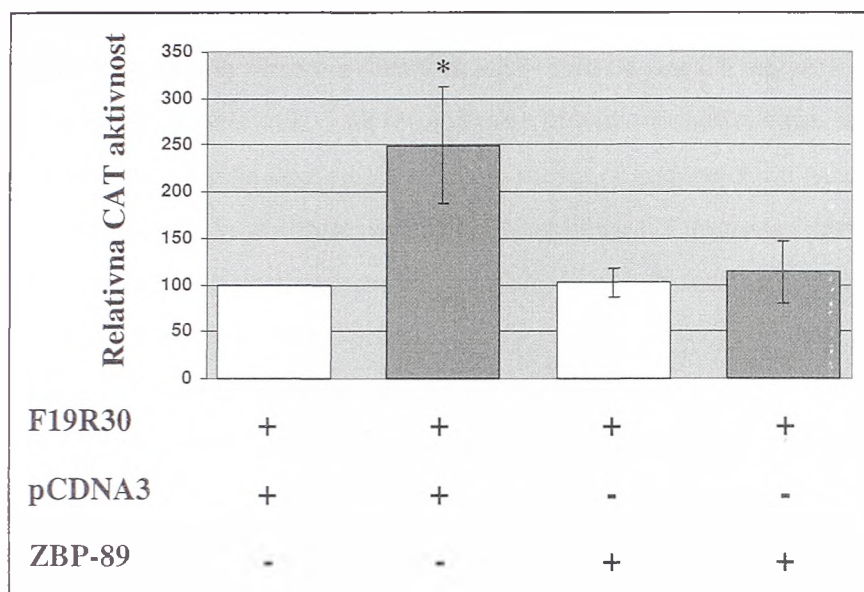
U slučaju kada su mutirana oba, blisko pozicionirana konsenzusna mesta za ZBP-89 (pozicije -308/-305 i -301/-298) u okviru CT regiona 2, u neindukovanim NT2/D1 ćelijama dolazi do pada reporterske aktivnosti na oko 40% u odnosu na *wt* F19R30 (Slika 29B, *MUT2/3*). Ovaj rezultat ukazuje da su ova dva vezivna mesta, takođe funkcionalno značajna za regulaciju transkripcione aktivnosti *SOX3* gena.

U ovom setu eksperimenata, tretman NT2/D1 ćelija retinoičnom kiselinom je doveo do indukcije promotorske aktivnosti *wt* F19R30 konstrukta od 5.3 puta. U slučaju mutantnog konstrukta *MUT2/3*, promotorska aktivnost u indukovanim ćelijama je pala na 20% u odnosu na *wt* konstrukt, odnosno, inducibilnost je pala sa 5.3 na 2,6 puta (Slika 29B). Rezultat ove mutacione analize pokazuje da su vezivna mesta koje prepoznaje ZBP-89 u okviru CT regiona 2 važna, kako za konstitutivnu promotorsku aktivnost, tako i za odgovor *SOX3* promotora na indukciju retinoičnom kiselinom.

4.4.5 Efekat povećane ekspresije transkripcionog faktora ZBP-89 na aktivnost *SOX3* promotora u NT2/D1 ćelijama

Da bi ispitali ulogu ZBP-89 proteina u aktivaciji *SOX3* promotora praćen je efekat povećane ekspresije ovog transkripcionog faktora u eksperimentima tranzijentne transfekcije NT2/D1 ćelija. U ovim eksperimentima ekspresioni vektor za ZBP-89 je kotransfektovan sa promotor-reporterskim konstruktom F19R30, a efekat je praćen, kako u neindukovanim, tako i u indukovanim NT2/D1 ćelijama (Slika 30).

Uticao povećane ekspresije ZBP-89 proteina na aktivnost promotorskog konstrukta je bio neočekivan. U neindukovanim ćelijama, kotransfekcija sa ekspresionim vektorom nije dovela do značajne promene u aktivnosti reporterskog gena u neindukovanim NT2/D1 ćelijama. Međutim, povećana ekspresija ZBP-89 je u potpunosti inhibirala odgovor F19R30 reporter konstrukta na indukciju retinoičnom kiselinom (Slika 30).



Slika 30. Efekat povećane ekspresije ZBP-89 proteina na aktivnost *SOX3* promotora. NT2/D1 ćelije su, pored F19R30 konstrukta, kotransfektovane ili kontrolnim pCDNA3 vektorom (koji ne sadrži insertovanu cDNK) ili CREB ekspresionim vektorom. Normalizovane CAT aktivnosti su predstavljene kao procenat aktivnosti F19R30 konstrukta kotransfektovanog kontrolnim pCDNA3 vektorom u neindukovanim ćelijama (NT2), kojoj je dodeljena vrednost 100%. Vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost \pm S.D. (standardna devijacija) iz tri nezavisna eksperimenta. Vrednosti relativnih CAT aktivnosti su poredene u Studentovom *t*-testu. Vrednost za koju je $p < 0.05$ je predstavljena jednom zvezdicom (*).

4.4.6 Uloga MAZ transkripcionog faktora u transkripcionoj regulaciji ekspresije *SOX3* gena

Prethodni rezultati su pokazali da sekvence u okviru CT regiona 1 i 2 specifično vezuju jedarne proteine NT2/D1 ćelija i da mutacije ovih regiona dovode do smanjenja, kako konstitutivne, tako i retinoičnom kiselinom indukovane promotorske aktivnosti *SOX3* gena. Mutacija sekvence u okviru CT regiona 2 je ukazala da ovaj region ima, bar delimično, ulogu u odgovoru *SOX3* promotora na indukciju retinoičnom kiselinom. Ovi podaci ukazuju da se za ove sekvence vezuju i neki drugi transkripcioni faktori koji imaju ulogu aktivatora a čija su mesta vezivanja takođe pogođena mutacijama koje smo primenili u ovom istraživanju. Zbog toga se pristupilo daljim istraživanjima transkripcionih faktora koji bi se vezivali za CT region 2 u okviru -427/-293 regulatornog regiona.

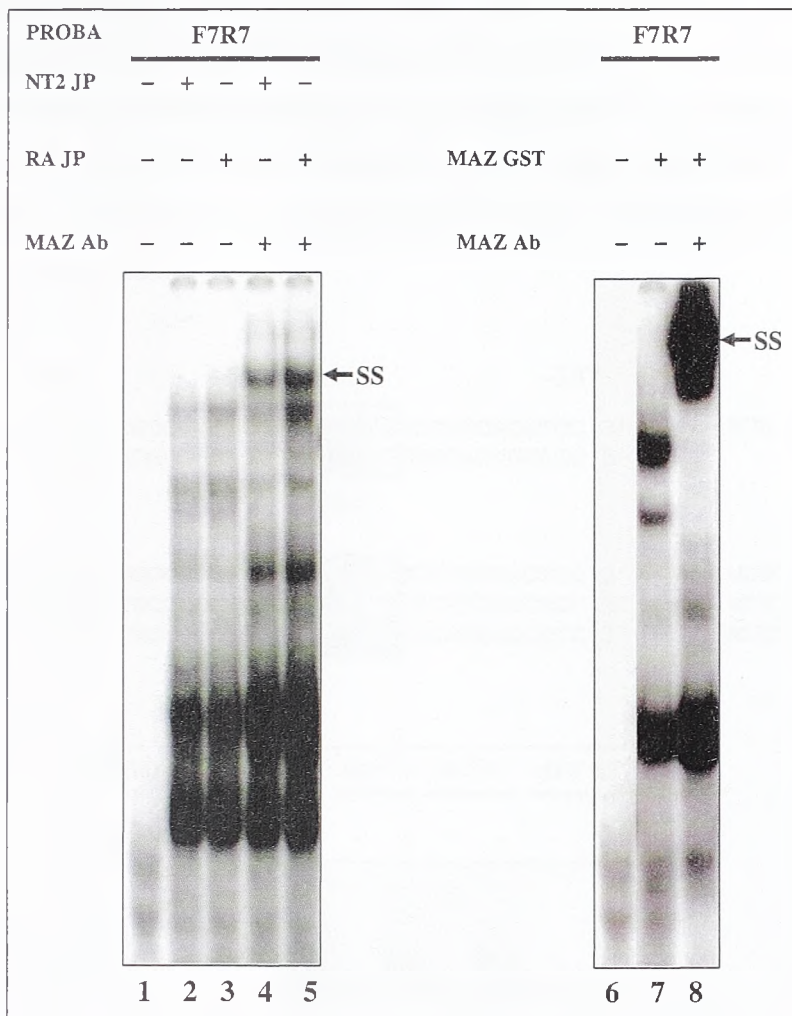
Kao što je ranije pomenuto, *in silico* analiza je pokazala da se u okviru oba CT regiona nalazi više potencijalnih vezivnih mesta za transkripcione faktore sa cinkanim prstićima, koja

U slučaju MAZ mesta, u okviru CT regiona 2, detektovana je varijacija u promotorskoj sekvenci kod rezus majmuna u odnosu na čoveka i šimpanzu (CCTC/CCGC) (Slika 31A). Iako je konsenzusno mesto za MAZ protein CCCTCCC ili GGGAGGG motiv, (Ashfield *et al.*, 1994; Bossone *et al.*, 1992; Duncan *et al.*, 1995; Okamoto *et al.*, 2002), literaturni podaci ukazuju da je MAZ sposoban da se vezuje i za druge GC bogate sekvence kao što je CCGCCC (Song *et al.*, 2001). S druge strane, detaljnom inspekcijom sekvence CT regiona 2 i korišćenjem raspoloživih literaturnih podataka o vezivnim mestima za MAZ protein (Ashfield *et al.*, 1994; Bossone *et al.*, 1992; DesJardins and Hay, 1993; Song *et al.*, 2001) uočeno je da postoje dva tandemska ponovka koja u potpunosti odgovaraju konsenzusnim mestima za MAZ protein (Slika 31B). Ove činjenice su nas navele da ispitamo da li MAZ protein prepoznaje ova potencijalna vezivna mesta u okviru CT regiona 2 i njegovu potencijalnu ulogu u regulaciji ekspresije *SOX3* gena.

4.4.7 Interakcija MAZ proteina sa potencijalnim vezivnim mestom/mestima u okviru CT regiona 2 *SOX3* promotora

Analizirane su interakcije jedarnih proteina neindukovanih i retinoičnom kiselinom indukovanih NT2/D1 ćelija sa F7R7 probom is *SOX3* promotora koja sadrži potencijalna vezivna mesta za MAZ (jedno koje je predvideo MatInspector program, odnosno dva na osnovu detaljne inspekcije sekvence) (Slika 32). Kao što je i u prethodnim eksperimentima pokazano, proba F7R7 formira nekoliko DNK-protein kompleksa (Slika 32, kolone 2 i 3). Da bi ustanovili da li MAZ protein prepoznaje i vezuje se za potencijalna vezivna mesta u okviru F7R7 probe, urađena je "superšift" analiza korišćenjem antitela na MAZ. Antitelo na MAZ je dovelo do pojave kompleksa sporije elektroforetske pokretljivosti ("superšifta") u EMSA reakcijama sa jedarnim proteinima i neindukovanih i indukovanih NT2/D1 ćelija (Slika 32, kolone 4 i 5) ukazujući na specifično prisustvo MAZ transkripcionog faktora u kompleksima formiranim sa F7R7 probom.

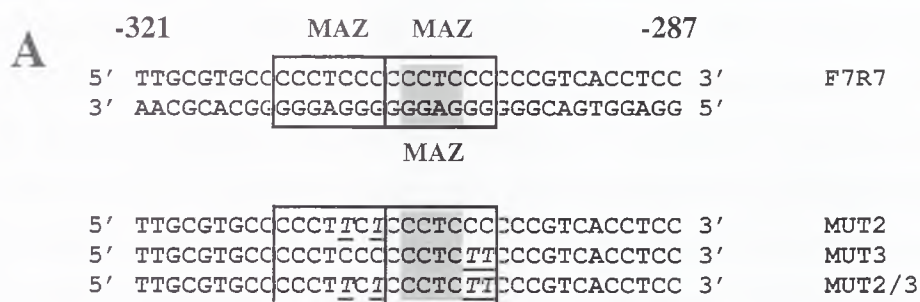
Kao dodatnu potvrdu da se za probu F7R7 vezuje MAZ protein urađene su EMSA i "superšift" reakcije sa rekombinantnim MAZ proteinom. Kao što se može videti na Slici 32., F7R7 vezuje rekombinantni MAZ protein (kolona 7), koji specifično biva prepoznat od strane antitela na MAZ u reakciji "superšifta" (kolona 8). Ovi rezultati dodatno potvrđuju da MAZ protein specifično prepoznaje i vezuje se za CT region 2 *SOX3* promotora.



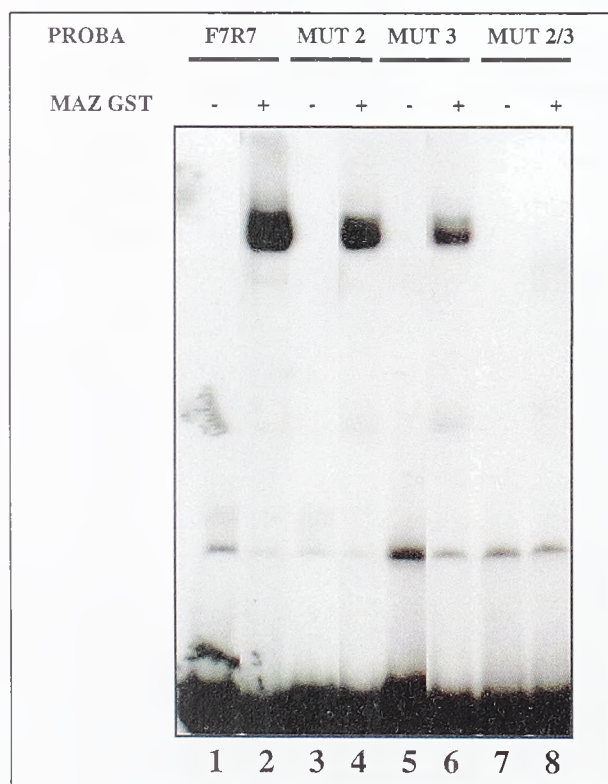
Slika 32. EMSA reakcije sa F7R7 probom. Jedarni proteini iz neindukovanih (kolone 2 i 4) i indukovanih NT2/D1 ćelija (kolone 3 i 5) kao i rekombinantni MAZ protein (840 ng) (kolone 7 i 8) inkubirani su sa obeleženom F7R7 probom. Za "superšift" reakcije korišćena su antitela na MAZ – MAZ Ab (kolone 4, 5 i 8). Kompleksi dobijeni u reakcijama "superšifta" su označeni strelicama i obeleženi sa SS.

Da bi dalje analizirali vezivanje MAZ proteina za CT region 2 testirana je sposobnost mutiranih proba koje su korišćene u prethodnim eksperimentima (MUT2, MUT3 i MUT2/3) da vezuju rekombinantni MAZ (Slika 33A). Na Slici 33A može se videti da su u MUT2 i MUT3 probi mutirana pojedinačna potencijalna vezivna mesta za MAZ koja su detektovana detaljnom inspekcijom, a da su u MUT2/3 probi narušena oba mesta. U EMSA reakcijama i *wt* F7R7 proba i pojedinačni mutanti MUT2 i MUT3 vezuju rekombinantni MAZ protein (Slika 33B, kolone 2, 4, 6). Može se primetiti da MUT2 i MUT3 imaju manji afinitet vezivanja za MAZ, naročito MUT3 proba. Takođe, MUT2/3 je u potpunosti izgubio

spособnost vezivanja rekombinantnog MAZ proteina (kolona 8). Ovi rezultati ukazuju na mogućnost da oba potencijalna vezivna mesta za MAZ vezuju rekombinantni MAZ protein, jer tek kada su oba mutirana gubi se sposobnost probe za vezivanje ovog proteina. Drugo objašnjenje bi bilo da se MAZ vezuje za mesto koje je predvideo MatInspector program (Slika 33A), a da mutacija okolnih nukleotida utiče na smanjenje afiniteta vezivanja MAZ proteina za ovo mesto.

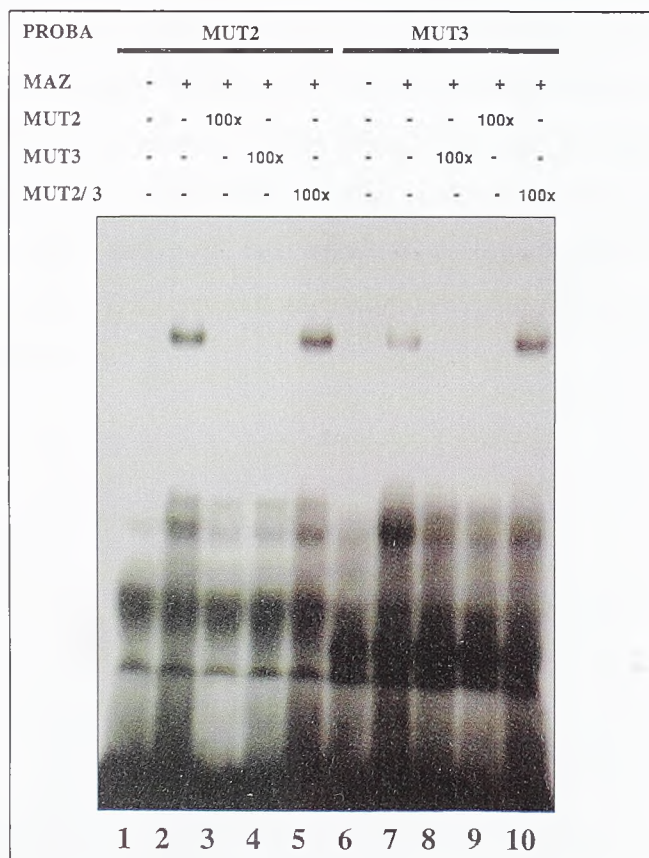


B



Slika 33. Vezivanje rekombinantnog MAZ proteina za F7R7 i mutirane oligonukleotide. (A) Sekvence F7R7 probe i mutiranih oligonukleotida. Dva potencijalna mesta za vezivanje MAZ proteina otkrivena detaljnom inspekcijom sekvence su uokvirena. Vezivno mesto koje je predvideo MatInspector program je zasenčeno. Mutirani nukleotidi su podvučeni i u italic formi. (B) Rekombinantni MAZ protein (840 ng) je inkubiran sa obeleženim F7R7 i mutiranim oligonukleotidima (kolone 2, 4, 6, 8).

Da bi dodatno potvrdili da se za obe konsenzusne sekvence u okviru CT regiona 2 vezuje MAZ protein, u EMSA esejima korišćeni su pojedinačni mutanti MUT2 i MUT3 kao probe i rađeni su isti eksperimenti kompeticije kao u slučaju rekombinantnog ZBP-89 proteina (Slika 28). Kao kompetitori korišćene su same neobeležene mutirane probe MUT2, MUT3 i MUT2/3. Kao što je i prethodnim eksperimentom pokazano, MUT2 i MUT3 vezuju rekombinantni MAZ, pri čemu MUT3 ima znatno slabiji afinitet za vezivanje rekombinantnog proteina (Slika 34, kolone 2 i 7). U reakcijama kompeticije MUT2 i MUT3 probe sa samom sobom dolazi do "hlađenja" kompleksa formiranog sa MAZ proteinom (Slika 34, kolone 3 i 8). Takođe, u reakciji međusobne kompeticije pojedinačnih mutanata, u oba slučaja dolazi do "hlađenja" kompleksa, što ukazuje da očuvana konsenzusna mesta u okviru oba pojedinačna mutanta imaju sposobnost vezivanja rekombinantnog MAZ proteina (Slika 34, kolone 4 i 9). Dodatna potvrda da oba konsenzusna mesta vezuju MAZ je odsustvo kompeticije u prisustvu MUT2/3 mutanta kojem su narušena oba vezivna mesta za MAZ zbog čega ova proba nije sposobna da vezuje MAZ protein (Slika 34, kolone 5 i 10).

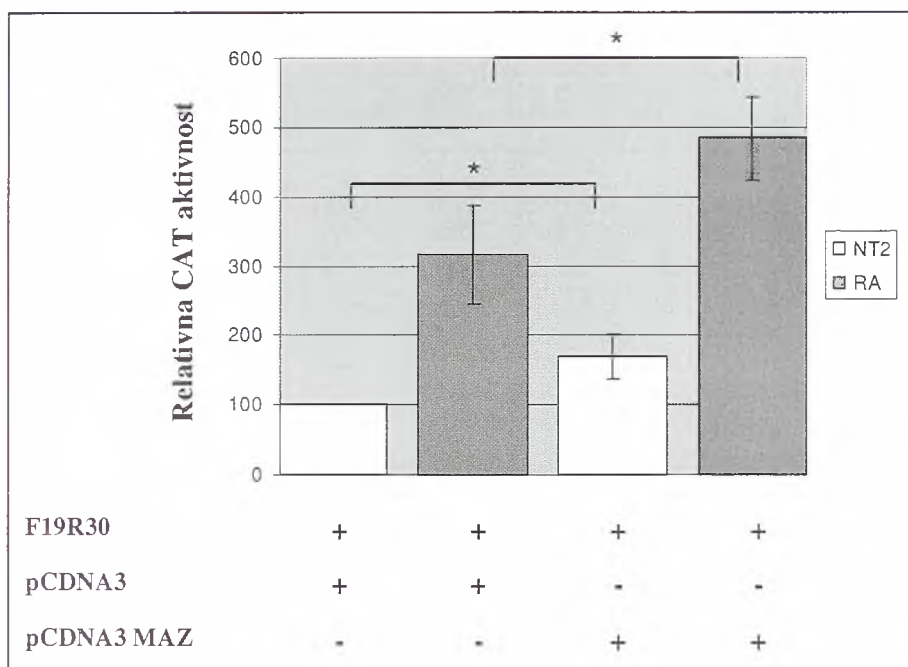


Slika 34. Vezivanje rekombinantnog MAZ proteina za mutirane oligonukleotide MUT2 i MUT3 i reakcije kompeticije. Neobeležene mutirane probe su dodavane u 100 puta većem molarnom odnosu (kolone 3 – 5 i 8 – 10).

4.4.8 Efekat povećane ekspresije transkripcionog faktora MAZ na aktivnost *SOX3* promotora u NT2/D1 ćelijama

S obzirom da je dokazano da se MAZ protein specifično vezuje za CT region 2 u okviru *SOX3* promotora, interesovalo nas je da ispitamo potencijalnu ulogu MAZ proteina u regulaciji ekspresije *SOX3* gena. Takođe, u prethodnim eksperimentima transfekcije je pokazano da mutant MUT2/3, koji je potpuno izgubio sposobnost da vezuje jedarne proteine i rekombinantni MAZ protein, dovodi do pada kako konstitutivne promotorske aktivnosti tako i inducibilnosti *SOX3* promotora (Slika 29B). Iz tih razloga, analiziran je efekat povećane ekspresije MAZ proteina na aktivnost *SOX3* promotora u NT2/D1 ćelijama. Rađeni su eksperimenti tranzijentne transfekcije neindukovanih i retinoičnom kiselinom indukovanih NT2/D1 ćelija uz korišćenje F19R30 promotor-reporterskog konstrukta i ekspresionog vektora za MAZ. Dobijeni rezultati prikazani su na Slici 35.

Ovi rezultati pokazuju da povećana ekspresija MAZ proteina u neindukovanim ćelijama dovodi do povećanja ekspresije reporterskog gena od oko 1.7 puta, dok u slučaju indukovanih ćelija povećanje iznosi oko 1.5 put. Dobijeni rezultati ukazuju da je MAZ pozitivan regulator ekspresije *SOX3* gena, kako u neindukovanim, tako i u indukovanim NT2/D1 ćelijama i da najverovatnije svoj uticaj ostvaruje preko vezivnih mesta MAZ u okviru CT regiona 2. Iako je MAZ povećao i konstitutivnu i retinoičnom kiselinom indukovanu promotorsku aktivnost, naši rezultati ukazuju da ovaj transkripcioni faktor ne doprinosi inducibilnosti *SOX3* promotora tokom neuralne diferencijacije NT2/D1 ćelija u prisustvu retinoične kiseline.



Slika 35. Efekat povećane ekspresije MAZ proteina na aktivnost *SOX3* promotora. NT2/D1 ćelije su, pored F19R30 konstrukta, kotransfektovane ili kontrolnim pCDNA3 vektorom (koji ne sadrži insertovanu cDNK) ili MAZ ekspresionim vektorom. Normalizovane CAT aktivnosti su predstavljene kao procenat aktivnosti F19R30 konstrukta kotransfektovanog kontrolnim pCDNA3 vektorom u neindukovanim ćelijama (NT2), kojoj je dodeljena vrednost 100%. Vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost \pm S.D. (standardna devijacija) iz četiri nezavisna eksperimenta. Vrednosti relativnih CAT aktivnosti su poređene u Studentovom *t*-testu. Vrednost za koju je $p < 0.05$ je predstavljena jednom zvezdicom (*).

5. DISKUSIJA

Familija *SOX/Sox* gena kodira transkripcione faktore koji imaju važnu ulogu u nizu procesa vezanih za razviće i ćelijsku diferencijaciju (*Pevny and Lovell-Badge, 1997; Wegner, 1999*).

Smatra se da je *SOX3/Sox3* gen jedan od najranijih neuralnih markera kod kičmenjaka, determinišući neuronalni tip ćelijske diferencijacije (*Brunelli et al., 2003*). Pokazano je da *Sox1, Sox2* i *Sox3* predstavljaju kritične determinante neurogeneze, jer zadržavaju neuralne ćelije u nediferenciranom stanju, suprotstavljajući se aktivnosti proneuralnih proteina (*Bylund et al., 2003*). Ekspresiona analiza kod miša je pokazala da je *Sox3* neophodan za formiranje hipotalamo-adenohipofizne ose i specifičnih struktura centralne ose CNS-a, epifize i talamusa (*Rizzoti et al., 2004*). Takođe, ekspresija *Sox3* gena detektovana je i u adultnom mozgu miša (*Wang et al., 2006*), gde ovaj gen verovatno ima ulogu u održavanju populacije neuralnih progenitora.

Pokazano je da mutacije koje dovode do promene u funkciji *SOX3* proteina kod čoveka vode ka različitim patološkim stanjima kao što su X-vezana mentalna retardacija sa nedostatkom hormona rasta (*Laumonnier et al., 2002*), hipoplazija adenohipofize kao i odsustvo infundibuluma (*Woods et al., 2005*). I povećana ekspresija *SOX3* gena (usled duplikacije) i smanjena doza funkcionalnog *SOX3* proteina (usled polialaninske ekspanzije) povezane su sa istim fenotipom - hipopituitarizmom i hipoplazijom infundibuluma koji nisu obavezno praćeni i mentalnom retardacijom (*Woods et al., 2005*). Na osnovu ovih podataka se može zaključiti da je odgovarajuća doza *SOX3* proteina izuzetno značajna za normalno razviće diencefalona, infundibuluma i adenohipofize, kao i za ćelijske procese neophodne za razviće kognitivnih funkcija (*Laumonnier et al., 2002; Woods et al., 2005*).

Uprkos velikom broju dokaza da je *SOX3* gen ključni regulator ranih faza embrionalnog razvića, do skora je u literaturi postojalo malo podataka o mehanizmima regulacije aktivnosti ovog gena. Zbog toga je predmet ovog rada bilo rasvetljavanje mehanizama transkripcione regulacije ekspresije *SOX3* gena koji bi trebalo da pruže odgovore na pitanja na koji način ovaj gen ostvaruje svoju visoko specifičnu ulogu tokom razvića i diferencijacije.

Rezultati prikazani u ovoj tezi bili su usmereni na karakterizaciju promotora *SOX3* gena, što je uključivalo određivanje starta transkripcije ovog gena, kao i definisanje minimalnog promotorskog regiona neophodnog za njegovu bazalnu transkripcionu aktivnost.

Takođe, identifikovani su *cis* regulatorni regioni uključeni u regulaciju bazalne promotorske aktivnosti *SOX3* gena, kao i elementi uključeni u indukciju ovog gena retinoičnom kiselinom. Analizirana je i uloga transkripcionih faktora Sp1, USF1, ZBP-89, MAZ i CREB kao i TATA boksa u regulaciji transkripcije *SOX3* gena.

5.1 Određivanje starta transkripcije *SOX3* gena

Sve je veći broj kompjuterskih programa razvijenih za predikciju, kako promotorskih regiona, tako i starta transkripcije gena od interesa. Ovi programi koriste veliku količinu informacija o prokariotskim i eukariotskim genima, uključujući deponovane cDNK i genomske sekvence, poređenje kodirajućih i nekodirajućih regiona gena, histonske modifikacije na genomskoj skali, eksperimentalno utvrđene pozicije promotor-specifičnih elemenata, razlike u stabilnosti DNK sekvenci promotorskih i ne-promotorskih regiona itd. Na osnovu ovih podataka moguće je predvideti pozicije starta transkripcije gena kao i promotorski region tzv. *in silico* metodama.

Dva kompjuterska programa, korišćena u ovom radu (Neural Network Promoter Prediction i PromoterInspector), ukazala su na potencijalne pozicije promotorskog regiona *SOX3* gena koje su se poklopile sa kasnije eksperimentalno okarakterisanim bazalnim promotorskim regionom *SOX3* gena (Slika 9) (Kovacevic Grujicic et al., 2005).

Precizna analiza 5' nekodirajućeg regiona nekog gena uključuje eksperimentalno određivanje starta transkripcije. U ovom radu, korišćenjem totalne RNK izolovane iz NT2/D1 ćelija, indukovanih retinoičnom kiselinom, i primenom metode elongacije oligonukleotida ("primer extension") određen je start transkripcije *SOX3* gena. Za nukleotid od kojeg započinje transkripcija, određen je citozin na poziciji 252 nt uzvodno od ATG kodona (Slika 9) (Kovacevic Grujicic et al., 2005). Interesantno je da je na poziciji -9/-5, u odnosu na eksperimentalno dobijeni *tsp*, detektovan TATA boks što je neuobičajena pozicija za ovaj regulatorni motiv. Zbog toga je važno istaći da je isti nukleotid određen kao start transkripcije *SOX3* gena korišćenjem tri različita reverzna oligonukleotida (Kovacevic Grujicic et al., 2005). Takođe, dobijeni rezultat je u korelaciji sa dužinom transkripta za *SOX3* (Stevanovic, 2003) kao i sa kompjuterskom predikcijom starta transkripcije koji je predviđen 13 bp nizvodno od starta transkripcije dobijenog metodom elongacije oligonukleotida.

5.2 Funkcionalna analiza *SOX3* promotora

5.2.1 Karakterizacija bazalnog promotorskog regiona *SOX3* gena i identifikacija pozitivnih *cis* regulatornih regiona neophodnih za optimalnu aktivnost *SOX3* promotora

U cilju razumevanja molekularnih mehanizama odgovornih za regulaciju ekspresije *SOX3* gena, dalja istraživanja su bila usmerena ka definisanju i analizi promotorskog regiona ovog gena. Naime, sledeći korak u ispitivanju 5' nekodirajućeg regiona *SOX3* gena bio je generisanje serije promotor-reporter konstrukata, a aktivnost dobijenih delecionijskih reporter konstrukata je analizirana u eksperimentima tranzijentne transfekcije NT2/D1 ćelija.

Funkcionalna analiza prikazana u ovom radu je ukazala da region -219/+67, sadrži regulatorne elemente neophodne za bazalnu transkripcionu aktivnost humanog *SOX3* gena te samim tim predstavlja njegov minimalni promotorski region (Slike 10 i 13) (Kovacevic Grujicic *et al.*, 2005). Takođe, delecionom analizom su u okviru minimalnog promotora *SOX3* gena identifikovana dva *cis* regulatorna regiona, -219/-100 i +27/+67, koja su od esencijalne važnosti za njegovu aktivnost, s obzirom da njihove delecije, nezavisno, dovode do potpunog gubitka promotorske aktivnosti (Slike 10 i 13) (Kovacevic Grujicic *et al.*, 2005).

Region +27/+67 sadrži esencijalni regulatorni element neophodan za bazalnu promotorsku aktivnost *SOX3* gena. Potraga za potencijalnim mestima za vezivanje transkripcionih faktora u okviru ovog regiona kao i poređenje sa odgovarajućim sekvencama ortologa *SOX3* gena kod sisara su ukazali na prisustvo potencijalnog vezivnog mesta za Nanog koje je evolutivno očuvano kod primata (Slika 14). Nanog je homeodomenski transkripcioni faktor koji ima esencijalnu ulogu u održavanju pluripotentnosti ćelija unutrašnje ćelijske mase tokom embrionalnog razvića (Chambers *et al.*, 2003). Literaturni podaci ukazuju da postoji mogućnost da je detektovano vezivno mesto za Nanog u okviru regiona +27/+67 od funkcionalnog značaja za *SOX3*. Naime, mada Nanog i *SOX3* gen imaju slične obrazce ekspresije, u jednom periodu embrionalnog razvića miša, Nanog se eksprimira u početnim stadijumima razvića i to još u unutrašnjim ćelijama stadijuma morule, a zatim u unutrašnjoj ćelijskoj masi blastocista (Chambers *et al.*, 2003), što je mnogo ranije od *SOX3*. Nakon implantacije embriona, Nanog transkripti su detektovani u epiblastu 6. dana embrionalnog razvića što se prostorno i vremenski poklapa sa ekspresijom *Sox3* gena (Hart *et al.*, 2004; Wood and Episkopou, 1999). Takođe, u nezavisnim studijama, ekspresija oba gena je detektovana i u urogenitalnoj brazdi, 11.5 dana embrionalnog razvića miša (Chambers *et*

al., 2003; Collignon et al., 1996; Hart et al., 2004). Dalji eksperimenti su neophodni da bi se utvrdila potencijalna uloga Nanog proteina u regulaciji transkripcije *SOX3* gena.

U regionu -219/-100, za koji se u ovoj tezi takođe pokazalo da je od esencijalne važnosti za bazalnu promotorsku aktivnost *SOX3* gena (Kovacevic Grujicic et al., 2005), eksperimentalno je potvrđen funkcionalni značaj dva regulatorna motiva. Oba motiva – vezivno mesto za NF-Y (pozicija -105/-101) i konsenzusno polumesto za CREB (pozicija -195/-191) su detaljno okarakterisani u ovom radu i o njima će biti više reči u sledećem odeljku Diskusije.

Deleciona analiza promotor-reporter konstrukata, zahvaljujući kojoj je definisan minimalni promotorski region *SOX3* gena, razotkrila je i prisustvo dva regiona, -427/-219 i +67/+286, koji sadrže pozitivne *cis* regulatorne elemente neophodne za optimalnu, ali koji nisu od esencijalne važnosti za bazalnu promotorsku aktivnost *SOX3* gena (Slika 10 i 13) (Kovacevic Grujicic et al., 2005). Samo u prisustvu oba regiona obezbeđena je puna promotorska aktivnost (Slika 10). Tek kada su oba regiona prisutna u promotor-reporterskom konstrukt F19R30, ostvarena je maksimalna aktivnost *cat* reporter gena, što ukazuje na modularnu prirodu *cis* regulatornih elemenata uključenih u transkripcionu regulaciju *SOX3* gena.

5.2.2 Uloga TATA boksa u transkripcionoj regulaciji *SOX3* gena

Evolutivna očuvanost TATA boksa u ortologim promotorima *SOX3* gena svih ispitivanih vrsta sisara je ukazala na značaj ovog elementa u regulaciji transkripcije ovog gena (Slika 14) (Kovacevic-Grujicic et al., 2008a). U ovoj tezi, detaljno je ispitana i dokazana uloga ovog regulatornog motiva u regulaciji bazalne transkripcione aktivnosti *SOX3* gena.

Mutacionom analizom pokazan je funkcionalni značaj TATA boksa u regulaciji aktivnosti *SOX3* promotora (Slika 15). Naime, mutacija TATA boksa je dovela do pada *SOX3* promotorske aktivnosti, ukazujući da, iako neobično pozicioniran u odnosu na *tsp* (-9/-5), ovaj motiv igra važnu ulogu u bazalnoj transkripcionoj aktivnosti *SOX3* gena (Kovacevic Grujicic et al., 2005). Naime, kod većine eukariotskih gena, TATA boks je pozicioniran 25 do 30 bp uzvodno od starta transkripcije (Johnson and McKnight, 1989) gde kroz specifične interakcije sa multiproteinskim kompleksom TFIID omogućava pravilnu inicijaciju transkripcije (Ghosh and Van Duyne, 1996). Pregledom literature, utvrdili smo da iako retki, postoje slučajevi gde je TATA boks atipično pozicioniran u odnosu na *tsp*. Mudge i saradnici su u promotoru gena za tRNK sintetazu glicina detektovali TATA boks na poziciji +9 u

odnosu na *tsp* (Mudge et al., 1998), dok je za adenovirusni IVa2 promotor pokazano da poseduje funkcionalan TATA motiv smešten oko 20 bp nizvodno od *tsp* (Carcamo et al., 1990). Takođe, alternativni promotor za MOR-1 gen (μ opioid receptor) u egzonu 11 poseduje funkcionalan TATA boks lociran na poziciji -92 / -84 bp u odnosu na *tsp* (Pan, 2002).

5.2.3 Uloga vezivnih mesta za Sp1, USF, NF-Y i CREB u okviru minimalnog promotorskog regiona *SOX3* gena u njegovoj transkripcionoj regulaciji

In silico analiza minimalnog promotorskog regiona *SOX3* gena je ukazala na prisustvo potencijalnih vezivnih mesta za opšte transkripcione faktore koji su uključeni u regulaciju niza ćelijskih procesa (Slika 14). Dodatni kriterijum za njihovo prikazivanje i dalju analizu bila je njihova evolutivna očuvanost kod *SOX3* ortologa primata ili svih analiziranih vrsta sisara (Slika 14) (Kovacevic-Grujicic et al., 2008a), kao i činjenica da su ovi motivi pozicionirani u regionima zaštićenim jedarnim proteinima NT2/D1 ćelija u "DNase I footprinting" reakcijama (Mojsin, 2008). Evolutivna očuvanost vezivnih mesta za USF, Sp1, NF-Y i CREB transkripcioni faktor u ortologim promotorima *SOX3* gena svih ispitivanih vrsta sisara je ukazala na njihov značaj u regulaciji transkripcije ovog gena (Slika 14) (Kovacevic-Grujicic et al., 2008a). U ovoj tezi, detaljno je ispitana i dokazana uloga ova četiri regulatornih motiva u regulaciji bazalne transkripcione aktivnosti *SOX3* gena.

EMSA i "superšift" reakcijama sa jedarnim proteinima NT2/D1 ćelija je pokazano da se Sp1, USF1 i NF-Y proteini direktno vezuju za konsenzusne sekvence na pozicijama -48/-45, -71/-68, odnosno -105/-101 bp u odnosu na *tsp SOX3* gena (Slika 16) (Kovacevic Grujicic et al., 2005). Takođe, mutacije vezivnih mesta za Sp1, USF1 i NF-Y su izazvale drastičan pad u aktivnosti *SOX3* promotora, što je ukazalo na funkcionalni značaj ovih vezivnih mesta u regulaciji bazalne transkripcione aktivnosti *SOX3* gena (Slika 17) (Kovacevic Grujicic et al., 2005).

Sp1 je sveprisutni transkripcioni faktor koji aktivira veliki broj gena kroz direktnu interakciju sa komponentama bazalne transkripcione mašinerije, uključujući i TBP (TATA binding protein) (Emili et al., 1994). Takođe, Sp1 ima važnu ulogu u transkripcionoj regulaciji gena koji ne poseduju TATA boks (Pugh and Tjian, 1990). Među brojnim transkripcionim faktorima i koaktivatorima sa kojima Sp1 fizički i/ili funkcionalno interaguje, nalaze se i proteini iz USF familije (Furhata et al., 2004; Ge et al., 2003) kao i NF-Y transkripcioni faktor (Inoue et al., 1999; Roder et al., 1999), a rezultat tih interakcija je transaktivacija ciljnih gena, koja je najčešće, ćelijski-, tkivno- ili vremenski- specifična.

USF1, zajedno sa USF2, spada u sveprisutne transkripcione faktore koji poseduju bHLH-zip (basic helix-loop-helix-leucine zipper) domen, i koji se specifično vezuju za E-boks motive (5' CANNTG 3') u vidu homo- ili hetero-dimera (*Sirito et al.*, 1992; *Viollet et al.*, 1996). Iako spadaju u sveprisutne transkripcione faktore, USF proteini imaju ulogu u regulaciji ekspresije nekoliko tkivno- specifičnih i razvojno-regulisanih gena (*Henrion et al.*, 1995).

NF-Y je opšti transkripcioni faktor koji je sposoban da pri vezivanju za konsenzusnu sekvencu savije DNK za 62° do 80° (*Ronchi et al.*, 1995). Zahvaljujući tome, NF-Y ima sposobnost da remodeluje lokalnu strukturu hromatina i stupa u interakcije sa nukleozomima (*Romier et al.*, 2003). Formiranjem kompleksa sa DNK, NF-Y olakšava vezivanje susednih faktora i dovodi do regrutovanja koaktivatora, poput p300 proteina (*Caretti et al.*, 2003; *Coustry et al.*, 2001; *Li Q. et al.*, 1998). Funkcija NF-Y je da olakša i/ili stabilizuje vezivanje koaktivatora ili drugih transkripcionih faktora za susedne vezujuće elemente, što za posledicu ima povišen nivo transkripcije ciljnih gena (*Caretti et al.*, 2003). Pored *SOX3* gena, niz drugih *SOX/Sox* gena je regulisan od strane NF-Y, kao što su *Sox2* miša i *SOX9*, *SOX14* i *SOX18* čoveka (*Colter et al.*, 2005; *Djurovic and Stevanovic*, 2004; *Kovacevic Grujicic et al.*, 2005; *Krstic et al.*, 2007; *Petrovic et al.*, 2009; *Wiebe et al.*, 2000). Ovi podaci ukazuju da *SOX/Sox* geni poseduju zajednički, evolutivno očuvan mehanizam regulacije ekspresije koji je zavisin od NF-Y.

S obzirom da CREB protein ima važnu ulogu u brojnim procesima specifičnim za razviće nervnog sistema kao što su opstanak različitih subtipova neurona (neuroprotekcija), proliferacija neuralnih progenitora, rast aksona, rast dendrita kortikalnih neurona, učenje, dugotrajna memorija i sinaptička plastičnost (*Lonze and Ginty*, 2002) ovaj rad je bio fokusiran i na detaljniju analizu uloge ovog transkripcionog faktora u regulaciji bazalne transkripcije *SOX3* gena. Kompeticijama u reakcijama vezivanja proteina sa *wt* i mutiranom probom, kao i korišćenjem specifičnih antitela, pokazano je da se CREB specifično vezuje za konsenzusno polumesto u okviru minimalnog promotora *SOX3* gena, na poziciji -195/-191 (Slike 18B i 19). Funkcionalni značaj ovog regulatornog motiva je potvrđen mutacionom analizom u kojoj je mutirani F19R30 reporterski konstrukt doveo do pada bazalne aktivnosti *SOX3* promotora od 2 puta (Slika 20). Takođe, povećana ekspresija CREB transkripcionog faktora je pokazala da je CREB veoma potentan aktivator bazalne transkripcione aktivnosti *SOX3* gena (Slika 21A). U skladu sa ovim rezultatima, eksperimenti kotransfekcije sa specifičnim dominantno negativnim inhibitorom CREB proteina doveli su do pada bazalne promotorske aktivnosti na

oko 60% (Slika 21B). Ovaj rezultat ukazuje da konstitutivno prisutan CREB protein doprinosi bazalnoj transkripcionoj aktivnosti *SOX3* gena u NT2/D1 ćelijama.

Poznato je da je CREB prototip transkripcionog faktora koji reaguje na različite stimulse kao što su faktori rasta, neurotransmiteri, stresori i uopšte signali koji povećavaju intracelularnu koncentraciju cAMP-a i Ca^{2+} (Mayr and Montminy, 2001; Shaywitz and Greenberg, 1999). Kao odgovor na te stimulse dolazi do fosforilacije serina na poziciji 133 i CREB protein postaje potentni transkripcioni aktivator ciljnih gena zahvaljujući interakciji sa koaktivatorima CBP i p300 (Mayr and Montminy, 2001; Shaywitz and Greenberg, 1999). Međutim, u odsustvu stimulusa nefosforilisani CREB je takođe sposoban da aktivira transkripciju ciljnih gena kao što je pokazano na primeru *SOX9*, *HK α 2* gena (H^+ - K^+ -ATPase α 2-subunit) (Piera-Velazquez et al., 2007; Xu et al., 2004) i sada na primeru *SOX3* gena. Za bazalnu aktivnost CREB proteina je odgovoran glutaminom bogati konstitutivno aktivni domen (CAD) na C-terminusu koji interaguje sa komponentama generalne transkripcione mašinerije i na taj način promoviše transkripciju (Felinski et al., 2001; Felinski and Quinn, 1999; Felinski and Quinn, 2001). Opisan je i drugi način aktivacije gena koji ne zavisi od fosforilacije CREB proteina. Naime CREB preko bZIP domena interaguje sa familijom koaktivatora pod nazivom TORC (transducers of regulated CREB activity) (Conkright et al., 2003). Rekrutovanje TORC koaktivatora pojačava interakciju CREB proteina sa TAF_{II}130 komponentom TFIID kompleksa koji biva rekrutovan na ciljni promotor (Conkright et al., 2003) Dalja istraživanja će pokazati koji od ova dva mehanizma je odgovoran za stimulatornu ulogu CREB proteina u NT2/D1 ćelijama.

U regionu -219/-100 za koji je pokazano da je esencijalan za aktivnost bazalnog promotora *SOX3* gena (Slika 10), funkcionalno su okarakterisana dva motiva, NF-Y (-105/-101) i CREB (-195/-191) (Slike 17 i 20). Interesantno je da mutacije ova dva vezivna mesta (Slike 17 i 20) ne dovode do potpunog gubitka promotorske aktivnosti kao delecija celog regiona -219/-100 (Slika 10). Ovaj rezultat ukazuje na mogućnost da ova dva regulatorna motiva funkcionišu sinergistički, a ova hipoteza bi mogla biti proverena dodatnim eksperimentima kotransfekcije sa konstruktom u kojem bi oba vezivna mesta bila mutirana. Druga mogućnost je da se u ovom esencijalnom regionu -219/-100 nalaze još neki, do sada neotkriveni *cis* regulatorni elementi neophodni za bazalnu aktivnost *SOX3* promotora.

Literaturni podaci ukazuju da transkripcioni faktori, NF-Y i CREB, zajedno učestvuju u transkripcionoj regulaciji gena. Naime, poznato je da NF-Y i CREB, zajedno sa RFX (X box-binding) proteinom formiraju komplekse na promotorima gena klase II glavnog histokompatibilnog kompleksa, gde sinergistički doprinose optimalnoj promotorskoj

aktivnosti (*Masternak et al.*, 2000; *Zhu et al.*, 2000). Takođe, u slučaju gena za claudin 11, NF-Y, CREB i GATA stupaju u protein-protein interakcije, formirajući kompleks koji je odgovoran za aktivaciju ovog promotora (*Lui et al.*, 2007). Oba transkripciona faktora, NF-Y i CREB su poznata po tome da regrutuju transkripcione koaktivatore p300 i TORC (transducers of regulated CREB activity) i na taj način modulišu aktivnost ciljnih gena (*Caretti et al.*, 2003; *Conkright et al.*, 2003).

Interesantno je da promotor *SOX9* gena poseduje dva vezivna mesta za NF-Y kao i CREB polumesto, za koja je pokazano da su od funkcionalnog značaja za transkripcionu aktivnost (*Colter et al.*, 2005; *Piera-Velazquez et al.*, 2007). I ovi podaci ukazuju na mogućnost da *SOX* geni imaju slične, evolutivno očuvane mehanizme transkripcione regulacije.

Rezultati prezentovani u ovom radu ukazuju da su Sp1, USF1, NF-Y i CREB ključni regulatori bazalne transkripcione aktivnosti *SOX3* gena. Takođe, evolutivna očuvanost u nukleotidnom sastavu i poziciji ovih vezivnih mesta u okviru minimalnog promotorskog regiona između ispitivanih ortologa ukazuje da je mehanizam regulacije ekspresije *SOX3/Sox3* gena evolutivno konzervisan. S obzirom na veliki broj podataka o međusobnim kooperativnim i sinergističkim interakcijama između pomenutih faktora, nije isključeno da je bazalna transkripcija *SOX3* gena modulirana tim interakcijama. Naravno, da bi se to dokazalo, neophodni su dodatni eksperimenti koji bi uključivali mutacione analize, eksperimente kotransfekcije i *in vitro* i *in vivo* eseje za ispitivanje interakcija između navedenih transkripcionih faktora i DNK.

5.2.4 Identifikacija pozitivnih *cis* regulatornih regiona uključenih u indukciju *SOX3* promotora retinoičnom kiselinom

Pokazano je da tokom prvih 48h indukcije retinoičnom kiselinom dolazi do značajnog povećanja nivoa transkripcije *SOX3* gena, koji u kasnijim fazama diferencijacije dramatično pada, mada i dalje ostaje na nivou većem od onog detektovanog kod neindukovanih NT2/D1 ćelija (*Stevanovic*, 2003). Jedan od ciljeva ovog istraživanja bio je da se definišu regulatorni regioni koji su uključeni u odgovor *SOX3* promotora na indukciju retinoičnom kiselinom. U tu svrhu korišćeni su, kako promotor-zavisni, tako i enhenser-zavisni reporter konstrukti koji su tranzijentno transfektovani u NT2/D1 ćelije, a zatim je njihova aktivnost praćena u neindukovanim i retinoičnom kiselinom indukovanim ćelijama (Slike 11 i 12).

Rezultati ovih eksperimenata ukazuju da prethodno identifikovani, pozitivni *cis* regulatorni regioni -427/-219 i +67/+286, takođe igraju važnu ulogu i u odgovoru *SOX3* promotora na indukciju retinoičnom kiselinom (Slika 11 i 13). Naime, delecija +67/+286 regiona (F19R24 konstrukt) dovodi do pada u stepenu indukcije od 2 puta, što ukazuje da se u ovom regionu nalaze regulatorni elementi koji doprinose inducibilnosti *SOX3* promotora (Slika 11). Iako ova delecija dovodi do pada inducibilnosti, odgovor F19R24 konstrukta na retinoičnu kiselinu je i dalje značajan i iznosi skoro 2 puta (Slika 11). S druge strane, delecija -427/-219 regiona dovodi do gubitka inducibilnosti konstrukta F17R30, na osnovu čega bi se moglo zaključiti da se u ovom regionu nalaze *cis* regulatorni elementi neophodni za odgovor *SOX3* promotora na indukciju retinoičnom kiselinom. Drugo objašnjenje koje se nameće je da se elementi preko kojih retinoična kiselina ostvaruje svoju aktivatorsku ulogu nalaze raspoređeni duž *SOX3* promotora.

S obzirom da delecija -427/-219 regiona dovodi do gubitka inducibilnosti, predmet dalje analize u ovoj tezi bilo je preciznije definisanje kontrolnih elemenata uključenih u indukciju *SOX3* retinoičnom kiselinom, koristeći enhenser-zavisne reporter konstrukte (Slika 12). Rezultat te analize je pokazao da je region -293/-219 važan za promotorsku aktivnost *SOX3* gena u neindukovanim NT2/D1 ćelijama, odnosno da sadrži pozitivne *cis* regulatorne elemente (Slike 12 i 13). Takođe, delecija regiona -427/-293 dovela je do pada promotorske aktivnosti na oko 60% u neindukovanim NT2/D1 ćelijama, ali i do gubitka inducibilnosti (Slika 12, konstrukt F18R12). Zbog toga je sledeći korak u ovom istraživanju bio identifikacija sekvenci u okviru -427/-293 regiona koje interaguju sa jedarnim proteinima NT2/D1 ćelija i potencijalno imaju ulogu u odgovoru *SOX3* gena na indukciju retinoičnom kiselinom.

5.2.5 Uloga CT regiona u okviru -427/-293 regiona *SOX3* promotora

U prethodnoj studiji u našoj laboratoriji, korišćenjem "DNase I footprinting" metode, praćena je interakcija jedarnih proteina iz neindukovanih i retinoičnom kiselinom indukovanih NT2/D1 ćelija i promotorskog regiona *SOX3* gena (Mojsin, 2008). Ova analiza je ukazala na postojanje dva zaštićena regiona u okviru fragmenta -427/-293 (Slika 22): FP4 (zaštićen na oba lanca DNK) i FP7 (zaštićen na nekodirajućem lancu DNK) (Mojsin, 2008). S obzirom da je FP7 region (-395/-391) detaljno okarakterisan u studiji gde je pokazano da se za konsenzusnu sekvencu u okviru ovog regiona vezuje TGIF protein koji ima ulogu represora

SOX3 gena (Mojsin, 2008), u ovom radu je analiziran detaljnije FP4 region koji se nalazi na poziciji -342/-279 u odnosu na *tsp*.

Interesantno je istaći da je u ovom radu pokazano da FP4 region sadrži jedno od tri NF-Y mesta koja su detektovana u promotoru *SOX3* gena (Slika 22). Studija vezana za ispitivanje uloge NF-Y transkripcionog faktora u regulaciji transkripcije *SOX3* gena je pokazala da su sva tri NF-Y vezivna mesta u okviru optimalnog promotorskog regiona ovog gena (-427/+286), funkcionalno značajna za regulaciju ekspresije *SOX3* gena (Kovacevic Grujicic et al., 2005; Krstic et al., 2007). Između ostalog, za NF-Y mesto (-330/-326) detektovano u okviru FP4 regiona je pokazano da je bitno za inducibilnost *SOX3* gena retinoičnom kiselinom (Krstic et al., 2007).

Detaljnim pregledom sekvence FP4 regiona uočena su dva CT regiona koja su označena kao CT region 1 (-341/-331) i CT region 2 (-315/-296) (Slika 22). Veliki je broj literaturnih podataka u kojima su ovakve ili njima slične sekvence detektovane i funkcionalno okarakterisane u regulatornim regionima gena koji su bitni za ćelijski rast i diferencijaciju, razviće i/ili reaguju na različite stimulse (Bai and Merchant, 2000; Hasan and MacDonald, 2002; Keates et al., 2001; Law et al., 1998). Na primer, za TCCCCTCCCCT sekvencu u okviru humanog interleukin-1 beta promotora je pokazano da je važna i za konstitutivnu i za TNF α proteinom (tumor necrosis factor-alpha) indukovanu transkripcionu aktivnost ovog gena (Husmann et al., 1996). Takođe, CT element u promotorskom regionu *Flk-1/KDR* (fetal liver kinase 1/kinase insert domain receptor) gena koji kodira receptor za VEGF (vascular endothelial growth factor) je esencijalan za njegovu transkripcionu aktivaciju indukovanu mehaničkim stresom (Abumiya et al., 2002). U drugoj studiji je utvrđeno da bazalna i cAMP-om indukovana ekspresija gena za biglikan (biglycan) zavisi od CT elementa na poziciji -59 u promotoru ovog gena (Ungefroren et al., 1998). U najvećem broju slučajeva za pomenute regulatorne elemente se vezuju transkripcioni faktori sa cinkanim prstićima kao DNK vezujućim domenom.

In silico analiza FP4 regiona *SOX3* gena je ukazala na prisustvo većeg broja potencijalnih vezivnih mesta za transkripcione faktore sa cinkanim prstićima u okviru oba CT regiona, pri čemu se ova mesta delimično ili u potpunosti preklapaju. U ovoj tezi fokusirali smo se na ispitivanje uloge vezivnih mesta za ZBP-89 transkripcioni faktor u regulaciji ekspresije *SOX3* gena iz nekoliko razloga. Najpre, podaci u literaturi pokazuju da se obrasci ekspresije *Sox3* i ZBP-89 delimično poklapaju. ZBP-89 je visoko eksprimiran u nervnoj cevi i gonadama oba pola tokom embrionalnog razvića miša (Takeuchi et al., 2003) što se poklapa sa profilom ekspresije *Sox3* gena (Brunelli et al., 2003; Collignon et al., 1996; Raverot et al.,

2005; Wood and Episkopou, 1999). Himerne miševе koji poseduju samo jedan funkcionalan alel za ZBP-89 i *Sox3* "knock-out" miševе odlikuje sličan fenotip: hipogonadizam i sterilitet (Raverot et al., 2005; Takeuchi et al., 2003). Takođe, ekspresija ZBP-89 transkripcionog faktora je stimulisana brojnim ekstraćelijskim signalima kao što su retinoična kiselina, butirat i TGF β (tumor growth factor β) (Bai et al., 2002; Dawson et al., 2001). Konačno, dva od tri potencijalna vezivna mesta za ZBP-89 transkripcioni faktor su evolutivno očuvana kako po nukleotidnom sastavu (CCCC) tako i po poziciji kod svih ispitivanih sisarskih vrsta (Slika 23).

Konkretno, u okviru CT regiona 1 detektovano je potencijalno ZBP-89 vezivno mesto na poziciji -334/-331 koje je očuvano kod svih ispitivanih vrsta dok se u CT regionu 2 nalaze dva blisko pozicionirana vezivna mesta (pozicije -308/-305 i -301/-298) od kojih je 3' mesto očuvano samo kod primata (Slika 23) (Kovacevic-Grujicic et al., 2008a). Na osnovu svega navedenog smo se odlučili da ispitamo ulogu CT regiona i vezivnih mesta za ZBP-89, detektovanih u okviru FP4 regiona, u regulaciji ekspresije *SOX3* gena u NT2/D1 ćelijskoj liniji.

5.2.5.1 Uloga CT regiona i vezivnih mesta za ZBP-89 u transkripcionoj regulaciji *SOX3* gena

U EMSA eksperimentima pokazano je da oba CT regiona formiraju specifične komplekse sa jedarnim proteinima kako neindukovanih, tako i retinoičnom kiselinom indukovanih NT2/D1 ćelija (Slika 24). Kompleksi formirani sa jedarnim proteinima indukovanih ćelija su jačeg inteziteta, što je ukazalo na potencijalnu ulogu CT regiona u procesu indukcije *SOX3* promotora. Takođe, oba CT regiona specifično prepoznaju i vezuju rekombinantni ZBP-89 protein (Slika 24). Specifičnost interakcije sa CT regionom 1 potvrđena je u EMSA eksperimentima sa mutiranom probom, gde je narušeno konsenzusno vezivno mesto za ZBP-89. Mutacija je dovela do skoro potpunog gubitka kompleksa formiranih sa jedarnim proteinima, kao i do potpunog gubitka sposobnosti vezivanja rekombinantnog ZBP-89 proteina (Slika 25). U slučaju CT regiona 2, u EMSA reakcijama analizirano je vezivanje proteina, kako za pojedinačne ZBP-89 mutante, tako i za duplog mutanta koji je jedini u potpunosti izgubio sposobnost vezivanja, kako jedarnih proteina NT2/D1 ćelija, tako i rekombinantnog ZBP-89 proteina (Slike 26 i 27). U eksperimentima kompeticije sa pojedinačnim i duplim mutantima potvrđeno je da oba ZBP-89 mesta u okviru CT regiona 2 vezuju ZBP-89 *in vitro* (Slika 28).

Mutaciona analiza konsenzusnog mesta za ZBP-89 (-334/-331) u okviru CT regiona 1 dovela je do pada promotorske aktivnosti na 70% u neindukovanim NT2/D1 ćelijama, ukazujući na značaj tog regiona u transkripcionoj aktivnosti *SOX3* promotora (Slika 29, MUT1). Takođe, analizirana mutacija praktično nije dovela do pada stepena indukcije reporterskog konstrukta, ukazujući na to da ova sekvenca nema ulogu u indukciji *SOX3* gena retinoičnom kiselinom (Slika 29, MUT1). Ovo se može objasniti i time da analizirana mutacija CT regiona 1 nije narušila nizvodno pozicionirano konsenzusno mesto za NF-Y (-330/-326), za koje je već utvrđeno da je veoma bitno indukciju transkripcije *SOX3* gena (Krstic et al., 2007).

Funkcionalna analiza mutanta kod koga su mutirana oba blisko pozicionirana konsenzusna mesta za ZBP-89 (pozicije -308/-305 i -301/-298) u okviru CT regiona 2, dovela je do pada promotorske aktivnosti na oko 40% u neindukovanim NT2/D1 ćelijama (Slika 29, MUT2/3), ukazujući na to da su ova dva vezivna mesta takođe funkcionalno značajna za regulaciju transkripcione aktivnosti *SOX3* gena. U ovom slučaju, dupla mutacija je dovela do pada u inducibilnosti *SOX3* promotora od 2 puta (Slika 29, MUT2/3), ukazujući da su vezivna mesta koje prepoznaje ZBP-89 u okviru CT regiona 2 bitna i za promotorsku aktivnost u neindukovanim ćelijama i, delimično, za odgovor *SOX3* promotora na indukciju retinoičnom kiselinom.

5.2.5.2 Efekat povećane ekspresije ZBP-89 u transkripcionoj regulaciji *SOX3* gena

Sledeći korak u ovim istraživanjima bio je da se ispita efekat povećane ekspresije ZBP-89 proteina na aktivnost *SOX3* promotora u NT2/D1 ćelijama. Kao što je ranije pomenuto, ZBP-89 je opšti transkripcioni faktor koji može imati ulogu i represora i aktivatora transkripcije zavisno od promotorskog konteksta, interakcije sa kofaktorima i kompeticije sa drugim transkripcionim faktorima (Bai and Merchant, 2000; Law et al., 1998; Malo et al., 2006; Zhang X. et al., 2003). U neindukovanim ćelijama, ektopično eksprimiran ZBP-89 protein nije imao uticaja na aktivnost *SOX3* promotora. Međutim, povećana ekspresija ZBP-89 je u potpunosti inhibirala odgovor *SOX3* promotora na indukciju retinoičnom kiselinom (Slika 30). Ovakav efekat povećane ekspresije ZBP-89 proteina na aktivnost promotorskog konstrukta je bio neočekivan, ako se uzme u obzir da mutacije u okviru CT regiona 2 dovode do pada, kako promotorske aktivnosti u neindukovanim NT2/D1 ćelijama, tako i inducibilnosti *SOX3* promotora.

Mehanizmi preko kojih ZBP-89 ostvaruje svoju represorsku funkciju su relativno dobro proučeni. Najčešće ZBP-89 kompetira za vezivanje za isto ili preklapajuće vezivno mesto sa transkripcionim faktorima koji imaju ulogu aktivatora, što je po literaturnim podacima najčešće Sp1 (Keates *et al.*, 2001; Law *et al.*, 1998; Passantino *et al.*, 1998). MatInspector program je predvideo i dva vezivna mesta za Sp1 koja se preklapaju sa ZBP-89 mestima u okviru CT regiona 2, ali analiza vezana za proučavanje uloge Sp1 nije sprovedena jer je predviđena verovatnoća vezivanja ovog transkripcionog faktora za sekvence niska (core similarity - 0.807). To naravno ne isključuje mogućnost da *in vivo* ZBP-89 kompetira sa Sp1 za vezivanje za ovaj region. Do sada u literaturi nije opisana interakcija ZBP-89 proteina sa ostalim transkripcionim faktorima čija su vezivna mesta sa visokom verovatnoćom predviđena od strane MatInspector programa u okviru istog regiona *SOX3* promotora (cKrox, MZF1, ZNF219 i MAZ).

Dakle, jedno od mogućih objašnjenja dobijenih rezultata je da se u ranim fazama neuralne diferencijacije NT2/D1 ćelija za CT region 2 vezuje neki aktivatorski protein čije se vezivno mesto preklapa sa vezivnim mestima za ZBP-89. U uslovima povećane ekspresije ZBP-89 moguće je da on uspešno kompetira sa aktivatorom, i na taj način onemogućava njegovo vezivanje za CT region 2. Druga mogućnost je da povećana količina ekotopično eksprimiranog ZBP-89 vezuje za sebe transkripcione faktore ili koaktivatore bitne za indukciju *SOX3*, smanjujući njihovu koncentraciju raspoloživu za obavljanje normalnih procesa u ćeliji. Naime, poznato je da ZBP-89 stupa u protein-protein interakcije sa koaktivatorom p300 (Bai and Merchant, 2000) za koji je utvrđeno da dovodi u vezu sekvencno-specifične transkripcione faktore sa bazalnom transkripcionom mašinerijom (Chan and La Thangue, 2001).

ZBP-89 transkripcioni faktor potencijalno ima represorsku ulogu u transkripcionoj regulaciji *SOX3* gena u kasnijim fazama diferencijacije NT2/D1 ćelija. Naime, pokazano je da posle prvih 48h indukcije, kada dolazi do značajnog povećanja transkripcije *SOX3* gena, nivo ekspresije dramatično pada, mada i dalje ostaje na nivou većem od onog kod neindukovanih ćelija (Stevanovic, 2003). Moguće je da u tom padu ekspresije *SOX3* gena važnu ulogu ima ZBP-89, što bi moglo biti predmet budućih istraživanja.

Rezultati prikazani u ovoj tezi omogućili su detektovanje sekvence u okviru CT regiona 1 i 2 koje vezuju jedarne proteine NT2/D1 ćelija, i čije mutacije dovode do smanjenja promotorske aktivnosti *SOX3* gena kako u neindukovanim NT2/D1 ćelijama tako i u retinoičnom kiselinom indukovanim ćelijama. Ovo se naročito odnosi na CT region 2 koji ima, bar delimično, ulogu u odgovoru *SOX3* promotora na indukciju retinoičnom kiselinom.

Očigledno je da se za ovu sekvencu vezuju transkripcioni faktori koji imaju ulogu aktivatora, a čija su mesta vezivanja takođe pogođena mutacijama koje su analizirane u ovom istraživanju. Kao što je pomenuto, *in silico* analizom smo ustanovili da se vezivna mesta za cKrox, MZF1, ZNF219 i MAZ preklapaju delimično ili u potpunosti sa vezivnim mestima za ZBP-89 i da su i ona narušena mutacijama uvedenim u okviru CT regiona 2 (rezultati nisu prikazani). Iako u ovom radu nije funkcionalno ispitana potencijalna uloga cKrox, MZF1 i ZNF219 transkripcionih faktora kao medijatora indukcije *SOX3* promotora preko CT regiona 2, oni bi mogli da budu kandidati koji će biti proučavani u nekoj od budućih analiza.

MZF1 (myeloid zinc finger protein 1) je najpre otkriven kao transkripcioni faktor koji se eksprimira u hematopoetskim progenitorskim ćelijama i ima ulogu u regulaciji mijeloidne diferencijacije (*Morris et al.*, 1994). Nedavno je pokazano da MZF1 učestvuje u regulaciji ekspresije gena u ćelijama nervnog sistema. Ovaj transkripcioni faktor deluje stimulatorno na aktivnost FGF-2 promotora (fibroblast growth factor-2) u astrocitima i HeLa ćelijama indukovanim apomorfinom, agonistom dopaminskog D1/D2 receptora, koji se koristi za prevenciju gubitka dopaminergičkih neurona *in vitro* (*Luo et al.*, 2009). S druge strane, MZF1 deluje kao represor gena za pleksin B3 (PLXNB3), neuralno ekspimiran transmembranski receptor značajan za razviće nervnog sistema i sinaptičku plastičnost (*Tamagnone et al.*, 1999; *Winberg et al.*, 2001).

ZNF219 (Krüppel-like zinc finger protein 219) transkripcioni faktor je konstitutivno ekspimiran u različitim fetalnim i adultnim tkivima (*Sakai et al.*, 2000). Literaturni podaci ukazuju da ima ulogu represora gena za HMGN1 protein (high mobility group nucleosomal binding protein 1) (*Sakai et al.*, 2003).

cKrox je transkripcioni faktor za koji je utvrđeno da može imati ulogu i represora i aktivatora transkripcije. Članovi familije hcKrox gena reprimiraju transkripciju gena koji kodiraju proteine ekstracelularnog matriksa: $\alpha 1$ (I) kolagen, $\alpha 1$ (II) kolagen, fibronektin i elastin (*Widom et al.*, 2001). Nedavno su se u literaturi pojavili rezultati koji su pokazali da je hcKrox potentan aktivator gena za kolagen tipa I i u normalnim adultnim fibroblastima ali i u patofiziološkim uslovima (*Kypriotou et al.*, 2007). Ova aktivacija je praćena fizičkim interakcijama između cKrox proteina i Sp1 i Sp3 transkripcionih faktora.

Od svih navedenih transkripcionih faktora, opredelili smo se da u daljoj analizi proučimo ulogu MAZ proteina u regulaciji ekspresije *SOX3* gena, što je detaljnije obrazloženo u sledećem odeljku Diskusije.

5.2.5.3 Uloga MAZ transkripcionog faktora u transkripcionoj regulaciji *SOX3* gena

Podaci iz literature ukazuju da MAZ protein ima ključnu ulogu u prolaznom povećanju ekspresije *c-myc* gena tokom prvih 48 h neuralne indukcije P19 embrionalnih karcinoma ćelija (mišiji pandan NT2/D1 ćelija) retinoičnom kiselinom (Komatsu *et al.*, 1997). Okamoto i saradnici su identifikovali MAZ i Sp1 kao ključne transkripcione faktore koji se vezuju za GC-bogati element u okviru promotora za NR1 gen (N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor subunit type 1) koji je odgovoran za indukciju ovog promotora tokom neuralne diferencijacije P19 ćelija (Okamoto *et al.*, 2002). Takođe, potencijalno vezivno mesto za MAZ protein, detektovano od strane MatInspector programa, u okviru CT regiona 2, je evolutivno očuvano kod svih ispitivanih vrsta sisara (Slika 31A). Detaljnom inspekcijom sekvence CT regiona 2 i korišćenjem raspoloživih literaturnih podataka o vezivnim mestima za MAZ protein (Ashfield *et al.*, 1994; Bossone *et al.*, 1992; DesJardins and Hay, 1993; Song *et al.*, 2001) uočeno je da postoje dva tandemska ponovka koja u potpunosti odgovaraju konsenzusnim mestima za MAZ protein (Slika 31B).

U EMSA i "superšift" reakcijama sa jedarnim proteinima i rekombinantnim MAZ proteinom pokazano je da ovaj protein specifično prepoznaje i vezuje se za CT region 2 koji sadrži potencijalna vezivna mesta za MAZ (Slika 32). Korišćenjem istih mutiranih proba kao u analizi vezivanja ZBP-89 proteina, utvrđeno je da pojedinačni mutanti MUT2 i MUT3 vezuju rekombinantni MAZ i da samo MUT2/3 u potpunosti gubi sposobnost vezivanja ovog proteina (Slika 33). Takođe, u eksperimentima kompeticije sa pojedinačnim i duplim mutantima potvrđeno je da oba MAZ mesta, detektovana detaljnom inspekcijom sekvence CT regiona 2, vezuju rekombinantni MAZ *in vitro* (Slika 34).

5.2.5.4 Efekat povećane ekspresije MAZ proteina u transkripcionoj regulaciji *SOX3* gena

S obzirom da je u prethodnim eksperimentima transfekcije pokazano da mutant MUT2/3, koji je potpuno izgubio sposobnost da vezuje jedarne proteine i rekombinantni MAZ protein, dovodi do pada, kako konstitutivne promotorske aktivnosti, tako i inducibilnosti *SOX3* promotora (Slika 29B), sledeći korak je bio da se ispita efekat povećane ekspresije MAZ proteina na aktivnost *SOX3* promotora u NT2/D1 ćelijama. Povećana

ekspresija ovog proteina, u eksperimentima kotransfekcije sa ekspresionim vektorom, dovela je do povećanja aktivnosti reporterskog konstrukta F19R30, kako u neindukovanim tako i u indukovanim NT2/D1 ćelijama (Slika 35). Dobijeni rezultati ukazuju da je MAZ pozitivni regulator ekspresije *SOX3* gena, koji ostvaruje svoju funkciju, najverovatnije, preko preko vezivnih mesta u okviru CT regiona 2 (Kovacevic-Grujicic et al., 2008b).

Postoje podaci da je MAZ protein sposoban da izazove savijanje DNK za oko 77° (Ashfield et al., 1994), čime bi mogle da se omoguće interakcije između međusobno udaljenih regulatornih motiva i transkripcionih faktora vezanih za njih u okviru *SOX3* promotora. Time bi se mogao objasniti stimulatorni efekat MAZ proteina na promotorsku aktivnost *SOX3* gena (Slika 35). Doprinos ekotopično eksprimiranog MAZ proteina je relativno skroman, što nije neobično s obzirom na kompleksan mehanizam regulacije *SOX3* gena koji zavisi od većeg broja *cis* regulatornih motiva raspoređenih u modulima duž promotora i transkripcionih faktora koji se za njih vezuju. Verovatno bi eksperimenti kotransfekcije, gde bi istovremeno eksprimirali nekoliko transkripcionih faktora rasvetleli neka od pitanja vezanih za mehanizam transkripcione regulacije *SOX3* gena.

Svi *cis* regulatorni regioni koji su definisani u ovoj tezi postavili su osnovu za dalju identifikaciju transkripcionih faktora koji su bili predmet paralelnih istraživanja, a pregled te literature biće predstavljen u sledećem odeljku Diskusije. Svi rezultati dobijeni u ovoj i u drugim paralelnim studijama su sumirani na Slici 36.

5.3 Mehanizmi transkripcione regulacije ekspresije *SOX3* gena kao odgovor na indukciju retinoičnom kiselinom

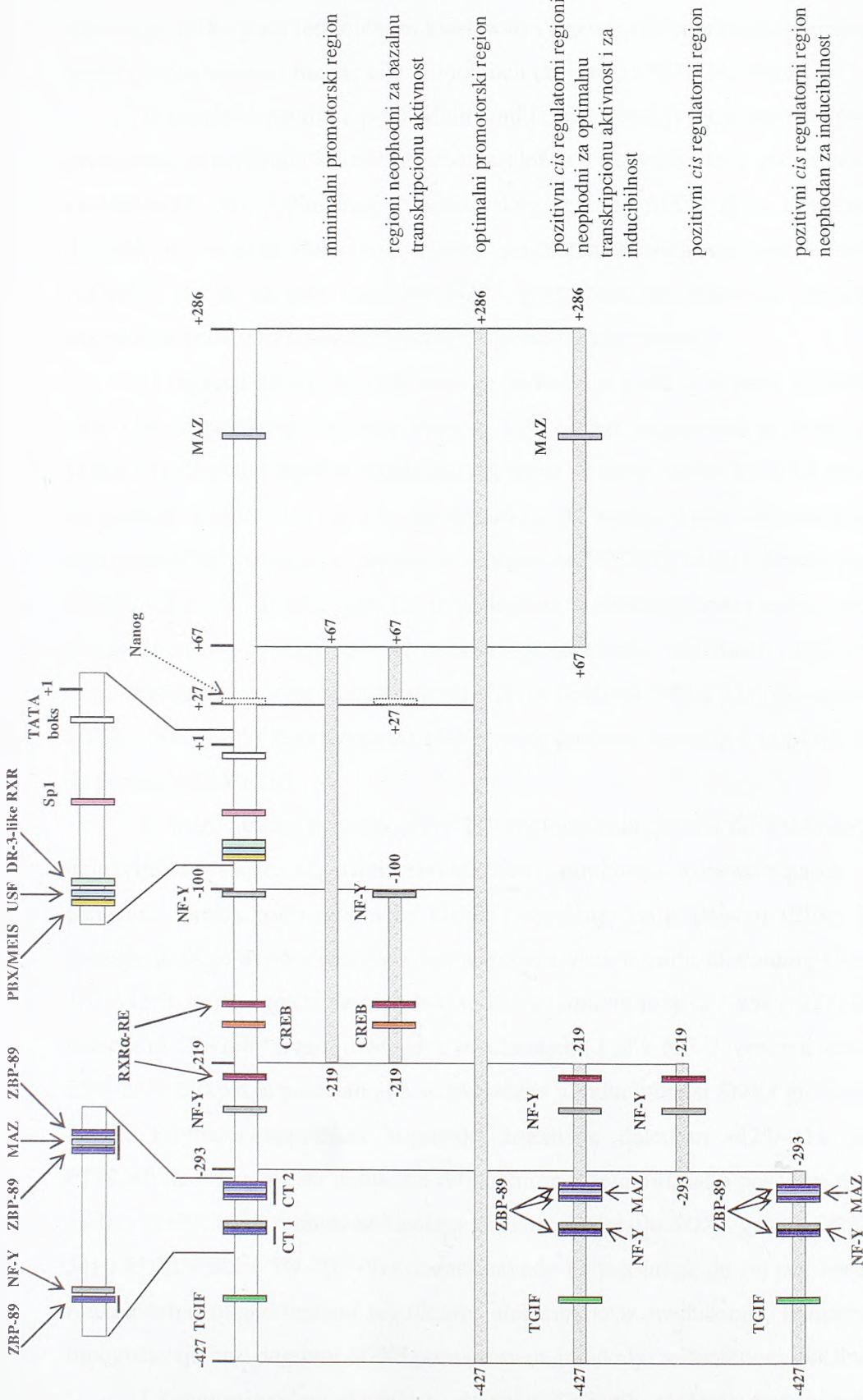
U ovom radu identifikovano je nekoliko regiona za koje je pokazano da imaju ulogu u indukciji *SOX3* gena retinoičnom kiselinom. Dobijeni rezultati su pružili osnovu za dalja istraživanja, kako kontrolnih elemenata, tako i transkripcionih faktora uključenih u ovaj proces. Naime, paralelnim studijama urađenim u našoj laboratoriji, u okviru identifikovanih regiona, definisano je nekoliko *cis* regulatornih elemenata preko kojih retinoična kiselina ostvaruje svoje pozitivno dejstvo na transkripcionu aktivnost *SOX3* gena (Slika 36).

U jednoj od studija identifikovan je kontrolni element koji je, bar jednim delom, odgovoran za indukciju *SOX3* gena retinoičnom kiselinom, pri čemu je pokazano da je nuklearni receptor RXR α medijator te indukcije (Mojsin et al., 2006). Taj element predstavlja atipično mesto za vezivanje RXR α , koje se sastoji od dva G-bogata motiva međusobno

udaljena 49 bp, na pozicijama -254 /-227 i -177 /-155 u odnosu na *tsp* (Mojsin et al., 2006) (Slika 36, RXR α -RE). U eksperimentima kotransfekcije sa enhenser-zavisnim reporterskim konstruktima ustanovljeno je da su oba motiva neophodna za postizanje indukcije retinoičnom kiselinom u prisustvu RXR α , što ukazuje da ovi elementi deluju sinergistički. Međutim, iako neophodan, ovaj region nije dovoljan za ostvarivanje punog efekta retinoične kiseline na aktivaciju *SOX3* promotora.

Složenost mehanizama indukcije *SOX3* gena retinoičnom kiselinom potvrđuje i studija koja ukazuje da je opšti transkripcioni faktor NF-Y uključen u ovaj proces. Ulogu u ovom regulatornom mehanizmu igraju NF-Y vezivna mesta na pozicijama -330/-326 i -250/-246 (Krstic et al., 2007) koja su locirana u pozitivnom *cis* regulatornom regionu -427/-219, okarakterisanom u ovom radu (Slika 36, NF-Y). NF-Y najverovatnije igra više uloga u ovom procesu: pomaže u otvaranju hromatinskih struktura na promotoru, stupa u interakcije sa bazalnom transkripcionom mašinerijom i interaguje sa koaktivatorima i okolnim transkripcionim faktorima vezanim za susedne sekvence u okviru *SOX3* promotora. Dok je proksimalno NF-Y mesto (-105/-101) bitno za konstitutivnu promotorsku aktivnost, dva distalna NF-Y mesta su bitna za inducibilnost *SOX3* promotora (Kovacevic Grujicic et al., 2005; Krstic et al., 2007).

Nedavno je objavljena studija u kojoj je pokazano da je nuklearni receptor RXR glavni medijator preko kojeg retinoična kiselina ostvaruje svoje pozitivno dejstvo na transkripciju *SOX3* gena (Nikcevic et al., 2008). U radu je identifikovano novo DR3-like-RXR vezivno mesto (-68/-54) preko kojeg retinoična kiselina u prisustvu RXR α proteina aktivira ekspresiju *SOX3* gena (Nikcevic et al., 2008) (Slika 36, DR-3-like RXR). Ovaj motiv se sastoji iz dva nesavršena heksamerna direktna ponovka razdvojena sa 3 bp (Nikcevic et al., 2008). Neposredno uzvodno od ovog regulatornog motiva, na poziciji -79/-70, funkcionalno je okarakterisano PBX/MEIS vezivno mesto za koje se, samo u prisustvu retinoične kiseline, vezuje heterodimerni kompleks PBX1/MEIS1 (Slika 36, PBX1/MEIS1) (Mojsin and Stevanovic, 2009). Rezultati te studije ukazuju da su PBX1 i MEIS1 proteini, takođe, medijatori aktivacije *SOX3* gena retinoičnom kiselinom (Mojsin and Stevanovic, 2009). Postoje podaci koji ukazuju da PBX1/MEIS1 kompleks može da stupa u direktne interakcije sa nuklearnim receptorima. Naime, trijodtironinom (T3) indukovana ekspresija gena za malični enzim rezultat je direktnih interakcija PBX1/MEIS1 kompleksa sa heterodimerom nuklearnih receptora TR/RXR (Wang et al., 2001). Postoji mogućnost da RXR α vezan za DR-3-like RXR motiv i blisko pozicionirani PBX1/MEIS1 kompleks stupaju u međusobne interakcije i na taj način posreduju u aktivaciji *SOX3* promotora retinoičnom kiselinom.



Slika 36. Shematski prikaz *cis* regulatornih regiona definisanih u ovoj tezi. Pozicije minimalnog i optimalnog promotorskog regiona, kao i identifikovanih *cis* regulatornih regiona su obeležene u odnosu na *isp* SOX3 gena. Obeležena su i vezivna mesta za transkripcione faktore identifikovane kako u ovoj tezi tako i u drugim istraživanjima (Kovacevic Grijić et al., 2005; Kovacevic Grijić et al., 2008b; Krstić et al., 2007; Mojsin, 2008; Mojsin et al., 2006; Mojsin and Stevanovic, 2009; Nikević et al., 2008)

Ipak, iako su oba opisana motiva funkcionalno značajna, ni ona nisu dovoljna za puni efekat aktivacije *SOX3* gena retinoičnom kiselinom s obzirom da minimalni promotorski region, koji poseduje ova vezivna mesta, nije inducibilan (konstrukt F17R24, Slika 11).

Iz pregleda rezultata prethodnih studija očigledno je da je mehanizam indukcije *SOX3* promotora retinoičnom kiselinom veoma složen i da veliki broj *cis* regulatornih elemenata raspoređenih duž optimalnog promotorskog regiona *SOX3* gena doprinosi tom procesu. Takođe, na osnovu delecione analize promotor-zavisnih reporter konstrukata može se zaključiti da je za pun odgovor *SOX3* promotora na indukciju retinoičnom kiselinom neophodno prisustvo mnogobrojnih *cis* regulatornih elemenata.

U regionu +67/+286 čija delecija dovodi do pada u stepenu indukcije od 2 puta do sada nije identifikovan nijedan element koji bi bio odgovoran za ovaj pad inducibilnosti (Slika 11). U ovom regionu analizirano je samo vezivno mesto za MAZ transkripcioni faktor na poziciji +213/+216, za koje je pokazano da vezuje kako rekombinantni MAZ tako i endogeni MAZ prisutan u jedarnim proteinima NT2/D1 ćelija (Kovacevic-Grujicic et al., 2008b) (Slika 36, MAZ). Kao što je pomenuto, u funkcionalnom eseju, povećana ekspresija MAZ proteina dovodi do povećanja promotorske aktivnosti *SOX3* gena, kako u neindukovanim tako i u indukovanim NT2/D1 ćelijama (Slika 35) (Kovacevic-Grujicic et al., 2008b). Verovatno je aktivatorski efekat ovog proteina povezan i sa MAZ vezivnim mestom na poziciji +213/+216.

S druge strane, delecija -427/-219 regiona koja dovodi do značajnog pada u stepenu indukcije se može objasniti eliminacijom prethodno okarakterisanih *cis* regulatornih elemenata preko kojih retinoična kiselina ostvaruje svoje dejstvo (Slike 11 i 36). Naime, moguće je da je ovom delecijom onemogućena veza između nizvodnog G-bogatog motiva (-177/-155), koji ne može da funkcioniše bez uzvodnog motiva (-254/-227) koji je obuhvaćen delecijom. Takođe, ovom delecijom su uklonjena i oba NF-Y vezivna mesta (-330/-326 i -250/-246) za koja je pokazano da su uključena u inducibilnost *SOX3* promotora (Krstic et al., 2007). Promotor-reporterski konstrukt kojem je deletiran -427/-219 region (konstrukt F17R30) ne odgovara na indukciju retinoičnom kiselinom, iako poseduje dva *cis* regulatorna motiva preko kojih retinoična kiselina aktivira ekspresiju *SOX3* gena - DR3-like-RXR (-68/-54) i PBX/MEIS (-79/-70). Ovi podaci navode na zaključak da svi ovi međusobno udaljeni, funkcionalno okarakterisani regulatorni elementi kroz međusobne, kooperativne interakcije omogućavaju pun odgovor *SOX3* promotora na indukciju retinoičnom kiselinom.

Literaturni podaci ukazuju na postojanje sličnih, složenih mehanizama transkripcione regulacije kao odgovor na indukciju retinoičnom kiselinom. U slučaju promotora za gen

Col11a2 (collagen type IX alpha 2), odgovor na indukciju retinoičnom kiselinom se postiže specifičnom interakcijom između RXR β koji se vezuje za DR-4 RARE i proteina koji prepoznaju uzvodni D/E enhenser odgovoran za ćelijski-specifičnu ekspresiju *Col11a2* gena u hondrocitima (Harris *et al.*, 2004). U ovom slučaju inducibilnost promotora je modulirana ne samo nuklearnim receptorima i kofaktorima vezanim za RARE, već i prisustvom/odsustvom proteina vezanih za D/E enhenser. Takođe, pokazano je da retinoičnom kiselinom indukovana ekspresija *blr1* gena (Burkitt lymphoma receptor 1) zavisi od RARE elementa koji se sastoji od dva GT boksa koja vezuju RAR i RXR, ali i njihove koordinisane interakcije sa nizvodnim vezivnim mestima za Oct1 (Octamer-binding transcription factor 1), NFATc3 (nuclear factor of activated T cells cytoplasmic calcineurin-dependent 3) i CREB2 (Wang and Yen, 2004). Pretpostavlja se da retinoična kiselina indukuje formiranje multiproteinskog kompleksa na RARE elementu tako što dolazi do savijanja DNK promotorske sekvence dovodeći u bliski kontakt međusobno udaljene regulatorne motive, čime je omogućeno transkripcionim faktorima vezanim za njih da interaguju sa RAR-om i RXR-om i aktiviraju transkripciju *blr1* gena (Wang and Yen, 2004). Bush i saradnici su pokazali da su za transkripcionu aktivaciju CD18 gena neophodni funkcionalan RARE, pozicioniran 900 nt uzvodno od *tsp*, i *ets* i Sp1 vezivna mesta u proksimalnom promotoru (Bush *et al.*, 2003). Njihova istraživanja su pokazala da je kooperativna interakcija između nuklearnih receptora RAR-ova i transkripcionih faktora Sp1 i GABP (GA-binding protein) neophodna za pun odgovor CD18 gena na indukciju retinoičnom kiselinom u mijeloidnim ćelijama, a da je ta interakcija omogućena od strane transkripcionih koaktivatora kao što je p300 (Bush *et al.*, 2003).

6. ZAKLJUČCI

U ovoj tezi su prikazani prvi i osnovni koraci u ispitivanju kontrolnih mehanizama ekspresije *SOX3* gena. Analiza je obuhvatala određivanje starta transkripcije ovog gena, kao i definisanje minimalnog promotorskog regiona neophodnog za njegovu bazalnu transkripcionu aktivnost. Takođe, identifikovani su pozitivni *cis* regulatorni regioni uključeni u regulaciju bazalne promotorske aktivnosti *SOX3* gena, kao i regioni bitni za indukciju ovog gena retinoičnom kiselinom. Rezultati prezentovani u ovom radu su pokazali da su Sp1, USF1, NF-Y i CREB ključni regulatori bazalne transkripcione aktivnosti *SOX3* gena. Takođe, pokazana je i uloga ZBP-89 i MAZ transkripcionog faktora u regulaciji promotorske aktivnosti *SOX3* gena. Svi *cis* regulatorni regioni koji su definisani u ovoj tezi postavili su osnovu i omogućili niz drugih paralelnih istraživanja vezanih za ispitivanje uloge brojnih transkripcionih faktora u modulaciji ekspresije *SOX3* gena. Na osnovu rezultata prikazanih u ovoj tezi mogu se izvesti sledeći zaključci:

1. Metodom elongacije reverznog oligonukleotida, određen je start transkripcije *SOX3* gena čoveka. Za nukleotid od kojeg započinje transkripcija, određen je citozin na poziciji 252 nt uzvodno od ATG kodona *SOX3* gena. Važno je istaći da je isti nukleotid određen kao start transkripcije ovog gena korišćenjem tri različita reverzna oligonukleotida.
2. Korišćenjem promotor-reporterskih konstrukata u eksperimentima tranzijentne transfekcije NT2/D1 ćelija, definisan je da minimalni promotorski region *SOX3* gena (-219/+67) koji sadrži regulatorne elemente neophodne za njegovu bazalnu transkripcionu aktivnost. Takođe, daljom delecionom analizom minimalnog promotora identifikovana su dva *cis* regulatorna regiona, -219/-100 i +27/+67, koja su od esencijalne važnosti za aktivnost *SOX3* promotora.
3. Funkcionalnom analizom, identifikovana su dva regiona, -427/-219 i +67/+286, koji sadrže pozitivne *cis* regulatorne elemente neophodne za optimalnu aktivnost *SOX3* promotora. Prisustvo ovih regiona omogućuje maksimalnu aktivnost reporterskog konstrukta, što ukazuje na modularnu prirodu *cis* regulatornih elemenata uključenih u transkripcionu regulaciju *SOX3* gena.
4. Funkcionalnom analizom je pokazano da su isti regulatorni regioni (-427/-219 i +67/+286) uključeni i u indukciju *SOX3* gena retinoičnom kiselinom. Dalja preciznija analiza regiona -

427/-219, korišćenjem enhenser-zavisnih reporter konstrukata, je pokazala da fragment -293/-219 poseduje pozitivne *cis* regulatorne elemente, kao i da je -427/-293 region neophodan za inducibilnost *SOX3* promotora.

5. Poređenje sekvenci minimalnih promotora *SOX3* ortologa je ukazalo na izuzetno visok stepen evolutivne očuvanosti ovih regiona kod sisara. Takođe, poređenje sekvenci je pokazalo da su mesta za vezivanje Sp1, USF, NF-Y i CREB proteina, kao i TATA boks, očuvani i po nukleotidnom sastavu i po poziciji u promotorskim regionima, kod svih analiziranih ortologa sisara.

6. Mutacija TATA boksa, lociranog na poziciji -9/-5, dovela je do pada *SOX3* promotorske aktivnosti na oko 30% u odnosu na *wt*, što je potvrdilo funkcionalni značaj ovog elementa u regulaciji transkripcije *SOX3* promotora.

7. Analizom interakcija jedarnih proteina NT2/D1 ćelija i korišćenjem specifičnih antitela, pokazano je da se Sp1, USF1, NF- Y i CREB specifično vezuju za konsenzusna mesta u okviru minimalnog promotorskog regiona *SOX3* gena. Mutaciona analiza Sp1, USF1, NF-Y i CREB vezivnih mesta je pokazala da su sva četiri transkripciona faktora ključni regulatori bazalne transkripcione aktivnosti *SOX3* gena. Rezultati prikazani u ovoj tezi ukazuju da su ovi proteini transkripcioni aktivatori *SOX3* promotora.

8. Detaljna analiza regiona -427/-293, koji je neophodan za inducibilnost *SOX3* promotora, otkrila je prisustvo dva CT regiona. U okviru njih, detektovana su 3 potencijalna, evolutivno očuvana ZBP-89 vezivna mesta koja specifično vezuju jedarne proteine neindukovanih i retinoičnom kiselinom indukovanih NT2/D1 ćelija, kao i rekombinantni ZBP-89 protein. Mutaciona analiza ZBP-89 vezivnog mesta u okviru CT regiona 1 dovodi do pada *SOX3* promotorske aktivnosti u neindukovanim NT2/D1 ćelijama, dok mutacija oba vezivna mesta u okviru CT regiona 2 dovodi do pada i konstitutivne promotorske aktivnosti, i retinoičnom kiselinom indukovano odgovora *SOX3* promotora. Povećana ekspresija ZBP-89 proteina nije dovela do značajne promene u promotorskoj aktivnosti u neindukovanim NT2/D1 ćelijama, ali je u potpunosti inhibirala odgovor *SOX3* promotora na indukciju retinoičnom kiselinom.

9. Analizom interakcija jedarnih proteina NT2/D1 ćelija i rekombinantnog MAZ proteina, uz korišćenje specifičnih antitela, pokazano je da se za CT region 2 specifično vezuje i MAZ

protein. Povećana ekspresija ovog proteina dovodi do povećanja promotorske aktivnosti *SOX3* gena, kako u neindukovanim tako i u indukovanim NT2/D1 ćelijama, ukazujući na aktivatorsku ulogu ovog transkripcionog faktora u regulaciji ekspresije *SOX3* gena.

7. LITERATURA

- Abumiya T., Sasaguri T., Taba Y., Miwa Y. and Miyagi M.* (2002). Shear stress induces expression of vascular endothelial growth factor receptor Flk-1/KDR through the CT-rich Sp1 binding site. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22: 907-913.
- Ahn S., Olive M., Aggarwal S., Krylov D., Ginty D.D. and Vinson C.* (1998). A dominant-negative inhibitor of CREB reveals that it is a general mediator of stimulus-dependent transcription of c-fos. *Mol Cell Biol* 18: 967-977.
- Aida M., Chen Y., Nakajima K., Yamaguchi Y., Wada T. and Handa H.* (2006). Transcriptional pausing caused by NELF plays a dual role in regulating immediate-early expression of the junB gene. *Mol Cell Biol* 26: 6094-6104.
- Alberts B.* (1994) *Molecular biology of the cell*, 3rd edn. Garland Pub., New York
- Albrecht A.N., Kornak U., Boddreich A., Suring K., Robinson P.N., Stiege A.C. et al* (2004). A molecular pathogenesis for transcription factor associated poly-alanine tract expansions. *Hum Mol Genet* 13: 2351-2359.
- Amiel J., Trochet D., Clement-Ziza M., Munnich A. and Lyonnet S.* (2004). Polyalanine expansions in human. *Hum Mol Genet* 13 Spec No 2: R235-243.
- Andrews G.K., Lee D.K., Ravindra R., Lichtlen P., Sirito M., Sawadogo M. et al* (2001). The transcription factors MTF-1 and USF1 cooperate to regulate mouse metallothionein-I expression in response to the essential metal zinc in visceral endoderm cells during early development. *Embo J* 20: 1114-1122.
- Andrews P.W.* (1984). Retinoic acid induces neuronal differentiation of a cloned human embryonal carcinoma cell line in vitro. *Dev Biol* 103: 285-293.
- Andrews P.W.* (1988). Human teratocarcinomas. *Biochim Biophys Acta* 948: 17-36.
- Andrews P.W.* (1998). Teratocarcinomas and human embryology: pluripotent human EC cell lines. Review article. *Apmis* 106: 158-167.
- Andrews P.W., Damjanov I., Simon D., Banting G.S., Carlin C., Dracopoli N.C. et al* (1984). Pluripotent embryonal carcinoma clones derived from the human teratocarcinoma cell line Tera-2. Differentiation in vivo and in vitro. *Lab Invest* 50: 147-162.
- Arias J., Alberts A.S., Brindle P., Claret F.X., Smeal T., Karin M. et al* (1994). Activation of cAMP and mitogen responsive genes relies on a common nuclear factor. *Nature* 370: 226-229.
- Arnone M.I. and Davidson E.H.* (1997). The hardwiring of development: organization and function of genomic regulatory systems. *Development* 124: 1851-1864.
- Ashfield R., Patel A.J., Bossone S.A., Brown H., Campbell R.D., Marcu K.B. et al* (1994). MAZ-dependent termination between closely spaced human complement genes. *Embo J* 13: 5656-5667.
- Avilion A.A., Nicolis S.K., Pevny L.H., Perez L., Vivian N. and Lovell-Badge R.* (2003). Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. *Genes Dev* 17: 126-140.
- Bai L., Logsdon C. and Merchant J.L.* (2002). Regulation of epithelial cell growth by ZBP-89: potential relevance in pancreatic cancer. *Int J Gastrointest Cancer* 31: 79-88.
- Bai L. and Merchant J.L.* (2000). Transcription factor ZBP-89 cooperates with histone acetyltransferase p300 during butyrate activation of p21waf1 transcription in human cells. *J Biol Chem* 275: 30725-30733.
- Bajic V.B., Choudhary V. and Hock C.K.* (2004). Content analysis of the core promoter region of human genes. *In Silico Biol* 4: 109-125.

- Bajic V.B., Tan S.L., Christoffels A., Schonbach C., Lipovich L., Yang L. et al* (2006). Mice and men: their promoter properties. *PLoS Genet* 2: e54.
- Beranger F., Mejean C., Moniot B., Berta P. and Vandromme M.* (2000). Muscle differentiation is antagonized by SOX15, a new member of the SOX protein family. *J Biol Chem* 275: 16103-16109.
- Bergstrom D.E., Young M., Albrecht K.H. and Eicher E.M.* (2000). Related function of mouse SOX3, SOX9, and SRY HMG domains assayed by male sex determination. *Genesis* 28: 111-124.
- Berk A.J.* (2000). TBP-like factors come into focus. *Cell* 103: 5-8.
- Bernadt C.T., Nowling T., Wiebe M.S. and Rizzino A.* (2005). NF-Y behaves as a bifunctional transcription factor that can stimulate or repress the FGF-4 promoter in an enhancer-dependent manner. *Gene Expr* 12: 193-212.
- Bernard P., Tang P., Liu S., Dewing P., Harley V.R. and Vilain E.* (2003). Dimerization of SOX9 is required for chondrogenesis, but not for sex determination. *Hum Mol Genet* 12: 1755-1765.
- Blake M.C., Jambou R.C., Swick A.G., Kahn J.W. and Azizkhan J.C.* (1990). Transcriptional initiation is controlled by upstream GC-box interactions in a TATAA-less promoter. *Mol Cell Biol* 10: 6632-6641.
- Bolognese F., Wasner M., Dohna C.L., Gurtner A., Ronchi A., Muller H. et al* (1999). The cyclin B2 promoter depends on NF-Y, a trimer whose CCAAT-binding activity is cell-cycle regulated. *Oncogene* 18: 1845-1853.
- Boshart M., Kluppel M., Schmidt A., Schutz G. and Luckow B.* (1992). Reporter constructs with low background activity utilizing the cat gene. *Gene* 110: 129-130.
- Bossone S.A., Asselin C., Patel A.J. and Marcu K.B.* (1992). MAZ, a zinc finger protein, binds to c-MYC and C2 gene sequences regulating transcriptional initiation and termination. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 7452-7456.
- Bouwman P. and Philipsen S.* (2002). Regulation of the activity of Sp1-related transcription factors. *Mol Cell Endocrinol* 195: 27-38.
- Bowles J., Schepers G. and Koopman P.* (2000). Phylogeny of the SOX family of developmental transcription factors based on sequence and structural indicators. *Dev Biol* 227: 239-255.
- Brandeis M., Frank D., Keshet I., Siegfried Z., Mendelsohn M., Nemes A. et al* (1994). Sp1 elements protect a CpG island from de novo methylation. *Nature* 371: 435-438.
- Breathnach R. and Chambon P.* (1981). Organization and expression of eucaryotic split genes coding for proteins. *Annu Rev Biochem* 50: 349-383.
- Brunelli S., Silva Casey E., Bell D., Harland R. and Lovell-Badge R.* (2003). Expression of Sox3 throughout the developing central nervous system is dependent on the combined action of discrete, evolutionarily conserved regulatory elements. *Genesis* 36: 12-24.
- Burke T.W. and Kadonaga J.T.* (1996). Drosophila TFIID binds to a conserved downstream basal promoter element that is present in many TATA-box-deficient promoters. *Genes Dev* 10: 711-724.
- Burke T.W. and Kadonaga J.T.* (1997). The downstream core promoter element, DPE, is conserved from Drosophila to humans and is recognized by TAFII60 of Drosophila. *Genes Dev* 11: 3020-3031.
- Burley S.K. and Roeder R.G.* (1996). Biochemistry and structural biology of transcription factor IID (TFIID). *Annu Rev Biochem* 65: 769-799.
- Bush T.S., St Coeur M., Resendes K.K. and Rosmarin A.G.* (2003). GA-binding protein (GABP) and Sp1 are required, along with retinoid receptors, to mediate retinoic acid responsiveness of CD18 (beta 2 leukocyte integrin): a novel mechanism of transcriptional regulation in myeloid cells. *Blood* 101: 311-317.

- Butler J.E. and Kadonaga J.T. (2002). The RNA polymerase II core promoter: a key component in the regulation of gene expression. *Genes Dev* 16: 2583-2592.
- Bylund M., Andersson E., Novitsch B.G. and Muhr J. (2003). Vertebrate neurogenesis is counteracted by Sox1-3 activity. *Nat Neurosci* 6: 1162-1168.
- Caburet S., Demarez A., Moumne L., Fellous M., De Baere E. and Veitia R.A. (2004). A recurrent polyalanine expansion in the transcription factor FOXL2 induces extensive nuclear and cytoplasmic protein aggregation. *J Med Genet* 41: 932-936.
- Cameron F.J. and Sinclair A.H. (1997). Mutations in SRY and SOX9: testis-determining genes. *Hum Mutat* 9: 388-395.
- Carcamo J., Maldonado E., Cortes P., Ahn M.H., Ha I., Kasai Y. et al (1990). A TATA-like sequence located downstream of the transcription initiation site is required for expression of an RNA polymerase II transcribed gene. *Genes Dev* 4: 1611-1622.
- Caretti G., Salsi V., Vecchi C., Imbriano C. and Mantovani R. (2003). Dynamic recruitment of NF-Y and histone acetyltransferases on cell-cycle promoters. *J Biol Chem* 278: 30435-30440.
- Carreira S., Liu B. and Goding C.R. (2000). The gene encoding the T-box factor Tbx2 is a target for the microphthalmia-associated transcription factor in melanocytes. *J Biol Chem* 275: 21920-21927.
- Cartharius K., Frech K., Grote K., Klocke B., Haltmeier M., Klingenhoff A. et al (2005). MatInspector and beyond: promoter analysis based on transcription factor binding sites. *Bioinformatics* 21: 2933-2942.
- Chalkley G.E. and Verrijzer C.P. (1999). DNA binding site selection by RNA polymerase II TAFs: a TAF(II)250-TAF(II)150 complex recognizes the initiator. *Embo J* 18: 4835-4845.
- Chambers I., Colby D., Robertson M., Nichols J., Lee S., Tweedie S. et al (2003). Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell* 113: 643-655.
- Chambon P. (1996). A decade of molecular biology of retinoic acid receptors. *Faseb J* 10: 940-954.
- Chan H.M. and La Thangue N.B. (2001). p300/CBP proteins: HATs for transcriptional bridges and scaffolds. *J Cell Sci* 114: 2363-2373.
- Chenn A. and Walsh C.A. (2002). Regulation of cerebral cortical size by control of cell cycle exit in neural precursors. *Science* 297: 365-369.
- Chiang C.M. and Roeder R.G. (1995). Cloning of an intrinsic human TFIID subunit that interacts with multiple transcriptional activators. *Science* 267: 531-536.
- Collignon J., Sockanathan S., Hacker A., Cohen-Tannoudji M., Norris D., Rastan S. et al (1996). A comparison of the properties of Sox-3 with Sry and two related genes, Sox-1 and Sox-2. *Development* 122: 509-520.
- Colter D.C., Piera-Velazquez S., Hawkins D.F., Whitecavage M.K., Jimenez S.A. and Stokes D.G. (2005). Regulation of the human Sox9 promoter by the CCAAT-binding factor. *Matrix Biol* 24: 185-197.
- Conkright M.D., Canettieri G., Sreaton R., Guzman E., Miraglia L., Hogenesch J.B. et al (2003). TORCs: transducers of regulated CREB activity. *Mol Cell* 12: 413-423.
- Connor F., Wright E., Denny P., Koopman P. and Ashworth A. (1995). The Sry-related HMG box-containing gene Sox6 is expressed in the adult testis and developing nervous system of the mouse. *Nucleic Acids Res* 23: 3365-3372.
- Cooper S.J., Trinklein N.D., Anton E.D., Nguyen L. and Myers R.M. (2006). Comprehensive analysis of transcriptional promoter structure and function in 1% of the human genome. *Genome Res* 16: 1-10.

- Coustry F., Hu Q., de Crombrughe B. and Maity S.N. (2001). CBF/NF-Y functions both in nucleosomal disruption and transcription activation of the chromatin-assembled topoisomerase II α promoter. Transcription activation by CBF/NF-Y in chromatin is dependent on the promoter structure. *J Biol Chem* 276: 40621-40630.
- Daniel J.A., Pray-Grant M.G. and Grant P.A. (2005). Effector proteins for methylated histones: an expanding family. *Cell Cycle* 4: 919-926.
- Darnell J.E., Jr. (1982). Variety in the level of gene control in eukaryotic cells. *Nature* 297: 365-371.
- Dawson M.I., Park J.H., Chen G., Chao W., Dousman L., Waleh N. et al (2001). Retinoic acid (RA) receptor transcriptional activation correlates with inhibition of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced ornithine decarboxylase (ODC) activity by retinoids: a potential role for trans-RA-induced ZBP-89 in ODC inhibition. *Int J Cancer* 91: 8-21.
- Dawson T.M. and Ginty D.D. (2002). CREB family transcription factors inhibit neuronal suicide. *Nat Med* 8: 450-451.
- de la Cruz X., Lois S., Sanchez-Molina S. and Martinez-Balbas M.A. (2005). Do protein motifs read the histone code? *Bioessays* 27: 164-175.
- Deato M.D. and Tjian R. (2007). Switching of the core transcription machinery during myogenesis. *Genes Dev* 21: 2137-2149.
- Denny P., Swift S., Brand N., Dabhade N., Barton P. and Ashworth A. (1992). A conserved family of genes related to the testis determining gene, SRY. *Nucleic Acids Res* 20: 2887.
- Desdouets C., Matesic G., Molina C.A., Foulkes N.S., Sassone-Corsi P., Brechot C. et al (1995). Cell cycle regulation of cyclin A gene expression by the cyclic AMP-responsive transcription factors CREB and CREM. *Mol Cell Biol* 15: 3301-3309.
- DesJardins E. and Hay N. (1993). Repeated CT elements bound by zinc finger proteins control the absolute and relative activities of the two principal human c-myc promoters. *Mol Cell Biol* 13: 5710-5724.
- Dignam J.D., Lebovitz R.M. and Roeder R.G. (1983). Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei. *Nucleic Acids Res* 11: 1475-1489.
- Djurovic J. and Stevanovic M. (2004). Structural and functional characterization of the human SOX14 promoter. *Biochim Biophys Acta* 1680: 53-59.
- Doetzlhofer A., Rotheneder H., Lagger G., Koranda M., Kurtev V., Brosch G. et al (1999). Histone deacetylase 1 can repress transcription by binding to Sp1. *Mol Cell Biol* 19: 5504-5511.
- Dubin R.A., Coward P., Lau Y.F. and Ostrer H. (1995). Functional comparison of the *Mus musculus molossinus* and *Mus musculus domesticus* Sry genes. *Mol Endocrinol* 9: 1645-1654.
- Duncan D.D., Stupakoff A., Hedrick S.M., Marcu K.B. and Siu G. (1995). A Myc-associated zinc finger protein binding site is one of four important functional regions in the CD4 promoter. *Mol Cell Biol* 15: 3179-3186.
- Dunn T.L., Mynett-Johnson L., Wright E.M., Hosking B.M., Koopman P.A. and Muscat G.E. (1995). Sequence and expression of Sox-18 encoding a new HMG-box transcription factor. *Gene* 161: 223-225.
- Dvir A., Conaway J.W. and Conaway R.C. (2001). Mechanism of transcription initiation and promoter escape by RNA polymerase II. *Curr Opin Genet Dev* 11: 209-214.
- Emili A., Greenblatt J. and Ingles C.J. (1994). Species-specific interaction of the glutamine-rich activation domains of Sp1 with the TATA box-binding protein. *Mol Cell Biol* 14: 1582-1593.

- Evans R., Fairley J.A. and Roberts S.G. (2001). Activator-mediated disruption of sequence-specific DNA contacts by the general transcription factor TFIIB. *Genes Dev* 15: 2945-2949.
- Falender A.E., Freiman R.N., Geles K.G., Lo K.C., Hwang K., Lamb D.J. et al (2005). Maintenance of spermatogenesis requires TAF4b, a gonad-specific subunit of TFIID. *Genes Dev* 19: 794-803.
- Felinski E.A., Kim J., Lu J. and Quinn P.G. (2001). Recruitment of an RNA polymerase II complex is mediated by the constitutive activation domain in CREB, independently of CREB phosphorylation. *Mol Cell Biol* 21: 1001-1010.
- Felinski E.A. and Quinn P.G. (1999). The CREB constitutive activation domain interacts with TATA-binding protein-associated factor 110 (TAF110) through specific hydrophobic residues in one of the three subdomains required for both activation and TAF110 binding. *J Biol Chem* 274: 11672-11678.
- Felinski E.A. and Quinn P.G. (2001). The coactivator dTAF(II)110/hTAF(II)135 is sufficient to recruit a polymerase complex and activate basal transcription mediated by CREB. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 13078-13083.
- Firlej V., Bocquet B., Desbiens X., de Launoit Y. and Chotteau-Lelievre A. (2005). Pea3 transcription factor cooperates with USF-1 in regulation of the murine bax transcription without binding to an Ets-binding site. *J Biol Chem* 280: 887-898.
- Flores O., Lu H. and Reinberg D. (1992). Factors involved in specific transcription by mammalian RNA polymerase II. Identification and characterization of factor IIIH. *J Biol Chem* 267: 2786-2793.
- Freemantle S.J., Kerley J.S., Olsen S.L., Gross R.H. and Spinella M.J. (2002). Developmentally-related candidate retinoic acid target genes regulated early during neuronal differentiation of human embryonal carcinoma. *Oncogene* 21: 2880-2889.
- Freiman R.N., Albright S.R., Zheng S., Sha W.C., Hammer R.E. and Tjian R. (2001). Requirement of tissue-selective TBP-associated factor TAFII105 in ovarian development. *Science* 293: 2084-2087.
- Friedle H. and Knochel W. (2002). Cooperative interaction of Xvent-2 and GATA-2 in the activation of the ventral homeobox gene Xvent-1B. *J Biol Chem* 277: 23872-23881.
- Furihata T., Hosokawa M., Satoh T. and Chiba K. (2004). Synergistic role of specificity proteins and upstream stimulatory factor 1 in transactivation of the mouse carboxylesterase 2/microsomal acylcarnitine hydrolase gene promoter. *Biochem J* 384: 101-110.
- Ge Y., Jensen T.L., Matherly L.H. and Taub J.W. (2003). Physical and functional interactions between USF and Sp1 proteins regulate human deoxycytidine kinase promoter activity. *J Biol Chem* 278: 49901-49910.
- Ghosh G. and Van Duyne G.D. (1996). Pieces of the puzzle: assembling the preinitiation complex of Pol II. *Structure* 4: 891-895.
- Gilchrist D.A., Nechaev S., Lee C., Ghosh S.K., Collins J.B., Li L. et al (2008). NELF-mediated stalling of Pol II can enhance gene expression by blocking promoter-proximal nucleosome assembly. *Genes Dev* 22: 1921-1933.
- Gill G., Pascal E., Tseng Z.H. and Tjian R. (1994). A glutamine-rich hydrophobic patch in transcription factor Sp1 contacts the dTAFII110 component of the Drosophila TFIID complex and mediates transcriptional activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 192-196.
- Girard M. and Goossens M. (2006). Sumoylation of the SOX10 transcription factor regulates its transcriptional activity. *FEBS Lett* 580: 1635-1641.
- Goodfellow P.N. and Lovell-Badge R. (1993). SRY and sex determination in mammals. *Annu Rev Genet* 27: 71-92.

- Gowri P.M., Yu J.H., Shaufli A., Sperling M.A. and Menon R.K. (2003). Recruitment of a repressosome complex at the growth hormone receptor promoter and its potential role in diabetic nephropathy. *Mol Cell Biol* 23: 815-825.
- Graham V., Khudyakov J., Ellis P. and Pevny L. (2003). SOX2 functions to maintain neural progenitor identity. *Neuron* 39: 749-765.
- Graves J.A. (1998). Evolution of the mammalian Y chromosome and sex-determining genes. *J Exp Zool* 281: 472-481.
- Gubbay J., Collignon J., Koopman P., Capel B., Economou A., Munsterberg A. et al (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: 245-250.
- Gudas L.J. (1994). Retinoids and vertebrate development. *J Biol Chem* 269: 15399-15402.
- Guth S.I. and Wegner M. (2008). Having it both ways: Sox protein function between conservation and innovation. *Cell Mol Life Sci* 65: 3000-3018.
- Hahn S. (1993). Structure(?) and function of acidic transcription activators. *Cell* 72: 481-483.
- Hamel B.C., Smits A.P., Otten B.J., van den Helm B., Ropers H.H. and Mariman E.C. (1996). Familial X-linked mental retardation and isolated growth hormone deficiency: clinical and molecular findings. *Am J Med Genet* 64: 35-41.
- Hargrave M., Karunaratne A., Cox L., Wood S., Koopman P. and Yamada T. (2000). The HMG box transcription factor gene Sox14 marks a novel subset of ventral interneurons and is regulated by sonic hedgehog. *Dev Biol* 219: 142-153.
- Harland R. (2000). Neural induction. *Curr Opin Genet Dev* 10: 357-362.
- Harley V.R., Lovell-Badge R. and Goodfellow P.N. (1994). Definition of a consensus DNA binding site for SRY. *Nucleic Acids Res* 22: 1500-1501.
- Harris L.R., Kamarainen O.P., Sevakivi M., Miller G.C., Clarke J.W., Potter J.L. et al (2004). A novel retinoic acid-response element requires an enhancer element mediator for transcriptional activation. *Biochem J* 383: 37-43.
- Hart A.H., Hartley L., Ibrahim M. and Robb L. (2004). Identification, cloning and expression analysis of the pluripotency promoting Nanog genes in mouse and human. *Dev Dyn* 230: 187-198.
- Hasan N.M. and MacDonald M.J. (2002). Sp/Kruppel-like transcription factors are essential for the expression of mitochondrial glycerol phosphate dehydrogenase promoter B. *Gene* 296: 221-234.
- Hasegawa T., Takeuchi A., Miyaishi O., Isobe K. and de Crombrughe B. (1997). Cloning and characterization of a transcription factor that binds to the proximal promoters of the two mouse type I collagen genes. *J Biol Chem* 272: 4915-4923.
- Hattori T., Eberspaecher H., Lu J., Zhang R., Nishida T., Kahyo T. et al (2006). Interactions between PIAS proteins and SOX9 result in an increase in the cellular concentrations of SOX9. *J Biol Chem* 281: 14417-14428.
- Hawley S.H., Wunnenberg-Stapleton K., Hashimoto C., Laurent M.N., Watabe T., Blumberg B.W. et al (1995). Disruption of BMP signals in embryonic *Xenopus* ectoderm leads to direct neural induction. *Genes Dev* 9: 2923-2935.
- Heintzman N.D. and Ren B. (2007). The gateway to transcription: identifying, characterizing and understanding promoters in the eukaryotic genome. *Cell Mol Life Sci* 64: 386-400.
- Henrion A.A., Martinez A., Mattei M.G., Kahn A. and Raymondjean M. (1995). Structure, sequence, and chromosomal location of the gene for USF2 transcription factors in mouse. *Genomics* 25: 36-43.
- Her S., Claycomb R., Tai T.C. and Wong D.L. (2003). Regulation of the rat phenylethanolamine N-methyltransferase gene by transcription factors Sp1 and MAZ. *Mol Pharmacol* 64: 1180-1188.

- Hiraoka Y., Ogawa M., Sakai Y., Kido S. and Aiso S. (1998). The mouse Sox5 gene encodes a protein containing the leucine zipper and the Q box. *Biochim Biophys Acta* 1399: 40-46.
- Hoey T., Weinzierl R.O., Gill G., Chen J.L., Dynlacht B.D. and Tjian R. (1993). Molecular cloning and functional analysis of Drosophila TAF110 reveal properties expected of coactivators. *Cell* 72: 247-260.
- Hokamp K., McLysaght A. and Wolfe K.H. (2003). The 2R hypothesis and the human genome sequence. *J Struct Funct Genomics* 3: 95-110.
- Huang D.Y., Kuo Y.Y., Lai J.S., Suzuki Y., Sugano S. and Chang Z.F. (2004). GATA-1 and NF-Y cooperate to mediate erythroid-specific transcription of Gfi-1B gene. *Nucleic Acids Res* 32: 3935-3946.
- Huang W., Chung U.I., Kronenberg H.M. and de Crombrughe B. (2001). The chondrogenic transcription factor Sox9 is a target of signaling by the parathyroid hormone-related peptide in the growth plate of endochondral bones. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 160-165.
- Huang W., Zhou X., Lefebvre V. and de Crombrughe B. (2000). Phosphorylation of SOX9 by cyclic AMP-dependent protein kinase A enhances SOX9's ability to transactivate a Col2a1 chondrocyte-specific enhancer. *Mol Cell Biol* 20: 4149-4158.
- Husmann M., Jehnichen P., Jahn B., Schlosshan D., Romahn E. and Marx J. (1996). A novel SP-1 site in the human interleukin-1 beta promoter confers preferential transcriptional activity in keratinocytes. *Eur J Immunol* 26: 3008-3014.
- Imbalzano A.N., Zaret K.S. and Kingston R.E. (1994). Transcription factor (TF) IIB and TFIIA can independently increase the affinity of the TATA-binding protein for DNA. *J Biol Chem* 269: 8280-8286.
- Inoue T., Kamiyama J. and Sakai T. (1999). Sp1 and NF-Y synergistically mediate the effect of vitamin D(3) in the p27(Kip1) gene promoter that lacks vitamin D response elements. *J Biol Chem* 274: 32309-32317.
- Iourgenko V., Zhang W., Mickanin C., Daly I., Jiang C., Hexham J.M. et al (2003). Identification of a family of cAMP response element-binding protein coactivators by genome-scale functional analysis in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 12147-12152.
- Jager M., Queinnec E., Houliston E. and Manuel M. (2006). Expansion of the SOX gene family predated the emergence of the Bilateria. *Mol Phylogenet Evol* 39: 468-477.
- Jenkinson S.R., Intlekofer A.M., Sun G., Feigenbaum L., Reiner S.L. and Bosselut R. (2007). Expression of the transcription factor cKrox in peripheral CD8 T cells reveals substantial postthymic plasticity in CD4-CD8 lineage differentiation. *J Exp Med* 204: 267-272.
- Johnson P.F. and McKnight S.L. (1989). Eukaryotic transcriptional regulatory proteins. *Annu Rev Biochem* 58: 799-839.
- Jump D.B., Thelen A.P. and Mater M.K. (2001). Functional interaction between sterol regulatory element-binding protein-1c, nuclear factor Y, and 3,5,3'-triiodothyronine nuclear receptors. *J Biol Chem* 276: 34419-34427.
- Kaczynski J., Cook T. and Urrutia R. (2003). Sp1- and Kruppel-like transcription factors. *Genome Biol* 4: 206.
- Kadonaga J.T. (2002). The DPE, a core promoter element for transcription by RNA polymerase II. *Exp Mol Med* 34: 259-264.
- 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: 2521-2532.

- Kamachi Y., Uchikawa M. and Kondoh H.* (2000). Pairing SOX off: with partners in the regulation of embryonic development. *Trends Genet* 16: 182-187.
- Kamachi Y., Uchikawa M., Tanouchi A., Sekido R. and Kondoh H.* (2001). Pax6 and SOX2 form a co-DNA-binding partner complex that regulates initiation of lens development. *Genes Dev* 15: 1272-1286.
- Kanai Y., Kanai-Azuma M., Noce T., Saido T.C., Shiroishi T., Hayashi Y. et al* (1996). Identification of two Sox17 messenger RNA isoforms, with and without the high mobility group box region, and their differential expression in mouse spermatogenesis. *J Cell Biol* 133: 667-681.
- Katoh Y. and Katoh M.* (2005). Comparative genomics on SOX2 orthologs. *Oncol Rep* 14: 797-800.
- Keates A.C., Keates S., Kwon J.H., Arseneau K.O., Law D.J., Bai L. et al* (2001). ZBP-89, Sp1, and nuclear factor-kappa B regulate epithelial neutrophil-activating peptide-78 gene expression in Caco-2 human colonic epithelial cells. *J Biol Chem* 276: 43713-43722.
- Kim T.H., Barrera L.O., Zheng M., Qu C., Singer M.A., Richmond T.A. et al* (2005). A high-resolution map of active promoters in the human genome. *Nature* 436: 876-880.
- King N., Westbrook M.J., Young S.L., Kuo A., Abedin M., Chapman J. et al* (2008). The genome of the choanoflagellate *Monosiga brevicollis* and the origin of metazoans. *Nature* 451: 783-788.
- Kobayashi A., Yamagiwa H., Hoshino H., Muto A., Sato K., Morita M. et al* (2000). A combinatorial code for gene expression generated by transcription factor Bach2 and MAZR (MAZ-related factor) through the BTB/POZ domain. *Mol Cell Biol* 20: 1733-1746.
- Komatsu M., Li H.O., Tsutsui H., Itakura K., Matsumura M. and Yokoyama K.K.* (1997). MAZ, a Myc-associated zinc finger protein, is essential for the ME1a1-mediated expression of the c-myc gene during neuroectodermal differentiation of P19 cells. *Oncogene* 15: 1123-1131.
- Kovacevic Grujicic N., Mojsin M., Krstic A. and Stevanovic M.* (2005). Functional characterization of the human SOX3 promoter: identification of transcription factors implicated in basal promoter activity. *Gene* 344: 287-297.
- Kovacevic-Grujicic N., Mojsin M., Djurovic J., Petrovic I. and Stevanovic M.* (2008a). Comparison of promoter regions of SOX3, SOX14 and SOX18 orthologs in mammals. *DNA Seq* 19: 185-194.
- Kovacevic-Grujicic N., Yokoyama K.K. and Stevanovic M.* (2008b). Trans-activation of human SOX3 promoter by MAZ in NT2/D1 cells. *Archives of Biological Sciences* 60: 379-387.
- Krstic A., Mojsin M. and Stevanovic M.* (2007). Regulation of SOX3 gene expression is driven by multiple NF-Y binding elements. *Arch Biochem Biophys* 467: 163-173.
- Kuhlbrodt K., Herbarth B., Sock E., Hermans-Borgmeyer I. and Wegner M.* (1998). Sox10, a novel transcriptional modulator in glial cells. *J Neurosci* 18: 237-250.
- Kutach A.K. and Kadonaga J.T.* (2000). The downstream promoter element DPE appears to be as widely used as the TATA box in *Drosophila* core promoters. *Mol Cell Biol* 20: 4754-4764.
- Kwok R.P., Lundblad J.R., Chrivia J.C., Richards J.P., Bachinger H.P., Brennan R.G. et al* (1994). Nuclear protein CBP is a coactivator for the transcription factor CREB. *Nature* 370: 223-226.
- Kypriotou M., Beauchef G., Chadjichristos C., Widom R., Renard E., Jimenez S.A. et al* (2007). Human collagen Krox up-regulates type I collagen expression in normal and

- scleroderma fibroblasts through interaction with Sp1 and Sp3 transcription factors. *J Biol Chem* 282: 32000-32014.
- Lagrange T., Kapanidis A.N., Tang H., Reinberg D. and Ebricht R.H.* (1998). New core promoter element in RNA polymerase II-dependent transcription: sequence-specific DNA binding by transcription factor IIB. *Genes Dev* 12: 34-44.
- Lamb P. and McKnight S.L.* (1991). Diversity and specificity in transcriptional regulation: the benefits of heterotypic dimerization. *Trends Biochem Sci* 16: 417-422.
- Larroux C., Luke G.N., Koopman P., Rokhsar D.S., Shimeld S.M. and Degnan B.M.* (2008). Genesis and expansion of metazoan transcription factor gene classes. *Mol Biol Evol* 25: 980-996.
- Laudet V., Stehelin D. and Clevers H.* (1993). Ancestry and diversity of the HMG box superfamily. *Nucleic Acids Res* 21: 2493-2501.
- Laumonier F., Ronce N., Hamel B.C., Thomas P., Lespinasse J., Raynaud M. et al* (2002). Transcription factor SOX3 is involved in X-linked mental retardation with growth hormone deficiency. *Am J Hum Genet* 71: 1450-1455.
- Lavoie H., Debeane F., Trinh Q.D., Turcotte J.F., Corbeil-Girard L.P., Dicaire M.J. et al* (2003). Polymorphism, shared functions and convergent evolution of genes with sequences coding for polyalanine domains. *Hum Mol Genet* 12: 2967-2979.
- Law D.J., Du M., Law G.L. and Merchant J.L.* (1999). ZBP-99 defines a conserved family of transcription factors and regulates ornithine decarboxylase gene expression. *Biochem Biophys Res Commun* 262: 113-120.
- Law G.L., Itoh H., Law D.J., Mize G.J., Merchant J.L. and Morris D.R.* (1998). Transcription factor ZBP-89 regulates the activity of the ornithine decarboxylase promoter. *J Biol Chem* 273: 19955-19964.
- 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. *Int J Biochem Cell Biol* 39: 2195-2214.
- Lefebvre V., Li P. and de Crombrughe B.* (1998). A new long form of Sox5 (L-Sox5), Sox6 and Sox9 are coexpressed in chondrogenesis and cooperatively activate the type II collagen gene. *Embo J* 17: 5718-5733.
- Lewis B.A. and Reinberg D.* (2003). The mediator coactivator complex: functional and physical roles in transcriptional regulation. *J Cell Sci* 116: 3667-3675.
- Lewis M.K. and Burgess R.R.* (1982). Eukaryotic RNA polymerases, In: *The Enzymes 3rd ed.*, (Eds. Boyer P.D.), 109-153. Academic Press, New York.
- Li M., Pevny L., Lovell-Badge R. and Smith A.* (1998). Generation of purified neural precursors from embryonic stem cells by lineage selection. *Curr Biol* 8: 971-974.
- Li Q., Herrler M., Landsberger N., Kaludov N., Ogryzko V.V., Nakatani Y. et al* (1998). Xenopus NF-Y pre-sets chromatin to potentiate p300 and acetylation-responsive transcription from the Xenopus hsp70 promoter in vivo. *Embo J* 17: 6300-6315.
- Li Y., Flanagan P.M., Tschochner H. and Kornberg R.D.* (1994). RNA polymerase II initiation factor interactions and transcription start site selection. *Science* 263: 805-807.
- Lim C.Y., Santoso B., Boulay T., Dong E., Ohler U. and Kadonaga J.T.* (2004). The MTE, a new core promoter element for transcription by RNA polymerase II. *Genes Dev* 18: 1606-1617.
- Linker C. and Stern C.D.* (2004). Neural induction requires BMP inhibition only as a late step, and involves signals other than FGF and Wnt antagonists. *Development* 131: 5671-5681.

- Liu M., Whetstone J.R., Payton S.G., Ge Y., Flatley R.M. and Matherly L.H. (2004). Roles of USF, Ikaros and Sp proteins in the transcriptional regulation of the human reduced folate carrier B promoter. *Biochem J* 383: 249-257.
- Locker J. (2001) Transcription factors. BIOS Scientific Publishers Limited
- Lodish H.F. (2000) Molecular cell biology, 4th edn. W.H. Freeman, New York
- Lonze B.E. and Ginty D.D. (2002). Function and regulation of CREB family transcription factors in the nervous system. *Neuron* 35: 605-623.
- Lui W.Y., Wong E.W., Guan Y. and Lee W.M. (2007). Dual transcriptional control of claudin-11 via an overlapping GATA/NF-Y motif: positive regulation through the interaction of GATA, NF-YA, and CREB and negative regulation through the interaction of Smad, HDAC1, and mSin3A. *J Cell Physiol* 211: 638-648.
- Lumsden A. and Krumlauf R. (1996). Patterning the vertebrate neuraxis. *Science* 274: 1109-1115.
- Luo X., Zhang X., Shao W., Yin Y. and Zhou J. (2009). Crucial roles of MZF-1 in the transcriptional regulation of apomorphine-induced modulation of FGF-2 expression in astrocytic cultures. *J Neurochem* 108: 952-961.
- Lynch M. and Force A. (2000). The probability of duplicate gene preservation by subfunctionalization. *Genetics* 154: 459-473.
- Macleod D., Charlton J., Mullins J. and Bird A.P. (1994). Sp1 sites in the mouse *aprt* gene promoter are required to prevent methylation of the CpG island. *Genes Dev* 8: 2282-2292.
- Magie C.R., Pang K. and Martindale M.Q. (2005). Genomic inventory and expression of Sox and Fox genes in the cnidarian *Nematostella vectensis*. *Dev Genes Evol* 215: 618-630.
- Maldonado E., Ha I., Cortes P., Weis L. and Reinberg D. (1990). Factors involved in specific transcription by mammalian RNA polymerase II: role of transcription factors IIA, IID, and IIB during formation of a transcription-competent complex. *Mol Cell Biol* 10: 6335-6347.
- Malki S., Nef S., Notarnicola C., Thevenet L., Gasca S., Mejean C. et al (2005). Prostaglandin D2 induces nuclear import of the sex-determining factor SOX9 via its cAMP-PKA phosphorylation. *Embo J* 24: 1798-1809.
- Malo M.S., Mozumder M., Zhang X.B., Biswas S., Chen A., Bai L.C. et al (2006). Intestinal alkaline phosphatase gene expression is activated by ZBP-89. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 290: G737-746.
- Mangelsdorf D.J., Thummel C., Beato M., Herrlich P., Schutz G., Umesono K. et al (1995). The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* 83: 835-839.
- Mantovani R. (1998). A survey of 178 NF-Y binding CCAAT boxes. *Nucleic Acids Res.* 26: 1135-1143.
- Maretto S., Cordenonsi M., Dupont S., Braghetta P., Broccoli V., Hassan A.B. et al (2003). Mapping Wnt/beta-catenin signaling during mouse development and in colorectal tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 3299-3304.
- Mark M., Ghyselinck N.B., Wendling O., Dupe V., Mascrez B., Kastner P. et al (1999). A genetic dissection of the retinoid signalling pathway in the mouse. *Proc Nutr Soc* 58: 609-613.
- Masternak K., Muhlethaler-Mottet A., Villard J., Zufferey M., Steimle V. and Reith W. (2000). CIITA is a transcriptional coactivator that is recruited to MHC class II promoters by multiple synergistic interactions with an enhanceosome complex. *Genes Dev* 14: 1156-1166.
- Mavrigh T.N., Jiang C., Ioshikhes I.P., Li X., Venters B.J., Zanton S.J. et al (2008). Nucleosome organization in the *Drosophila* genome. *Nature* 453: 358-362.

- Mayr B. and Montminy M. (2001). Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2: 599-609.
- McClintock J.M., Carlson R., Mann D.M. and Prince V.E. (2001). Consequences of Hox gene duplication in the vertebrates: an investigation of the zebrafish Hox paralogue group 1 genes. *Development* 128: 2471-2484.
- Melichar H.J., Narayan K., Der S.D., Hiraoka Y., Gardiol N., Jeannot G. et al (2007). Regulation of gammadelta versus alphabeta T lymphocyte differentiation by the transcription factor SOX13. *Science* 315: 230-233.
- Mellor J. (2005). The dynamics of chromatin remodeling at promoters. *Mol Cell* 19: 147-157.
- Merchant J.L., Bai L. and Okada M. (2003). ZBP-89 mediates butyrate regulation of gene expression. *J Nutr* 133: 2456S-2460S.
- Merchant J.L., Iyer G.R., Taylor B.R., Kitchen J.R., Mortensen E.R., Wang Z. et al (1996). ZBP-89, a Kruppel-like zinc finger protein, inhibits epidermal growth factor induction of the gastrin promoter. *Mol Cell Biol* 16: 6644-6653.
- Merika M. and Orkin S.H. (1995). Functional synergy and physical interactions of the erythroid transcription factor GATA-1 with the Kruppel family proteins Sp1 and EKLf. *Mol Cell Biol* 15: 2437-2447.
- Mertin S., McDowall S.G. and Harley V.R. (1999). The DNA-binding specificity of SOX9 and other SOX proteins. *Nucleic Acids Res* 27: 1359-1364.
- Mitchell P.J. and Tjian R. (1989). Transcriptional regulation in mammalian cells by sequence-specific DNA binding proteins. *Science* 245: 371-378.
- Mizuseki K., Kishi M., Matsui M., Nakanishi S. and Sasai Y. (1998). Xenopus Zic-related-1 and Sox-2, two factors induced by chordin, have distinct activities in the initiation of neural induction. *Development* 125: 579-587.
- Mojsin M. (2008). Uloga TALE transkripcionih faktora u regulaciji ekspresije SOX3 gena retinoicnom kiselinom. Doktorska disertacija. Univerzitet u Beogradu.
- Mojsin M., Grujicic N.K., Nikcevic G., Krstic A., Savic T. and Stevanovic M. (2006). Mapping of the RXRalpha binding elements involved in retinoic acid induced transcriptional activation of the human SOX3 gene. *Neurosci Res* 56: 409-418.
- Mojsin M. and Stevanovic M. (2009). PBX1 and MEIS1 up-regulate SOX3 gene expression by direct interaction with a consensus binding site within the basal promoter region. *Biochem J*
- Morris J.F., Hromas R. and Rauscher F.J., 3rd (1994). Characterization of the DNA-binding properties of the myeloid zinc finger protein MZF1: two independent DNA-binding domains recognize two DNA consensus sequences with a common G-rich core. *Mol Cell Biol* 14: 1786-1795.
- Moshier J.A., Skunca M., Wu W., Boppana S.M., Rauscher F.J., 3rd and Dosescu J. (1996). Regulation of ornithine decarboxylase gene expression by the Wilms' tumor suppressor WT1. *Nucleic Acids Res* 24: 1149-1157.
- Mudge S.J., Williams J.H., Eyre H.J., Sutherland G.R., Cowan P.J. and Power D.A. (1998). Complex organisation of the 5'-end of the human glycine tRNA synthetase gene. *Gene* 209: 45-50.
- Muse G.W., Gilchrist D.A., Nechaev S., Shah R., Parker J.S., Grissom S.F. et al (2007). RNA polymerase is poised for activation across the genome. *Nat Genet* 39: 1507-1511.
- Nason-Burchenal K., Takle G., Pace U., Flynn S., Allopenna J., Martin P. et al (1998). Targeting the PML/RAR alpha translocation product triggers apoptosis in promyelocytic leukemia cells. *Oncogene* 17: 1759-1768.
- Nasrallah I.M., Minarcik J.C. and Golden J.A. (2004). A polyalanine tract expansion in Arx forms intranuclear inclusions and results in increased cell death. *J Cell Biol* 167: 411-416.

- Nichols M., Weih F., Schmid W., DeVack C., Kowenz-Leutz E., Luckow B. et al* (1992). Phosphorylation of CREB affects its binding to high and low affinity sites: implications for cAMP induced gene transcription. *Embo J* 11: 3337-3346.
- Nikcevic G., Savic T., Kovacevic-Grujicic N. and Stevanovic M.* (2008). Up-regulation of the SOX3 gene expression by retinoic acid: characterization of the novel promoter-response element and the retinoid receptors involved. *J Neurochem* 107: 1206-1215.
- Nowling T., Bernadt C., Johnson L., Desler M. and Rizzino A.* (2003). The co-activator p300 associates physically with and can mediate the action of the distal enhancer of the FGF-4 gene. *J Biol Chem* 278: 13696-13705.
- Ogryzko V.V., Schiltz R.L., Russanova V., Howard B.H. and Nakatani Y.* (1996). The transcriptional coactivators p300 and CBP are histone acetyltransferases. *Cell* 87: 953-959.
- Ohler U., Liao G.C., Niemann H. and Rubin G.M.* (2002). Computational analysis of core promoters in the Drosophila genome. *Genome Biol* 3: RESEARCH0087.
- Okamoto S., Sherman K., Bai G. and Lipton S.A.* (2002). Effect of the ubiquitous transcription factors, SP1 and MAZ, on NMDA receptor subunit type 1 (NR1) expression during neuronal differentiation. *Brain Res Mol Brain Res* 107: 89-96.
- Orphanides G. and Reinberg D.* (2002). A unified theory of gene expression. *Cell* 108: 439-451.
- Osaki E., Nishina Y., Inazawa J., Copeland N.G., Gilbert D.J., Jenkins N.A. et al* (1999). Identification of a novel Sry-related gene and its germ cell-specific expression. *Nucleic Acids Res* 27: 2503-2510.
- Oshima Y., Naruse K., Nakamura Y. and Nakamura M.* (2009). Sox3: a transcription factor for Cyp19 expression in the frog *Rana rugosa*. *Gene* 445: 38-48.
- Pan X., Li H., Zhang P., Jin B., Man J., Tian L. et al* (2006). Ubc9 interacts with SOX4 and represses its transcriptional activity. *Biochem Biophys Res Commun* 344: 727-734.
- Pan Y.X.* (2002). Identification and characterization of a novel promoter of the mouse mu opioid receptor gene (*Oprm*) that generates eight splice variants. *Gene* 295: 97-108.
- Parks C.L. and Shenk T.* (1996). The serotonin 1a receptor gene contains a TATA-less promoter that responds to MAZ and Sp1. *J Biol Chem* 271: 4417-4430.
- Passantino R., Antona V., Barbieri G., Rubino P., Melchionna R., Cossu G. et al* (1998). Negative regulation of beta enolase gene transcription in embryonic muscle is dependent upon a zinc finger factor that binds to the G-rich box within the muscle-specific enhancer. *J Biol Chem* 273: 484-494.
- Peiffer D.A., Von Bubnoff A., Shin Y., Kitayama A., Mochii M., Ueno N. et al* (2005). A *Xenopus* DNA microarray approach to identify novel direct BMP target genes involved in early embryonic development. *Dev Dyn* 232: 445-456.
- Peirano R.I. and Wegner M.* (2000). The glial transcription factor Sox10 binds to DNA both as monomer and dimer with different functional consequences. *Nucleic Acids Res* 28: 3047-3055.
- Penzel R., Oswald R., Chen Y., Tacke L. and Grunz H.* (1997). Characterization and early embryonic expression of a neural specific transcription factor xSOX3 in *Xenopus laevis*. *Int J Dev Biol* 41: 667-677.
- Pera M.F., Reubinoff B. and Trounson A.* (2000). Human embryonic stem cells. *J Cell Sci* 113 (Pt 1): 5-10.
- Petrovic I., Kovacevic-Grujicic N. and Stevanovic M.* (2009). ZBP-89 and Sp3 down-regulate while NF-Y up-regulates SOX18 promoter activity in HeLa cells. *Mol Biol Rep* 36: 993-1000.
- Pevny L. and Placzek M.* (2005). SOX genes and neural progenitor identity. *Curr Opin Neurobiol* 15: 7-13.

- Pevny L.H. and Lovell-Badge R.* (1997). Sox genes find their feet. *Curr Opin Genet Dev* 7: 338-344.
- Pevny L.H., Sockanathan S., Placzek M. and Lovell-Badge R.* (1998). A role for SOX1 in neural determination. *Development* 125: 1967-1978.
- Piera-Velazquez S., Hawkins D.F., Whitecavage M.K., Colter D.C., Stokes D.G. and Jimenez S.A.* (2007). Regulation of the human SOX9 promoter by Sp1 and CREB. *Exp Cell Res* 313: 1069-1079.
- Pointud J.C., Mengus G., Brancorsini S., Monaco L., Parvinen M., Sassone-Corsi P. et al* (2003). The intracellular localisation of TAF7L, a paralogue of transcription factor TFIID subunit TAF7, is developmentally regulated during male germ-cell differentiation. *J Cell Sci* 116: 1847-1858.
- Pugh B.F. and Tjian R.* (1990). Mechanism of transcriptional activation by Sp1: evidence for coactivators. *Cell* 61: 1187-1197.
- Rasmussen E.B. and Lis J.T.* (1993). In vivo transcriptional pausing and cap formation on three Drosophila heat shock genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 7923-7927.
- Rastegar S., Friedle H., Frommer G. and Knochel W.* (1999). Transcriptional regulation of Xvent homeobox genes. *Mech Dev* 81: 139-149.
- Raverot G., Lejeune H., Kotlar T., Pugeat M. and Jameson J.L.* (2004). X-linked sex-determining region Y box 3 (SOX3) gene mutations are uncommon in men with idiopathic oligozoospermic infertility. *J Clin Endocrinol Metab* 89: 4146-4148.
- Raverot G., Weiss J., Park S.Y., Hurley L. and Jameson J.L.* (2005). Sox3 expression in undifferentiated spermatogonia is required for the progression of spermatogenesis. *Dev Biol* 283: 215-225.
- Reed G.E., Kirchner J.E. and Carr L.G.* (1995). NF-Y activates mouse tryptophan hydroxylase transcription. *Brain Res* 682: 1-12.
- Remenyi A., Lins K., Nissen L.J., Reinbold R., Scholer H.R. and Wilmanns M.* (2003). Crystal structure of a POU/HMG/DNA ternary complex suggests differential assembly of Oct4 and Sox2 on two enhancers. *Genes Dev* 17: 2048-2059.
- Rex M., Orme A., Uwanogho D., Tointon K., Wigmore P.M., Sharpe P.T. et al* (1997). Dynamic expression of chicken Sox2 and Sox3 genes in ectoderm induced to form neural tissue. *Dev Dyn* 209: 323-332.
- Rizzoti K., Brunelli S., Carmignac D., Thomas P.Q., Robinson I.C. and Lovell-Badge R.* (2004). SOX3 is required during the formation of the hypothalamo-pituitary axis. *Nat Genet* 36: 247-255.
- Rizzoti K. and Lovell-Badge R.* (2007). SOX3 activity during pharyngeal segmentation is required for craniofacial morphogenesis. *Development* 134: 3437-3448.
- Roder K., Wolf S.S., Larkin K.J. and Schweizer M.* (1999). Interaction between the two ubiquitously expressed transcription factors NF-Y and Sp1. *Gene* 234: 61-69.
- Roder K.H., Wolf S.S. and Schweizer M.* (1997). Interaction of Sp1 and NF-Y in the diet-induced regulation of the rat fatty acid synthase (FAS) gene. *Biochem Soc Trans* 25: 72S.
- Rogers C.D., Archer T.C., Cunningham D.D., Grammer T.C. and Casey E.M.* (2008). Sox3 expression is maintained by FGF signaling and restricted to the neural plate by Vent proteins in the Xenopus embryo. *Dev Biol* 313: 307-319.
- Rogers C.D., Harafuji N., Archer T., Cunningham D.D. and Casey E.S.* (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. *Mech Dev* 126: 42-55.

- Romier C., Cocchiarella F., Mantovani R. and Moras D. (2003). The NF-YB/NF-YC structure gives insight into DNA binding and transcription regulation by CCAAT factor NF-Y. *J Biol Chem* 278: 1336-1345.
- Ronchi A., Bellorini M., Mongelli N. and Mantovani R. (1995). CCAAT-box binding protein NF-Y (CBF, CP1) recognizes the minor groove and distorts DNA. *Nucleic Acids Res.* 23: 4565-4572.
- Rougvie A.E. and Lis J.T. (1988). The RNA polymerase II molecule at the 5' end of the uninduced hsp70 gene of *D. melanogaster* is transcriptionally engaged. *Cell* 54: 795-804.
- Roy R., Schaeffer L., Humbert S., Vermeulen W., Weeda G. and Egly J.M. (1994). The DNA-dependent ATPase activity associated with the class II basic transcription factor BTF2/TFIIH. *J Biol Chem* 269: 9826-9832.
- Ryu S., Zhou S., Ladurner A.G. and Tjian R. (1999). The transcriptional cofactor complex CRSP is required for activity of the enhancer-binding protein Sp1. *Nature* 397: 446-450.
- Sakai T., Hino K., Wada S. and Maeda H. (2003). Identification of the DNA binding specificity of the human ZNF219 protein and its function as a transcriptional repressor. *DNA Res* 10: 155-165.
- Sakai T., Toyoda A., Hashimoto K. and Maeda H. (2000). Isolation and characterization of a novel zinc finger gene, ZNF219, and mapping to the human chromosome 14q11 region. *DNA Res* 7: 137-141.
- Sandberg M., Kallstrom M. and Muhr J. (2005). Sox21 promotes the progression of vertebrate neurogenesis. *Nat Neurosci* 8: 995-1001.
- Sanders S.L. and Weil P.A. (2000). Identification of two novel TAF subunits of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* TFIID complex. *J Biol Chem* 275: 13895-13900.
- Savare J., Bonneaud N. and Girard F. (2005). SUMO represses transcriptional activity of the *Drosophila* SoxNeuro and human Sox3 central nervous system-specific transcription factors. *Mol Biol Cell* 16: 2660-2669.
- Sawadogo M., Luo X., Siritto M., Lu T., Ismail P.M., Qyang Y. et al (1999). Biological function of the USF family of transcription factors. *Gene Ther Mol Biol* 3: 447-453.
- Schepers G.E., Bullejos M., Hosking B.M. and Koopman P. (2000). Cloning and characterisation of the Sry-related transcription factor gene Sox8. *Nucleic Acids Res* 28: 1473-1480.
- Schepers G.E., Teasdale R.D. and Koopman P. (2002). Twenty pairs of sox: extent, homology, and nomenclature of the mouse and human sox transcription factor gene families. *Dev Cell* 3: 167-170.
- Schlierf B., Ludwig A., Klenovsek K. and Wegner M. (2002). Cooperative binding of Sox10 to DNA: requirements and consequences. *Nucleic Acids Res* 30: 5509-5516.
- Shaywitz A.J. and Greenberg M.E. (1999). CREB: a stimulus-induced transcription factor activated by a diverse array of extracellular signals. *Annu Rev Biochem* 68: 821-861.
- Shen J.H. and Ingraham H.A. (2002). Regulation of the orphan nuclear receptor steroidogenic factor 1 by Sox proteins. *Mol Endocrinol* 16: 529-540.
- Sieweke M.H. and Graf T. (1998). A transcription factor party during blood cell differentiation. *Curr Opin Genet Dev* 8: 545-551.
- Sinclair A.H., Berta P., Palmer M.S., Hawkins J.R., Griffiths B.L., Smith M.J. et al (1990). A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature* 346: 240-244.
- Siritto M., Walker S., Lin Q., Kozlowski M.T., Klein W.H. and Sawadogo M. (1992). Members of the USF family of helix-loop-helix proteins bind DNA as homo- as well as heterodimers. *Gene Expr* 2: 231-240.

- Smale S.T. and Baltimore D.* (1989). The "initiator" as a transcription control element. *Cell* 57: 103-113.
- Smale S.T. and Kadonaga J.T.* (2003). The RNA polymerase II core promoter. *Annu Rev Biochem* 72: 449-479.
- Smale S.T., Schmidt M.C., Berk A.J. and Baltimore D.* (1990). Transcriptional activation by Sp1 as directed through TATA or initiator: specific requirement for mammalian transcription factor IID. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87: 4509-4513.
- Solomon N.M., Nouri S., Warne G.L., Lagerstrom-Fermer M., Forrest S.M. and Thomas P.Q.* (2002). Increased gene dosage at Xq26-q27 is associated with X-linked hypopituitarism. *Genomics* 79: 553-559.
- Solomon N.M., Ross S.A., Morgan T., Belsky J.L., Hol F.A., Karnes P.S. et al* (2004). Array comparative genomic hybridisation analysis of boys with X linked hypopituitarism identifies a 3.9 Mb duplicated critical region at Xq27 containing SOX3. *J Med Genet* 41: 669-678.
- Song J., Murakami H., Tsutsui H., Tang X., Matsumura M., Itakura K. et al* (1998). Genomic organization and expression of a human gene for Myc-associated zinc finger protein (MAZ). *J Biol Chem* 273: 20603-20614.
- Song J., Ugai H., Kanazawa I., Sun K. and Yokoyama K.K.* (2001). Independent repression of a GC-rich housekeeping gene by Sp1 and MAZ involves the same cis-elements. *J Biol Chem* 276: 19897-19904.
- Stevanovic M.* (2003). Modulation of SOX2 and SOX3 gene expression during differentiation of human neuronal precursor cell line NTERA2. *Mol Biol Rep* 30: 127-132.
- Stevanovic M., Lovell-Badge R., Collignon J. and Goodfellow P.N.* (1993). SOX3 is an X-linked gene related to SRY. *Hum Mol Genet* 2: 2013-2018.
- Stolt C.C., Schlierf A., Lommes P., Hillgartner S., Werner T., Kosian T. et al* (2006). SoxD proteins influence multiple stages of oligodendrocyte development and modulate SoxE protein function. *Dev Cell* 11: 697-709.
- Streit A. and Stern C.D.* (1999). Neural induction. A bird's eye view. *Trends Genet* 15: 20-24.
- Strobl L.J. and Eick D.* (1992). Hold back of RNA polymerase II at the transcription start site mediates down-regulation of c-myc in vivo. *Embo J* 11: 3307-3314.
- Sung J.Y., Shin S.W., Ahn Y.S. and Chung K.C.* (2001). Basic fibroblast growth factor-induced activation of novel CREB kinase during the differentiation of immortalized hippocampal cells. *J Biol Chem* 276: 13858-13866.
- Suske G.* (1999). The Sp-family of transcription factors. *Gene* 238: 291-300.
- Takeuchi A., Mishina Y., Miyaishi O., Kojima E., Hasegawa T. and Isobe K.* (2003). Heterozygosity with respect to Zfp148 causes complete loss of fetal germ cells during mouse embryogenesis. *Nat Genet* 33: 172-176.
- Tamagnone L., Artigiani S., Chen H., He Z., Ming G.I., Song H. et al* (1999). Plexins are a large family of receptors for transmembrane, secreted, and GPI-anchored semaphorins in vertebrates. *Cell* 99: 71-80.
- Tanabe Y. and Jessell T.M.* (1996). Diversity and pattern in the developing spinal cord. *Science* 274: 1115-1123.
- 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. *Mol Cell Biol* 24: 8834-8846.
- Tanese N., Saluja D., Vassallo M.F., Chen J.L. and Admon A.* (1996). Molecular cloning and analysis of two subunits of the human TFIID complex: hTAFII130 and hTAFII100. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 13611-13616.

- Thomson J.A., Itskovitz-Eldor J., Shapiro S.S., Waknitz M.A., Swiergiel J.J., Marshall V.S. et al (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282: 1145-1147.
- Tjian R. and Maniatis T. (1994). Transcriptional activation: a complex puzzle with few easy pieces. *Cell* 77: 5-8.
- Tomioka M., Nishimoto M., Miyagi S., Katayanagi T., Fukui N., Niwa H. et al (2002). Identification of Sox-2 regulatory region which is under the control of Oct-3/4-Sox-2 complex. *Nucleic Acids Res* 30: 3202-3213.
- Tora L. (2002). A unified nomenclature for TATA box binding protein (TBP)-associated factors (TAFs) involved in RNA polymerase II transcription. *Genes Dev* 16: 673-675.
- Tran D.P., Kim S.J., Park N.J., Jew T.M. and Martinson H.G. (2001). Mechanism of poly(A) signal transduction to RNA polymerase II in vitro. *Mol Cell Biol* 21: 7495-7508.
- Tropepe V., Hitoshi S., Sirard C., Mak T.W., Rossant J. and van der Kooy D. (2001). Direct neural fate specification from embryonic stem cells: a primitive mammalian neural stem cell stage acquired through a default mechanism. *Neuron* 30: 65-78.
- Tsuda M., Takahashi S., Takahashi Y. and Asahara H. (2003). Transcriptional co-activators CREB-binding protein and p300 regulate chondrocyte-specific gene expression via association with Sox9. *J Biol Chem* 278: 27224-27229.
- Turner B.M., Birley A.J. and Lavender J. (1992). Histone H4 isoforms acetylated at specific lysine residues define individual chromosomes and chromatin domains in *Drosophila* polytene nuclei. *Cell* 69: 375-384.
- 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. *Mech Dev* 84: 103-120.
- Ungefroren H., Gellersen B., Krull N.B. and Kalthoff H. (1998). Biglycan gene expression in the human leiomyosarcoma cell line SK-UT-1. Basal and protein kinase A-induced transcription involves binding of Sp1-like/Sp3 proteins in the proximal promoter region. *J Biol Chem* 273: 29230-29240.
- Uwanogho D., Rex M., Cartwright E.J., Pearl G., Healy C., Scotting P.J. et al (1995). Embryonic expression of the chicken Sox2, Sox3 and Sox11 genes suggests an interactive role in neuronal development. *Mech Dev* 49: 23-36.
- van de Wetering M., Oosterwegel M., van Norren K. and Clevers H. (1993). Sox-4, an Sry-like HMG box protein, is a transcriptional activator in lymphocytes. *Embo J* 12: 3847-3854.
- Viollet B., Lefrancois-Martinez A.M., Henrion A., Kahn A., Raymondjean M. and Martinez A. (1996). Immunochemical characterization and transacting properties of upstream stimulatory factor isoforms. *J Biol Chem* 271: 1405-1415.
- Wallrath L.L., Lu Q., Granok H. and Elgin S.C. (1994). Architectural variations of inducible eukaryotic promoters: preset and remodeling chromatin structures. *Bioessays* 16: 165-170.
- Wang J. and Yen A. (2004). A novel retinoic acid-responsive element regulates retinoic acid-induced BLR1 expression. *Mol Cell Biol* 24: 2423-2443.
- Wang T.W., Stromberg G.P., Whitney J.T., Brower N.W., Klymkowsky M.W. and Parent J.M. (2006). Sox3 expression identifies neural progenitors in persistent neonatal and adult mouse forebrain germinative zones. *J Comp Neurol* 497: 88-100.
- Wang Y., Yin L. and Hillgartner F.B. (2001). The homeodomain proteins PBX and MEIS1 are accessory factors that enhance thyroid hormone regulation of the malic enzyme gene in hepatocytes. *J Biol Chem* 276: 23838-23848.
- Wegner M. (1999). From head to toes: the multiple facets of Sox proteins. *Nucleic Acids Res.* 27: 1409-1420.

- Weiss J., Meeks J.J., Hurley L., Raverot G., Frassetto A. and Jameson J.L. (2003). Sox3 is required for gonadal function, but not sex determination, in males and females. *Mol. Cell. Biol.* 23: 8084-8091.
- Weiss M.A. (2001). Floppy SOX: mutual induced fit in hmg (high-mobility group) box-DNA recognition. *Mol Endocrinol* 15: 353-362.
- West A.G. and Fraser P. (2005). Remote control of gene transcription. *Hum Mol Genet* 14 Spec No 1: R101-111.
- West A.G., Huang S., Gaszner M., Litt M.D. and Felsenfeld G. (2004). Recruitment of histone modifications by USF proteins at a vertebrate barrier element. *Mol Cell* 16: 453-463.
- White P.C., Shore A.M., Clement M., McLaren J., Soeiro I., Lam E.W. et al (2006). Regulation of cyclin D2 and the cyclin D2 promoter by protein kinase A and CREB in lymphocytes. *Oncogene* 25: 2170-2180.
- Widom R.L., Lee J.Y., Joseph C., Gordon-Froome I. and Korn J.H. (2001). The hcKrox gene family regulates multiple extracellular matrix genes. *Matrix Biol* 20: 451-462.
- Wiebe M.S., Wilder P.J., Kelly D. and Rizzino A. (2000). Isolation, characterization, and differential expression of the murine Sox-2 promoter. *Gene* 246: 383-393.
- Willy P.J., Kobayashi R. and Kadonaga J.T. (2000). A basal transcription factor that activates or represses transcription. *Science* 290: 982-985.
- Wilson M. and Koopman P. (2002). Matching SOX: partner proteins and co-factors of the SOX family of transcriptional regulators. *Curr Opin Genet Dev* 12: 441-446.
- Winberg M.L., Tamagnone L., Bai J., Comoglio P.M., Montell D. and Goodman C.S. (2001). The transmembrane protein Off-track associates with Plexins and functions downstream of Semaphorin signaling during axon guidance. *Neuron* 32: 53-62.
- Wissmuller S., Kosian T., Wolf M., Finzsch M. and Wegner M. (2006). The high-mobility-group domain of Sox proteins interacts with DNA-binding domains of many transcription factors. *Nucleic Acids Res* 34: 1735-1744.
- Wolffe A.P. and Pruss D. (1996). Targeting chromatin disruption: Transcription regulators that acetylate histones. *Cell* 84: 817-819.
- Won J., Yim J. and Kim T.K. (2002). Sp1 and Sp3 recruit histone deacetylase to repress transcription of human telomerase reverse transcriptase (hTERT) promoter in normal human somatic cells. *J Biol Chem* 277: 38230-38238.
- Wong J., Farlie P., Holbert S., Lockhart P. and Thomas P.Q. (2007). Polyalanine expansion mutations in the X-linked hypopituitarism gene SOX3 result in aggresome formation and impaired transactivation. *Front Biosci* 12: 2085-2095.
- Wood H.B. and Episkopou V. (1999). Comparative expression of the mouse Sox1, Sox2 and Sox3 genes from pre-gastrulation to early somite stages. *Mech Dev* 86: 197-201.
- Woods K.S., Cundall M., Turton J., Rizotti K., Mehta A., Palmer R. et al (2005). Over- and underdosage of SOX3 is associated with infundibular hypoplasia and hypopituitarism. *Am J Hum Genet* 76: 833-849.
- Wright E., Hargrave M.R., Christiansen J., Cooper L., Kun J., Evans T. et al (1995). The Sry-related gene Sox9 is expressed during chondrogenesis in mouse embryos. *Nat Genet* 9: 15-20.
- Wright E.M., Snopek B. and Koopman P. (1993). Seven new members of the Sox gene family expressed during mouse development. *Nucleic Acids Res* 21: 744.
- Wunderle V.M., Critcher R., Ashworth A. and Goodfellow P.N. (1996). Cloning and characterization of SOX5, a new member of the human SOX gene family. *Genomics* 36: 354-358.
- Xie X., Lu J., Kulbokas E.J., Golub T.R., Mootha V., Lindblad-Toh K. et al (2005). Systematic discovery of regulatory motifs in human promoters and 3' UTRs by comparison of several mammals. *Nature* 434: 338-345.

- Xu X., Zhang W. and Kone B.C. (2004). CREB trans-activates the murine H(+)-K(+)-ATPase alpha(2)-subunit gene. *Am J Physiol Cell Physiol* 287: C903-911.
- Yang J., Tan C., Darken R.S., Wilson P.A. and Klein P.S. (2002). Beta-catenin/Tcf-regulated transcription prior to the midblastula transition. *Development* 129: 5743-5752.
- Ye S., Whatling C., Watkins H. and Henney A. (1999). Human stromelysin gene promoter activity is modulated by transcription factor ZBP-89. *FEBS Lett* 450: 268-272.
- Yuan H., Corbi N., Basilico C. and Dailey L. (1995). Developmental-specific activity of the FGF-4 enhancer requires the synergistic action of Sox2 and Oct-3. *Genes Dev* 9: 2635-2645.
- Zappone M.V., Galli R., Catena R., Meani N., De Biasi S., Mattei E. et al (2000). Sox2 regulatory sequences direct expression of a (beta)-geo transgene to telencephalic neural stem cells and precursors of the mouse embryo, revealing regionalization of gene expression in CNS stem cells. *Development* 127: 2367-2382.
- Zawel L. and Reinberg D. (1992). Advances in RNA polymerase II transcription. *Curr Opin Cell Biol* 4: 488-495.
- Zhang C., Basta T., Jensen E.D. and Klymkowsky M.W. (2003). The beta-catenin/VegT-regulated early zygotic gene *Xnr5* is a direct target of SOX3 regulation. *Development* 130: 5609-5624.
- Zhang X., Diab I.H. and Zehner Z.E. (2003). ZBP-89 represses vimentin gene transcription by interacting with the transcriptional activator, Sp1. *Nucleic Acids Res* 31: 2900-2914.
- Zhu J., Giannola D.M., Zhang Y., Rivera A.J. and Emerson S.G. (2003). NF-Y cooperates with USF1/2 to induce the hematopoietic expression of HOXB4. *Blood* 102: 2420-2427.
- Zhu X.S., Linhoff M.W., Li G., Chin K.C., Maity S.N. and Ting J.P. (2000). Transcriptional scaffold: CIITA interacts with NF-Y, RFX, and CREB to cause stereospecific regulation of the class II major histocompatibility complex promoter. *Mol Cell Biol* 20: 6051-6061.
- Zile M.H. (2001). Function of vitamin A in vertebrate embryonic development. *J Nutr* 131: 705-708.
- Zorn A.M., Barish G.D., Williams B.O., Lavender P., Klymkowsky M.W. and Varmus H.E. (1999). Regulation of Wnt signaling by Sox proteins: XSox17 alpha/beta and XSox3 physically interact with beta-catenin. *Mol Cell* 4: 487-498.





РД 20661



300160991

COBISS ©