

**UNIVERZITET U BEOGRADU
BIOLOŠKI FAKULTET**

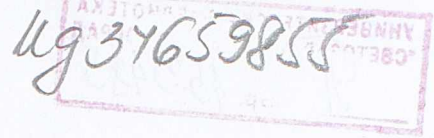
Marija Mojsin

**ULOGA TALE TRANSKRIPCIONIH FAKTORA U REGULACIJI
EKSPRESIJE SOX3 GENA RETINOIČNOM KISELINOM**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Beograd, 2008.

PA 20093



Univerzitet u Beogradu
Biološki fakultet

Marija Mojsin

**ULOGA TALE TRANSKRIPCIONIH FAKTORA U REGULACIJI
EKSPRESIJE SOX3 GENA RETINOIČNOM KISELINOM**

Doktorska disertacija

Beograd, 2008

ČLANOVI KOMISIJE:

dr Milena Stevanović, naučni savetnik,

Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo

dr Svetlana Radović, vanredni profesor,

Biološki fakultet

dr Goran Brajušković, docent,

Biološki fakultet

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 Milena Stevanović ukazala mi je poverenje i pružila šansu da radim u Laboratoriji za humanu molekularnu genetiku. Zahvaljujem se za spremnost da svoje veliko znanje i iskustvo podeli sa mnom Hvala za strpljenje i pažnju koje uvek ima za mene.

Prof. dr Svetlana Radović bila je moj profesor na fakultetu, član komisije za odbranu moje magistarske teze i sada član komisije za odbranu ovog rada. Zahvaljujem se za sve ove trenutke, za znanje, pažnju, pomoć i strpljenje.

Dr Goranu Brajuškoviću zahvaljujem se za pomoć prilikom pisanja ovog rada.

Zahvaljujem se svim kolegama sa Instituta što su učinili da svakodnevni rad bude zadovoljstvo.

Najveću zahvalnost dugujem kolegama iz Laboratorije za humanu molekularnu genetiku. Najpre, ekipi iz *SOX3* promotora, mojoj najboljoj drugarici Gruji, Goci, Aci i našoj dragoj Tići koju smo tako rano izgubili...

Takođe, mojim dragim koleginicama Đurđini, Isidori, Danijeli i Mileni za divnu atmosferu u Labu.

Zahvaljujem se i Sandrini, Marini i Jeli za podršku.

APSTRAKT

Sox3/SOX3 gen je jedan od najranijih markera neuralnog razvića kičmenjaka, koji ima ključnu ulogu u održavanju populacije ćelija neuralnih progenitora. Naša ranija istraživanja dovela su do prve karakterizacije promotora humanog *SOX3* gena i identifikacije kontrolnih elemenata preko kojih su opšti transkripcioni faktori NF-Y, Sp1 i USF uključeni u regulaciju ekspresije ovog gena. Rezultati predstavljeni u ovom radu po prvi put pokazuju da su TALE transkripcioni faktori PBX1, MEIS1 i TGIF uključeni u regulaciju ekspresije humanog *SOX3* gena.

PBX1 i MEIS1 proteini direktno interaguju sa konsenzusnim mestom za vezivanje Pbx/Meis heterodimera koje je visoko evolutivno očuvano u bazalnom promotoru *Sox3* gena sisara. PBX1 je prisutan u proteinskim kompleksima formiranim na ovom mestu sa jedarnim proteinima iz neindukovanih ćelija, dok su i PBX1 i MEIS1 prisutni u kompleksima formiranim sa jedarnim proteinima iz NT2/D1 ćelija indukovanih retinoičnom kiselinom. Zanimljivo je da je MEIS1 jedini do sada identifikovani faktor koji interaguje sa kontrolnim elementima *SOX3* promotora tek nakon indukcije ovog gena retinoičnom kiselinom. Funkcionalne analize su pokazale da mutacije Pbx/Meis vezivnog mesta dovode do pada aktivnosti *SOX3* promotora u RA indukovanim NT2/D1 ćelijama, dok povećana ekspresija PBX1 i MEIS1 proteina dovodi do aktivacije *SOX3* gena kako u indukovanim tako i u neindukovanim ćelijama.

Transkripcioni faktor TGIF ostvaruje funkciju transkripcionog represora interakcijom sa konsenzusnim vezivnim mestom u promotoru *SOX3* gena. Mutacija ovog mesta dovodi do povećane aktivnosti *SOX3* promotora, dok povećana ekspresija transkripcionog faktora TGIF značajno smanjuje ekspresiju *SOX3* gena u neindukovanim i RA indukovanim NT2/D1 ćelijama.

Prikazani rezultati po prvi put uspostavljaju funkcionalnu vezu između članova TALE familije transkripcionih faktora (PBX1, MEIS1 i TGIF) i ekspresije humanog *SOX3* gena. Povezivanje ove dve familije transkripcionih faktora ima poseban značaj kada se ima u vidu njihova uloga tokom razvića nervnog sistema kičmenjaka.

Ključne reči: NT2/D1 ćelije, *SOX3*, PBX1, MEIS1, TGIF, retinoična kiselina

ABSTRACT

Sox3/SOX3 is considered to be one of the earliest neural markers in vertebrates, playing the role in specifying neuronal fate. The characterization of *SOX3* promoter was previously reported and it was demonstrated that general transcription factors NF-Y, Sp1 and USF are involved in transcriptional regulation of the *SOX3* promoter. In this thesis first evidence is presented that TALE transcription factors PBX1, MEIS1 and TGIF are involved in the regulation of human *SOX3* gene expression.

PBX1 and MEIS1 proteins are involved in the up-regulation of human *SOX3* gene expression in NT2/D1 cells by direct interaction with the consensus Pbx/Meis binding site that is conserved in all analyzed mammalian orthologue promoters. PBX1 is present in the protein complex formed on this site with nuclear proteins from uninduced cells, while both, PBX1 and MEIS1 proteins were detected in the complex created with extract from retinoic acid (RA) induced NT2/D1 cells. Interestingly, MEIS1 is the only transcription factor demonstrated so far to interact with *SOX3* promoter upon RA induced activation of the *SOX3* gene expression. By functional analysis it was demonstrated that mutations of the Pbx1/Meis1 binding sites resulted in profound reduction of the *SOX3* promoter responsiveness to RA. Finally, it was demonstrated that overexpressed Pbx1 and Meis1 increased endogenous *SOX3* protein expression in both uninduced and RA induced NT2/D1 cells.

Transcription factor TGIF is involved in the down-regulation of human *SOX3* gene by direct interaction with the binding site within *SOX3* promoter. Functional analysis showed that mutation of the TGIF binding site increased *SOX3* expression while overexpressed TGIF decreased *SOX3* expression in both uninduced and RA induced NT2/D1 cells.

By data presented here, for the first time, a functional link was established between TALE proteins, PBX1, MEIS1 and TGIF and expression of human *SOX3* gene. This link is of particular interest since both TALE family members and members of *SOX* super-family are recognized as important developmental regulators.

Key words: NT2/D1 cells, *SOX3*, PBX1, MEIS1, TGIF, retinoic acid

SADRŽAJ

1 UVOD	1
1.1 SOX proteini	1
1.1.1 Karakteristike SOX proteina	4
1.1.2 Vezivanje SOX proteina za DNK	6
1.1.2.1 Konformacione promene DNK izazvane vezivanjem SOX protein	7
1.1.3 Interakcije sa drugim proteinima	8
1.1.4 Lokalizacija SOX proteina u ćeliji	9
1.1.5 Transaktivacija i transrepresija	10
1.1.6 Homodimerizacija	11
1.1.7 Posttranslacione modifikacije	12
1.2 Funkcije Sox gena in vivo	12
1.2.1 Onkogeni potencijal Sox gena	14
1.3 SOX3 gen	17
1.3.1 Mutacije SOX3 gena	19
1.3.2 Ekspresija Sox3 gena tokom razvića centralnog nervnog sistema	23
1.3.3 Regulacija ekspresije SOX3 gena	26
1.4 TALE homeoboks proteini.	28
1.4.1 PBX proteini	29
1.4.2 MEIS proteini	33
1.4.3 TGIF proteini	37
1.4.4 PKNOX proteini	38
1.5 NT2/D1 ćelije kao model sistem za izučavanje neuralne diferencijacije	39

2	CILJ RADA	42
3	MATERIJAL I METODE	43
3.1	<i>NT2/D1 ćelije</i>	43
3.1.1	<i>Tranzijentna transfekcija NT2/D1 ćelija kalcijum-fosfatnom precipitacijom</i>	43
3.1.2	<i>Priprema ćelijskih ekstrakata</i>	44
3.1.3	<i>β-galaktozidazni esej</i>	45
3.1.4	<i>CAT esej</i>	45
3.2	<i>Analiza sekvenci Sox3 ortologa</i>	47
3.3	<i>Analiza regiona promotora zaštićenih od dejstva enzima DnkazaI ("DNasa I footprinting" analiza)</i>	47
3.4	<i>Izolacija jedarnih proteina</i>	48
3.5	<i>In vitro transkripcija i translacija</i>	49
3.6	<i>Esej smanjene elektroforetske pokretljivosti (EMSA-electrophoretic mobility shift assay)</i>	50
3.7	<i>Ekstrakcija proteina iz gela posle EMSA reakcija</i>	52
3.8	<i>Generisanje mutiranih promotorskih konsrukata SOX3 gena</i>	52
3.9	<i>Izolacija ukupnih ćeliskih proteina i Western blot analiza</i>	54
3.10	<i>Koimunoprecipitacija</i>	54
4	REZULTATI	56
4.1	<i>Analiza regiona promotora humanog SOX3 gena koji su zaštićeni od dejstva enzima DNKaza I</i>	56
4.2	<i>In silico analiza sekvenci u okviru zaštićenih regiona SOX3 gena</i>	62
4.3	<i>Analiza potencijalnog vezivnog mesta za heterodimer PBX/MEIS u okviru FP2 regiona humanog SOX3 promotora</i>	63
4.3.1	<i>Interakcije PBX/MEIS konsenzusnog mesta sa proteinima</i>	66
4.3.2	<i>Identifikacija proteinima prisutnih u kompleksima formiranim na probi F31R31</i>	68
4.3.3	<i>Specifičnost vezivanja PBX i MEIS proteina za konsenzusno mesto</i>	69

4.3.4	<i>PBX1 i MEIS1 proteini se vezuju za konsenzusno mesto u promotoru SOX3 gena</i>	72
4.3.5	<i>Uticaj povećane ekspresije PBX1 i MEIS1 proteina na formiranje proteinskih kompleksa F31R31 regulatornom regionu SOX3 promotora</i>	73
4.3.6	<i>Profil ekspresije PBX1 i MEIS1 proteina tokom indukcije NT2/D1 ćelija retinoičnom kiselinom</i>	75
4.3.7	<i>Dimerizacija PBX1 i MEIS1 proteina u odsustvu DNK</i>	76
4.3.8	<i>PBX1 i MEIS1 regulišu in vivo ekspresiju SOX3 gena u NT2/D1 ćelijama</i>	78
4.3.9	<i>Funkcionalna analiza regulatornog elementa SOX3 promotora koji sadrži vezivno mesto za heterodimer PBX/MEIS</i>	79
4.3.10	<i>Transkripcioni faktori PBX1 i MEIS1 aktiviraju SOX3 promotor u NT2/D1 ćelijama</i>	79
4.3.11	<i>Analiza uticaja mutacija vezivnih mesta za PBX i MEIS na aktivnost SOX3 promotora</i>	81
4.4	<i>Uloga transkripcionog faktora TGIF u regulaciji ekspresije SOX3 gena</i>	83
4.4.1	<i>Analiza potencijalnog, vezivnog mesta za TGIF u FP2 zaštićenom regionu promotora SOX3 gena</i>	83
4.4.1.1	<i>Interakcije TGIF proteina sa potencijalnim vezivnim mestom u FP2 regionu bazalnog promotora SOX3 gena</i>	84
4.4.2	<i>Karakterizacija vezivnog mesta za transkripcioni faktor TGIF u FP7 regionu SOX3 gena</i>	86
4.4.2.1	<i>Interakcije potencijalnog vezivnog mesta za TGIF u FP7 regionu sa jedarnim proteinima</i>	88
4.4.2.2	<i>Profil ekspresije TGIF proteina tokom ranih faza indukcije NT2/D1 ćelija retinoičnom kiselinom</i>	90
4.4.2.3	<i>Funkcionalna analiza regulatornog elementa promotora SOX3 gena koji sadrži vezivno mesto za TGIF</i>	92

5	DISKUSIJA	95
5.1	<i>Analiza zaštićenih regiona FP1-FP7 u promotoru SOX3 gena</i>	95
5.2	<i>Uloga PBX1 i MEIS1 proteina u regulaciji bazalne ekspresije humanog SOX3 gena u NT2/D1 ćelijskoj liniji</i>	99
5.3	<i>Uloga PBX1 i MEIS1 proteina u aktivaciji ekspresije humanog SOX3 gena tokom neuralne diferencijacije NT2/D1 ćelija retinoičnom kiselinom</i>	103
5.4	<i>Uloga transkripcionog faktora TGIF u regulaciji ekspresije humanog SOX3 gena u NT2/D1 ćelijskoj liniji</i>	108
5.5	<i>Literaturni podaci o regulaciji Sox3 gena drugih kičmenjaka</i>	111
6	ZAKLJUČCI	116
7	LITERATURA	118

1. UVOD

Normalno embrionalno razviće i održavanje homeostaze adultnih višećelijskih organizama obezbeđeno je složenim mehanizmima kontrole osnovnih ćelijskih procesa koji obuhvataju opredeljivanje multipotentnih progenitora u pravcu određenih ćelijskih tipova, diferencijaciju, proliferaciju i ćelijsku smrt. Ovi mehanizmi omogućavaju da organizam tokom razvića i u adultnom stadijumu raspolaze populacijom matičnih ćelija koje pod određenim uslovima mogu ući u proces opredeljivanja za određenu ćelijsku liniju. Proces opredeljivanja ukida neograničen proliferativni kapacitet i multipotentnost matičnih ćelija i označava ulazak opredeljenih progenitora u ireverzibilan proces koji se završava diferencijacijom u određeni ćelijski tip (Lefebvre et al., 2007). Mehanizam opredeljivanja ćelija praćen je promenom ekspresije određene grupe gena i u velikoj meri je kontrolisan transkripcionim faktorima specifičnim za određeni ćelijski tip. Ovi transkripcioni faktori pripadaju različitim proteinskim familijama: HLH proteini, POU proteini, Runt proteini, homeodomenski proteini, forkhead proteini i SOX proteini (Lefebvre *et al.*, 2007).

Ovaj rad bavi se ulogom TALE familije homeodomenskih proteina u regulaciji ekspresije humanog *SOX3* gena. Kratka rekapitulacija objavljenih rezultata olakšaće razumevanje klasifikacije, evolucije i jedinstvenih karakteristika proteina koji pripadaju SOX i TALE familijama. Takođe, ukazaće i na značaj funkcionalnog povezivanja članova ovih proteinskih familija i potencijalne implikacije njihovih interakcija na embrionalno razviće kičmenjaka, posebno na razviće CNS-a, proces tokom kog se u neuralnim progenitorima povećava ekspresija kako *SOX3*, tako i pojedinih članova TALE familije proteina

1.1 *SOX* proteini

SOX proteini evolutivno su povezani sa familijom HMG domenskih proteina (Wegner, 1999). HMG domenski proteini prisutni su u svim eukariotskim ćelijama. Poseduju

dva ili više kanonskih HMG domena dugih oko 80 amino kiselina koji obezbeđuju vezivanje proteina za DNK (Weiss, 2001). Većina drugih proteina koji se vezuju za DNK ostvaruju ovaj kontakt preko velikog žljeba DNK zavojnice čime se konformacija DNK molekula neznatno menja. Zahvaljujući strukturi svog DNK vezujućeg domena, HMG domenski proteini se umeću u mali žljeb DNK uslovljavajući značajno savijanje DNK zavojnice pri čemu dolazi do širenja malog žljeba i kompresije velikog (Lefebvre et al., 2007). Promena konformacije DNK olakšava pristup proteinima i ubrzava formiranje enhensozoma, funkcionalno aktivnih kompleksa transkripcionih faktora na enhenserskim sekvencama gena (Lefebvre et al., 2007).

SOX proteini se odlikuju prisustvom jednog nekanonskog HMG domena koji je označen kao HMG boks domen (Lefebvre et al., 2007). Prisutni su samo u životinjskom carstvu, što ukazuje da su nastali evolucijom HMG domenskih proteina. Za razliku od širokog profila ekspresije HMG domenskih gena, nizak nivo ekspresije *Sox* gena, podgrupe HMG boks gena, detektovan je u ograničenom broju ćelijskih tipova. HMG boks domen pokazuje samo 20% homologije sa predačkim, kanonskim HMG domenom ali su amino kiseline koje obezbeđuju konformacione promene DNK prilikom vezivanja ostale evolutivno očuvane (Lefebvre et al., 2007).

Sry je prvi otkriveni *Sox* gen (Gubbay et al., 1990; Sinclair et al., 1990). Njegovim otkrićem okončana je duga potraga za genom odgovornim za diferencijaciju muškog pola na Y hromozomu (SRY; sex-determining region on the Y chromosome). Ostali članovi ove genske familije otkriveni su na osnovu homologije sa *Sry* genom u HMG boks domenu i na osnovu ove karakteristike nastao je akronim *Sox* (*Sry*-related HMG box) (Gubbay et al., 1990; Sinclair et al., 1990; Denny et al., 1992; Wright et al., 1993). Brojevi su *Sox* genima dodeljivani na osnovu redosleda otkrivanja. Schepers i saradnici su 2002. godine izvršili pretraživanje sekvenci kompletnih genoma čoveka i miša i izvršili ponovnu numeraciju i klasifikaciju približno dvadesetak *Sox* gena prisutnih kod ove dve vrste (Schepers et al.,

2002). Na osnovu poređenja proteinskih sekvenci *Sox* geni sisara su svrstani u 8 grupa, A-H (Tabela 1), pri čemu je grupa B podeljena na podgrupe B1 i B2 (Lefebvre *et al.*, 2007).

GRUPA	GEN	LOKUS		HEMATSKI PRIKAZ GENA	REFERENCE
		MIŠ	ČOVEK		
A	<i>Sry</i>	YC3	Yp11.3		Gubbay <i>et al.</i> , 1992 Dubin <i>et al.</i> , 1995
B1	<i>Sox1</i>	8 A1-A2	13q34		Collignon <i>et al.</i> , 1996 Kamachi <i>et al.</i> , 1999
	<i>Sox2</i>	3 A2-B	3q26.3-q27		Collignon <i>et al.</i> , 1996 Kamachi <i>et al.</i> , 1999
	<i>Sox3</i>	X A7.3-B	Xq26.3		Collignon <i>et al.</i> , 1996
B2	<i>Sox14</i>	9 E3.3	3q22-q23		Hargrave <i>et al.</i> , 2000
	<i>Sox21</i>	14 E4	13q31-q32		Uchikawa <i>et al.</i> , 1999
C	<i>Sox4</i>	13 A3-A5	6p22.3		van de Wetering <i>et al.</i> , 1993
	<i>Sox11</i>	12 A3	2p25		Kuhbrodt <i>et al.</i> , 1998
	<i>Sox12</i>	2 G3	20p13		NCBI - CAM23207
D	<i>Sox5</i>	6 G3	12p12.1		Denny <i>et al.</i> , 1992 Lefebvre <i>et al.</i> , 1998
	<i>L-Sox5</i>	6 G3			Lefebvre <i>et al.</i> , 1998 Hiroaka <i>et al.</i> , 1998
	<i>Sox6</i>	7 F1	11p15.3		Lefebvre <i>et al.</i> , 1998 Takamatsu <i>et al.</i> , 1995 Connor <i>et al.</i> , 1995
	<i>Sox13</i>	1 E4	1q32		Kido <i>et al.</i> , 1998
E	<i>Sox8</i>	17 A3	16pter-p13.3		Schepers <i>et al.</i> , 2000
	<i>Sox9</i>	11 E2	17q24.3q25.1		Sudbeck <i>et al.</i> , 1996 Wright <i>et al.</i> , 1995
	<i>Sox10</i>	15 E1	22q13		Pusch <i>et al.</i> , 1996 Kuhbrodt <i>et al.</i> , 1998
F	<i>Sox7</i>	14 C3	8p22		Taniguchi <i>et al.</i> , 1999 Takashi <i>et al.</i> , 2001
	<i>Sox17</i>	1 A1	8q11.23		Kanei <i>et al.</i> , 1996
	<i>Sox18</i>	2 H4	20q13.33		Dunn <i>et al.</i> , 1995 Hosking <i>et al.</i> , 2001
G	<i>Sox15</i>	11 B3	17p13		Beranger <i>et al.</i> , 2000
H	<i>Sox30</i>	11 B1.1	5q33		Osaki <i>et al.</i> , 1999

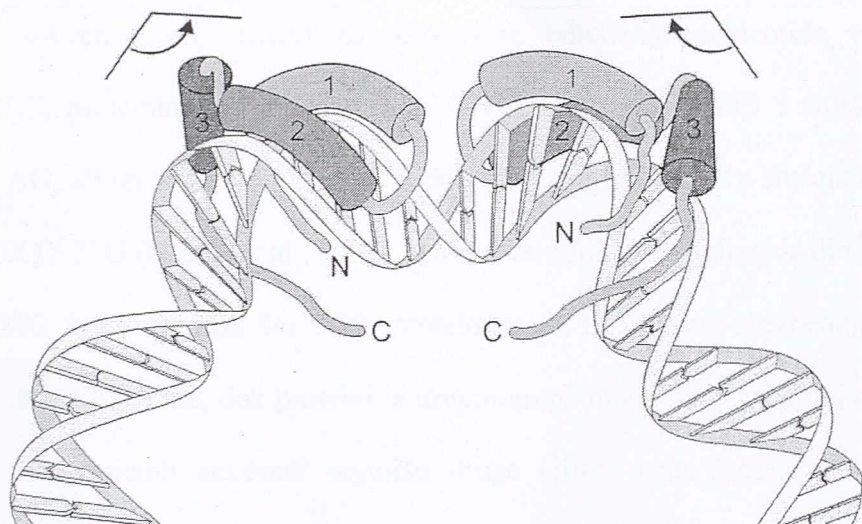
Tabela 1: Klasifikacija *Sox* gena miša, sa oznakom grupe, hromozomske pozicije kod miša i čoveka (lokus) i strukturnom organizacijom gena. Na shemi organizacije gena blokovi označavaju funkcionalne domene: crni-HMG domen, uzdužne pruge-transaktivacioni, poprečne pruge-transrepresorski, dijagonalne pruge-dimerizacioni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

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 (Wunderle et al., 1996; Hiraoka et al., 1998; Lefebvre et al., 1998; Osaki et al., 1999). *Sox* geni su prisutni i kod invertebrata, tako na primer, *Drosophila melanogaster* ima samo pet a *Caenorhabditis elegans* osam *Sox* gena ali svi ovi geni imaju odgovarajuće ortologe u pomenutim grupama *Sox* gena vertebrata (Bowles et al., 2000).

1.1.1 Karakteristike SOX proteina

Većina SOX proteina ima više funkcionalnih domena (Gubbay et al., 1992; Connor et al., 1995; Dunn et al., 1995; Takamatsu et al., 1995; Wright et al., 1995; Collignon et al., 1996; Kanai et al., 1996; Kido et al., 1998; Kuhlbrodt et al., 1998; Taniguchi et al., 1999; Hargrave et al., 2000; Kamachi et al., 2000; Schepers et al., 2000). Najznačajniji je svakako HMG boks domen koji sam obezbeđuje ostvarivanje veoma značajnih funkcija: vezivanje proteina za DNK i konformacione promene DNK, interakcije sa drugim proteinima, transport proteina u i van jedra (Lefebvre et al., 2007) (Slika 1). 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 ~ 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-a 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 (Sudbeck et al., 1996; Pusch et al., 1998). *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 boks-a (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).



Slika 1: Shematski prikaz strukture HMG domena SOX proteina. Domen se savija u strukturu oblika slova L koja se sastoji od 3 α -heliksa i ostvaruje kontakt sa malim žljebom DNK zavojnice, savijajući ga pod uglom od 30° do 110° . Slika prikazuje dva HMG domena vezana za DNK u suprotnoj orijentaciji. α -heliksi su predstavljeni cilindrima a sekvece između heliksa, kao i N i C terminalni domeni su predstavljeni trakama. Ugao savijanja DNK je predstavljen iznad HMG domena. Preuzeto iz Lefebvre, V et al., 2007.

1.1.2 Vezivanje SOX proteina za DNK

SOX i TEF/LEF-1 proteini pokazuju veću specifičnost za određene sekvence prilikom vezivanja za DNK od svojih evolutivnih predaka, HMG domenskih proteina (Lefebvre et al., 2007). Ova karakteristika omogućava SOX proteinima da, iako su prisutni u maloj količini u ćeliji, ostvare svoje funkcije preko specifičnih sekvenci u regulatornim regionima ciljnih gena. *In vitro* eksperimenti u kojima je ispitivan afinitet SOX proteina za vezivanje za specifične sekvence DNK ukazali su da se SOX proteini preferencijalno vezuju za heksamernu sekvencu 5' (A/T)(A/T)CAA(A/T) 3' (Denny et al., 1992; van de Wetering et al., 1993; Harley et al., 1994; Mertin et al., 1999). Ova sekvenca veoma je slična konsenzusnoj sekvenci za vezivanje TEF/LEF-1 proteina, 5' T(A/T)(A/T)CAAG 3' (Love et al., 1995; Werner et al., 1995). Na afinitet vezivanja SOX proteina utiču i nukleotidi koji okružuju heksamernu sekvencu, ali zahtevi za prisustvom određenih nukleotida variraju među različitim SOX proteinima (Mertin et al., 1999). Na primer SOX9 i SOX17 zahtevaju prisustvo 5' AG, ali im se zahtevi za nucleotide 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 da regulišu ekspresiju 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). Eksperimentalni podaci ukazuju da oba mehanizma funkcionišu *in vivo*. SOX5 i SOX6, koji pripadaju SoxD grupi, aktiviraju *Col2a1* gen preko enhensera koji sadrži nekoliko mesta za vezivanje SOX proteina kooperativno se vezujući sa SOX9 (pripada grupi E) (Lefebvre et al., 1998). Međutim, u promotorima *Mpz* i *Mpb* gena ovi proteini kompetiraju za vezivanje sa SOX9 i SOX10 ostvarujući pri tom represorsku funkciju (Stolt et al., 2006).

Važno je naglasiti da je otkriveno više slučajeva u kojima se SOX proteini vezuju za sekvence DNK koje samo delimično odgovaraju konsenzusnoj sekvenci otkrivenoj *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*. Gore pomenuti enhenser *Col2a1* gena, za koji se vezuju SOX5, SOX6 i SOX9, poseduje 4 vezivna mesta za SOX proteine od kojih ni jedno ne deli homologiju sa konsenzusnim heksamerom u svih 6 nukleotida (Lefebvre et al., 1997; Lefebvre et al., 1998). Ova 4 mesta nalaze se u delu enhensera koji sačinjavaju 2 invertovana ponovka od po 11 nukleotida koji mogu da formiraju nelinearne strukture DNK (Lefebvre et al., 1997; Lefebvre et al., 1998). Konformacija DNK u regionima gde se nalaze nekonsenzusne sekvence može da bude jedan od kriterijuma po kojima SOX proteini vrše selekciju mesta za vezivanje. Činjenica da se SOX proteini *in vivo* vezuju za DNK sekvence koje ne odgovaraju u potpunosti konsenzusnom mestu otkrivenom *in vitro* otežavaju pronalaženje potencijalnih ciljnih gena ovih proteina. Potencijalna vezivna mesta za SOX proteine ne mogu se otkriti samo na osnovu sekvence DNK, po čemu se razlikuju od većine drugih transkripcionih faktora. Sve dok se ne otkriju svi kriterijumi po kojima SOX proteini vrše selekciju vezivnih mesta na DNK biće teško identifikovati sve ciljne gene u čiju regulaciju ekspresije su ovi proteini uključeni.

1.1.2.1 Konformacione promene DNK izazvane vezivanjem SOX proteina

Pokazano je da LEF-1 protein ima ključnu arhitektonsku ulogu u formiranju aktivnog transkripcionog kompleksa na enhenseru gena za T ćelijski receptor alfa (*TCR α*) (Giese et al., 1995). Prilikom formiranja ovog enhensozoma, LEF-1 se vezuje za DNK i izaziva veoma oštro savijanje zavojnice koje dovodi do bliskog kontakta proteina vezanih za veoma udaljene sekvence na linearnoj DNK (Lefebvre et al., 2007). Iako SOX proteini takođe izazivaju savijanje DNK i verovatni imaju značajnu ulogu u formiranju enhensozoma, ovakav primer uloge SOX proteina kao arhitektonskih faktora još nije potvrđen *in vivo*. U prilog hipotezi da



je promena konformacije DNK jedna od osnovnih funkcija SOX proteina idu podaci o specifičnim mutacijama SOX proteina. Kod čoveka su opisane mutacije u *SRY* i *SOX2* genu, povezane sa patološkim fenotipom, koje ne utiču na njihovo vezivanje za DNK već selektivno pogađaju sposobnost ovih proteina da izazovu konformacione promene DNK (Scaffidi and Bianchi, 2001).

Ugao savijanja DNK zavojnice prilikom vezivanja SOX proteina varira od 30° do čak 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 terciarne strukture. Fleksibilna struktura HMG boks domena predstavlja veoma ekonomičan način da u mnogobrojnim ćelijskim tipovima dvadesetak SOX proteina organizuje veoma različite tipove enhensozoma.

1.1.3 Interakcije sa drugim proteinima

Još jedna važna karakteristika SOX proteina je njihova sposobnost da interaguju sa različitim transkripcionim faktorima (Kamachi et al., 2000; Wilson and Koopman, 2002). 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 drugim slučajevima aktivacije gena specifično eksprimiranih u matičnim ćelijama, uključujući i *Sox2* gen

(Tomioka *et al.*, 2002). Transkripcioni faktori sa kojima SOX2 ostvaruje interakcije u drugim ćelijskim tipovima su Pax6 u ćelijama sočiva (Kamachi *et al.*, 2001) i Brn2 u neuralnom primordijumu (Tanaka *et al.*, 2004).

Interakcije SOX proteina sa drugim transkripcionim faktorima odvijaju se preko domena za vezivanje za DNK. Efikasnost ovih proteinskih interakcija na DNK verovatno je povezana sa činjenicom da se SOX proteini vezuju za mali, a većina ostalih transkripcionih faktora za veliki žljeb DNK zavojnice (Lefebvre *et al.*, 2007).

In vitro je pokazano da SOX proteini ostvaruju interakcije sa različitim transkripcionim faktorima: homeodomenskim proteinima, proteinima koji poseduju Zn-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 enhensozoma, ne samo promenom konformacije DNK, već i direktnom interakcijom sa različitim tipovima transkripcionih faktora.

1.1.4 Lokalizacija SOX proteina u ćeliji

HMG boks SOX proteina sadrži dva domena koji obezbeđuju lokalizaciju ovih proteina u jedru. Ovi domeni (NLS-Nuclear Localisation Signal) su međusobno nezavisni i evolutivno visoko očuvani kod svih SOX proteina (Sudbeck and Scherer, 1997). HMG boksovi gena iz SoxE grupe, pored signala za ulazak proteina u jedro, poseduju i signal za izlazak proteina iz jedra u citoplazmu (Gasca *et al.*, 2002). Još uvek je nejasno da li je transport SOX proteina između citoplazme i jedra generalni mehanizam regulacije aktivnosti ovih proteina. SOX 9 je lokalizovan u citoplazmi u nediferenciranim gonadama embriona i ranim stadijumima diferencijacije ženskih gonada (Morais da Silva *et al.*, 1996), dok je SOX2

detektovan u citoplazmi ćelija unutrašnje ćelijske mase blastocista (Avilion *et al.*, 2003). Osim u ovim slučajevima i SOX2 i SOX9, kao i svi ostali proteini ove familije, smatraju se jedarnim proteinima.

1.1.5 Transaktivacija i transrepresija

SOX proteini koji pripadaju grupama B1, C, E i F, koji čine 12 od ukupno dvadesetak SOX proteina, poseduju veoma jak transaktivacioni domen na svom C terminusu. Ovaj domen SOX2 i SOX9 proteina fizički interaguje sa transkripcionim koaktivatorima CBP/p300 što je još jedan mehanizam preko koga SOX proteini učestvuju u aktivaciji enhensozoma (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 HMG boks domena i imaju preklapajući profil ekspresije: transrepresori 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 SOX proteina B1 podgrupe za vezivanje za DNK, već i direktnim interakcijama preko domena na C terminusu (Uchikawa *et al.*, 1999).

SOX15 (jedini član G grupe SOX proteina) funkciju represije takođe ostvaruje 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 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 interaguje sa Pdx1 proteinom preko HMG boks-a. U oligodendrocitima SOX5 i SOX6 kompetiraju sa SOX proteinima E grupe (SOX 8, 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).

1.1.6 Homodimerizacija

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 koji obezbeđuju homodimerizaciju u prisustvu ili u odsustvu DNK i omogućavaju visoko efikasno vezivanje za susedna konsenzusna mesta (Lefebvre *et al.*, 1998). Takođe, pošto se homodimerizacija ne odvija preko HMG boks domena, moguće su interakcije sa drugim transkripcionim faktorima. SoxE proteini takođe formiraju homodimere, ali nakon vezivanja za DNK, i to preko evolutivno očuvanih regiona koji se nalazi na N terminusu proteina (Schlierf *et al.*, 2002). Zanimljivo je da mutacija ovog regiona u humanom *SOX9* 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).

1.1.7 Posttranslacione modifikacije

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 potvrđena samo fosforilacija SOX9 proteina kinazom A na dva mesta u regionima oko HMG boksa (Huang *et al.*, 2000). Ova modifikacija SOX9 proteina događa se u hrskavici (Huang *et al.*, 2001) i tokom razvića muških gonada (Malki *et al.*, 2005) gde omogućava translokaciju proteina u jedro.

SOX3, SOX4, SOX6 i SoxE proteini mogu biti modifikovani sumoilizacijom ili ubikvitinacijom *in vitro*, čime se menjaju karakteristike ovih proteina: stabilnost, ćelijska lokalizacija, transaktivacioni potencijal i afinitet za vezivanje za DNK (Savare *et al.*, 2005).

1.2 Funkcije Sox gena *in vivo*

Sox geni imaju značajnu ulogu u brojnim regulatornim mehanizmima tokom embrionalnog razvića i učestvuju u ključnim fiziološkim procesima tokom adultnog života kičmenjaka (Lefebvre *et al.*, 2007). U Tabeli 2 dat je sažet pregled funkcija Sox gena miša koje su potvrđene *in vivo*.

Grupa	Gen	Uloga
A	<i>Sry</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Determinacija pola (Polanco and Koopman, 2007) • Regulacija aktivnosti mozga (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 ES 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
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"> • Funkcije srca (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)

Grupa	Gen	Uloga
	<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 muskulature (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 koje su potvrđene *in vivo*. Preuzeto iz Lefebvre, V et al., 2007.

1.2.1 Onkogeni potencijal *Sox* gena

Pokazano je da mnogi proteini koji imaju ulogu u kontroli razvića, poseduju onkogeni potencijal, kao i da brojni geni prvobitno identifikovani kao protoonkogeni učestvuju u procesima vezanim za diferencijaciju (Dong et al., 2004). Ovakvi proteini pripadaju grupama sekretornih proteina (Dong *et al.*, 2004), transmembranskih proteina (Alberti *et al.*, 2003), proteina uključenih u puteve signalne transdukcije (Wicking et al., 1999; Classon and Harlow, 2002; Lustig and Behrens, 2003) i transkripcionim faktorima (Lu et al., 1995; Barr, 1997; Chang et al., 1997). Brojni podaci ukazuju na onkogeni potencijal članova SOX familije (Dong *et al.*, 2004).

Jednu od retkih direktnih studija onkogenog potencijala *Sox* gena izveli su Xia et al. (Xia et al., 2000). U toj studiji je pokazano da ektopična ekspresija *Sox3* gena u fibroblastima embriona pileta dovodi do onkogene transformacije ovih ćelija. Takođe je pokazano da je za proces transformacije neophodno prisustvo kako HMG, tako i transaktivacionog domena *Sox3* gena. Ova studija međutim nije dala odgovor na pitanje da li je uticaj delecija ovih domena na onkogeni potencijal zasnovan na njihovoj funkcionalnoj aktivnosti ili na konformacionim promenama mutiranih proteina (Xia et al., 2000). Uloga *Sox3* u tumorogenezi potvrđena je i u ispitivanjima mišijeg T ćelijskog limfoma (Kim et al., 2003). Naime, *Sox3* gen je bio jedno od brojnih mesta retrovirusne insercije koja indukuje ovaj tip maligne transformacije (Kim et al., 2003). Takođe, ekspresija SOX1, SOX2, SOX3 i SOX14 je povećana u ćelijama karcinoma pluća, a sva četiri proteina su prisutna i u serumu pacijenata obolelih od SCLC (small cell lung cancer) (Gure et al., 2000). U normalnom razviću, ekspresija ova četiri SOX gena detektovana je tokom ranih faza razvića, da bi u adultnim tkivima došlo do značajnog pada njihove ekspresije (Gure et al., 2000). Opisani rezultati su u skladu sa hipotezom da je maligna transformacija često posledica reverzije procesa koji prate normalno razviće.

Članovi C grupe *Sox* gena, *SOX4* i *SOX11*, ekspimirani su u visokom nivou kod klasičnog meduloblastoma (Lee et al., 2002), anaplastičnog oligodendroglioma i glioblastoma (Dong et al., 2004). Povećana ekspresija SOX4 detektovana je u brojnim drugim tipovima tumora: SCLC (small cell lung cancer) (Friedman et al., 2004), malignitetima pankreasa, ovarijuma i prostate (Lee et al., 2002), adenoidnom cističnom karcinomu (Frierson et al., 2002), kao i ćelijskim linijama kancera dojke (Graham et al., 1999).

Brojne studije ukazuju na onkogeni potencijal gena koji pripadaju SoxE i SoxD grupi. Opsežna studija ekspresije ovih gena u humanim gliomima pokazuje povećan nivo *SOX6*, *SOX8* i *SOX13* gena u oligodendrogliomima (Schlierf et al., 2007). Visok nivo ekspresije *SOX6* gena zabeležen je u ćelijama glije i fetalnom mozgu dok je ekspresija u adultnom

mozgu veoma slaba (Schlierf et al., 2007). Otuda i profil ekspresije ovog gena u malignitetima vezanim za nervni sistem zavisi od tipa ćelija u kojima je došlo do maligne transformacije (Ueda et al., 2004). Tako je visok nivo ekspresije *SOX6* zabeležen kod tumora koji su nastali od multipotentnih, progenitorskih ćelija nervnog sistema, dok u tumorima poreklom od diferenciranih nervnih ćelija ekspresija ovog gena ili nije detektovana ili je slaba (Ueda et al., 2004). Gubitak heterozigotnosti na hromozomima 1p i 19q dovodi do povećanja nivou iRNK za *SOX8* (Schlierf et al., 2007). Promena ekspresije *SOX8* primećena je kod astrocitoma, ali ne i kod glioblastoma (Schlierf et al., 2007). EST analiza ukazuje na ekspresiju *SOX10* u anaplastičnim oligodendrogliomima (Dong et al., 2004).

Različite analize (Northern blot, RT-PCR) ukazuju na visok nivo iRNK specifične za *SOX18* u ćelijskim linijama gastrointestinalnog trakta, pankreasa i embrionalnih tumora (Saitoh and Katoh, 2002). EST analiza takođe ukazuje na visok nivo ekspresije *SOX18* u melanomu, karcinom pankreasa, neuroblastomu (Dong et al., 2004). Izučavanje onkogenog potencijala *SOX18* gena komplikuje činjenica da je ovaj gen eksprimiran u endotelijalnim ćelijama i tokom neovaskularizacije (Pennisi et al., 2000; Darby et al., 2001). Otuda je teško razgraničiti da li je *SOX18* marker tumorskih ćelija ili je rezultat procesa angiogeneze u tumoru.

Jedna od važnih karakteristika imortalizovanih ćelija je amplifikacija gena koja nastaje kao posledica hromozomske nestabilnosti. Mesta amplifikacije ukazuju na regione genoma u kojima mogu biti locirani potencijalni onkogeni uključeni u tumorogenezu (Savelieva et al., 1997). Tako pozicija *SOX18* (20q13.3) predstavlja region čija je amplifikacija povezana sa kancerom dojke (Collins et al., 1998), kolona (Schlegel et al., 1995) i ovarijuma (Iwabuchi et al., 1995). Potrebna su dodatna istraživanja da bi se utvrdilo da li je *SOX18* povezan sa uzrocima navedenih transformacija.

Pokazano je da se broj kopija *SOX2*, *SOX4* i *SOX5* gena povećava u tumorskim ćelijama. Broj kopija *SOX2* gena povećan je u ćelijama kancera prostate (Sattler *et al.*, 2000) a *SOX4* u ćelijama karcinoma mokraćne bešike (Bruch *et al.*, 2000). *SOX5* je jedan od tri otkrivena gena koji su smešteni u regionu amplifikacije na kratkom kraku hromozoma 12 u testikularnom karcinomu (Zafarana *et al.*, 2002). Međutim EST analiza je ukazala da je *SOX5* eksprimiran i u normalnom tkivu testisa, pa su dodatna istraživanja neophodna da bi se utvrdilo eventualno povećanje ekspresije ovog gena tokom maligne transformacije (Dong *et al.*, 2004).

Navedeni literaturni podaci jasno pokazuju brojne primere povezanosti SOX transkripcionih faktora i pojave karcinoma kod čoveka. Međutim, još uvek nema podataka koji bi direktno povezali mutacije u *SOX* genima sa procesima tumorogeneze ili mišijih modela koji bi dokazali da je neki *SOX* gen uzročnik maligne transformacije. Takođe, povećana ekspresija *Sox* transgena u mišu nije ukazala na vezu ekspresije *Sox* gena i kancera (Dong *et al.*, 2004).

Svi ovi rezultati nedvosmisleno povezuju ekspresiju brojnih *Sox* gena sa progresijom različitih tumora, potvrđujući njihov onkogeni potencijal. Međutim, uloga *Sox* gena kao uzročnika maligne transformacije nije dokazana. Ipak, i na ovom stadijumu istraživanja SOX proteini služe kao tumor markeri i koriste se za bolju dijagnostiku, klasifikaciju i prognostiku različitih tumora kod čoveka (Dong *et al.*, 2004).

1.3 *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 domenom *Sry* gena (Wegner, 1999). Takođe, ova dva gena su

jedini članovi *Sox* familije 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 ima jedan egzon dužine 1125 bp. Produkt ovog gena je protein koji se sastoji od 446 amino kiselina i karakteriše ga prisustvo domena karakterističnih za članove *SOX* familije (Stevanovic et al., 1993). To su pre svega HMG domen (79 amino kiselina), region visoke homologije između proteina *SoxB* grupe (Group B homology) i *SOX123C* domen (region visoke homologije između članova *SoxB1* subgrupe) na C terminusu (Katoh and Katoh, 2005). Takođe, u okviru *SOX3* proteina su detektovani NLS motivi koji omogućavaju transport ovog proteina u jedro (Stevanovic et al., 1993).

Humani *SOX3* protein se odlikuje i prisustvom homopolimernih nizova: poliglutaminski niz na N terminusu, poliprolinski i 4 polialaninska niza na C terminusu (Stevanovic et al., 1993). Veoma je interesantna evolucija polialaninskih nizova *SOX3* proteina kičmenjaka koji su očuvani kod sisara, dok se na nivou kičmenjaka može pratiti povećanje broja alaninskih nizova, kao i broja alanina u okviru pojedinačnih nizova tokom evolucije (Wallis et al., 2007). Ovo nam ukazuje da polialaninski nizovi mogu imati značaj u regulaciji funkcije *SOX3* proteina. Indikativno je i to što su promene na nivou polialaninskih nizova humanog *SOX3* gena povezane sa patološkim fenotipom (Laumonier et al., 2002; Woods et al., 2005; Salemi et al., 2007). O poremećajima funkcije *SOX3* gena izazvanim promenama na nivou polialaninskih traktova biće više reči u nastavku ovog teksta, u delu koji se bavi mutacijama *SOX3* gena.

Ekspresija humanog *SOX3* gena je 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 pokazan RT-PCR

analizom u moždanom tkivu (Stevanovic et al., 1993). SAGE analiza (SAGE-Serial Analysis of Gene Expression) pokazuje vrlo visok nivo ekspresije u pankreasu.

Funkcije humanog *SOX3* gena uglavnom su izučavane praćenjem patoloških fenotipa koji se javljaju kao posledica mutacija ovog gena. Razlog leži u nemogućnosti izučavanja regulacije ekspresije i funkcije *SOX3* gena tokom embrionalnog razvića čoveka. To je uslovalo upotrebu permanentnih ćelijskih linija koje predstavljaju model sistem neurogeneze, i korišćenje transgenih životinja u kojima je analizirana aktivnost ortologa *SOX3* gena tokom embrionalnog razvića kičmenjaka. Pregled rezultata dobijenih ovakvim analizama biće dat u narednim poglavljima.

1.3.1 Mutacije *SOX3* gena

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 aberantne ekspresije 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), a zatim na region od 685,5 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* povezana sa fenotipom hipopituitarizma (Woods et al., 2005). Takođe je pokazano da je ekspanzija od 7 alanina u okviru prvog polialaninskog trakta *SOX3* proteina

(na poziciji od 234. do 248. amino kiseline), koja dovodi do gubitka funkcionalnosti proteina usled promenjene lokalizacije, povezana sa hipopituitarizmom (Woods *et al.*, 2005). Ovi podaci ukazuju da svaka promena nivoa SOX3 proteina (smanjenje ili povećanje) dovodi do poremećaja tokom razvića hipotalamo-pituitarne ose organizma i da rezultuje fenotipom hipopituitarizma (Woods *et al.*, 2005). Zanimljivo je da u opisanim slučajevima ekspanzije polialaninskih nizova nije zabeležena mentalna retardacija kod analiziranih pacijenata (Woods *et al.*, 2005).

Još jedna studija povezanosti mentalne retardacije i mutacija SOX3 gena pokazala je da delecija od 6 bp u prvom polialaninskom traktu, koja ne menja okvir čitanja i dovodi do gubitka 2 alanina, nije povezana sa mentalnom retardacijom (Salemi *et al.*, 2007).

Analiza 17 familija sa X-vezanim sindromom nedostatka hormona rasta i mentalnom retardacijom pokazala je prisustvo mutacija u SOX3 genu kod 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 amino kiselina (Laumonnier *et al.*, 2002). Nosioци ove mutacije su niskog rasta usled potpunog odsustva hormona rasta i imaju 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. Svi pomenuti nosioци ove mutacije imaju normalan nivo hormona rasta (Laumonnier *et al.*, 2002).

Fenotipske posledice mutacija u polialaninskim traktovima SOX3 proteina ukazuju na značaj ovog regiona za funkcionalnu aktivnost ovog proteina. Korelacija ekspanzije polialaninskih traktova i kongenitalnih poremećaja opisana je u slučaju osam različitih gena (Amiel *et al.*, 2003). Poznato je da ekspanzije dovode do formiranja nesolubilnih proteinskih

agregata u slučaju PABPN1 proteina (polyadenine-binding protein nuclear 1) (Brais *et al.*, 1998), dok je kod HOXD13 (Albrecht *et al.*, 2004) zabeležena promena pozicije proteina iz jedra u citolazmu gde se, i u ovom slučaju, formiraju agregati. Međutim, mehanizmi preko kojih proteinski agregati dovode do pojave kongenitalnih poremećaja još uvek nisu dovoljno istraženi (Wong *et al.*, 2007). Otuda je veoma interesantna analiza funkcionalnih karakteristika mutiranih SOX3 proteina koji nose, već opisane, ekspanzije od 7 i 11 alanina (Wong *et al.*, 2007). Studija je pokazala da oba mutantna proteina formiraju agregate u citoplazmi i perijedarnom prostoru (Wong *et al.*, 2007). Aktivnost mutiranih proteina kao transkripcionih faktora je promenjena i njihov kapacitet inhibicije beta-katenina je smanjen (Wong *et al.*, 2007). Ovim se menja efikasnost Wnt signalnog puta u neuralnim progenitorima što može dovesti do promene funkcije duž hipotalamo-pituitarne ose CNS-a, tj. pojave hipopituitarizma (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 gen neophodan za morfogenezu hipotalamisa i hipofize i da obezbeđuje normalne funkcije duž hipotalamo-hipofizne ose (Rizzoti *et al.*, 2004). *Sox3*^{-/-} miš ima patuljasti rast, smanjenje količine hormona hipofize i patološke promene u morfologiji hipotalamusa i hipofize (Rizzoti *et al.*, 2004). Ovi defekti su posledica nenormalnog 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 nosilaca *SOX3* mutacija (Hamel *et al.*, 1996).

Sox3 se eksprimira u urogenitalnoj brazdi (Collignon *et al.*, 1996) od koje će tokom razvića nastati 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 potvrđuje ekspresija 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 u germinativnim ćelijama. Kod adulta *SOX3* je ekspimiran u testisima (Weiss *et al.*, 2003). 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). Mušjaci kod kojih je ovaj gen deletiran 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 i gametogenezu u njima.

Kod čoveka velika delecija regiona X hromozoma koji sadrži i *SOX3* gen kod nekih pacijenata dovodi do smanjenja veličine testisa (Raverot *et al.*, 2004). Međutim, 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 uloge pojedinih faktora usled njihove funkcionalne redundantnosti (Bergstrom *et al.*, 2000) i smrti embriona na ranim stadijumima razvića kod pojedinih delecionih mutanata (Avilion *et al.*, 2003). Takođe, ciljni geni koji su

regulisani ovim transkripcionim faktorom u neuralnim progenitorima i nizvodni signalni putevi u koje je *Sox3* gena uključen nisu još uvek identifikovani. 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 kom akumulacija β -katenina u jedru dovodi do njegove interakcije sa proteinima LEF/TCF familije i do aktivacije ekspresije ciljnih gena (Zorn *et al.*, 1999). Ovi rezultati ukazuju da bi SOX3 mogao biti uključen u kanonski put Wnt signalne transdukcije, za koji je pokazano da ima ključnu ulogu u neurogenezi embriona sisara (Wodarz and Nusse, 1998).

1.3.2 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 anterio-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 grupa 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 sugerišu 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 jednog od ova dva gena može se iskoristiti za izolaciju prečišćene populacije neuralnih progenitora iz mešovite populacije ES ćelija ili embriona (Li

et al., 1998; Zappone et al., 2000). *Sox14* i *Sox21* su takođe eksprimirani 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, jer dosadašnja saznanja podržavaju oba aktuelna modela započinjanja 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). Signalni putevi koji uz BMP mogu biti uključeni u inicijaciju neurogeneze su Wnt i FGF (Fibroblast growth factor) (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 (Mizuseki *et al.*, 1998; Pevny *et al.*, 1998; Uchikawa *et al.*, 1999; Wood and Episkopou, 1999; Bowles *et al.*, 2000). 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).

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

1.3.3 Regulacija ekspresije *SOX3* gena

Naša grupa uradila je prvu karakterizaciju regulatornih elemenata humanog *SOX3* promotora odgovornih za njegovu bazalnu ekspresiju u NT2/D1 ćelijama (Kovacevic Grujicic *et al.*, 2005). Korišćenjem promotorskih reporterskih konstrukata identifikovan je optimalni promotor *SOX3* gena (pozicija -427/+286), a u okviru ovog regiona, bazalni promotor (pozicija -219/+67) i enhenserski element na poziciji -427/-219 u odnosu na start transkripcije (Kovacevic Grujicic *et al.*, 2005). *In silico* analiza optimalnog promotora *SOX3* gena pokazala

je visok stepen homologije ove sekvence kod svih ispitivanih ortologa sisara (šimpanza, makaka majmun, pacov, miš) (Kovacevic-Grujicic *et al.*, 2008). Pretraživanje ortologih sekvenci na prisustvo potencijalnih vezivnih mesta za transkripcione faktore pokazalo je da su brojna mesta očuvana kako po nukleotidnom sastavu, tako i po poziciji u promotoru *SOX3* gena (Kovacevic-Grujicic *et al.*, 2008). Ovo ukazuje da su mehanizmi regulacije ekspresije *Sox3* gena sisara koji se odvijaju preko regulatornih elemenata u promotoru ovog gena, verovatno evolutivno očuvani kod sisara.

Takođe, na modelu NT2/D1 ćelija indukovanih retinoičnom kiselinom, identifikovani su promotorski regioni preko kojih se ostvaruje aktivacija *SOX3* gena tokom ranih faza (48h) neuralne diferencijacije ovih ćelija (Mojsin *et al.*, 2006; Krstic *et al.*, 2007). Ovaj model sistem biće detaljnije opisan na kraju ovog poglavlja.

Istraživanja regulacije ekspresije *Sox3* gena kod drugih kičmenjaka pokazala su da pored elemenata u optimalnom promotoru, brojni regulatorni moduli u udaljenijim regionima, uzvodno i nizvodno od otvorenog okvira čitanja *Sox3* gena, utiču na njegovu ekspresiju (Brunelli *et al.*, 2003; Rogers *et al.*, 2008). Do sada su regulatorni elementi *Sox3* gena kičmenjaka ispitivani na većim genomskim regionima miša (Brunelli *et al.*, 2003) i žabe (Rogers *et al.*, 2008). Rezultati ovih istraživanja ukazuju na složenost regulacije ekspresije *Sox3* gena tokom razvića miša i žabe, kao i na velike razlike koje postoje u mehanizmima regulacije ovog gena kod različitih kičmenjaka (Brunelli *et al.*, 2003; Rogers *et al.*, 2008).

Literaturni podaci i naša istraživanja pokazuju da je regulacija ekspresije *Sox3* gena veoma složena i da uključuje brojne enhenserske i represorne module koji mogu biti smešteni na velikoj udaljenosti od otvorenog okvira čitanja ovog gena (Brunelli *et al.*, 2003; Rogers *et al.*, 2008). Za razliku od *Sox2* gena kičmenjaka, gde je prisutna velika evolutivna očuvanost regulatornih elemenata, u slučaju *Sox3* je jasno da regulatorni mehanizmi njegove aktivacije

nisu evolutivno očuvani. Ovo dodatno otežava ispitivanje regulacije ekspresije humanog *SOX3* gena i njegove uloge u neurogenezi.

1.4 TALE homeoboks proteini

TALE homeoboks geni predstavljaju familiju atipičnih homeodomenskih gena. TALE geni imaju ključnu ulogu u razviću nervnog sistema (Geerts *et al.*, 2003), a većina članova ove familije uključena je i u tumorogenezu. Ovi geni se odlikuju karakteristikama koje ih izdvajaju od drugih familija homeoboks gena.

Proteini kodirani ovim genima poseduju jedinstvenu inserciju dugu 3 amino kiseline između α -heliksa 1 i 2 u homeodomenu, po čemu je cela familija dobila ime (TALE-three amino acid length) (Chang *et al.*, 1995). Ova insercija je ključna za interakcije sa drugim homeoboks proteinima. Kooperativno vezivanje TALE proteina sa drugim homeoboks proteinima (npr. interakcije sa HOX proteinima) značajno povećava njihov afinitet i specifičnost za vezivanje za DNK (Chang *et al.*, 1995). Ovi proteini se ne vezuju za sve homeoboks proteine što ih čini selektivnim aktivatorima različitih homeoboks proteina (Chang *et al.*, 1995).

Geni koji kodiraju TALE proteine visoko su evolutivno očuvani i prisutni su kod zajedničkih predaka gljiva, biljaka i životinja (Yang *et al.*, 2000). Za razliku od većine homeoboks gena, TALE geni pokazuju visoku homologiju sekvenci izvan homeoboksa, što sugeriše da i N i C terminus imaju evolutivo očuvane funkcije (Burglin, 1997). Evolutivna očuvanost funkcija ovih regiona već je potvrđena kod različitih članova TALE familije (Burglin, 1997).

Nasuprot ostalim homeoboks genima, TALE geni imaju veoma širok profil ekspresije, a pojedini članovi familije su konstitutivno eksprimirani (Geerts *et al.*, 2003). Pojedini

članovi familije imaju ograničen profil ekspresije i detektovani su samo tokom razvića, dok su drugi eksprimirani i u adultnim tkivima (Geerts *et al.*, 2003).

TALE familija je podeljena na 4 dobro okarakterisane subfamilije: MEIS, PBX, TGIF i PKNOX (Burglin, 1997). U daljem tekstu biće opisane karakteristike sve četiri subfamilije TALE proteina, sa posebnim osvrtom na PBX i MEIS subfamilije, koje su i najbolje okarakterisane.

1.4.1 PBX proteini

PBX1 protein (pre B-cell leukaemia transcription factor) je identifikovan kao onkoprotein u humanim leukemijama koje su indukovane translokacijom t(1;19) i ekspresijom onkogenog fuzionog proteina E2a-PBX1 (Kamps *et al.*, 1990; Nourse *et al.*, 1990). PBX1 pripada PBC proteinskoj familiji. Ime su dobili po evolutivno očuvanom PBC motivu na N terminusu njihovog homeodomena. PBC familiji pripadaju PBX1, PBX2, PBX3 (Monica *et al.*, 1991) i PBX4 kod sisara (Wagner *et al.*, 2001), Lazarus (Lzr) kod *Danio rerio* (Popperl *et al.*, 2000; Waskiewicz *et al.*, 2001), kao i Extradenticle (Exd) kod *Drosophila melanogaster* i Ceh-20 kod *Caenorhabditis elegans* (Shanmugam *et al.*, 1999; Shen *et al.*, 1999).

Pbx1, *Pbx2*, *Pbx3* i *Pbx4* geni kodiraju proteine koji pokazuju visok stepen homologije, kako u okviru homeodomena koji obezbeđuje vezivanje za DNK (i do 97%), tako i u sekvencama koje ga okružuju (Monica *et al.*, 1991). Neki od ovih gena daju različite izoforme proteina zahvaljući alternativnoj obradi, tako da postoje duge (PBX1a, PBX2a, PBX3a i PBX4a) i kratke (PBX1b, PBX3b, PBX3c i PBX3c) forme odgovarajućih proteina (Monica *et al.*, 1991; Milech *et al.*, 2001; Wagner *et al.*, 2001).

Biohemijske karakteristike PBX proteina i njihovih izoformi unekoliko se razlikuju. Prvo, svi PBX proteini ne pokazuju isti afinitet za vezivanje DNK. Iako su *in vitro* studije

pokazale da svi PBX proteini prepoznaju istu konsenzusnu sekvencu, PBX1 ne može u odsustvu partnera da se veže za DNK, dok se PBX2 i PBX3 vezuju za DNK samostalno, bez prisustva partnera (Neuteboom and Murre, 1997).

Drugo, sposobnost homodimerizacije na DNK pokazuju samo PBX1 (obe izoformre) i PBX3 (Neuteboom and Murre, 1997; Calvo et al., 1999). Iako je fenomen homodimerizacije PBX proteina proučavan samo *in vitro*, on bi mogao imati značajnu ulogu u regulaciji aktivnosti gena mehanizmom kompeticije među različitim partnerima. Važnost homodimerizacije već je pokazana za neke homeodomenske proteine kao što je Oct1 (Poellinger and Roeder, 1989), Cdx2 (Suh *et al.*, 1994), Mix1 (Mead *et al.*, 1996) i Pit1 (Jacobson *et al.*, 1997). Homodimerizacija može biti mehanizam kojim se sprečava vezivanje PBX proteina za druge transkripcione faktore i time vrši selekcija proteina koji će imati pristup promotorima ciljnih gena (Laurent et al., 2008).

Alternativna obrada je još jedan mehanizam koji uslovljava funkcionalne razlike izoformi PBX proteina. Najočigledniji primer predstavljaju funkcionalne karakteristike 4 izoforme PBX3 proteina nastale translacijom različitih transkripata *Pbx3* gena (Ferretti *et al.*, 1999). Najduža izoforma je PBX3a, dok izoforme PBX3b i PBX3c nemaju N odnosno C terminus, a najkraća forma PBX3d ne sadrži ni N ni C terminus (Ferretti et al., 1999). Izoforme PBX3c i PBX3d kojima nedostaje C terminus proteina, u kome su dva evolutivno visoko očuvana regiona PBC-A i PBC-B, ne interaguju sa Prep1 i veoma slabo interaguju sa MEIS, dok ostale izoforme PBX3 ostvaruju snažne interakcije sa ovim proteinima (Ferretti et al., 1999). Kao rezultat, izoforme PBX3c i PBX3d ne mogu da se transportuju u jedro sa Prep1 proteinom, već se aktiviraju drugi mehanizmi njihovog transporta (Berthelsen *et al.*, 1999). Slične razlike uočavaju se i u slučaju izoformi PBX1 i njihovih interakcija sa PDX1 proteinom (Peers *et al.*, 1995). Kompleks PDX1/PBX1b je transkripcioni aktivator, dok je

PDX1/PBX1a represorki kompleks zahvaljujući C terminusu prisutnom u izoformi PBX1a koji regrutuje korepresorske proteine SMRT i NcoR (Asahara *et al.*, 1999).

Dodatak na biohemijsku raznolikost predstavlja i različit profil ekspresije izoformi PBX proteina. Ekspresija PBX1a izoforme je ograničena na mozak, dok se PBX1b eksprimira u svim tkivima organizma (Laurent *et al.*, 2008). PBX1b je dominantna izoforma tokom embrionalnog razvića dok je PBX1a izoforma specifična za adultni stadijum (Schnabel *et al.*, 2001). Čest je slučaj da su različiti transkripti *Pbx* gena prisutni tokom razvića nekog organa, ali da je distribucija odgovarajućih proteina ograničena na neke ćelijske tipove (Laurent *et al.*, 2008). Tako se tokom embrionalnog razvića PBX1a ne može detektovati u pankreasu, dok je PBX1b lokalizovan samo u jedrima acinusnih ćelija. PBX2 je prisutan i u jedarnoj i u citoplazmatičnoj frakciji endokrinih i acinusnih ćelija, dok je PBX3b prisutan u citoplazmi oba ćelijska tipa (Swift *et al.*, 1998). Takođe je pokazano da se ekspresija pojedinih izoformi vezuje za određeni patološki kontekst, pa je PBX3d prisutan u normalnim a PBX3c u leukemičnim ćelijama (Milech *et al.*, 2001). Svi ovi podaci ukazuju da mehanizmi koji regulišu posttranslacione modifikacije i ćelijsku lokalizaciju PBX proteina igraju važnu ulogu u određivanju njihovih funkcija.

Funkcije PBX proteina i mehanizmi njihovog delovanja izučavaju se korišćenjem mutanata članova PBC familije. Miševi koji nemaju PBX1 umiru tokom embrionalnog razvića (E15.5) a na embrionima su detektovane teške forme hipoplazije (pluća, jetra, stomak, creva, bubrezi i pankreas), ektopije (timus i bubrezi) ili aplazije (slezina i nadbubrežna žlezda) različitih organa kao i brojni defekti aksijalnog i apendikularnog skeleta (Selleri *et al.*, 2001). Malformacije skeleta prisutne su u proksimalnim elementima udova, rebrima i kičmenim pršljenovima (Selleri *et al.*, 2001). Miševi bez PBX3 preživljavaju do rođenja, ali umiru par sati nakon rođenja usled respiratornih problema nastalih kao posledica izmenjene aktivnosti inspiratornih neurona u meduli gde je ovaj gen visoko ekprimiran (Laurent *et al.*, 2008).

Zanimljivo je da PBX1 i PBX3 imaju preklapajući profil ekspresije i da mogu pokazati redundantnost u ostvarivanju funkcija (Laurent et al., 2008). Međutim, nedostatak jednog od ovih gena ispoljava se patološkim fenotipom naročito na mestima gde je taj gen dominantno eksprimiran (Rhee et al., 2004). U slučajevima *Pbx1* ili *Pbx3* mutanata neke fenotipske karakteristike odgovaraju fenotipovima mutanata *Hox* gena, potvrđujući ulogu PBX proteina kao HOX kofaktora (Laurent et al., 2008). Međutim, ovi *Pbx* mutanti ne predstavljaju fenokopije *Hox* mutanata. Ova poređenja sugerišu da drugi članovi PBC familije mogu da kompenzuju funkcije odsutnog proteina u tkivima gde im se ekspresioni profili preklapaju i da PBX proteini ostvaruju funkcije koje su nezavisne od HOX proteina (Laurent et al., 2008). Ovu hipotezu potvrđuju rezultati dobijeni na mišu kome nedostaje PBX2. *Pbx2* mutantni miševi su vijabilni i ne ispoljavaju vidljiv patološki fenotip uprkos veoma širokom profilu ekspresije *Pbx2* tokom embrionalnog razvića (Selleri et al., 2004). Jedino objašnjenje ovog fenomena je da su funkcije PBX2 kompenzovane aktivnošću drugih članova PBC familije.

Mehanizmi delovanja PBX proteina još uvek nisu rasvetljeni, ali je kvantitativni model, aktuelan za HOX proteine, za sada jedini predložen. Po ovom modelu, redundantnost različitih PBX proteina i održavanje kritičnog nivoa (praga) njihove koncentracije su neophodan uslov za normalno razviće (Laurent et al., 2008). Za potvrđivanje ovog modela neophodno je analizirati složene *Pbx* mutante (mutirano je više *Pbx* gena) koji mogu ukazati na preklapanje funkcija pojedinih PBC proteina u različitim procesima diferencijacije tokom organogeneze. Rezultati dobijeni poređenjem pojedinačnog *Pbx1* mutanta sa složenim *Pbx1/Pbx2* mutantima ukazuju da smanjenje doze PBX2 u odsustvu PBX1 dovodi do težih poremećaja u razviću udova nego samo odsustvo PBX1 (Capellini et al., 2006). Takođe, mutant koji nema nijedan alel *Pbx2* (*Pbx1^{-/-}/Pbx2^{-/-}*) nema zadnje ekstremitete (Capellini et al., 2006). Ovo je u korelaciji sa kvantitativnim modelom jer pokazuje da je prag koncentracija PBX proteina ključan za normalno razviće udova (Capellini et al., 2006).

Dugo vremena PBC proteini su tretirani kao ključni kofaktori HOX proteina, s obzirom da je ova njihova funkcija potvrđena u mnogim slučajevima regulacije gena uključenih u razviće (Moens and Selleri, 2006). Međutim, istraživanja su pokazala da funkcija PBX proteina nije ograničena na interakcije sa HOX proteinima. Novija istraživanja pokazuju da samo 6% potencijalnih partnera PBX1 predstavljaju homeodomenski proteini, a samo 18% ostali transkripcioni faktori (Laurent *et al.*, 2008). Veliki broj partnera PBX1 koji ne pripadaju homeodomenskim proteinima pokazuje da PBX proteini imaju znatno širu ulogu u regulaciji razvića.

1.4.2 MEIS proteini

Meis1 gen prvi put je identifikovan kao glavno onkogeno mesto virusne integracije u BXH-2 mišijem model-sistemu leukemogeneze (Moskow *et al.*, 1995). Virusna integracija u promotorsku sekvencu *Meis1* gena uvek rezultira povećanom ekspresijom ovog gena i inicijacijom onkogenog događaja. Ispitivanja u ovom model sistemu pokazuju da sličan onkogeni potencijal imaju i *Meis2* i *Meis3* geni, što je u korelaciji sa rezultatima dobijenim proučavanjem humanih ortologa ovih gena (Nakamura *et al.*, 1996). Tako je region hromozoma 15 u kom je smešten *Meis2* povezan sa akutnom mijeloidnom leukemijom (AML) i hroničnom mijeloidnom leukemijom (CML) (Steelman *et al.*, 1997), a region koji sadrži *Meis3* sa gliomom i neuroblastomom (Hartmann *et al.*, 2002). *Meis* geni su identifikovani i okarakterisani kod *Dani rerio*, *Xenopus*-a, miša i čoveka, a podeljeni su u 4 grupe: *Meis1*, *Meis2*, *Meis3* i *Prep1* (Moskow *et al.*, 1995; Nakamura *et al.*, 1996; Salzberg *et al.*, 1999).

Od četiri člana MEIS familije MEIS1, MEIS2 i MEIS3 pokazuju visoku homologiju kompletne proteinske sekvence (MEIS1 i MEIS2 imaju 77,2% homologije, MEIS1 i MEIS3 69,9%) (Thorsteinsdottir *et al.*, 2001), koja je najveća u homeodomenskom i N terminalnom

regionu (Nakamura *et al.*, 1996). PREP1 protein, međutim, osim u homeodomenu i N terminusu, ne pokazuje homologiju sa sekvencama ostalih članova MEIS familije. I pored toga pokazano je da PREP1 uspešno zamenjuje funkciju MEIS1 proteina i njegovog ortologa kod vinske mušice, HTH, u prenošenju PBX ili EXD proteina u jedro (Berthelsen *et al.*, 1999; Jaw *et al.*, 2000), i da kao i MEIS1 formira heterodimere sa PBX1 i HOXB1 na enhenseri *Hoxb2* gena (Jacobs *et al.*, 1999; Ferretti *et al.*, 2000). Studije na transgenim vinskih mušicama su takođe ukazale na funkcionalnu očuvanost PREP1 i HTH (Jaw *et al.*, 2000). Međutim, pokazano je da, za razliku od MEIS1, PREP1 ne može, zajedno sa HOXA9, da indukuje akutnu mijeloidnu leukemiju (AML) (Thorsteinsdottir *et al.*, 2001) što sugeriše postojanje funkcionalnih razlika između ova dva proteina. Ove razlike su verovatno rezultat aktivnosti domena ovih proteina koji se nalaze van homeoboksa i regiona kojima se ostvaruju interakcije sa drugim homeodomenskim proteinima (Thorsteinsdottir *et al.*, 2001), i nezavisne su od vezivanja za DNK i interakcija sa članovima PBC klase proteina (Thorsteinsdottir *et al.*, 2001). Ovo ukazuje da je evolutivni nastanak PREP1 kod kičmenjaka možda uslovljen potrebom da se obezbedi antagonistička funkcija ostalim članovima MEIS familije (Berthelsen *et al.*, 1998). Zanimljivo je da u P19 ćelijama embrionalnog karcinoma, retinoična kiselina različito reguliše ekspresiju MEIS1 i PREP1 proteina, tako da je PREP1 dominantno eksprimiran u neindukovanim a MEIS1 u indukovanim ćelijama (Ferretti *et al.*, 2000). U skladu sa ovim rezultatima, u tkivima adultnog miša PREP1 se konstitutivno eksprimira, dok ekspresija MEIS1 pokazuje veću specifičnost (Ferretti *et al.*, 1999). Ovo ukazuje na različite regularne uloge PREP1 i MEIS1, i predstavlja još jedan nivo složenosti signalnih puteva u koje su uključeni TALE i HOX transkripcioni faktori.

Za razliku od većine homeoboks proteina, MEIS proteini pokazuju izrazitu homologiju sekvenci N i C termina sa ostalim članovima TALE familije (Geerts *et al.*, 2005). Homologija ovih proteina povezana je sa funkcijom TALE proteina: pojedinačni

TALE proteini nemaju visok afinitet i specifičnost za vezivanje za DNK, ali u kompleksu sa članovima drugih TALE subfamilija ili HOX proteina postaju aktivni transkripcioni regulatori ciljnih gena (Chang et al., 1995; Chang et al., 1996; Shen et al., 1997). Pored vezivanja za DNK i stabilizacije proteinskih kompleksa na ciljnim sekvencama, MEIS proteini učestvuju i u translokaciji drugih TALE proteina u jedro (Rieckhof *et al.*, 1997).

Za sve TALE homeoboks gene karakteristična je alternativna obrada. Spojevi intron-egzon i mehanizmi obrade su očuvani kod članova TALE familije što ukazuje na važne funkcionalne razlike pojedinih izoformi (Geerts *et al.*, 2005). MEIS2 ima 4 izoforme MEIS2A-D, a kod MEIS1 su opisane varijante B i D (Oulad-Abdelghani et al., 1997; Yang et al., 2000). Izoforme se međusobno razlikuju u sekvencama na C terminusu proteina (Geerts *et al.*, 2005). Pošto MEINOX domen na N terminusu obezbeđuje interakcije sa drugim TALE i HOX proteinima, C terminus omogućava interakcije MEIS proteina sa dodatnim transkripcionim regulatorima (Geerts *et al.*, 2005). Mala homologija domena na C terminusu tako obezbeđuje da izoforme MEIS proteina formiraju transkripcione komplekse različite aktivnosti na promotorskim sekvencama ciljnih gena (Geerts et al., 2005). Funkcionalne razlike pojedinih izoformi već su opisane u slučaju MEIS1B i D tokom neuralnog razvića žabe (Maeda *et al.*, 2002). MEIS2 izoforme (A-D) pokazuju funkcionalne razlike u aktivaciji promotora ciljnih gena (Yang *et al.*, 2000) kao i različitu distribuciju u tkivima tokom embriogeneze kod miša (Oulad-Abdelghani *et al.*, 1997).

Uloga domena na C terminusu potvrđena je i otkrićem MEIS2E izoforme koja sadrži samo N terminus i trećinu homeodomena (Yang *et al.*, 2000). Kao rezultat toga, MEIS2E se ne vezuje za DNK i ne ostvaruje interakcije sa proteinima koji ne pripadaju homeoboks familiji. MEINOX domen na očuvanom N terminusu obezbeđuje ovoj izoformi interakcije sa drugim homeoboks proteinima (Yang *et al.*, 2000). Na taj način kompeticijom za vezivanje za druge homeoboks proteine MEIS2E negativno reguliše funkcije izoformi MEIS2A-D (Yang

et al., 2000). Opisane su i izoforme MEIS proteina kojima je deletiran domen na N terminusu (Geerts *et al.*, 2005). Po analogiji sa PBX mutantima kojima nedostaje isti region, ove varijante proteina pokazuju smanjeno vezivanje za druge homeoboks proteine u kompleksima na ciljnim promotorima (Milech *et al.*, 2001).

Delecija *Meis1* kod miša dovodi do embrionalno letalnog fenotipa i to od 13 do 14 dana embrionalnog razvića (E13.5), sa dominantnim nepravilnostima u razviću hematopoetskog sistema, angiogenezi i formiranju oka (Hisa *et al.*, 2004; Azcoitia *et al.*, 2005). Kod žabe izoforma MEIS1b reguliše ekspresiju gena tokom razvića neuralne kreste i zadnjeg mozga (Maeda *et al.*, 2002).

MEIS proteini su dominantni *in vivo* partneri PBX proteina. MEIS proteini takođe dimerizuju sa HOX proteinima i to članovima paralogih grupa 9-13 (Laurent *et al.*, 2008). Heterodimerne interakcije PBX-a i MEIS-a odvijaju se preko N terminusa oba proteina. Trimerni kompleksi koji uključuju i HOX proteine (HOX-PBX-MEIS/PREP) su takođe dobro okarakterisani (Moens and Selleri, 2006). Nasuprot HOX monomerima koji najčešće prepoznaju TAAT motiv na DNK (Gehring *et al.*, 1994), HOX-PBX, HOX-MEIS i PBX-MEIS heterodimeri prepoznaju veće motive na DNK sekvenci što rezultira povećanjem afiniteta i specifičnosti za vezivanje za DNK (Mann and Chan, 1996).

PBX1/MEIS1 heterodimeri pokazuju najveći afinitet vezivanja za bipartitnu DNK sekvencu koja se sastoji od polumesta za vezivanje PBX1 na 5' kraju (TGAT) i MEIS vezivnog mesta (TGACAG) smeštenog na 3' kraju (Chang *et al.*, 1997). PBX1 i MEIS dimerizuju i u odsustvu DNK, a ovo se odnosi i na *in vitro* sintetisane proteine i na PBX1 i MEIS1 iz jedarnih ekstrakata ćelija (Chang *et al.*, 1997). Sposobnost dimerizacije ova dva proteina u rastvoru može biti razlog što se PBX1 preferencijalno vezuje za MEIS1 (Chang *et al.*, 1997).

1.4.3 TGIF proteini

Članovi ove familije TALE proteina ime su dobili po karakteristikama motiva na DNK sekvenci za koji se vezuju, 5'-TG-3' interacting factor (Yang et al., 2000). Funkcionalne analize su pokazale da su TGIF proteini transkripcioni represori koji interaguju sa opštim korepresorskim proteinima, CtBP, mSin3 i histon deacetilazama (Wotton et al., 1999; Melhuish and Wotton, 2000; Sharma and Sun, 2001; Wotton et al., 2001). MEIS i TGIF proteini često imaju preklapajuća konsenzusna vezivna mesta, u suprotnim orijentacijama, na komplementarnim lancima DNK. Na ovakvim regulatornim elementima pokazana je kompeticija u vezivanju TGIF i MEIS proteina, pri čemu TGIF uglavnom inhibira, a MEIS aktivira transkripciju ciljnih gena (Yang et al., 2000). Humani *Tgif1* gen mapiran je u minimalnom regionu hromozoma 18 (18p11.3) koji je deletiran kod pacijenata sa holoprozencefalijom (sindrom nastao malformacijama srednjeg i prednjeg mozga) (Bartholin et al., 2006), ali u nastanak ovog sindroma su uključeni mnogi drugi faktori poput morfogena Sonic Hedgehog (Shh), i transkripcionih faktora *Zic2* i *Six3* (Roessler and Muenke, 1998; Muenke and Beachy, 2000).

Miševi sa delecijom *Tgif1* gena nemaju vidljive fenotipske nedostatke (Bartholin et al., 2006). Takođe, prisustvo *Tgif2* gena može mehanizmima kompenzacije da neutrališe efekat navedene mutacije. Jedini efekat koji je zapažen kod *Tgif1* mutanata je povećana ekspresija gena čija je aktivnost regulisana retinoičnom kiselinom u nekim tkivima u poređenju sa ekspresijom u *wt* životinjama (Bartholin et al., 2006). Povećanje ekspresije je izraženije u adultnim tkivima nego na nivou celih embriona, što je u saglasnosti sa odsustvom izmenjenog fenotipa tokom razvića (Bartholin et al., 2006). Navedeni rezultati sugerišu da je TGIF važan regulator signalnog puta retinoične kiseline. Pošto je ranije dokazana uloga TGIF-a u mreži TGF β signalne transdukcije, moguće je da TGIF integriše signale ova dva važna signalna puta (Bartholin et al., 2006).

1.4.4 PKNOX proteini

Ovu grupu za sada čine samo dva člana PKNOX1 i PKNOX2. PKNOX1 je identifikovan kao komponenta transkripcionog kompleksa UEF3 (UEF3-urokinase enhancer factor 3) (Berthelsen *et al.*, 1998). Homeodomen PKNOX proteina pokazuje visoku homologiju sa istim domenom MEIS i TGIF proteina, i shodno tome vezuje se za isti motiv na DNK 5'-TGACAG-3' (Berthelsen *et al.*, 1998). PKNOX1 formira stabilne heterodimere sa PBX1 proteinim što rezultira u povećanom afinitetu formiranog kompleksa za vezivanje za konsenzusno mesto TGACAG (Imoto *et al.*, 2001). Interakcije PKNOX1 i PBX1 odvijaju se preko N terminusa oba proteina. PKNOX1/PBX1 heterodimeri vezuju se za DNK kooperativno sa HOX proteinima, a u ovakvim trimernim kompleksima PKNOX1 ima ulogu koaktivatora (Berthelsen *et al.*, 1998; Penkov *et al.*, 2000). U nekim slučajevima, međutim, PKNOX1/PBX1 ima ulogu transkripcionog represora (Herzig *et al.*, 2000). Činjenica da se PKNOX i MEIS vezuju za PBX preko N terminalnog domena (Geerts *et al.*, 2003), koji pokazuje visoku homologiju u slučaju ova dva proteina, i da imaju isto vezivno mesto na DNK, ukazuje da prisustvo jednog proteina u kompleksu isključuje prisustvo drugog (Geerts *et al.*, 2003). Razlike u transkripcionoj aktivnosti PKNOX/PBX i MEIS/PBX kompleksa stoga potiču od interakcija PKNOX i MEIS proteina sa drugim transkripcionim regulatorima (Geerts *et al.*, 2003).

Analize ekspresije PKNOX1 pokazuju da je ovaj protein konstitutivno eksprimiran u gotovo svim analiziranim tkivima (Imoto *et al.*, 2001). Za razliku od njega, PKNOX2 iRNK je dominantno prisutna u mozgu i skeletnim mišićima (Imoto *et al.*, 2001). Tkivno specifična ekspresija PKNOX2 ukazuje da PKNOX1 i PKNOX2 mogu ostvarivati različite uloge formiranjem heterodimera sa različitim PBX proteinima, ili da PKNOX2 ima ulogu tkivno specifičnog modulatora funkcije PKNOX1 (Imoto *et al.*, 2001).

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

Poređenja humanih embrionalnih matičnih ćelija (ES-embriional stem) i ćelija humanog embrionalnog karcinoma (EC) pokazala su da ova dva ćelijska tipa dele brojne morfološke i fenotipske karakteristike (Thomson et al., 1998; Pera et al., 2000). 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).

NT2/D1 su ćelije humanog embrionalnog karcinoma (EC-embriional 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 humanog embrionalnog razvića, komplementaran humanim ES ćelijama (Freemantle *et al.*, 2002). Pluripotentne NT2/D1 ćelije nakon indukcije retinoičnom kiselinom (RA-retinoic acid) ulaze u process 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 elektrohemijska 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 *SOX3* iRNK nakon indukcije retinoičnom kiselinom potvrđeno je RT-PCR-om i Northern blot analizom (Stevanovic, 2003; Krstic et al., 2007), dok je Western blot analiza potvrdila i 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.

Treba naglasiti da tretman EC ćelija retinoičnom kiselinom predstavlja i važan model za proučavanje tumorogeneze, pošto RA izaziva reverziju malignog fenotipa (Mojsin *et al.*, 2006). I pored brojnih istraživanja, mehanizmi neuralne diferencijacije, procesi opredeljivanja multipotentnih preogenitora i represija tumorogenog potencijala pluriptentnih EC ćelija još uvek nisu potpuno razjašnjeni (Mojsin *et al.*, 2006).

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) (Mangelsdorf et al., 1995; Chambon, 1996). Vezivanje RA za retinoidne receptore dovodi do njihove hetero- ili homodimerizacije i vezivanja ovih kompleksa za konsenzusna mesta (RARE) u regulatornim sekvencama 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).

Identifikacija ciljnih gena retinoične kiseline tokom ranih faza (8-48h) indukcije NT2/D1 ćelija pokazala je aktivaciju 57 i represiju 37 gena (Freemantle *et al.*, 2002). Mnogi identifikovani geni pripadaju signalnim mrežama uključenim u razviće, uključujući TGF- β (Lefty A, NMA), IGF (IGFBP3, IGFBP6), Notch (ADAM11), Hedgehog (patched) i Wnt (Frat2) i homeodomenske proteine (HOXD1, MEIS1, MEIS2, GEIS2) (Freemantle *et al.*, 2002). Pored toga, identifikovani su geni uključeni u mehanizme ćelijske adhezije, remodelovanja citoskeleta i matriksa, intracelularne signalizacije, metabolizma (Freemantle *et al.*, 2002).

2. CILJ RADA

Dosadašnja istraživanja regulacije ekspresije *Sox3* gena kičmenjaka pokazale su da ovaj proces obuhvata više različitih, složenih mehanizama koji obezbeđuju preciznu tkivno i vremenski specifičnu ekspresiju ovog gena (Brunelli et al., 2003; Rogers et al., 2008). Ovi mehanizmi uključuju brojne opšte i tkivno specifične transkripcione faktore kao i neke morfogene čija je funkcija tokom razvića kičmenjaka dobro definisana (Brunelli et al., 2003; Kovacevic Grujicic et al., 2005; Rogers et al., 2008). Navedeni faktori interaguju sa regulatornim elementima koji mogu biti pozicionirani kako u neposrednoj blizini otvorenog okvira čitanja *Sox3* gena, tako i u okviru veoma udaljenih sekvenci. Dodatnu kompleksnost predstavlja slaba evolutivna očuvanost mehanizama regulacije *Sox3* gena kičmenjaka (Rogers et al., 2008).

Našim istraživanjima koja su bila usmerena ka određivanju strukture promotora humanog *SOX3* gena stekli su se uslovi za detaljniju analizu uloge ovog regiona u regulaciji ekspresije humanog *SOX3* gena (Kovacevic Grujicic et al., 2005). Takođe, na modelu indukcije NT2/D1 ćelija retinoičnom kiselinom omogućeno je istraživanje uloge pojedinih elemenata promotora humanog *SOX3* gena u aktivaciji ovog gena tokom ranih faza neuralne diferencijacije NT2/D1 (Stevanovic, 2003). Ciljevi ovog rada su bili:

1. Identifikacija potencijalnih kontrolnih elemenata u promotorskom regionu humanog *SOX3* gena
2. Analiza i precizna karakterizacija transkripcionih faktora koji se vezuju za identifikovane kontrolne elemente i učestvuju u regulaciji transkripcije *SOX3* gena
3. Funkcionalna analiza kontrolnih elemenata za koje se vezuju članovi TALE familije transkripcionih faktora
4. Ispitivanje uloge TALE transkripcionih faktora u indukciji *SOX3* gena retinoičnom kiselinom tokom ranih faza neuralne diferencijacije NT2/D1 ćelija

3. MATERIJAL I METODE

3.1 NT2/D1 ćelije

U ovom radu je korišćena permanentna ćelijska linija NT2/D1 poreklom iz humanog embrionalnog teratokarcinoma (ATCC br. CRL-1973) (Andrews, 1984, 1988). 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.

3.1.1 Tranzijentna transfekcija NT2/D1 ćelija kalcijum-fosfatnom precipitacijom

U eksperimentima tranzijentne transfekcije 2 x 10⁶ ćelija je zasejavano u Petri šolje prečnika 10 cm. Nakon 24h rasta ćelije su oprane dva puta HEPES rastvorom (6.7 mM KCl, 0.142 M 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; 0.274 M NaCl, 42 mM HEPES, 9.6 mM KCl, 1.5 mM Na₂HPO₄; pH 7.15 - 7.23), koji je neprekidno aerisan, nakapavanjem je dodavan 1 ml 250 mM rastvora CaCl₂. Ovako formiran kalcijum-fosfatni precipitat dodavan je na ćelije i inkubiran 4h u standardnim uslovima za gajenje NT2/D1 ćelija. Nakon inkubacije precipitati su uklonjeni sa ćelija pranjem 2 puta rastvorom HEPES-a. Ćelije su u svežem medijumu gajene narednih 48h, pri čemu su u eksperimentima sa indukovanim ćelijama 10 µM all-*trans* retinoična kiselina dodavana nakon transfekcije.

U eksperimentima tranzijentne transfekcije NT2/D1 ćelije su transfekovane sa 5 μg *wt* (F19R30) (Kovacevic Grujicic *et al.*, 2005) ili mutiranih *SOX3* promotorskih konstrukata (PBXMUT, MEISMUT i TGIFMUT) i 3 μg pCH110 vektora (Amersham Pharmacia).

Za ispitivanje uticaja povećane ekspresije PBX1 i MEIS1 proteina na aktivnost *SOX3* gena u NT2/D1 ćelijama, cDNK *Pbx1b* i *Meis1a* miša su klonirane u pCI, vector za ekspresiju proteina u sisarskim ćelijama. Prvi konstrukt, pCIPBX1b, generisan je *XbaI/EcoRI* digestijom pGEM3zf-Pbx1b plazmida. Dobijeni insert je zatim subkloniran u pCI, prethodno pripremljen *NheI/EcoRI* digestijom. Drugi konstrukt, pCIMEIS1a, nastao je duplom digestijom MSCV-Meis1a plazmida sa *BglII* i *EcoRI*., nakon čega je dobijeni fragment ukloniran u pCI vektor pripremljen digestijom sa *EcoRI* i *NheI*. Plazmide pGEM3zf-Pbx1b i MSCV-Meis1a ljubazno nam je ustupio prof. Mark P. Kamps (Department of Pathology, University of California, San Diego, USA).

Uticaj povećane ekspresije TGIF proteina praćen je korišćenjem ekspresionog vektora pCDNA3.1TGIF koji nam je ljubazno ustupio prof. Young Yang (Department of Biological Science, Sookmyng Women's University, South Korea).

U eksperimentima kotransfekcije korišćeno je 5 μg ekspresionih vektora pCIPBX1b, pCIMEIS1a i pCDNA3.1TGIF, 5 μg *wt* (F19R30) i 3 μg pCH110. Vektor pBluescript (Stratagene) korišćen je za ujednačavanje ukupne količine DNK u kotransfekcijama.

3.1.2 Priprema ćelijskih ekstrakata

Ćelijski ekstrakti su pripremani 48 h nakon transfekcije. Ćelije su oprane PBS-om, struganjem odvojene od podloge u 1 ml TEN rastvora (Tris-EDTA-NaCl; 0.04 M Tris-HCl pH 7.4, 1 mM EDTA, 0.15 M NaCl) i staložene centrifugiranjem na 13200 rpm, 2 min. 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 praćen 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 eseju.

3.1.3 β -galaktozidazni esej

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

β -galaktozidazni esej je uobičajen metod za određivanje aktivnosti enzima β -galaktozidaze u lizatima ćelija koje su transfekovane β -galaktosidaza 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 MgCl₂, 100 mM β -merkptoetanol i 1.33 mg/ml supstrata ONPG (*o*-nitrofenil- β -D-galaktopiranozid). Uzorci se inkubiraju na 37°C najmanje 30 minuta. Tokom ovog vremena β -galaktosidaza hidrolizuje bezbojan supstrat u *o*-nitrofenil koji ima žutu boju. Absorbanca je merena na Microplate reader Multiskan RC (Labsystems) aparatu 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 150 mU.

3.1.4 CAT esej

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

CAT ELIZA esej je enzimski imunoesej za kvantifikaciju hloramfenikol-acetil-transferaze (CAT) iz *E. coli* u transfekovanim eukariotskim ćelijama. CAT ELIZA se koristi za kvantifikovanje ekspresije CAT-a u eukariotskim ćelijama koje su transfekovane 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 transfekovanih ćelija i inkubiraju 60 min na 37°C. U ovom koraku dolazi do specifičnog vezivanja CAT enzima iz ćelijskih ekstrakata za anti-CAT antitela vezanim za dno bunarčića. U sledećem koraku dodaje se digoksininim obeleženo antitelo na CAT anti-CAT-DIG i događa se njegovo vezivanje za CAT. Sledi dodavanje antitela na digoksinin koja su konjugovana peroksidazom, anti-DIG-POD, i koja se vezuju za digoksinin. U završnom koraku ovog esaja dodaje se substrat ABTS, koji u prisustvu peroksidaze daje obojenu reakciju.

Absorbanca je merena na Microplate reader Multiskan RC (Labsystems) aparatu na talasnoj dužini 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*: 0,78 pg, 3,125 pg, 6,25 pg, 12,5 pg, 25 pg, 50 pg, 100 pg, 200 pg.

Vrednosti dobijenih aktivnosti CAT enzima normalizovane su u odnosu na aktivnost promotorskog konstrukta F19R30 (100%) i predstavljene kao srednja vrednost \pm S.E.M.(standard error mean) iz najmanje tri nezavisna eksperimenta. Srednje vrednosti relativnih aktivnosti CAT enzima poredene su Student *t*-testom, a statistička analiza je urađena programom SPSS. Samo u slučajevima kada je *p* vrednost bila manja od 0,05 rezultat je smatran statistički značajnim.

3.2 Analiza sekvenci *SOX3* ortologa

Pretraživanje baza podataka dostupnih sekvenci i njihovo međusobno poređenje urađeno je korišćenjem programa NCBI (National Center for Biotechnology Informations) i ClustalW. Sekvenca promotora humanog *SOX3* gena, prijavljena pod brojem AL121875.10 poređena je sa sekvencama ortologih promotora šimpanze (AC149044.1), rezus majmuna (NW_001218193.1), pacova (NW_048052.2) i miša (NT_039706.6).

MatInspector program (Quandt *et al.*, 1995) 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)-0,95.

3.3 Analiza regiona promotora zaštićenih od dejstva enzima DNKaza I ("DNase I footprinting" analiza)

"DNase I footprinting" analiza je urađena korišćenjem SureTrack Footprinting Kit-a (Amersham Pharmacia Biotech), uz određene modifikacije. DNK fragmenti promotorskog regiona humanog *SOX3* gena generisani su restrikcionim digestijama klonova F18R12 (-293 do -21) (Krstic *et al.*, 2007) i F19R14 (-427 do -92) (Mojsin *et al.*, 2006). Korišćeni fragmenti preklapaju se u regionu (-293 do -92). Na oba fragmenta analiziran je i kodirajući i nekodirajući lanac.

Kodirajući lanac je analiziran korišćenjem fragmenata nastalih *KpnI/XbaI* digestijom klonova: F18R12 fragment dužine 272 bp i F19R14 fragment dužine 335 bp. Navedena digestija ostavlja na 3' kraju fragmenata, posle digestije sa *XbaI*, produžene krajeve 5' AGATC 3'. Ovako generisani fragmenati nose nespareni guanozin na 3' krajevima što

obezbeđuje obeležavanje samo kodirajućeg lanca fragmenta korišćenjem Klenow-og fragmenta DNK polimeraze i [α - 32 P] dCTP.

Za analizu nekodirajućeg lanca korišćeni su F18R12 *SacI/ClaI* i F19R14 *SacI/ClaI* čije su dužine 273 i 336 baznih parova. Digestija sa *ClaI* ostavlja na ovim fragmentima 3' produžene krajeve 5' AGCT 3', na nekodirajućem lancu što obezbeđuje selektivno obeležavanje samo nekodirajućeg lanca Klenow-im fragmentom DNK polimeraze i [α - 32 P] dCTP.

Obeleženi DNK fragmenti su inkubirani sa jedarnim proteinima izolovanim iz neindukovanih i RA indukovanih NT2/D1 ćelija (25 μ g ili 50 μ g) i goveđim serumskim albuminom (BSA-bovine serum albumin) u kontrolnim reakcijama, u uslovima koji će detaljno biti opisani u delu koji se odnosi na esej smanjene elektroforetske pokretljivosti u gelu (EMSA). Uzorci su zatim tretirani DNkazom I, 0,4 U, 1 min na sobnoj temperaturi. DNK fragmenti su nakon tretmana DNkazom I prečišćavani ekstrakcijom fenol/hloroformom (1/1) i precipitacijom etanolom i razdvajani na denaturišućem gelu za sekvenciranje (8% poliakrilamid/7 M urea). Reakcija sekvenciranja odgovarajućeg DNK fragmenta rađena je po metodi Maxam i Gilbert (G+A reakcija). Pozicije zaštićenih nukleotida određene su poređenjem sa A+G sekvencom datog fragmenta i DNK markerom Φ X174 *HinfI*.

3.4 Izolacija jedarnih proteina

Jedarni proteini iz neindukovanih i RA indukovanih NT2/D1 ćelija su izolovani po modifikovanoj proceduri Dignam-a et al (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 (20000 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, 0.5 mM PMSF.

3.5 *In vitro* transkripcija i translacija

Prof. Mark P. Kamps nam je ljubazno ustupio cDNK *Meis1a* i *Pbx1b* miša uklonirane u pGEM3zf-. Ovi vektori iskorišćeni su za *in vitro* sintezu MEIS1a i PBX1b proteina. *In vitro* transkripcija i sinteza PBX1 i MEIS1 proteina sa ovih plazmida urađena je korišćenjem retikulocitnog lizata za transkripciju i translaciju proteina ("TNT coupled transcription-translation reticulocyte lysate (SP6 polymerase version)" (Promega).

Korišćeni retikulocitni lizat ("TNT coupled transcription-translation reticulocyte lysate") je *in vitro* model sistem translacije eukariota. Sistem obezbeđuje transkripciju i translaciju gena kloniranih nizvodno od SP6 promotora RNK polimeraze, u jednom koraku. U 40 µl TNT® Quick Master Mix-a doda se 1 µl 1mM metionina i 1 µg plazmidne DNK, nakon čega sledi inkubacija od 90 min na 30°C. 3 µl od ukupnog volumena *in vitro* sintetisanog proteina (50 µl) korišćeno je u EMSA reakcijama.

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

U EMSA reakcijama korišćene su *wt* (*wt*-wild type) i mutirane oligonukleotidne probe F31R31 i F3R3 regiona *SOX3* promotora. Na priloženim sekvencama mutirani nukleotidi su podvučeni, a malim slovima su označena po tri nesparena guanozina na 5' kraju R prajmera.

F31R31(*WT*) 5' GAACCTGTCAATCACGGGTCCTCCGGGTTGC 3'
3' CTTGGACAGTTAGTGCCCAGGAGGCCCAACGggg 5'

F31R31mut1 5' GAACCTCGAATCACGGGTCCTCCGGGTTGC 3'
3' CTTGGAGTCTTAGTGCCCAGGAGGCCCAACGggg 5'

F31R31mut2 5' GAACCTGTCTTAACGGGTCCTCCGGGTTGC 3'
3' CTTGGACAGAATGTGCCCAGGAGGCCCAACGggg 5'

F31R31mut3 5' GAACCTGTCAATGTGGGTCCTCCGGGTTGC 3'
3' CTTGGACAGTTACCCCCAGGAGGCCCAACGggg 5'

F31R31mut4 5' GAACCTGTGAAATCACGGGTCCTCCGGGTTGC 3'
3' CTTGGACACATAGTGCCCAGGAGGCCCAACGggg 5'

F3R3 5' CGCCGGTCTGCCTTGACAGGGTTGCAAAGTTG 3'
3' GCGGCCAGACGGAACTGTCCCAACGTTTCAACggg 5'

Dvolančane probe su generisane reakcijama hibridizacije komplementarnih F i R prajmera (2 nmol svakog prajmera) u 1 x STE puferu (0.1 M NaCl, 10 mM Tris-Cl 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 staložene etanolnom precipitacijom.

R prajmeri su dizajnirani tako da sadrže 3 nesparena guanozina na 5' kraju koji obezbeđuju obeležavanje probe ugrađivanjem [α -³²P] dCTP 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).

EMSA reakcije su rađene sa 2,5 μ g jedarnih proteina iz neindukovanih i RA 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 EDTA, 3% glycerol, 0,25mM DTT i 40 ng/ μ l poly (dI-dC) u volumenu od 25 μ l, 30 minuta na 37°C. U EMSA reakcijama sa *in vitro* sintetisanim PBX1 i MEIS1 proteinima korišćeno je 3 μ l od ukupno 50 μ l produkta dobijenog *in vitro* transkripcijom/translacijom. U reakcijama sa ukupnim ćelijskim lizatima (WCL-whole cell lysates) korišćeno je 20 μ g uzorka. Za kompeticiju (hlađenje) su korišćeni neobeleženi mutirani oligonukleotidi (mut1-4) u molarnom višku od 100 puta. U esejima smanjene elektroforetske pokretljivosti u prisustvu antitela ("superšift") jedarni proteini su inkubirani sa antitelima Pbx1 (C-20), Meis1/2 (H-80) i TGIF (K-15), Santa Cruz, CA, na sobnoj temperaturi, 20 minuta pre dodavanja obeležene probe.

Reakcije su elektroforetski razdvajane na 4% nativnom poliakrilamidnom gelu sa 0.5 X TBE puferom (Tris-borat-EDTA; 45 mM Tris-borat, 1 mM Na₂-EDTA).

3.7 Ekstrakcija proteina iz gela posle EMSA reakcija

Za ovaj eksperiment paralelno su rađene EMSA reakcije sa neobebeženom i obebeženom *wt* F31R31 probom i jedarnim proteinima iz neindukovanih i RA indukovanih NT2/D1 ćelija. Reakcije su elektroforetski razdvajane na istom 4% nativnom poliakrilamidnom gelu i na osnovu pozicije formiranih kompleksa u reakciji sa obebeženom probom isecani su delovi gela koji odgovaraju poziciji kompleksa formiranih sa neobebeženih probom (Zhang et al., 2002). Isečeni komadići gela su denaturisani kuvanjem 5 minuta u SDS puferu (12,5 mM Tris pH 6.8, 2% SDS, 20% glycerol, 0,002% bromphenol blue, 10% 2-mercaptoethanol) a proteini iz gela su razdvojeni na 10% SDS-PAGE (Zhang et al., 2002). Posle elektrotransfera na nitroceluloznu membranu proteini iz kompleksa formiranih na F31R31 probi su identifikovani Western blot analizom korišćenjem PBX1 i MEIS1/2 antitela (Zhang et al., 2002).

3.8 Generisanje mutiranih promotorskih konsrukata *SOX3* gena

Za generisanje promotorskih konsrukata *SOX3* gena koji nose mutacije u konsenzusnim sekvencama za vezivanje PBX i MEIS proteina (PBXMUT i MMEISMUT) i TGIF proteina (TGIFMUT) korišćen je QuickChange Multi Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene). Ovom metodom PCR reakcijama su uvedene mutacije u *SOX3 wt* promotorski konstrukt (F19R30) korišćenjem prajmera PBXmutF, MEISmutF i TGIFmutF koji nose mutacije odgovarajućih vezivnih mesta (podvučeni nukleotidi su mutirani):

PBXmutF- 5' GAACCTGTCATACACGGGTCCTCCGGGTTGC 3'

MEISmutF-5' GAACCTCAGAATCACGGGTCCTCCGGGTTGC 3'

TGIFmutF-5' CGCCGGTCTGCCTTGCTAGGTTGCAAAGTTG 3'

Navedeni prajmeri su fosforilisani u reakciji u kojoj je 1 nmol prajmera dodat u reakciju sa 2, 5 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). 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 prajmera, 1 μ l 25mM dNTP mix-a, 0,5 μ l (1,25 U) *PfuI* Polymerase (Fermentas) i 0,5 μ l VentPolymerase (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 restrikcioni enzim *DpnI* koji specifično prepoznaje metilovani adenzin motiva GATC tj. isključivo adenzin iz plazmidne matrice, a ne PCR produkta. Inkubacija enzimske reakcije je trajala 2 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 ni jedna dodatna mutacija.

3.9 Izolacija ukupnih ćelijskih proteina i Western blot analiza

Ekspresija PBX1, MEIS1, TGIF i SOX3 proteina tokom 48h indukcije NT2/D1 ćelija retinoičnom kiselinom praćena je Western blot analizom ukupnih ćelijskih proteina (WCL-whole cell lysates) izolovanih iz neindukovanih i RA indukovanih NT2 ćelija.

Radi praćenja ekspresije SOX3 proteina tokom povećane ekspresije PBX1 i MEIS1 proteina WCL su izolovani iz 1×10^7 NT2/D1 ćelija transfekovanih sa po 5 μ g ekspresionih plazmida pCIPbx1b i PCIMeis1a u prisustvu ili odsustvu retinoične kiseline.

Ukupni ćelijski proteini NT2/D1 ćelija su izolovani inkubacijom ćelija 20 minuta na ledu u TNE puferu (0.05 M Tris pH 8.0, 0.15 M NaCl, 1% NP-40, i 2 mM EDTA pH 8.0) i centrifugiranjem 10 minuta na 9,000g. U dobijenom supernatantu se nalaze ukupni ćelijski proteini (Qin *et al.*, 2004). Uzorci WCL (50 μ g) su razdvajani na 10% SDS-PAGE i elektrotransferom prebaćeni na nitroceluloznu membranu. Posle blokade u 5% nemasnom mleku, membrane su inkubirane sa primarnim antitelima (razblaženje 1:1000), SOX3 (H-135), Pbx1 (C-20), Meis1 (N-17), Meis1/2 (H-80), TGIF(K-15) i actin (H-196) (Santa Cruz, CA). Membrane su zatim inkubirane sa odgovarajućim sekundarnim antitelima, HRP-konjugovana anti-rabbit IgG (razblaženje 1:10000), anti-mouse IgG (Amersham Pharmacia Biotech) (razblaženje 1:20000) i anti-goat IgG (Sigma) (razblaženje 1:20000), a imunoblotovi su vizuelizovani ECL sistemom (Amersham Pharmacia Biotech).

3.10 Koimunoprecipitacija

Reakcije koimunoprecipitacija su raćene na ukupnim ćelijskim lizatima (WCL) neindukovanih i RA indukovanih NT2/D1 ćelija (Qin *et al.*, 2004). 300 μ g WCL i 2 μ g Meis1 (N-17) antitela (Santa Cruz, Inc) je inkubirano preko noći na 4°C, uz konstantno mešanje. Zatim je u uzorak dodato 20 μ l protein-AG agarose pa je inkubacija nastavljena još 2 h na

4°C, uz mešanje. Posle intenzivnog pranja (5 x 1ml TNE pufera), antitelo i proteini su odvojeni od agaroze kuvanjem uzorka u 2-mercaptoethanol puferu (120 mM Tris, 20% glycerol, 2% 2-mercaptoethanol, 0.01% bromophenol blue, pH 6.8). Uzorci su zatim centrifugirani 2 minuta na 18,000g. 25 µl supernatanta je pušteno na SDS-PAGE, a PBX1 protein je detektovan Western blot-om, korišćenjem antitela na Pbx1 (C-20) (Santa Cruz, Inc).

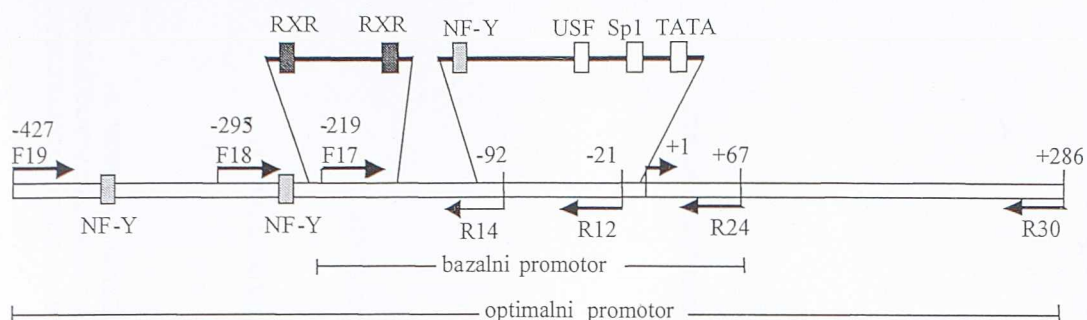
4. REZULTATI

4.1 Analiza regiona promotora humanog *SOX3* gena koji su zaštićeni od dejstva enzima DNKaza I

U cilju identifikacije regulatornih elemenata u okviru promotora humanog *SOX3* gena, urađena je "DNase I footprinting" analiza. Ova analiza ukazuje na regione DNK koji su prisustvom proteina zaštićeni od delovanja enzima DNKaza I. Logično je pretpostaviti da proteini koji se vezuju za sekvence DNK u zaštićenim regionima promotora ispitivanog gena učestvuju u regulaciji njegove ekspresije.

"DNase I footprinting" analiza promotora humanog *SOX3* gena urađena je za kodirajući i nekodirajući lanac DNK. Analiza oba lanca olakšava tumačenje rezultata ovog eseja, jer prisustvo zaštićenog regiona na istim pozicijama na oba lanca definitivno ukazuje da je u pitanju mesto interakcije proteina sa promotorskim regionom. Radi lakšeg praćenja dobijenih rezultata na Slici 2 shematski je prikazan promotor *SOX3* gena sa označenim pozicijama regiona neophodnih za bazalnu i optimalnu aktivnost promotora, kao i pozicije regulatornih elemenata za koje je dokazano da utiču na regulaciju aktivnosti *SOX3* gena. Takođe, predstavljeni su i delovi promotora ispitivani "DNase I footprinting" analizom.

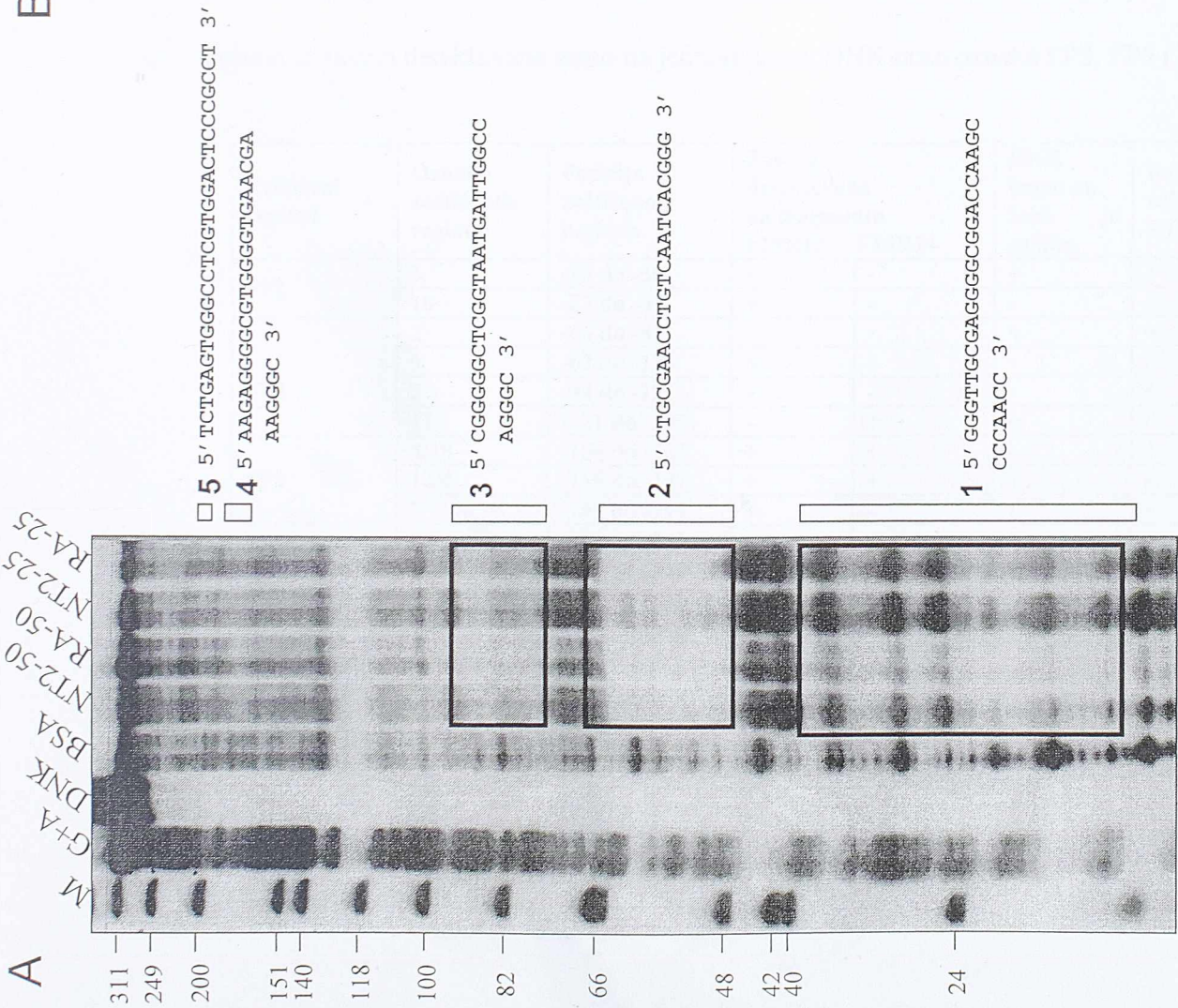
Oba lanca promotorskog regiona analizirana su korišćenjem preklapajućih fragmenata F18R12 i F19R14 (Mojsin et al., 2006; Krstic et al., 2007) (Slika 2), i jedarnih proteina izolovanih iz neindukovanih i RA indukovanih NT2/D1 ćelija. Generisanje preklapajućih fragmenata F18R12 i F19R14 detaljno je opisano u poglavlju Materijal i metode, u sekciji "DNase I footprinting" analiza. Korišćenje preklapajućih fragmenata omogućilo je preciznije određivanje pozicije zaštićenih sekvenci u regionima preklapanja kao i na krajevima analiziranih fragmenata.



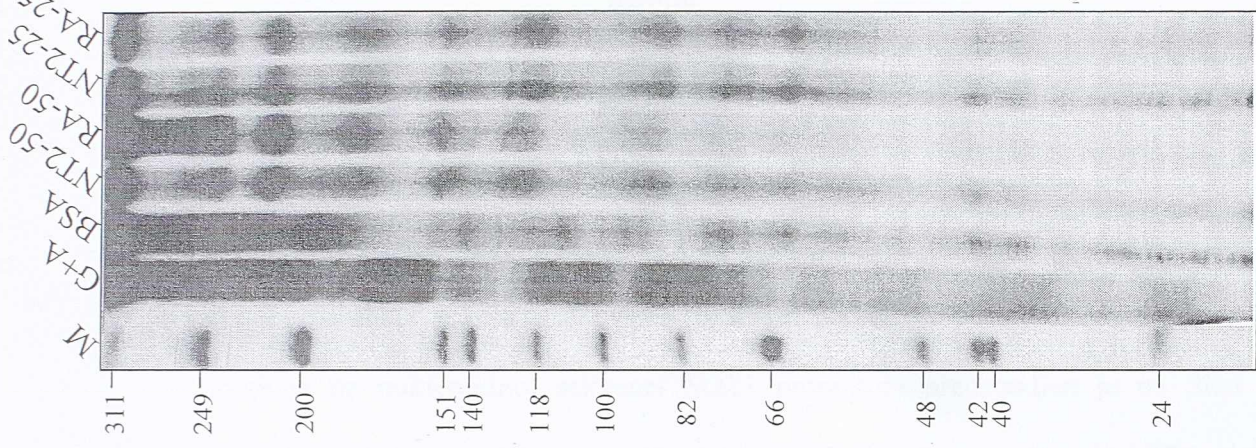
Slika 2: Shematski prikaz 5' regulatornog regiona *SOX3* gena dužine 713 bp i pozicije optimalnog i bazalnog promotora. Označena je pozicija starta transkripcije (+1), kao i pozicije prajmera koji su korišćeni za generisanje promotor-reportskih konstrukata (F19, F17, R30, R24) i fragmenata korišćenih u "DNase I footprinting" analizi (F19, F18, R14, R12). Shematski su prikazani i elementi preko kojih je regulisana aktivnost *SOX3* gena koji uključuju TATA boks, USF, Sp1, NF-Y i RXR.

Rezultati "DNase I footprinting" analize oba lanca fragmenta F18R12, koji obuhvata deo bazalnog promotora *SOX3* gena, predstavljeni su na Slici 3. Pet zaštićenih regiona detektovano je i na kodirajućem i na nekodirajućem lancu DNK. Pozicije ovih regiona određene su na osnovu DNK markera i G+A sekvence analiziranog fragmenta. Na oba lanca, u reakcijama sa 50 μ g jedarnih proteina (kolone 5 i 6 na panelu A; kolone 4 i 5 na panelu B) detektuje se veća zaštita nego u reakcijama sa 25 μ g proteina (kolone 7 i 8 na panelu A; kolone 6 i 7 na panelu B). Takođe, na kodirajućem lancu (Panel A), tri zaštićena regiona (1, 2 i 3) pokazuju veću zaštitu u reakcijama sa jedarnim proteinima iz indukovanih ćelija. Ovo ukazuje na potencijalnu razliku u proteinskim kompleksima poreklom iz indukovanih i neindukovanih ćelija formiranim na ovim regionima. U zaštićenim regionima na nekodirajućem lancu fragmenta F18R12 nije primećena razlika u zaštiti u reakcijama sa jedarnim proteinima iz indukovanih i neindukovanih ćelija. Odsustvo razlike u regionima 8, 9 i 10 koji odgovaraju regionima 1, 2 i 3 na kodirajućem lancu može se objasniti prisustvom veoma jakih hipersenzitivnih mesta na tim delovima sekvence nekodirajućeg lanca.

A



B



1 2 3 4 5 6 7 8

Slika 3: "DNase I footprinting" analiza kodirajućeg (A) i nekodirajućeg (B) lanca fragmenta F18R12. Pozicije zaštićenih regiona su označene pravougaonicima uz koje su prikazane odgovarajuće nukleotidne sekvence. Delovi gela uokvireni pravougaonicima označavaju regione sa pojačanom zaštitom u reakcijama sa indukovanim ćelijama. M-DNK marker; G+A-sekvencna analiziranog fragmenta; DNK-nedigerirani fragment; BSA-kontrolne reakcije sa BSA; NT2-reakcije sa jedarnim proteinima neindukovanih ćelija (50 i 25 µg); RA-reakcije sa jedarnim proteinima indukovanih ćelija (50 i 25 µg)

Rezultati analize fragmenta F19R14, koji se preklapa sa fragmentom F18R12 i koji sadrži distalni deo optimalnog promotora *SOX3* gena, prikazani su na Slici 4. Detektovana su četiri zaštićena regiona na kodirajućem i četiri na nekodirajućem lancu DNK. Pozicije ovih regiona određene su na osnovu G+A sekvence fragmenta. Kao i u slučaju fragmenta F18R12, na oba lanca, u reakcijama sa 50 µg jedarnih proteina (kolone 4 i 5 na panelima A i B) detektuje se veća zaštita nego u reakcijama sa 25 µg jedarnih proteina (kolone 6 i 7 na panelima A i B).

U regionu preklapanja fragmenata F18R12 i F19R14 zaštite istih regiona su detektovane na oba fragmenta. To su regioni 4, 5, 6 i 8 na F18R12, i odgovarajući regioni 12, 13, 17 i 18 na fragmentu F19R14.

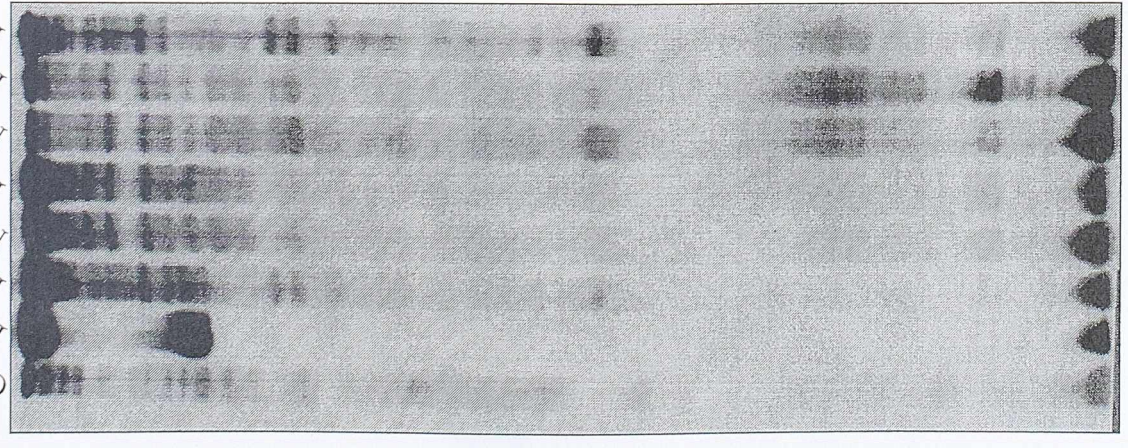
Dobijeni rezultati sumirani su u Tabeli 3, a shematski prikaz pozicija zaštićenih regiona na nukleotidnoj sekvenci *SOX3* promotora predstavljen je na Slici 5. Regioni promotora koji su zaštićeni na oba lanca DNK označeni su kao FP1-FP4, dok regioni u kojima je zaštita detektovana samo na jednom lancu DNK nose oznake FP5, FP6 i FP7.

Zaštićeni regioni	Oznake zaštićenih regiona	Pozicija zaštićenog regiona	Zaštita detektovana na fragmentu		DNK lanac na kom je zaštita	Razlika zaštiti NT2-RA u
			F18R12	F19R14		
FP1	1	-28 do -59	+	-	+	+
	10	-27 do -47	+	-	-	/
FP2	2	-66 do -87	+	-	+	+
	9	-62 do -123	+	-	-	/
	3	-94 do -121	+	-	+	+
	11	-121 do -135	-	+	+	/
FP3	8/18	-156 do -162	+	+	-	/
	12/4	-159 do -197	+	+	+	/
	7	-187 do -194	+	-	-	/
FP4	14	-279 do -342	-	+	+	/
	16	-295 do -336	-	+	-	/
FP5	5/13	-214 do -241	+	+	+	/
FP6	17/6	-242 do -260	+	+	-	/
FP7	15	-361 do -395	-	+	-	/

Tabela 3: Pozicije regiona zaštićenih u "DNase I footprinting" analizi promotora humanog *SOX3* gena. Pozicije su predstavljene u odnosu na start transkripcije. Kodirajući lanac je označen sa +, a nekodirajući sa -.

A

G+A
DNK
BSA
NT2-50
RA-50
NT2-25
RA-25
BSA



□ 14 5' TCTGCCCTCCCTCCCAATCTGCTTGGGTGCCCC
CTCCCCCTCCCCCGTCACCTCCTCAGGTTT 3'

□ 13 5' TCTGAGTGGGCTCGTG
GACTCCCGCCT 3'

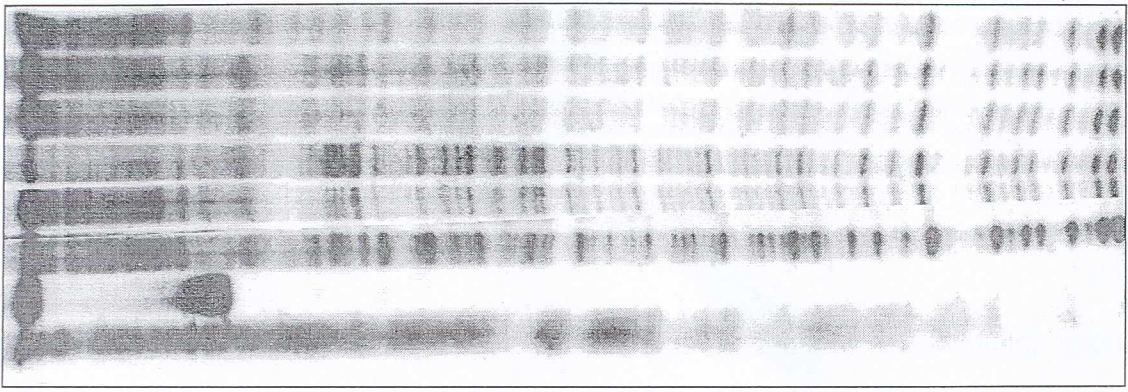
12 5' ACGTCACTAGGCCAAAGAGGGGCGT
GGGTGAACGAAA 3'

11 5' CCAGCCAGCCGAACG 3'

1 2 3 4 5 6 7 8

B

G+A
DNK
BSA
NT2-50
RA-50
NT2-25
RA-25
BSA



□ 18 5' CTTTGCCTTCC 3'

□ 17 5' CTTTGGGATTAACCACCG 3'

□ 16 5' GAGGGGTTAGACGAACGC
ACGGGGAGGGGGGAGGGGGG 3'

15 5' CCAGACGGAACTGTCCCA
ACGTTTCAACAAAAGA 3'

1 2 3 4 5 6 7 8

Slika 4: "DNase I footprinting" analiza kodirajućeg (A) i nekodirajućeg (B) lanca fragmenta F19R14. Pozicije zaštićenih regiona su označeni pravougaonima uz koje su prikazane odgovarajuće nukleotidne sekvence. G+A-sekvencija analiziranog fragmenta; DNK-nedigerirani fragment; BSA-kontrolne reakcije sa BSA; NT2-reakcije sa jedarnim proteinima neindukovanih ćelija (50 i 25 µg); RA-reakcije sa jedarnim proteinima indukovanih ćelija (50 i 25 µg)



Slika 5: Shematski prikaz pozicija zaštićenih regiona na nukleotidnoj sekvenci *SOX3* promotora. Velikim slovima je predstavljena nukleotidna sekvenca regiona ispitivanog “DNase I footprinting“ analizom, a strelicama pozicije prajmera F19, F18, R14 i R12. Svetlijim slovima su označene zaštićene sekvence, a pravougaonici uokviruju regione zaštićene na oba lanca DNK. Malim slovima je predstavljena nizvodna sekvenca *SOX3* promotora na kojoj su podvučeni nukleotidi koji predstavljaju start transkripcije i TATA boks. Pozicije zaštićenih sekvenci su predstavljene u odnosu na start transkripcije.

Analiza rezultata ukazuje da na promotoru *SOX3* gena postoje 4 regiona zaštićena na oba lanca DNK: FP1 na poziciji -27 do -59, FP2 od -62 do -135, FP3 u regionu -156/-197 i FP4 od -279 do -342. Zaštićeni regioni su na identičnim pozicijama u reakcijama sa jedarnim proteinima iz neindukovanih i RA indukovanih NT2/D1 ćelija. Međutim, na kodirajućem lancu, u regionima FP1 i FP2 zaštita je izraženija u reakcijama sa jedarnim proteinima iz NT2 ćelija indukovanih retinoičnom kiselinom (Slika 3).

Pored regiona FP1-FP4, "DNase I footprinting" analiza je pokazala prisustvo još 3 regiona zaštićena samo na jednom lancu, FP5 na kodirajućem lancu na poziciji -214 do -241 i FP6 (-242/-260) i FP7 (-361/-395) na nekodirajućem lancu.

4.2 *In silico* analiza sekvenci u okviru zaštićenih regiona *SOX3* gena

U cilju identifikacije proteina koji se vezuju za sekvence DNK u promotoru *SOX3* gena zaštićeni regioni su analizirani na prisustvo potencijalnih mesta za vezivanje transkripcionih faktora. Ova analiza je urađena programom MatInspector (Quandt *et al.*, 1995), uz kriterijum da verovatnoća vezivanja transkripcionog faktora za ispitivanu sekvencu bude 1.0. Dobijeni rezultati su prikazani u Tabeli 4.

Zaštićeni region	Pozicija zaštićenog regiona	Transkripcioni faktori čija se vezivna mesta nalaze u zaštićenim regionima
FP1	-27/-59	Sp1-Specificity protein1 MAZ-MYC-associated zinc finger protein AHR-aryl hydrocarbon receptor ZF2-zinc finger 2
FP2	-62/-135	TGIF-TGFβ-induced factor homeobox 1 USF-upstream stimulatory factor 1 PBX/MEIS heterodimer PBX-pre B-cell leukemia transcription factor 1; MEIS-myeloid ecotropic viral integration site 1 CCAAT boks HNF1-hepatocyte nuclear factor 1 COMP1-cooperates with myogenic proteins 1 PAX6-paired box gene 6
FP3	-156/-197	Egr-early growth response HNF4-hepatocyte nuclear factor 4 VDR/RXR heterodimer, VDR-vitamin D receptor; RXR-retinoid X receptor PPAR/RXR heterodimer, RXR-retinoid X receptor; PPAR-peroxisome proliferator activated receptor CREB-cAMP responsive element binding protein ATF 6-activating transcription factor 6
FP4	-279/-342	ZBP89-zinc binding protein 89 CCAAT boks MZF1-myeloid zinc finger Sp1-Specificity protein1 MAZ-MYC-associated zinc finger protein

Zaštićeni region	Pozicija zaštićenog regiona	Transkripcioni faktori čija se vezivna mesta nalaze u zaštićenim regionima
FP5	-214/-241	/
FP6	-242/-260	CCAAT boks EKLF-Erythroid krueppel-like transcription factor
FP7	-361/-395	TGIF-TGFβ-induced factor homeobox 1

Tabela 4: Prikaz transkripcionih faktora čija se potencijalna vezivna mesta nalaze u zaštićenim regionima promotora *SOX3* gena.

Rezultati dobijeni ovom analizom pokazuju da se u zaštićenim regionima *SOX3* promotora nalaze potencijalna mesta za vezivanje velikog broja transkripcionih faktora. Pored opštih transkripcionih faktora (Sp1, USF, NF-Y) prisutni su i faktori čija je ekspresija tkivno specifična (CREB, PBX, MEIS). Očekivano, analiza je pokazala i prisustvo vezivnog mesta za nuklearni receptor RXR, koji je jedan od medijatora aktivnosti retinoične kiseline.

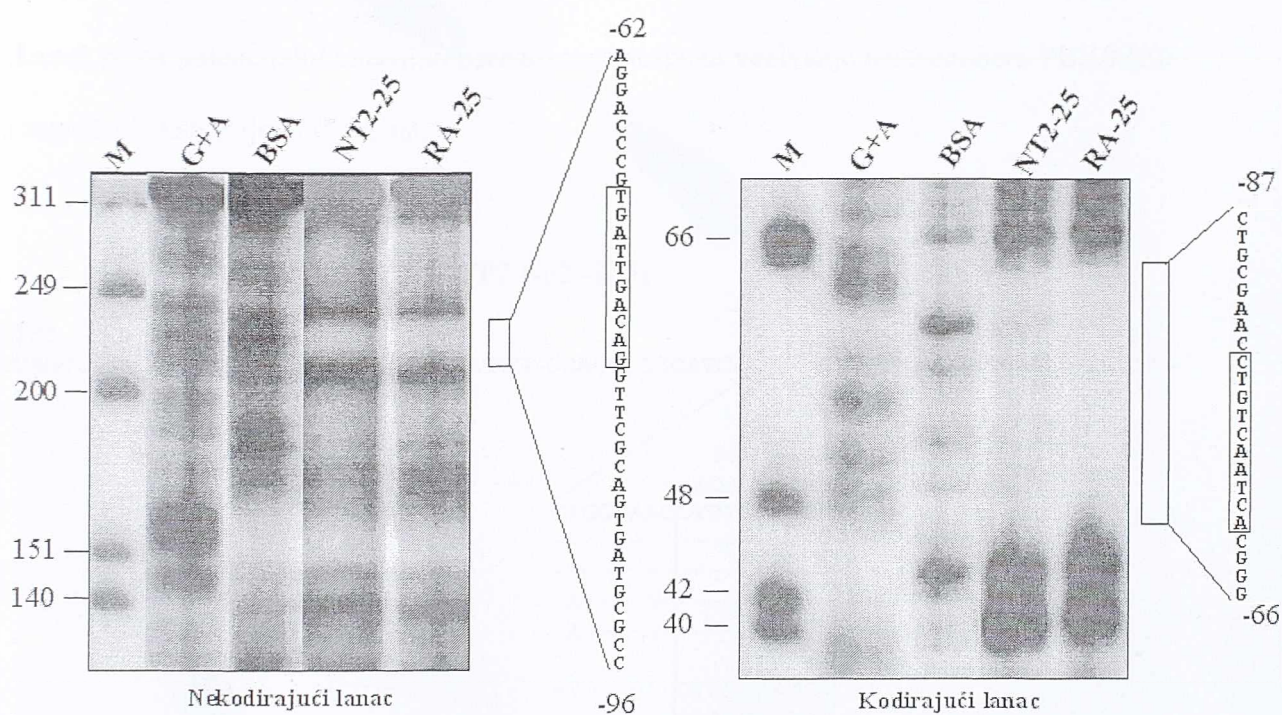
MatInspector analiza urađena je i za regione zaštićene samo na jednom lancu DNK. Rezultati su pokazali da se u regionima na nekodirajućem lancu nalaze potencijalna mesta za vezivanje transkripcionih faktora, i to CCAAT boks i EKLF u regionu FP6 (242/-260), a TGIF u zaštićenom regionu FP7 na poziciji -361/-395.

4.3 Analiza potencijalnog vezivnog mesta za heterodimer PBX/MEIS u okviru FP2 regiona humanog *SOX3* promotora

Region FP2 (Slika 6) bio je interesantan za dalju analizu iz više razloga. Prvo, ovaj region se nalazi u bazalnom promotoru *SOX3* gena (-62/-135). Drugo, "DNase I footprinting" analiza pokazala je da je u ovom regionu zaštita prisutna na oba lanca DNK. Takođe, na kodirajućem lancu DNK u okviru FP2, regioni 2 i 3 (Slika 3) pokazuju izraženiju zaštitu u reakciji sa jedarnim proteinima iz RA indukovanih NT2/D1 ćelija u poređenju sa netretiranim

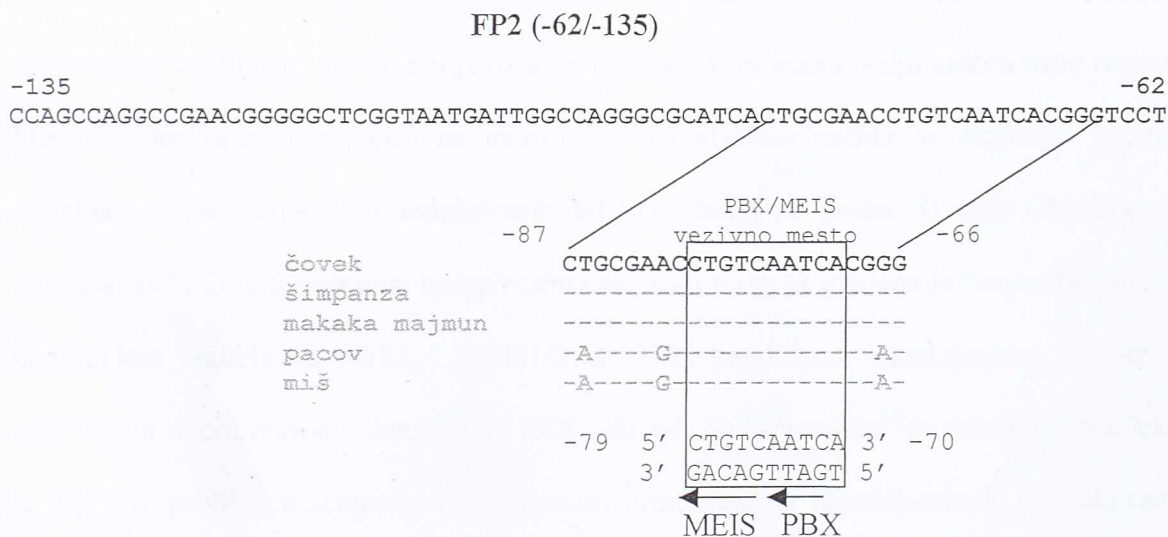
ćelijama. Ovo može ukazivati da retinoična kiselina povećava afinitet jedarnih proteina za vezivanje za FP2 ili da je ovaj region regulatorni element za koji se vezuju transkripcioni faktori koji su prisutni samo u jedarnim proteinima indukovanih NT2/D1 ćelija.

Pored toga, analiza sekvence FP2 regiona na prisustvo potencijalnih mesta za vezivanje transkripcionih faktora pokazala je da ovaj region sadrži brojna vezivna mesta, kako za opšte transkripcione faktore (NF-Y, USF), tako i za faktore koji pokazuju tkivnu i vremenski specifičnu ekspresiju (TGIF, PBX, MEIS, HNF1, PAX6) (Tabela 4).



Slika 6: Uvećani region zaštite 2 sa Slike 3 i odgovarajući zaštićeni deo regiona 9 na nekodirajućem lancu. Pozicije zaštićenih regiona su označene pravougaonicima uz koje su prikazane odgovarajuće nukleotidne sekvence. M-DNK marker; G+A-sekvencija analiziranog fragmenta; BSA-kontrolne reakcije sa BSA; NT2-reakcije sa jedarnim proteinima neindukovanih ćelija (25 µg); RA-reakcije sa jedarnim proteinima indukovanih ćelija (25 µg)

MatInspector analiza pokazala je da se u okviru FP2 regiona na nekodirajućem lancu (pozicija -70 do -79), nalazi konsenzusna sekvenca za vezivanje PBX/MEIS heterodimera-5' TGATTGACAG 3' (Chang *et al.*, 1997) (Slika 6). Konsenzus čine polumesto za vezivanje PBX proteina na 5' kraju (TGAT) i MEIS mesto (TGACAG) pozicionirano na 3' kraju (Chang *et al.*, 1997). Potencijalni značaj ovog mesta potvrđen je i rezultatima poređenja sekvence zaštićenog regiona sa odgovarajućim sekvencama ortologa *Sox3* gena kod sisara (Slika 7). Poređenje sekvenci čoveka, šimpanze, makaka majmuna, pacova i miša pokazalo je da je mesto za vezivanje PBX/MEIS heterodimera evolutivno očuvano, i po nukleotidnom sastavu i po poziciji u promotorskim regionima, kod svih analiziranih ortologa. Ovi rezultati ukazali su na potencijalni značaj konsenzusnog mesta za vezivanje heterodimera PBX/MEIS u regulaciji ekspresije *SOX3* gena.

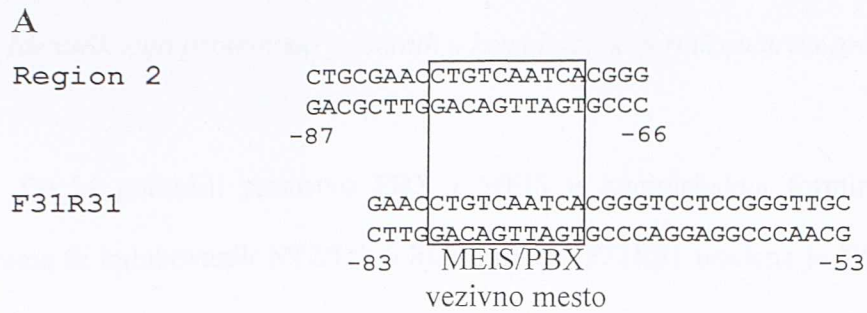


Slika 7: Sekvenca kodirajućeg lanca DNK u FP2 regionu (-62/-135) i poređenje konsenzusnog mesta za vezivanje PBX/MEIS heterodimera sa ortolognim sekvencama sisara. Pozicije sekvenci su predstavljene u odnosu na start transkripcije.

4.3.1 Interakcije PBX/MEIS konsenzusnog mesta sa proteinima

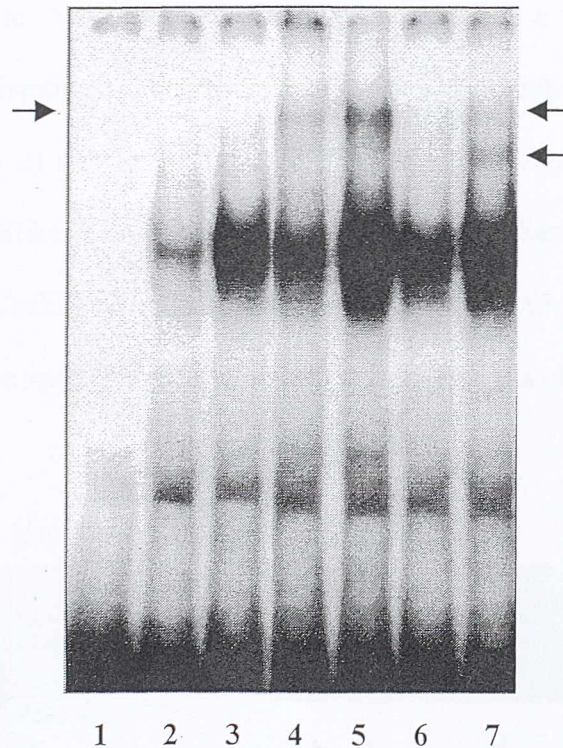
Dalja analiza PBX/MEIS konsenzusnog mesta u okviru *SOX3* promotora išla je u pravcu identifikacije transkripcionih faktora koji se za njega vezuju, tj. dokazivanja prisustva PBX i MEIS proteina u kompleksima formiranim na ovom mestu. Interakcije ovog mesta i proteina ispitivane su u esejima smanjene elektroforetske pokretljivosti, EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay). Za analizu je korišćena dvolančana oligonukleotidna proba, označena kao F31R31, koja zahvata 31 bp FP2 regiona, uključujući i PBX/MEIS vezivno mesto (Slika 8A), i jedarni proteini iz neindukovanih i RA indukovanih NT2/D1 ćelija. EMSA reakcije pokazuju da se za probu F31R31 vezuju jedarni proteini kako neindukovanih, tako i RA indukovanih NT2/D1 ćelija (Slika 8B, kolone 2 i 3). Formirani kompleksi manje elektroforetske pokretljivosti su izraženiji u reakcijama sa jedarnim proteinima indukovanih ćelija, što je u korelaciji sa rezultatima dobijenim "DNase I footprinting" analizom, gde su ovi jedarni proteini pokazali intenzivniju zaštitu ovog regiona. Međutim, formirani kompleksi ne ukazuju na kvalitativne razlike u vezivanju jedarnih proteina iz neindukovanih i indukovanih NT2/D1 ćelija za probu. U cilju identifikacije proteina prisutnih u formiranim kompleksima na probi F31R31 urađena je "superšift" analiza korišćenjem antitela na PBX1 i MEIS1/2 proteine, kandidatne transkripcione faktore za vezivanje u ovom regionu. Antitelo na PBX1 dovodi do "superšifta" proteinskih kompleksa na F31R31 probi u reakcijama i sa jedarnim proteinima iz neindukovanih i indukovanih NT2/D1 ćelija (Slika 8B, kolone 4 i 5). Međutim, u reakcijama sa MEIS1/2 antitelima "superšift" je dobijen samo sa kompleksima proteina iz RA indukovanih NT2/D1 ćelija (Slika 8B, kolone 6 i 7).

Povećanje intenziteta formiranih kompleksa u reakcijama "superšifta" može se objasniti većom stabilnošću kompleksa usled prisustva antitela u reakcijama i već je primećen kako u našim tako i u radovima drugih autora (Kovacevic Grujicic et al., 2005).



B

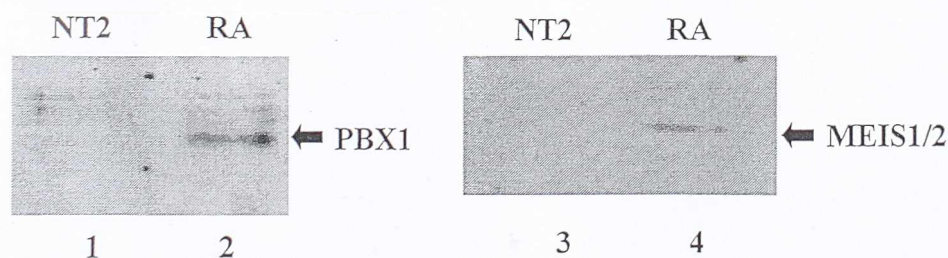
F31R31	+	+	+	+	+	+	+
NT2 JP	-	+	-	+	-	+	-
RA JP	-	-	+	-	+	-	+
Pbx1 Ab	-	-	-	+	+	-	-
Meis1/2 Ab	-	-	-	-	-	+	+



Slika 8: EMSA reakcije (A) Region 2 u okviru FP2 koji pokazuje veću zaštitu u reakcijama sa jedarnim proteinima indukovanih ćelija i proba F31R31 (koja sadrži PBX/MEIS vezivno mesto) korišćena u EMSA reakcijama. (B) EMSA reakcije sa jedarnim proteinima (JP) neindukovanih (NT2) i indukovanih (RA) ćelija i probom F31R31. "Supershift" reakcije su rađene korišćenjem antitela na PBX1 i MEIS1/2. Kompleksi dobijeni u reakcijama "supershiffta" su označeni strelicama.

4.3.2 Identifikacija proteinima prisutnih u kompleksima formiranim na probi F31R31

Da bi potvrdili prisustvo PBX i MEIS u kompleksima formiranim sa jedarnim proteinima iz indukovanih NT2/D1 ćelija i probom F31R31 urađena je Western blot analiza proteina prisutnih u kompleksima. Rezultati ove analize prikazani su na Slici 9. Nakon EMSA reakcija i detekcije kompleksa, delovi gela koji odgovaraju poziciji kompleksa su isečeni i analizirani metodama SDS-PAGE i Western blot. Ovom metodom proteini prisutni u formiranim kompleksima su isečeni kao delovi nativnog gela, a zatim analizirani razdvajanjem u denaturišućim uslovima i detekcijom u prisustvu specifičnih antitela. Analiza je potvrdila rezultate dobijene u reakcijama “superšifra”, u kojima je prisustvo PBX1 detektovano u oba ispitivana kompleksa, poreklom iz neindukovanih i indukovanih ćelija, (Slika 9, kolone 1 i 2) dok je prisustvo MEIS proteina detektovano samo u kompleksu iz indukovanih ćelija (Slika 9, kolone 3 i 4). Opisani rezultati ukazuju da je u NT2/D1 ćelijama na ispitivanom PBX/MEIS vezivnom mestu u promotoru *SOX3* gena prisutan samo PBX1, a da su nakon indukcije retinoičnom kiselinom na mestu prisutna oba transkripciona faktora.

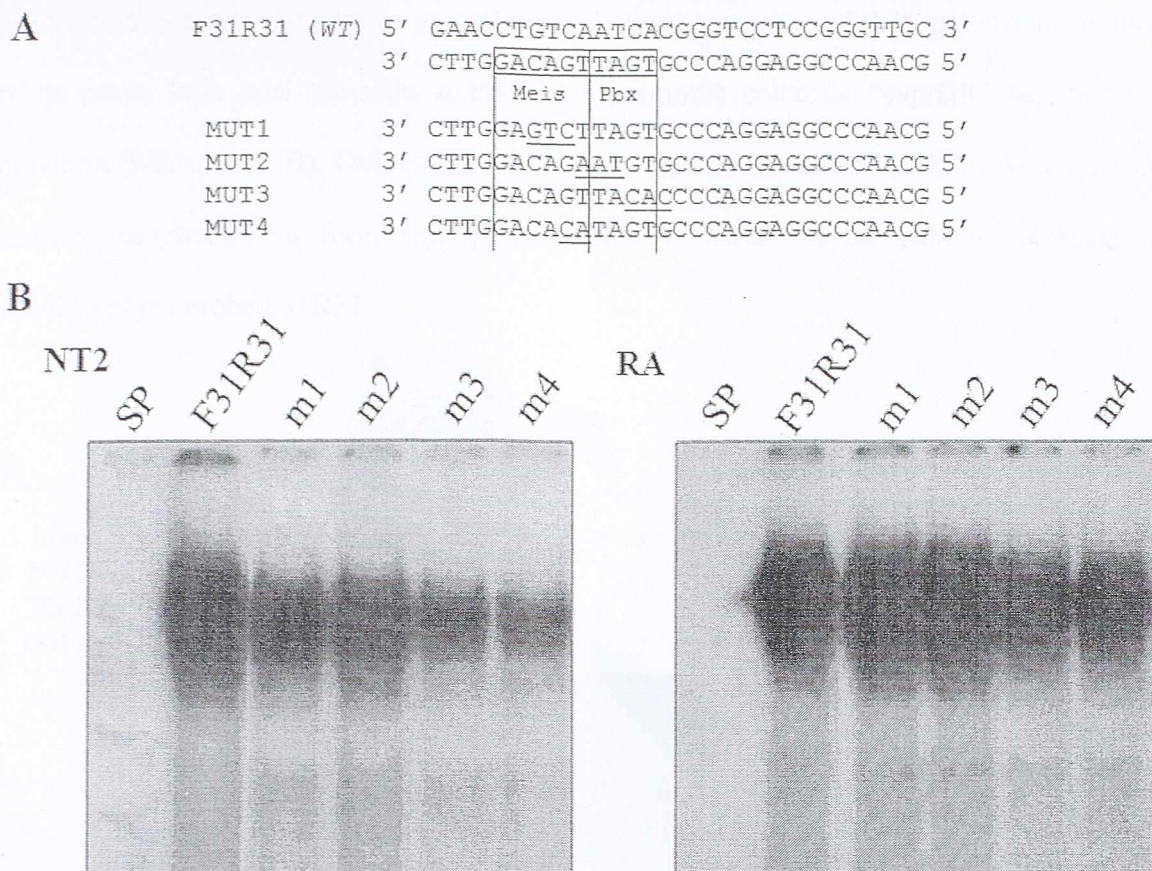


Slika 9: Western blot analiza proteina iz delova gela koji sadrže komplekse formirane na probi F31R31 sa jedarnim proteinima neindukovanih (NT2) i indukovanih (RA) ćelija. Korišćena su antitela na PBX1 i MEIS1/2.

4.3.3 Specifičnost vezivanja PBX i MEIS proteina za konsenzusno mesto

Specifičnost vezivanja PBX i MEIS proteina za probu F31R31 ispitivana je uvođenjem mutacija u konsenzusno mesto. Korišćene su 4 mutirane dvolančane oligonukleotidne probe (mut1-mut4), a pozicije mutiranih nukleotida odabrane su tako da naruše strukturu PBX vezivnog mesta (mut3), MEIS mesta (mut1 i mut4) ili oba mesta (mut2). Sekvence *wt* i mutiranih oligonukleotida prikazane su na Slici 10A.

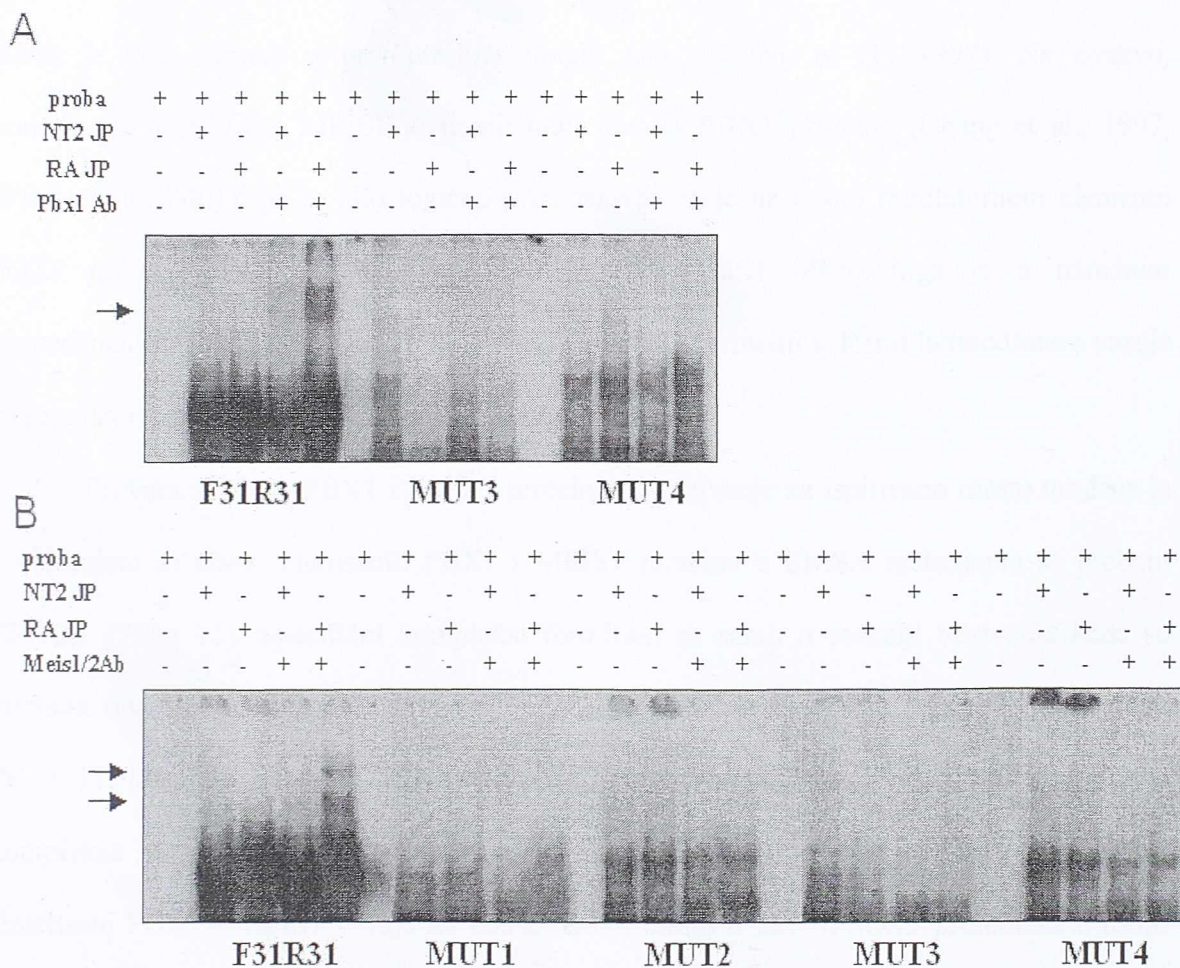
U prvom setu ekspreimenata, jedarni proteini iz neindukovanih i RA indukovanih NT2/D1 ćelija vezivani su za obeleženu F31R31 probu, a mutirani oligonukleotidi su korišćeni kao neobeleženi kompetitori (Slika 10B). Dobijeni rezultati su ukazali da su uvedene mutacije narušile integritet PBX/MEIS vezivnog mesta, tako da mutirane probe nisu mogle da vežu jedarne proteine. Usled nemogućnosti interakcija sa jedarnim proteinima mutirane probe ne kompetiraju (mut1 i mut2) ili slabo kompetiraju (mut3 i mut4) vezivanje proteina za *wt* probu (F31R31) (Slika 10B). Identični rezultati dobijeni su korišćenjem jedarnih proteina neindukovanih i indukovanih NT2/D1 ćelija (Slika 10B). Ovaj rezultat potvrđuje da sekvenca TGATTGACAG sadrži elemente neophodne za vezivanje proteina prisutnih u jedarnim ekstraktima neindukovanih i indukovanih NT2/D1 ćelija.



Slika 10: Mutaciona analiza PBX/MEIS vezivnog mesta. (A) Sekvence *wt* (F31R31) i mutiranih oligonukleotidnih proba (mut1-mut4). Mutirani nukleotidi su podvučeni. Vezivno mesto za PBX/MEIS je uokvireno, a isprekidane linije pokazuju pozicije vezivnog mesta u mutiranim probama. (B) EMSA reakcije sa obeleženom probom F31R31, jedarnim proteinima i kompetitorima mut1-4. Neobeležene mutirane probe su dodavane u 100 puta većem molarnom odnosu.

U drugom setu eksperimenata interakcije obeleženih mutiranih proba (mut1-mut4) su ispitivane primenom EMSA sa jedarnim proteinima neindukovanih i RA indukovanih NT2/D1 ćelija, a zatim je dodavanjem antitela na PBX1 i MEIS1/2 proveravano prisustvo ovih proteina u formiranim kompleksima (Slika 11A i B). Kod svih mutanata u reakcijama vezivanja nije detektovano formiranje kompleksa karakterističnih za *wt* probu (F31R31), a reakcije "superšifra" pokazuju da kompleksi slabijeg intenziteta formirani na mutiranim

probama ne sadrže PBX i MEIS proteine (Slika 11A i B). Interesantno je da “superšift” sa PBX1 antitelima nije detektovan sa probom koje nose mutaciju u MEIS polumestu (mut4), niti je proba koja nosi mutaciju u PBX mestu (mut3) pokazala “supršift” sa MEIS1/2 antitelima (Slika 11A i B). Ovi rezultati ukazuju da su oba polumesta u okviru konsenzusne sekvence neophodna za formiranje proteinskih kompleksa između jedarnih proteina iz NT2/D1 ćelija i probe F31R31.



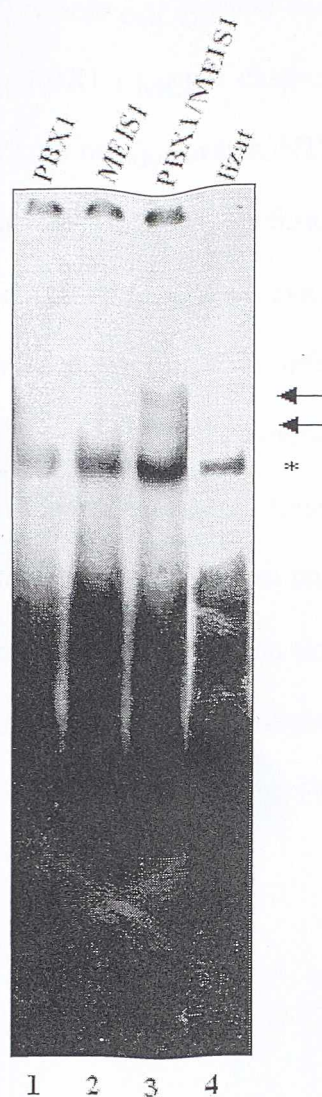
Slika 11: EMSA i “superšift” analiza sa *wt* (F31R31) i mutiranim oligonukleotidima (mut1-mut4) i jedarnim proteinima (JP) iz neindukovanih (NT2) i indukovanih (RA) NT2/D1 ćelija. U reakcijama “superšifta“ su korišćena antitela na PBX1 (Panel A) i MEIS1/2 (Panel B). Kompleksi dobijeni u reakcijama “superšifta“ su označeni strelicama.

Takođe, rezultati vezivanja sa probama koje nose mutacije u PBX/MEIS konsenzusnom mestu potvrđuju specifičnost vezivanja proteina PBX i MEIS za ovaj region.

4.3.4 PBX1 i MEIS1 proteini se vezuju za konsenzusno mesto u promotoru SOX3 gena

Dosadašnji rezultati su pokazali da se PBX1 i jedan od MEIS proteina (MEIS1 ili MEIS2) vezuju za ispitivano mesto. Već je naglašeno da vezivno mesto u SOX3 promotoru odgovara konsenzusnoj sekvenci za *in vitro* vezivanje heterodimera PBX1/MEIS1, i kao takvo je već opisano u promotorima drugih gena (Chang et al., 1997). Na ovakvoj konsenzusnoj sekvenci MEIS1 je dominantni partner PBX1 proteina (Chang et al., 1997; Wang et al., 2001), pa je bilo logično pretpostaviti da je na ovom regulatornom elementu SOX3 promotora partner PBX1 upravo protein MEIS1. Zbog toga je u narednim eksperimentima testirana hipoteza da se PBX1 i MEIS1 proteini u formi heterodimera vezuje za regulatorni element u promotoru SOX3 gena.

Provera afiniteta PBX1 i MEIS1 proteina za vezivanje za ispitivano mesto urađena je korišćenjem *in vitro* sintetisanih PBX1 i MEIS1 proteina u EMSA reakcijama sa probom F31R31 (Slika 12). Specifični kompleksi formirani su samo u reakciji vezivanja kada su prisutna oba sintetisana proteina. Ni PBX1 ni MEIS1 pojedinačno se ne vezuju za probu (Slika 12, kolone 1 i 2), dok prisustvo oba proteina u reakciji vezivanja inicira formiranje kompleksa na probi F31R31 (Slika 12, kolona 3). Ovaj rezultat ukazuje da se *in vitro* sintetisani PBX1 i MEIS1 vezuju za konsenzusno mesto u okviru SOX3 promotora u formi heterodimera.



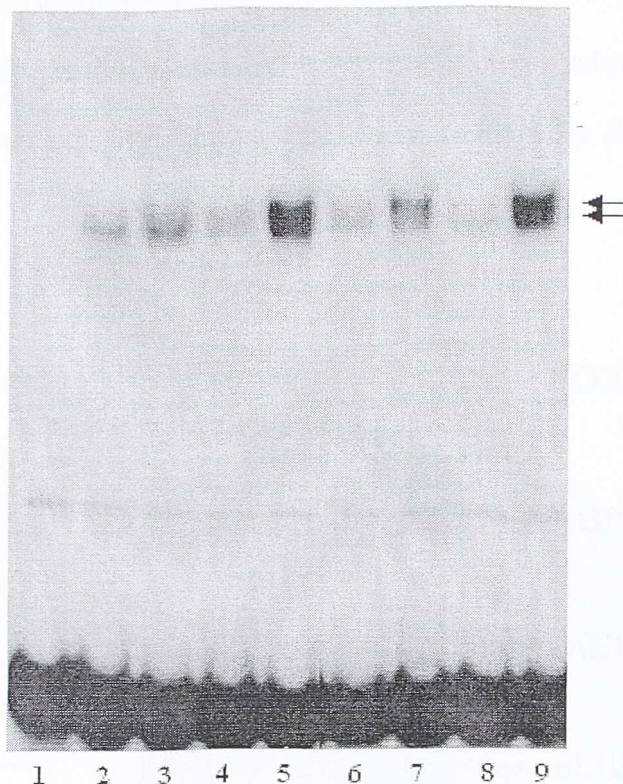
Slika 12: EMSA reakcije sa *in vitro* sintetisanim proteinima PBX1 i MEIS1. Strelice označavaju komplekse formirane na probi F31R31. Zvezdica označava nespecifičan kompleks prisutan i u reakciji vezivanja sa neprogramiranim lizatom.

4.3.5 Uticaj povećane ekspresije PBX1 i MEIS1 proteina na formiranje proteinskih kompleksa na probi F31R31

EMSA eksperimentima je takođe analiziran uticaj povećane ekspresije PBX1 i MEIS1 proteina na formiranje kompleksa u F31R31 regionu *SOX3* promotora. U reakcijama su

korišćeni ukupni ćelijski lizati (WCL-whole cell lysates) neindukovanih i RA indukovanih NT2/D1 ćelija koje su transfekovane PBX1 i MEIS1 ekspresionim vektorima. Rezultati su prikazani na Slici 13. Vezivanje WCL iz neindukovanih NT2/D1 ćelija (netransfekovanih i transfekovanih) rezultiralo je formiranjem jednog kompleksa (Slika 13, kolone 2, 4, 6 i 8), dok su WCL RA indukovanih ćelija doveli do formiranja dva proteinska kompleksa, od kojih jedan pokazuje manju elektroforetsku pokretljivost u odnosu na kompleks dobijen u reakcijama sa WCL neindukovanih ćelija (Slika 13, kolone 3, 5, 7 i 9). Novoformirani kompleks postaje intenzivniji u reakcijama sa WCL transfekovanih ćelija indukovanih retinoičnom kiselinom (Slika 13, kolone 5, 7 i 9 u odnosu na kolonu 3), pri čemu je najveći intenzitet primećen sa WCL ćelija kojima je bila povećana ekspresija oba proteina (Slika 13, kolona 9). Prikazani rezultati pokazuju da povećana ekspresija PBX1 i MEIS1 proteina omogućava formiranje kompleksa većeg intenziteta na PBX/MEIS vezivnom mestu u promotoru *SOX3* gena.

F31R31	+	+	+	+	+	+	+	+	+
NT2	-	+	-	-	-	-	-	-	-
RA	-	-	+	-	-	-	-	-	-
NT2 Pbx1	-	-	-	+	-	-	-	-	-
RA Pbx1	-	-	-	-	+	-	-	-	-
NT2 Meis1	-	-	-	-	-	+	-	-	-
RA Meis1	-	-	-	-	-	-	+	-	-
NT2 Pbx1/Meis1	-	-	-	-	-	-	-	+	-
RA Pbx1/Meis1	-	-	-	-	-	-	-	-	+

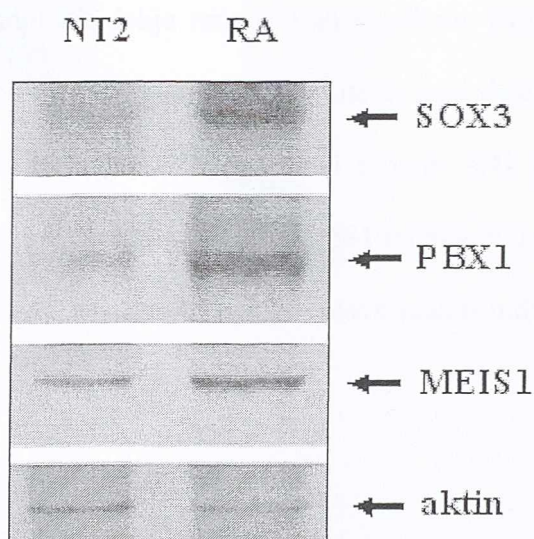


Slika 13: Efekti povećane ekspresije PBX1 i MEIS1 proteina na formiranje kompleksa na probi F31R31. U EMSA reakcijama korišćena je proba F31R31 i ukupni ćelijski lizati (WCL) neindukovanih (NT2) i indukovanih (RA) ćelija, kao i ovih ćelija u kojima je nakon transfekcije povećana ekspresija PBX1, MEIS1 ili oba proteina. Strelicama su označeni formirani kompleksi.

4.3.6 Profil ekspresije PBX1 i MEIS1 proteina tokom indukcije NT2/D1 ćelija retinoičnom kiselinom

Poznato je da su rane faze neuralne diferencijacije NT2/D1 ćelija, koje se događaju tokom prvih 48h indukcije retinoičnom kiselinom, praćene povećanjem ekspresije *SOX3*, kako na nivou iRNK (Stevanovic, 2003; Krstic et al., 2007) tako i na proteinskom nivou (Mojsin *et al.*, 2006). U cilju praćenja endogene ekspresije PBX1 i MEIS1 proteina tokom

indukcije NT2/D1 ćelija retinoičnom kiselinom, Western blotom je analizirano prisustvo ovih proteina u WCL neindukovanih i indukovanih ćelija (Slika 14). Ekspresija PBX1 i MEIS1 proteina je detektovana u WCL neindukovanih ćelija, a nakon 48h indukcije retinoičnom kiselinom dolazi do povećanja ekspresije oba proteina. Dobijeni rezultati pokazuju da profil ekspresije PBX1 i MEIS1 proteina tokom indukcije NT2/D1 ćelija retinoičnom kiselinom odgovara već opisanom profilu ekspresije *SOX3* gena u ovim uslovima. Ovaj rezultat je ukazao na potencijalnu ulogu ovih faktora kao medijatora indukcije *SOX3* gena retinoičnom kiselinom.

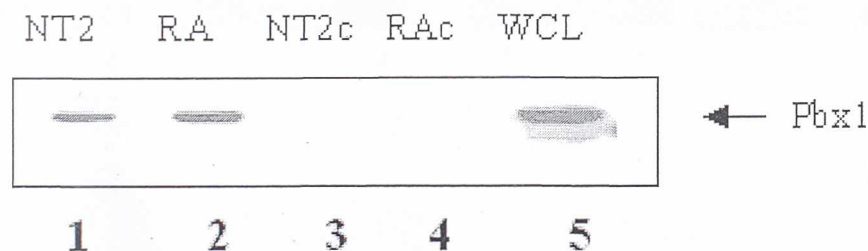


Slika 14: Western blot analiza ekspresije SOX3, PBX1 i MEIS1 proteina u neindukovanim (NT2) i ćelijama indukovanim retinoičnom kiselinom (RA) tokom 48h. Aktin je korišćen kao kontrola količine proteina unetih u reakciju. Strelice označavaju pozicije proteina SOX3, PBX1, MEIS1 i aktina.

4.3.7 Dimerizacija PBX1 i MEIS1 proteina u odsustvu DNK

Poznato je da su MEIS proteini glavni partneri PBX-a prilikom vezivanja za DNK u *in vivo* uslovima (Chang *et al.*, 1997). Međutim, *in vitro* je pokazano je da ovi proteini dimerizuju i u odsustvu DNK (Chang *et al.*, 1997). U cilju identifikacije potencijalnih

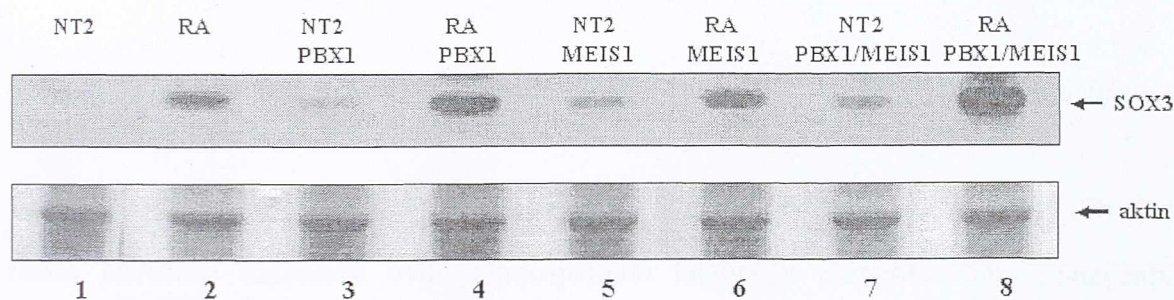
PBX/MEIS interakcija u NT2/D1 ćelijama, urađeni su eksperimenti koimunoprecipitacije. Dobijeni rezultati prikazani su na Slici 15. Antitelima na MEIS1 (konjugovanim sa protein A/G agarozom), imunoprecipitiran je endogeni MEIS1 iz WCL neindukovanih i RA indukovanih NT2/D1 ćelija, a proteini koji se nalaze u precipitiranom imunokompleksu su analizirani Western blotom, korišćenjem antitela na PBX1. U obe reakcije detektovano je prisustvo PBX1 proteina u kompleksu precipitiranom antitelima na MEIS1 (Slika 15, kolone 1 i 2), a detektovani protein komigrira sa PBX1 proteinom u pozitivnoj kontroli (WCL iz NT2/D1 ćelija, Slika 15, kolona 5). Osim toga, količina PBX1 proteina asocirana sa MEIS1 proteinom povećana je nakon indukcije ćelija retinoičnom kiselinom (Slika 15, kolona 2 u odnosu na kolonu 1). U kontrolnim reakcijama (bez antitela) nije detektovan PBX1, što potvrđuje odsustvo nespecifičnih reakcija između WCL i protein A/G agaroze (Slika 15, kolone 3 i 4). Ovim rezultatom je potvrđeno da PBX1 i MEIS1 interaguju i u odsustvu DNK u NT2/D1 ćelijama, i da se afinitet za ove interakcije povećava nakon indukcije retinoičnom kiselinom.



Slika 15: Dimerizacija PBX1 i MEIS1 proteina u NT2/D1 ćelijama. Ukupni ćelijski lizati (WCL) neindukovanih (NT2) i RA indukovanih ćelija (RA) su korišćeni u reakcijama koimunoprecipitacije. Imunoprecipitacija je urađena antitelima na MEIS1, a koimunoprecipitirani proteini su razdvojeni na SDS-PAGE, i detektovani Western blotom antitelima na PBX1. U kontrolnim reakcijama (NT2c i RAc), nisu dodavana antitela. WCL NT2/D1 ćelija korišćeni su kao pozitivna kontrola.

4.3.8 *PBX1* i *MEIS1* regulišu *in vivo* ekspresiju *SOX3* gena u NT2/D1 ćelijama

U sledećem eksperimentu ispitivan je efekat povećanja ekspresije *PBX1* i *MEIS1* na endogenu ekspresiju *SOX3* proteina. NT2/D1 ćelije su transfekovane *PBX1* i *MEIS1* ekspresionim vektorima, a efekat povećanja njihove ekspresije na aktivnost *SOX3* gena praćen je Western blot analizom. Rezultati su prikazani na Slici 16. Povećanje ekspresije, kako pojedinačnih, tako i oba proteina zajedno, dovodi do porasta nivoa *SOX3* proteina. Prikazani rezultati potvrđuju da su *PBX1* i *MEIS1* proteini uključeni u aktivaciju *SOX3* gena u NT2/D1 ćelijama. Očekivano, efekat je najizraženiji kada je u indukovanim ćelijama povećana ekspresija oba proteina (Slika 16, kolona 8), što ponovo ukazuje da *PBX1* i *MEIS1* proteini imaju ulogu medijatora u RA indukovanoj aktivaciji *SOX3*.



Slika 16: Efekat povećane ekspresije *PBX1* i *MEIS1* na ekspresiju endogenog *SOX3* proteina. U Western blot analizi su korišćeni ukupni ćelijski lizati (WCL) neindukovanih (NT2) i indukovanih (RA) ćelija, netransfekovanih (kolone 1 i 2), transfekovanih ekspresionim vektorima za *PBX1* (kolone 3 i 4), *MEIS1* (5 i 6) ili sa oba proteina (7 i 8). Aktin je korišćen kao kontrola količine proteina unetih u reakciju. Strelice označavaju pozicije *SOX3* proteina i aktina.

4.3.9 Funkcionalna analiza regulatornog elementa *SOX3* promotora koji sadrži vezivno mesto za heterodimer *PBX/MEIS*

Funkcionalni značaj *PBX/MEIS* vezivnog mesta u promotoru *SOX3* gena ispitivan je u eksperimentima tranzijentne transfekcije neindukovanih i RA indukovanih NT2/D1 ćelija. Korišćen je promotor-reporterski konstrukt F19R30pBLCAT6 koji sadrži 713 bp 5' regulatornog regiona *SOX3* gena, za koji je prethodno pokazano da sadrži optimalni promotor *SOX3* gena (Kovacevic Grujicic et al., 2005). Na ovaj način je u eksperimentima tranzijentne transfekcije praćena aktivnost reporterskog gena (*cat*) koji je pod kontrolom optimalnog promotora *SOX3* gena.

Takođe, funkcionalni značaj *PBX1/MEIS1* vezivnog mesta analiziran je u eksperimentima u kojima su primenom mesto-specifične mutageneze uvedene mutacije u analizirano konsenzusno mesto.

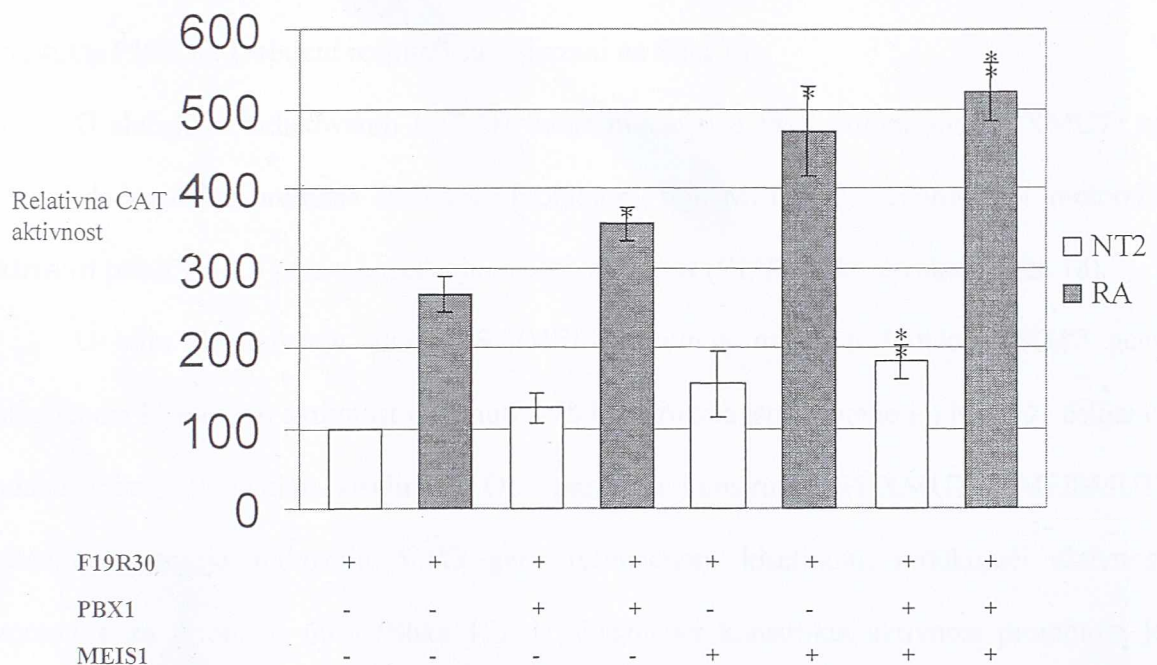
4.3.9.1 Transkripcioni faktori *PBX1* i *MEIS1* aktiviraju *SOX3* promotor u NT2/D1 ćelijama

Da bi ispitali ulogu *PBX1* i *MEIS1* proteina u aktivaciji *SOX3* promotora praćen je efekat povećane ekspresije ovih transkripcionih faktora u eksperimentima tranzijentne transfekcije NT2/D1 ćelija. U ovim eksperimentima ekspresioni vektori za *PBX1* i *MEIS1* su kotransfekovani sa *SOX3* promotor-reporterskim konstruktom F19R30. U ovom konstruktu reporterski gen se nalazi pod kontrolom optimalnog *SOX3* promotora (Kovacevic Grujicic et al., 2005). Rezultati ovih eksperimenata prikazani su na Slici 17.

U neindukovanim ćelijama, kotransfekcija sa pojedinačnim ekspresionim vektorima nije dovela do statistički značajne promene aktivnosti reporterskog gena, što ukazuje da pojedinačno ni jedan protein ne ostvaruje značajan efekat na aktivnost *SOX3* promotora. Međutim, prisustvo oba ekspresiona vektora, tj. povećana ekspresija i *PBX1* i *MEIS1* proteina, dovodi do povećanja aktivnosti reporterskog gena približno 1,8 puta (Slika 17),

ukazujući da u neindukovanim ćelijama samo prisustvo oba proteina dovodi do aktivacije *SOX3* promotora.

Rezultati dobijeni na ćelijama indukovanim 48h retinoičnom kiselinom pokazuju drugačiji trend. Aktivnost reporterskog gena povećava se u kotransfekcijama sa pojedinačnim vektorima, i to 1,3 puta u slučaju povećane ekspresije PBX1 i 1,8 puta pri povećanoj ekspresiji MEIS1 (Slika 17). U slučaju povećane ekspresije oba proteina beleži se povećanje aktivnosti od 2 puta u odnosu na aktivnost promotorskog konstrukta F19R30 (Slika 17). Ovi rezultati pokazuju da u prisustvu retinoične kiseline oba proteina pojedinačno mogu da dovedu do aktivacije *SOX3* promotora, a da se ovaj efekat povećava u prisustvu oba proteina.



Slika 17: Efekat povećane ekspresije PBX1 i MEIS1 proteina na aktivnost *SOX3* promotora. NT2/D1 ćelije su tranzijentno transfekovane F19R30 *SOX3* promotor-reporterskim konstruktom i ekspresionim konstruktima za PBX1 i MEIS1, kao što je naznačeno u tabeli. 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 ± S.E.M. (SEM-standard error mean) 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 $p < 0.01$ sa dve zvezdice (**).

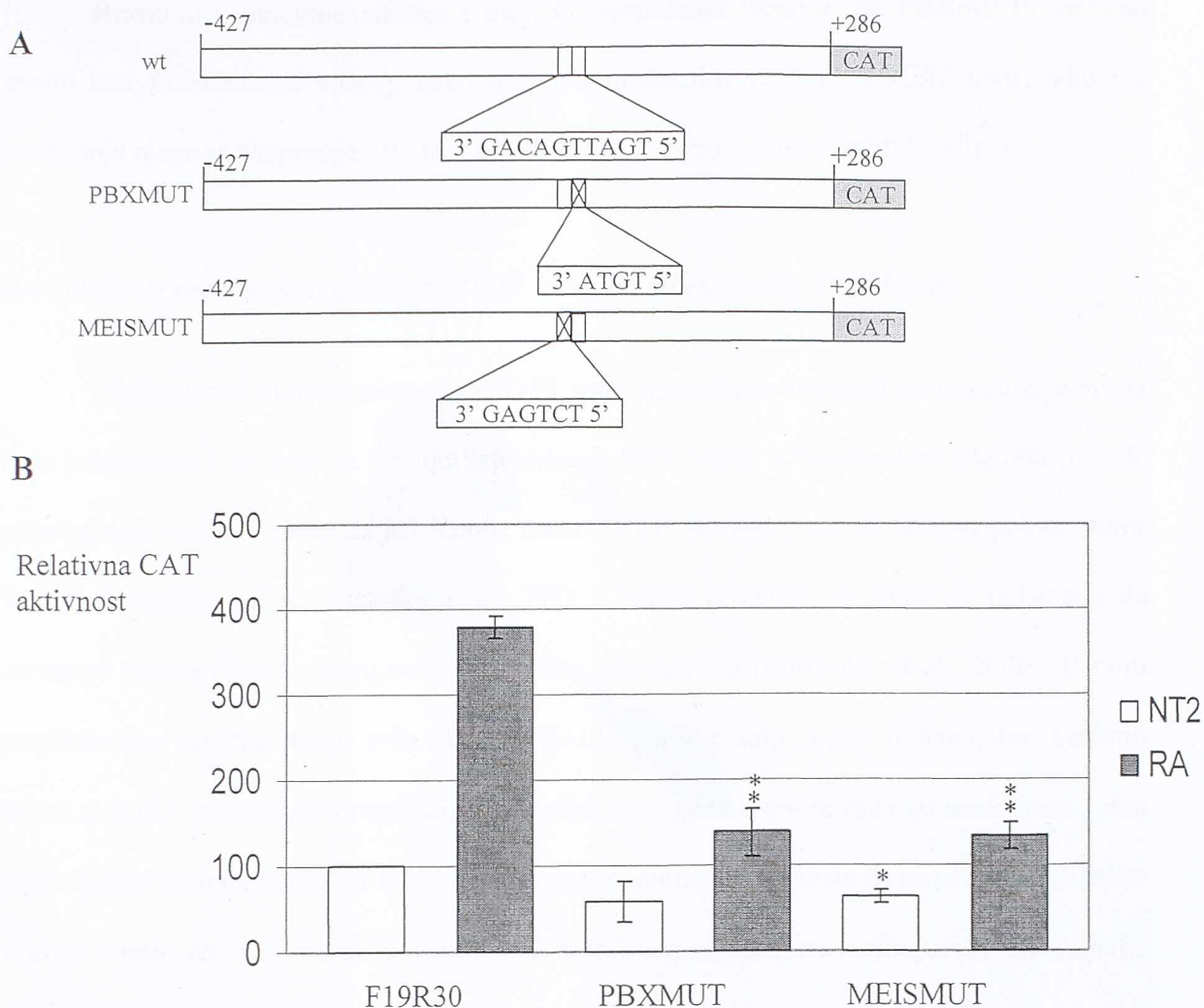
4.3.9.2 Analiza uticaja mutacija vezivnih mesta za PBX i MEIS na aktivnost *SOX3* promotora

Definitivna potvrda funkcionalnog značaja ispitivanog PBX/MEIS vezivnog mesta dobijena je analizom promotor-reporterskih konstrukata koji nose mutacije u ovom mestu. Mutacije su uvedene u promotor-reporterski konstrukt F19R30. U konstruktu PBXMUT mutacija je uvedena u polumesto koje prepoznaje PBX, gde je *wt* sekvenca TGAT zamenjena sekvencom TGTG, dok je u konstruktu MEISMUT polumesto koje prepoznaje MEIS, TGACAG, zamenjeno sekvencom TCTGAG. Mutirani konstrukti tranzijentno su transfekovani u NT2/D1 ćelije, a aktivnost reporterskog gena poređena je sa aktivnošću *wt* konstrukta F19R30. Dobijeni rezultati su prikazani na Slici 18.

U slučaju neindukovanih NT2/D1 ćelija mutacija u PBX polumestu (PBXMUT) ne dovodi do značajne promene aktivnosti promotora, dok MEISMUT smanjuje promotorsku aktivnost približno 1,6 puta u poređenju sa aktivnošću *wt* (F19R30) konstrukta (Slika 18).

U cilju dokazivanja uloge PBX/MEIS vezivnog mesta u indukciji *SOX3* gena retinoičnom kiselinom, aktivnost *wt* i mutiranih konstrukata ispitivana je i u NT2/D1 ćelijama indukovanim retinoičnom kiselinom. Oba mutirana konstrukta, PBXMUT i MEISMUT, značajno smanjuju indukciju *SOX3* gena retinoičnom kiselinom, redukujući aktivnost promotora za približno 60% (Slika 18). U slučaju *wt* konstrukta aktivnost promotora je indukovana retinoičnom kiselinom 3,8 puta, dok je stepen indukcije mutiranih konstrukata približno 1,3 puta (Slika 17).

Rezultati mutacione analize pokazuju da je vezivno mesto koje prepoznaje MEIS neophodno kako za bazalnu aktivnost *SOX3* promotora, tako i za njegovu aktivaciju retinoičnom kiselinom, dok je vezivno mesto koje prepoznaje PBX uključeno u odgovor promotora na indukciju *SOX3* gena retinoičnom kiselinom.



Slika 18: Efekti mutacija u polumestima za vezivanje PBX i MEIS na aktivnost *SOX3* promotora. NT2/D1 ćelije su transfekovane *wt* (F19R30) *SOX3* promotor-reporterskim konstruktom ili mutiranim konstruktima: PBXMUT (mutirano polumesto koje prepoznaje PBX) i MEISMUT (mutirano vezivno mesto koje prepoznaje MEIS). 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.E.M. (SEM-standard error mean) iz najmanje tri nezavisne transfekcije. Vrednosti relativnih CAT aktivnosti su poredene u Studentovom *t*-testu. Vrednosti za koje je $p < 0.01$ su predstavljene jednom zvezdicom (*), a vrednosti za koje je $p < 0.001$ sa dve zvezdice (**).

Rezultati mutacione analize i eseji kotransfekcije ukazuju da PBX/MEIS vezivno mesto ima funkcionalni značaj, kako u regulaciji bazalne aktivnosti *SOX3* gena, tako i u povećanju njegove ekspresije tokom indukcije NT2/D1 ćelija retinoičnom kiselinom.

4.4 Uloga transkripcionog faktora TGIF u regulaciji ekspresije *SOX3* gena

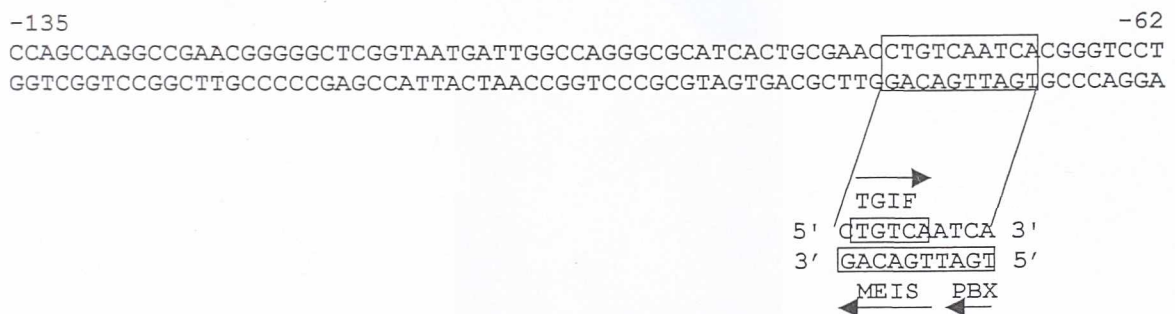
MatInspector analiza promotora *SOX3* gena pokazala je da pored konsenzusnog mesta koje prepoznaje i za koje se vezuje heterodimer PBX/MEIS u ispitivanom regionu postoje potencijalna vezivna mesta za još jednog člana TALE familije proteina-transkripcioni factor TGIF. Za razliku od aktivatorske uloge PBX i MEIS proteina, za TGIF je pokazano da ostvaruje represorsku funkciju na promotorima ciljnih gena (Bartholin et al., 2006). U cilju sveobuhvatne analize uloge svih članova TALE familije koji imaju potencijalno vezivno mesto u *SOX3* promotoru u regulaciji ekspresije ovog gena u ovom radu su analizirana i dva potencijalna vezivna mesta za TGIF. MatInspector analiza je pokazala da se prvo potencijalno vezivno mesto za TGIF nalazi u okviru FP2 zaštićenog regiona, na kodirajućem lancu DNK, na poziciji -70 do -74. Drugo mesto nalazi se u regionu FP7, na nekodirajućem lancu, na poziciji -381 do -385 (Slika 5, Tabela 4).

Potencijalna uloga transkripcionog faktora TGIF u regulaciji ekspresije *SOX3* gena analizirana je karakterizacijom oba identifikovana vezivna mesta i ispitivanjem funkcionalnog značaja ovih regulatornih elemenata *SOX3* promotora. Takođe, analiziran je profil ekspresije ovog transkripcionog faktora tokom RA indukcije NT2/D1 ćelija u cilju ispitivanja potencijalne uloge TGIF proteina u aktivaciji *SOX3* gena retinoičnom kiselinom.

4.4.1 Analiza potencijalnog, vezivnog mesta za TGIF u FP2 zaštićenom regionu promotora SOX3 gena

Jedno potencijalno vezivno mesto za transkripcioni factor TGIF nalazi se u bazalnom promotoru SOX3 gena, na kodirajućem lancu DNK, na poziciji -70 do -74 i obuhvaćeno je zaštićenom regionom FP2 (Slika 19). Literaturni podaci pokazuju da TGIF i MEIS proteini često imaju preklapajuća vezivna mesta, u suprotnim orijentacijama, na komplementarnim lancima DNK. Sekvenca zaštićenog regiona SOX3 promotora pokazuje prisustvo potencijalnog vezivnog mesta za TGIF na kodirajućem lancu DNK (5' TGTC A 3') koje se preklapa sa već opisanim vezivnim mestom za MEIS na nekodirajućem lancu (5' TGACAG 3') (Slika 19).

FP2 (-62/-135)

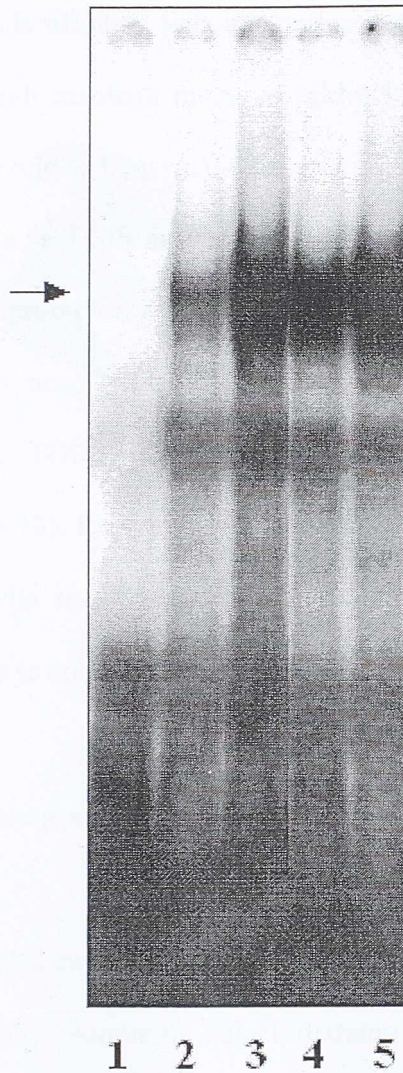


Slika 19: DNK sekvenca zaštićenog regiona FP2 sa označenim pozicijama konsenzusnih sekvenci za TGIF (kodirajući lanac) i heterodimer PBX/MEIS (nekodirajući lanac). Pozicije sekvenci su predstavljene u odnosu na start transkripcije.

4.4.1.1 Interakcije TGIF proteina sa potencijalnim vezivnim mestom u FP2 regionu bazalnog promotora SOX3 gena

Prisustvo transkripcionog faktora TGIF u proteinskim kompleksima na probi F31R31 (Slika 8), koja je u prethodnim istraživanjima korišćena za analizu vezivnog mesta za heterodimer PBX/MEIS, provereno je u reakcijama “supersifita“ korišćenjem antitela na TGIF (Slika 20).

F31R31	+	+	+	+	+
NT2 JP	-	+	-	+	-
RA JP	-	-	+	-	+
TGIF Ab	-	-	-	+	+



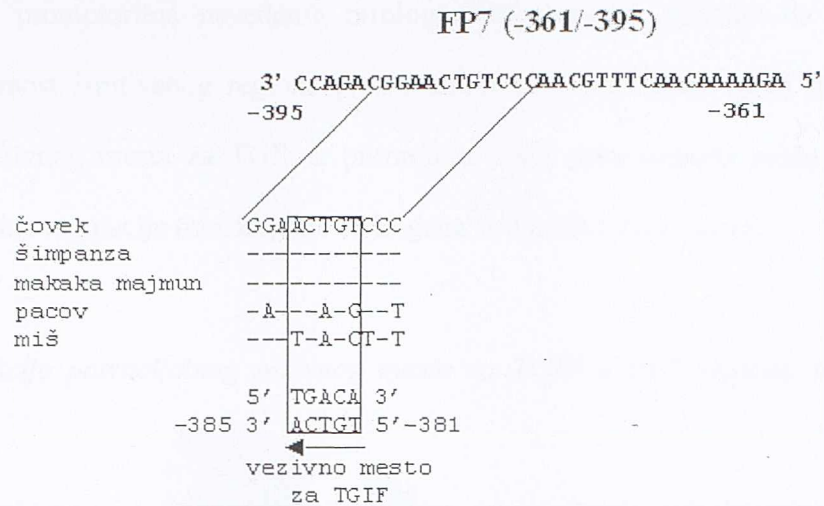
Slika 20. EMSA reakcije sa jedarnim proteinima (JP) neindukovanih (NT2) i indukovanih (RA) ćelija i probom F31R31. Proteinski kompleksi su označeni strelicom. U reakcijama “superšifra” korišćena su antitela na TGIF.

Reakcije "superšifra" na probi F31R31 sa jedarnim proteinima iz neindukovanih i RA indukovanih NT2/D1 ćelija nisu pokazale prisustvo transkripcionog faktora TGIF u proteinskim kompleksima detektovanim na ispitivanoj probi (Slika 20, kolone 4 i 5). U reakcijama "superšifra" primetno je samo povećanje vezanog proteinskog kompleksa, koje je verovatno posledica povećanja afiniteta jedarnih proteina za vezivanje za DNK u prisustvu antitela. Na osnovu prikazanih rezultata može se zaključiti da se protein TGIF iz jedarnih proteina NT2/D1 ćelija ne vezuje za konsenzusno mesto u bazalnom promotoru *SOX3* gena.

U prilog zaključku da se TGIF ne vezuje za potencijalno mesto u FP2 regionu idu i rezultati dobijeni analizom promotor reporterskog konstrukta koji nosi mutaciju u MEIS polumestu konsenzusne sekvence, MEISMUT (Slika 18). Ovaj mutant, zbog preklapajućih sekvenci vezivnih mesta za TGIF i MEIS, nosi i mutaciju u TGIF mestu (TGTC je izmenjeno u TCAGA) (Slika 18). Represija promotora izazvana ovom promenom ukazuje da mutirana sekvenca predstavlja mesto vezivanja proteina koji ima ulogu transkripcionog aktivatora, a ne represora, što je dokazana funkcija TGIF proteina (Bartholin et al., 2006).

4.4.2 Karakterizacija vezivnog mesta za transkripcioni faktor TGIF u FP7 regionu *SOX3* gena

Rezultati dobijeni MatInspector analizom promotora *SOX3* gena pokazali su da se i u distalnom regionu optimalnog promotora nalazi dodatno potencijalno vezivno mesto za transkripcioni faktor TGIF. Konsenzusno mesto za vezivanje TGIF transkripcionog faktora (5' TGTC 3') nalazi se na nekodirajućem lancu DNK na poziciji od -381 do -385 (Slika 21).



Slika 21: Sekvenca nekodirajućeg lanca DNK FP7 regiona promotora *SOX3* gena i poređenje konsenzusnog mesta za vezivanje TGIF sa ortologim sekvencama sisara. Vezivno mesto za TGIF je uokvireno. Pozicije sekvenci su predstavljene u odnosu na start transkripcije.

Iako TGIF i MEIS proteini često imaju preklapajuća vezivna mesta, u suprotnim orijentacijama, na komplementarnim lancima DNK, u slučaju ovog regiona MatInspector analiza nije pokazala prisustvo potencijalnog vezivnog mesta za MEIS proteine na kodirajućem lancu na poziciji -381/-385. Ovo je u saglasnosti sa rezultatom dobijenim “DNase I footprinting analizom“ promotora *SOX3* gena koja je pokazala prisustvo zaštićenog regiona na poziciji -361 do -395 samo na nekodirajućem lancu DNK (Slika 4B).

Evolutivna očuvanost potencijalnog vezivnog mesta za transkripcioni faktor TGIF ispitivana je poređenjem sekvence konsenzusnog mesta sa odgovarajućim sekvencama ortologa *Sox3* promotora sisara (šimpanza, makaka majmun, pacov i miš) (Slika 21). Ova analiza pokazuje da je potencijalno mesto za vezivanje TGIF proteina očuvano po nukleotidnom sastavu i po poziciji u promotoru kod svih ispitivanih primata (Slika 21). Analiza sekvenci pacova i miša ukazuje na izmenjen nukleotidni sastav u ispitivanom regionu, što je dovelo do narušavanja konsenzusnog mesta za vezivanje transkripcionog

faktora TGIF u promotorima navedenih ortologa. Ovi rezultati ukazuju da ne postoji evolutivna očuvanost ispitivanog regiona promotora *Sox3* gena sisara, kao i da prisustvo potencijalnog vezivnog mesta za TGIF u promotoru *Sox3* gena primata može ukazati na različite mehanizme regulacije transkripcije *Sox3* gena kod nižih i viših sisara.

4.4.2.1 *Interakcije potencijalnog vezivnog mesta za TGIF u FP7 regionu sa jedarnim proteinima*

Dalja karakterizacija konsenzusne sekvence za vezivanje transkripcionog faktora TGIF išla je u pravcu ispitivanja potencijalnih interakcija ovog mesta sa proteinima. Već je pomenuto da je zaštita u "DNase I footprinting" analizi ukazala na vezivanje jedarnih proteina za ovaj region promotora *SOX3* gena. Dalja analiza interakcija proteina i DNK u ovom regionu ispitivana je u eksperimentima smanjene elektroforetske pokretljivosti u gelu (EMSA). U ovim reakcijama korišćena je obeležena, dvolančana DNK proba F3R3 koja obuhvata deo zaštićenog regiona koji sadrži potencijalno vezivno mesto za TGIF (Slika 22A). Ova proba inkubirana je sa jedarnim proteinima neindukovanih i RA indukovanih NT2/D1 ćelija, a dobijeni rezultati su predstavljeni na Slici 22.

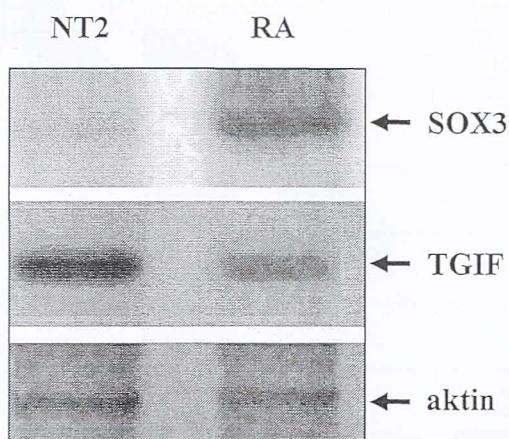
EMSA reakcije pokazuju da se za probu F3R3 vezuju proteini kako iz neindukovanih tako i iz RA indukovanih NT2/D1 ćelija. U oba slučaja formira se jedan proteinski kompleks čiji je intenzitet jači u reakcijama sa jedarnim proteinima iz neindukovanih NT2/D1 ćelija (Slika 22B, kolone 2 i 3). Kako je konsenzusno mesto za vezivanje TGIF u okviru probe F3R3 ukazivalo je na potencijalno prisustvo ovog proteina u identifikovanim kompleksima; vezivanje ovog transkripcionog faktora za probu F3R3 potvrđeno je u reakcijama “superšifta” korišćenjem antitela na TGIF. Prisustvo antitela na TGIF u EMSA reakcijama dovelo je do smanjenog vezivanja proteina za probu F3R3 (Slika 22B, kolone 4 i 5). Ovaj efekat “hlađenja” u reakcijama “superšifta” nastaje kao posledica konformacionih promena proteina prilikom vezivanja za antitela, što onemogućava njihovo vezivanje za DNK i već su opisane u literaturi (Won et al., 2002).

Rezultati dobijeni u EMSA reakcijama ukazuju da se transkripcioni faktor TGIF iz jedarnih proteina indukovanih i neindukovanih NT2/D1 ćelija vezuje za konsenzusno mesto u promotoru *SOX3* gena.

4.4.2.2 *Profil ekspresije TGIF proteina tokom ranih faza indukcije NT2/D1 ćelija retinoičnom kiselinom*

U uvodu ovog rada citirani su literaturni podaci koji ukazuju da je TGIF važan regulator signalnog puta retinoične kiseline (Bartholin et al., 2006). Otuda je bilo interesantno utvrditi profil ekspresije ovog proteina nakon prvih 48h indukcije NT2/D1 ćelija retinoičnom kiselinom i uporediti ga sa ekspresionim profilom *SOX3* proteina. Endogena ekspresija TGIF praćena je, kao i slučaju PBX i MEIS proteina, Western blot analizom ukupnih ćelijskih lizata (WCL) izolovanih iz NT2/D1 ćelija pre i nakon 48h indukcije retinoičnom kiselinom (Slika 23). Nakon 48h sati indukcije, nivo TGIF proteina značajno opada što ukazuje da je ekspresija TGIF proteina u NT2/D1 ćelijama regulisana retinoičnom kiselinom. Smanjena ekspresija

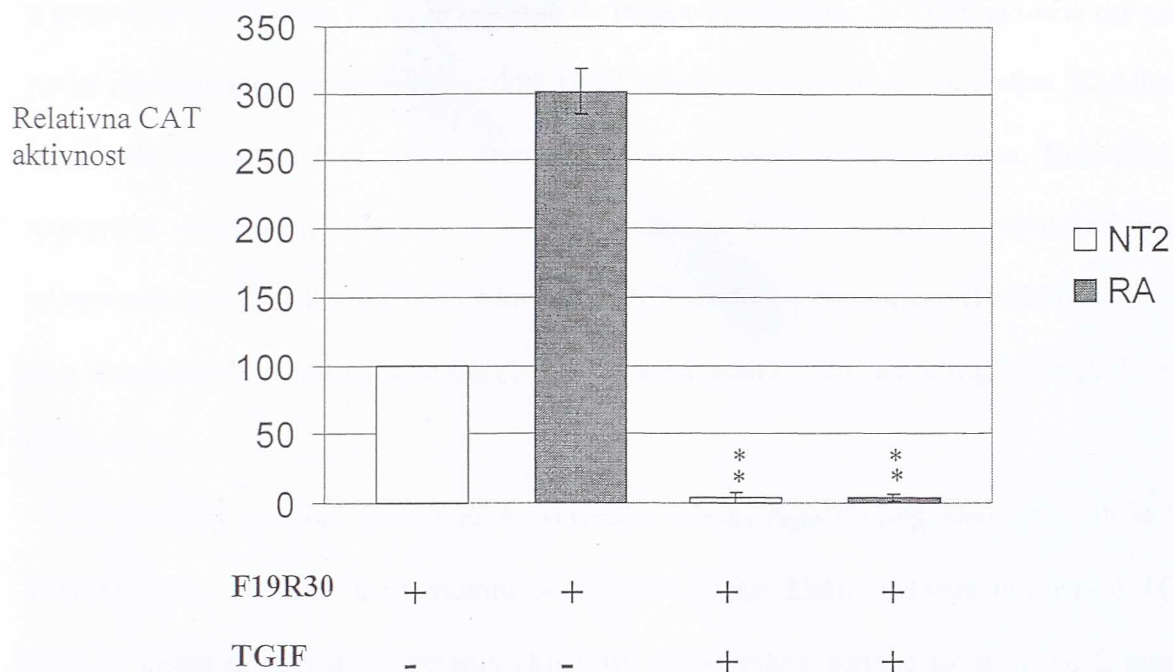
TGIF-a u vremenskom intervalu koji se poklapa sa aktivacijom ekspresije SOX3 proteina ukazuje na potencijalnu ulogu TGIF proteina kao negativnog regulatora transkripcije *SOX3* gena u NT2/D1 ćelijama. Različiti profili ekspresije članova TALE familije proteina u NT2/D1 ćelijama tokom indukcije retinoičnom kiselinom u skladu su sa njihovim ulogama u regulaciji transkripcije: PBX i MEIS deluju kao transkripcijski aktivatori, a TGIF kao represor ciljnih gena.



Slika 23: Western blot analiza ekspresije SOX3 i TGIF proteina u ukupnim ćelijskim lizatima neindukovanih NT2/D1 ćelija (NT2) i istih ćelija nakon 48h indukcije retinoičnom kiselinom (RA). Aktin je korišćen kao kontrola količine lizata unetih u reakcije. Strelice označavaju pozicije navedenih proteina na membrani.

4.4.2.3 Funkcionalna analiza regulatornog elementa promotora *SOX3* gena koji sadrži vezivno mesto za TGIF

Analiza potencijalne uloge TGIF proteina u regulaciji ekspresije *SOX3* gena ispitivana je u eksperimentima tranzijentne transfekcije neindukovanih i RA indukovanih NT2/D1 ćelija uz korišćene F19R30 promotor reporterskog konstrukta i ekspresionog vektora za za TGIF. Dobijeni rezultati prikazani su na Slici 24.

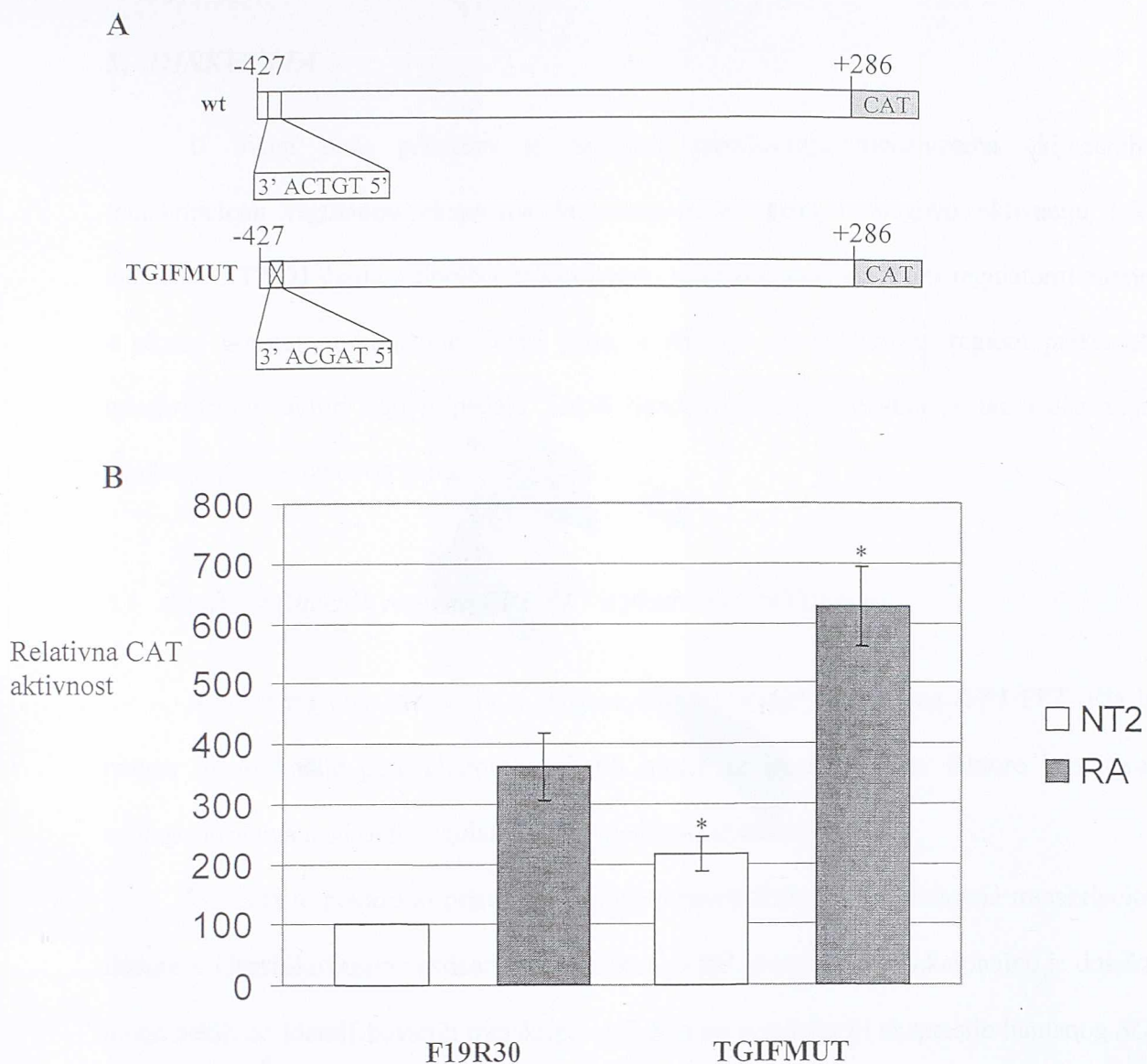


Slika 24: Efekat povećane ekspresije TGIF proteina na aktivnost *SOX3* promotora. NT2/D1 ćelije su tranzijentno transfekovane F19R30 *SOX3* promotor-reporterskim konstruktom i ekspresionim konstruktima za TGIF, kao što je naznačeno u tabeli. Normalizovana CAT aktivnosti su predstavljene kao procenat aktivnosti F19R30 konstrukta kojoj je dodeljena vrednost 100% u neindukovanim ćelijama (NT2). Vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost \pm S.E.M. (SEM-standard error mean) iz najmanje tri nezavisne transfekcije. Vrednosti relativnih CAT aktivnosti su poređene u Studentovom *t*-testu. Vrednosti za koje je $p < 0.01$ su predstavljene sa dve zvezdice (**).

Rezultati prikazani na Slici 24 su pokazali da i kod neindukovanih i RA indukovanih NT2/D1 ćelija, povećana ekspresija TGIF proteina dovodi do gubitka ekspresije reporterskog gena. Ovi rezultati ukazuju da povećana ekspresija transkripcionog faktora TGIF dovodi do represije transkripcije *SOX3* gena kako u neindukovanim tako i u indukovanim NT2/D1 ćelijama.

Da bi potvrdili funkcionalni značaj vezivnog mesta za TGIF, na poziciji -381 do -385 u promotoru *SOX3* gena, tj., da bi pokazali da se represorska funkcija TGIF proteina ostvaruje preko regulatornog elementa koji sadrži TGIF konsenzusnu sekvencu u analizu je uključen reporterski konstrukt koji sadrži mutaciju u okviru ovog vezivnog mesta. Konstrukt je napravljen uvođenjem mutacije u vezino mesto za TGIF u okviru optimalnog *SOX3* promotorskog konstrukta F19R30. Mutirani (TGIFMUT) i *wt* konstrukt (F19R30) korišćeni su u eksperimentima tranzijentne transfekcije neindukovanih i RA indukovanih NT2/D1 ćelija (Slika 25A).

Dobijeni rezultati potvrđuju funkcionalni značaj regulatornog elementa koji sadrži vezivno mesto za TGIF u promotoru *SOX3* gena (Slika 25B). Mutacija uvedena u TGIF vezivno mesto dovodi do povećanja aktivnosti reporterskog gena, i to približno 2 puta u slučaju neindukovanih ćelija i približno 1,7 puta u NT2/D1 ćelijama indukovanim retinoičnom kiselinom. Aktivacija *SOX3* promotora nakon uvođenja mutacije u TGIF konsenzusno mesto ukazuje na represorsku funkciju ovog regulatornog elementa i u skladu je sa prethodno opisanim rezultatima u kojima je povećana ekspresija TGIF proteina dovela do represije ekspresije reporterskog gena. Ovi rezultati nedvosmisleno potvrđuju da TGIF deluje kao represor transkripcije *SOX3* gena preko vezivnog mesta u optimalnom promotoru ovog gena.



Slika 25: Uticaj mutacije vezivnog mesta za TGIF na poziciji -381/-385 na aktivnost *SOX3* promotora. (A) Shematski prikaz mutacije uvedene u TGIF vezivno mesto u F19R30 promotor reporterskom konstrukt (B) Efekat mutacije na aktivnost *SOX3* promotora. NT2/D1 ćelije su tranzijentno transfekovane F19R30 promotor-reporterskim konstruktom ili mutiranim konstruktom TGIFMUT. 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.E.M. (SEM-standard error mean) iz najmanje tri nezavisne transfekcije. Vrednosti relativnih CAT aktivnosti su poređene u Studentovom *t*-testu. Vrednosti za koje je $p < 0.01$ su predstavljene jednom zvezdicom (*).

5. DISKUSIJA

U ovom radu prikazan je nastavak proučavanja mehanizama uključenih u transkripcionu regulaciju ekspresije humanog *SOX3* gena i njegovu aktivaciju tokom indukcije NT2/D1 ćelija retinoičnom kiselinom. Identifikovani su brojni regulatorni elementi u okviru promotora humanog *SOX3* gena, a detaljno su analizirani regioni preko kojih transkripcioni faktori koji pripadaju TALE familiji homeodomenskih proteina učestvuju u regulaciji ekspresije ovog gena.

5.1 Analiza zaštićenih regiona FP1-FP7 u promotoru *SOX3* gena

Analiza regiona zaštićenih u "DNase I footprinting" reakcijama (FP1-FP7) išla je u pravcu identifikacije potencijalnih vezivnih mesta za transkripcione faktore i ispitivanja evolutivne očuvanosti ovih regulatornih elemenata kod kičmenjaka.

Do sada je pokazano prisustvo brojnih potencijalnih mesta vezivanja transkripcionih faktora u identifikovanim zaštićenijim regionima *SOX3* promotora i funkcionalno je dokazana uloga nekih od identifikovanih transkripcionih faktora u regulaciji ekspresije humanog *SOX3* gena.

Na primer, u našim prethodnim istraživanjima pokazano je da se na kodirajućem lancu, na poziciji -45 do -48 vezuje opšti transkripcioni faktor Sp1 koji ima ulogu transkripcionog aktivatora promotora humanog *SOX3* gena (Kovacevic Grujicic *et al.*, 2005). Istraživanja u ovom radu su pokazala da se navedeno mesto nalazi u okviru zaštićenog regiona FP1. Istu funkciju ostvaruje i transkripcioni faktor USF čije vezivno mesto se nalazi u zaštićenom regionu FP2, na kodirajućem lancu DNK, na poziciji -68 do -71 (Kovacevic Grujicic *et al.*, 2005). Takođe, potvrđen je funkcionalni značaj tri CCAAT boksa identifikovana u regionima FP2, FP4 i FP6 u regulaciji ekspresije *SOX3* gena (Krstic *et al.*, 2007). Pokazano je da se za sva tri mesta vezuje opšti transkripcioni faktor NF-Y, i da preko

ovih regulatornih elemenata ostvaruje funkciju aktivatora transkripcije *SOX3* gena (Krstic et al., 2007).

Na model sistemu NT2/D1 ćelija indukovanih retinoičnom kiselinom praćena je uloga pojedinih regulatornih elemenata u aktivaciji *SOX3* gena tokom ranih faza neuralnog razvića ovih ćelija. Pokazano je da se u regionu FP3 nalazi regulatorni element koji vezuje nuklearni receptor RXR i učestvuje u aktivaciji *SOX3* gena retinoičnom kiselinom (Mojsin et al., 2006). Preciznije pozicioniranje ovog elementa uraćeno je "DNase I footprinting" analizom na fragmentu F18R12 uz vezivanje rekombinantnog RXR proteina (Mojsin et al., 2006). Veoma zanimljivi rezultati su dobijeni ispitivanjem uloge CCAAT boksova u aktivaciji humanog *SOX3* gena retinoičnom kiselinom. Ova istraživanja su pokazala da su dva CCAAT boksa u regionima FP4 i FP6 uključeni u aktivaciju *SOX3* gena tokom indukcije NT2/D1 ćelija retinoičnom kiselinom (Krstic et al., 2007).

Regulatorni elementi identifikovani u promotoru humanog *SOX3* gena, koji su u ovom radu otkriveni metodom "DNase I footprinting", takoće su analizirani metodom evolutivnog ili filogenetskog footprintinga (Neph and Tompa, 2006). Evolutivni footprinting je jedan od pristupa koji se koristi za identifikaciju regulatornih sekvenci koje imaju funkcionalni znaćaj u genomu. Ovaj metod podrazumeva identifikaciju vezivnih mesta za transkripcione faktore u nekodirajućem regionu DNK, porećenjem ortologih sekvenci razlićitih vrsta. Evolutivni footprinting zasnovan je na dva principa (Neph and Tompa, 2006). Prvo, funkcije transkripcionih faktora i njihov afinitet za vezivanje za specifićne sekvence na DNK su evolutivno oćuvani kod razlićitih vrsta. Drugo, nekodirajuće DNK sekvence koje imaju ulogu u regulaciji ekspresije gena izloćene su razlićitom selektivnom pritisku tokom evolucije. Sekvence koje predstavljaju vezivna mesta za transkripcione faktore pokazuju manju stopu promena tokom evolucije od ostalih, manje kritićnih, regiona nekodirajuće DNK.

Evolutivni footprinting promotorskih sekvenci *Sox3* ortologa sisara pokazao je visoku evolutivnu očuvanost brojnih regulatornih elemenata, pri čemu se neki od njih nalaze u okviru zaštićenih regiona koji su detektovani u ovom radu metodom "DNase I footprinting" (Kovacevic-Grujicic *et al.*, 2008). To ukazuje na njihov funkcionalni značaj tj. na očuvanost regulacionih mehanizama u kojima učestvuju (Kovacevic-Grujicic *et al.*, 2008). Evolutivna očuvanost potencijalnih mesta prepoznavanja transkripcionih faktora detaljno je analizirana i prikazana u radu Kovačević-Grujičić *et al.*, 2008. Rezultati prikazani u ovoj tezi su omogućili da se identifikuju potencijalna mesta vezivanja transkripcionih faktora koja se nalaze u regionima zaštićenim u reakcijama "DNase I footprinting-a". Tako, na primer, analiza je pokazala da se vezivna mesta za SP1 i MAZ, očuvana kod svih kičmenjaka, nalaze u okviru FP1 regiona. Takođe, u slučaju zaštićenog regiona FP2 evolutivno su očuvana vezivna mesta za USF i PBX/MEIS. U FP3 regionu kod svih kičmenjaka je očuvano vezivno mesto za CREB, dok je vezivno mesto za heterodimer VDR/RXR po nukleotidnom sastavu i poziciji očuvano kod primata, a kod nižih sisara pozicija ovog mesta je promenjena i nalazi se nizvodno u promotoru *Sox3* gena. Zanimljivo je da su dva CCAAT boksa u regionima FP2 i FP4 evolutivno očuvani kod svih kičmenjaka, dok je ovaj element u FP6 regionu očuvan samo kod primata. Uprkos tome, funkcionalni značaj CCAAT boksa u FP6 regionu *SOX3* promotora je eksperimentalno dokazan (Krstic *et al.*, 2007). Analiza FP7 regiona je pokazala da je vezivno mesto za TGIF evolutivno očuvano kod primata, ali ne i kod nižih sisara (Slika 21).

Od brojnih navedenih potencijalnih vezivnih mesta u našim prethodnim istraživanjima su analizirani regulatorni elementi za koje se vezuju opšti transkripcioni faktori Sp1, USF i NF-Y (Kovacevic Grujicic *et al.*, 2005; Krstic *et al.*, 2007) i nuklearni receptor RXR (Mojsin *et al.*, 2006) za koji je pokazano da je jedan od medijatora indukcije *SOX3* gena retinoičnom kiselinom.

U ovom radu po prvi put analizirana je uloga TALE transkripcionih faktora u regulaciji bazalne ekspresije *SOX3* gena i njegovoj indukciji tokom neuralne diferencijacije NT2/D1 ćelija. Brojni literaturni podaci, koji su usmerili istraživanja prikazana u ovoj tezi, ukazivali su da bi članovi TALE familije (transkripcioni faktori PBX1, MEIS1 i TGIF) mogli biti uključeni u složene mehanizme transkripcione regulacije *SOX3* gena:

- Prisustvo konsenzusnog vezivnog mesta za heterodimer PBX/MEIS u promotoru *SOX3* gena i njegova evolutivna očuvanost kod sisara.
- Interakcija PBX1 i MEIS1 proteina je evolutivno očuvan mehanizam kod kičmenjaka (Burglin, 1997; Rieckhof et al., 1997).
- PBX/MEIS heterodimeri ulaze u sastav aktivacionih kompleksa na promotorima gena uključenih u razviće nervnog sistema različitih organizama (Nakata et al., 1997).
- U različitim model sistemima je pokazano da je ekspresija PBX1 i MEIS1 proteina povećana tokom neuralne diferencijacije indukovane retinoičnom kiselinom što odgovara profilu ekspresije *SOX3* gena tokom neuralne diferencijacije NT2/D1 ćelija (Freemantle et al., 2002; Stevanovic, 2003; Qin et al., 2004).
- U promotoru *SOX3* gena se nalazi vezivno mesto za transkripcioni represor TGIF.
- TGIF je inhibitor signalnog puta retinoične kiseline tokom embrionalnog razvića miša (Bartholin et al., 2006).
- Ekspresija transkripcionog faktora TGIF se smanjuje tokom indukcije NT2/D1 ćelija retinoičnom kiselinom što je suprotno profilu ekspresije *SOX3* proteina tokom ovog procesa (Houldsworth et al., 2002; Stevanovic, 2003).

Rezultati prikazani u ovom radu potvrdili su da su članovi TALE familije homeodomenskih proteina uključeni u regulaciju bazalne aktivnosti *SOX3* gena. Takođe,

pokazano je da su ovi proteini uključeni u mehanizme aktivacije *SOX3* gena u ranim fazama neuralne diferencijacije NT2/D1 ćelija, indukovane retinoičnom kiselinom.

5.2 Uloga PBX1 i MEIS1 proteina u regulaciji bazalne ekspresije humanog *SOX3* gena u NT2/D1 ćelijskoj liniji

“DNase I footprinting“ analiza promotora *SOX3* gena ukazala je na prisustvo 4 regiona zaštićena na oba lanca DNK, i 3 zaštite na samo jednom lancu. *In silico* analiza jednog od zaštićenih regiona u okviru bazalnog promotora *SOX3* gena pokazala je prisustvo potencijalnog mesta za vezivanje PBX/MEIS heterodimera. Mesto se nalazi na nekodirajućem lancu DNK, na poziciji -70 do -79 i potpuno odgovara konsenzusnoj sekvenci za vezivanje PBX/MEIS heterodimera-5' TGATTGACAG 3' koja je prethodno opisana u literaturi (Chang *et al.*, 1997). Ova sekvenca je opisana kao mesto za koje se PBX1/MEIS1 kompleksi vezuju visokim afinitetom, pri čemu PBX1 prepoznaje 5' polumesto-5' TGAT 3', dok se MEIS1 vezuje za 3' polumesto-5' TGACAG 3' (Chang *et al.*, 1997; Shen *et al.*, 1997). Poređenje sekvenci ortologih promotora sisara i MatInspector analiza pokazuju da je ovo mesto očuvano, i po sekvenci i po poziciji, u promotorima *Sox3* gena svih analiziranih sisara (Slika 7). Evolutivna očuvanost vezivnih mesta u ortologim promotorima ukazuje na njihov značaj u regulaciji transkripcije ispitivanog gena. Imajući u vidu da je interakcija PBX1 i MEIS1 proteina takođe evolutivno očuvan mehanizam, naša polazna pretpostavka, potvrđena rezultatima prikazanim u ovoj tezi, je bila da ovo mesto može predstavljati važan transkripcioni regulatorni element *Sox3* gena sisara (Burglin, 1997; Rieckhof *et al.*, 1997; Steelman *et al.*, 1997).

Kooperativno vezivanje PBX i MEIS proteina za DNK je evolutivno očuvan mehanizam regulacije ekspresije gena od insekata do sisara. Homolozi PBX i MEIS proteina kod *Drosophila*, extradenticle (*exd*) i homothorax (Rieckhof *et al.*, 1997), i *C. elegans*, *ceh-20*

i ceh-25 (Burglin, 1997; Steelman et al., 1997), interaguju *in vitro*. Interakcije PBX i MEIS proteina su već opisane i okarakterisane kod sisara, a ostvaruju se preko N terminusa oba proteina (Moens and Selleri, 2006). Rezultati ispitivanja ovih interakcija u dvohibridnom sistemu kvasca pokazuju širok spektar mogućih interakcija, naročito u ćelijama koje ekprimiraju više izoformi ovih proteina (Williams et al., 2005). Tako su kompleksi PBX i MEIS/PREP proteina vezani za promotorske elemente uključeni u regulaciju ekspresije brojnih gena poput *Hoxb2*, *Hoxb1*, *Hoxa3*, *Hox11* (Jacobs et al., 1999; Ryoo et al., 1999; Salzberg et al., 1999; Ferretti et al., 2000; Manzanares et al., 2001; Brendolan et al., 2005). Ovi kompleksi uključeni su i u regulaciju endokrinih funkcija, pa je PBX/MEIS1 kompleks medijator efekta cAMP na transkripciju gena za 17 α -hidroksilaza citohrom P450 (Bischof et al., 1998). PBX/PREP1 kompleksi obezbeđuju u pankreasu specifičnu ekspresiju gena za somatostatin (Goudet et al., 1999) i glukagon (Herzig et al., 2000). Veoma je interesantno da ovi kompleksi ostvaruju interakcije i sa nuklearnim receptorima, pa su do sada opisane interakcije PBX proteina iz ovih kompleksa sa glukokortikoidnim (Subramaniam et al., 1998; Subramaniam et al., 2003) i tiroidnim receptorima (Wang et al., 2001).

Rezultati predstavljeni u ovoj tezi pokazuju da se PBX1 i MEIS1 direktno vezuju za konsenzusno mesto *SOX3* promotora. EMSA reakcije vezivanja i "superšifra" pokazuju da se PBX1 nalazi u kompleksima formiranim na ovom mestu vezivanjem jedarnih proteina neindukovanih NT2/D1 ćelija, dok su i PBX1 i MEIS1 prisutni u kompleksima sa jedarnim proteinima indukovanih ćelija (Slika 8B). Upotrebom mutiranih oligonukleotidnih proba, u eksperimentima kompeticije i "superšifra", potvrđena je specifičnost vezivanja PBX1 i MEIS1 proteina za konsenzusnu sekvencu (Slike 10 i 11). Takođe, PBX1 i MEIS1 proteini sintetisani *in vitro* formiraju dimerni kompleks na ovom mestu (Slika 12). Iako pojedinačno *in vitro* sintetisani proteini ne mogu da se vežu kao monomeri, PBX1 iz jedarnih proteina neindukovanih ćelija se vezuje za ovo mesto u odsustvu Meis1 (Slika 9). Ovo ukazuje da neki

drugi, još uvek neidentifikovan, faktor ili faktori, prisutni u jedarnim proteinima NT2/D1 ćelija, stabilizuju vezivanje PBX1 proteina. Pokazano je da interakcije PBX, MEIS i HOX proteina nisu ograničene samo na međusobne interakcije kada su ovi proteini vezani za DNK (Williams *et al.*, 2005) (Huang *et al.*, 2005). Naprotiv, trimerni kompleks ovih proteina može regulisati aktivnost gena i u takvoj konstelaciji, kada je samo jedan od ovih proteina vezan za DNK, dok interakcije sa ostala dva člana kompleksa nisu uslovljene njihovim vezivanjem za DNK. Ovakav mehanizam nije još uvek u potpunosti razjašnjen, ali je pokazano da se nasuprot brzog i efikasnog vezivanja HOXB1 i PBX za autoregulatorni element u *Hoxb1* promotoru, MEIS priključuje kasnije iako je prisutan u dovoljnoj količini u ćeliji (Huang *et al.*, 2005). Ovo sugerše da se MEIS ne vezuje za DNK samo kao deo preformiranog trimernog kompleksa sa PBX i HOX proteinima. Pored formiranja kompleksa sa homeodomenskim proteinima, PBX ostvaruje interakcije i sa nehomeodomenskim proteinima koji nemaju domene za vezivanje za DNK (Abramovich *et al.*, 2000). Ovi proteini, takođe, utiču na funkcionalne karakteristike PBX proteina preko protein-protein interakcija (Abramovich *et al.*, 2000). Tako je pokazano da HPIP (Haematopoietic Pbx1 interacting Protein) sprečava vezivanje PBX/HOX kompleksa za DNK *in vitro* (Manavathi *et al.*, 2006). Još jedan nehomeodomenski protein ZFPIP (Zinc Finger PBX1 Interacting Protein), inhibira *in vivo* vezivanje PBX/HOX kompleksa za DNK (Laurent *et al.*, 2008).

Sledeći rezultati prikazani u ovoj tezi potvrdili su da PBX1 i MEIS1 imaju ulogu aktivatora transkripcije *SOX3* gena. Povećanje ekspresije PBX1 i MEIS1 proteina u NT2/D1 ćelijama, u eksperimentima kotransfekcije sa ekspresionim vektorima, dovela je do povećanja aktivnosti reporterskog konstrukta F19R30, ukazujući da promotor *SOX3* gena sadrži regulatorne elemente preko kojih proteini ostvaruju efekat. Tako je, povećana ekspresija ovih proteina dovodi i do povećanja intenziteta kompleksa formiranog na regulatornom elementu u *SOX3* promotoru na poziciji -70/-79 (Slika 13), kao i do povećanja ekspresije *SOX3* proteina

in vivo (Slika 16). U korelaciji sa ovim rezultatima je i analiza mutiranih F19R30 reporterskih konstrukata. Oba mutanta, PBXMUT (mutirano PBX polumesto) i MEISMUT (mutacija u MEIS mestu), dovode do pada aktivnosti *SOX3* promotora (Slika 18).

Treba naglasiti da u okviru transkripcionog kompleksa na promotorima ciljnih gena, PBX proteini ostvaruju interakcije sa brojnim regulatornim proteinima. Partneri PBX su kako homeodomenski (HOX, MEIS, PDX1) (Laurent *et al.*, 2008), tako i nehomeodomenski proteini (FOXC1, HPIP, ZFPIP, Smad, MyoD) (Laurent *et al.*, 2008). Svi ovi proteini imaju profil ekspresije koji je vremenski i prostorno mnogo ograničeniji od ekspresije PBX-a tokom razvića (Laurent *et al.*, 2008). U kontekstu modulacije funkcije Pbx proteina, oni se mogu posmatrati kao PBX kofaktori pa ih neki autori označavaju kao XPIP (X PBX Interacting Proteins, gde X označava bilo koji factor koji ostvaruje interakcije sa PBX) (Laurent *et al.*, 2008). Ovakav koncept je u korelaciji sa rezultatima dobijenim poređenjem fenotipa PBX mutantnog miša i XPIP mutantnih fenotipa. Poremećaji u razviću prisutni kod PPX mutantnih miševa mnogo su izraženiji i zahvataju više struktura nego u slučaju XPIP mutanata (Laurent *et al.*, 2008). PBX proteini interaguju sa MEIS proteinima formirajući heterodimere PBX/MEIS koji u brojnim esejima tranzijentne transfekcije ne pokazuju drastičnu transkripcionu aktivaciju. Brojni autori su primetili mnogo veću efikasnost heterodimera PBX/MEIS/XPIP, sugerišući kooperativnu ulogu XPIP (Laurent *et al.*, 2008). Ova kooperacija ostvaruje se fizičkim interakcijama sa PBX-om i drugim transkripcionim faktorima. Međutim, često se kooperacija može ostvariti samo na proširenim promotorskim sekvencama koje se generalno ne koriste u promoter-reporterskim esejima (Laurent *et al.*, 2008).

5.3 Uloga *PBX1* i *MEIS1* proteina u aktivaciji ekspresije humanog *SOX3* gena tokom neuralne diferencijacije NT2/D1 ćelija retinoičnom kiselinom

Paralelno sa analizom regulacije bazalne aktivnosti *SOX3* gena, ispitivana je i promena ekspresije ovog gena u ranim fazama neuralne diferencijacije NT2/D1 ćelija, koja je indukovana retinoičnom kiselinom. Pokazano je da tokom prvih 48h indukcije dolazi do značajnog povećanja iRNK za *SOX3*, a da zatim nivo ekspresije dramatično pada, mada i dalje ostaje na nivou većem od onog kod neindukovanih ćelija (Stevanovic, 2003). Može se reći da su rane faze indukcije NT2/D1 ćelija praćene tranzijentnim povećanjem ekspresije *SOX3* gena (Stevanovic, 2003). Praćenje nivoa *SOX3* proteina tokom indukcije pokazalo je povećanje ekspresije i na proteinskom nivou (Mojsin *et al.*, 2006). Nuklearni receptor RXR je jedan od medijatora indukcije *SOX3* gena retinoičnom kiselinom i tokom ranih faza indukcije NT2/D1 ćelija RXR i *SOX3* proteini pokazuju sličan profil ekspresije (Mojsin *et al.*, 2006). Analiza promotor-reporterskih konstrukata *SOX3* gena u uslovima povećane ekspresije nuklearnog receptora RXR ukazala je na prisustvo nekoliko regiona preko kojih se odvija indukcija *SOX3* gena retinoičnom kiselinom. Jedan identifikovani region predstavlja atipično mesto za vezivanje RXR-a, koje se sastoji od dva polumesta na pozicijama -155/-178 i -227/-254 (Mojsin *et al.*, 2006). Delecija ovog mesta iz reporterskih konstrukata dovodi do smanjenja odgovora *SOX3* promotora na indukciju retinoičnom kiselinom. Međutim, iako neophodan, ovaj region nije dovoljan za ostvarivanje punog efekta retinoične kiseline na aktivaciju *SOX3* promotora (Mojsin *et al.*, 2006). Nedavno je identifikovan još jedan element preko koga RXR u prisustvu retinoične kiseline aktivira ekspresiju *SOX3* gena (Nikcevic *et al.*, 2008). Ovaj region nalazi se nizvodno od *PBX/MEIS* vezivnog mesta okarakterisanog u ovom radu, i predstavlja još jedan element preko koga se ostvaruje efekat retinoične kiseline (Nikcevic *et al.*, 2008). Kao i u slučaju prethodno opisanog regiona i ovaj element je

funkcionalno značajan, ali ne i dovoljan za puni efekat aktivacije *SOX3* gena retinoičnom kiselinom (Nikcevic et al., 2008).

Složenost mehanizama indukcije *SOX3* gena retinoičnom kiselinom potvrđuju i naši prethodni rezultati koji ukazuju da je opšti transkripcioni faktor NF- κ B uključen u ovaj proces (Krstic et al., 2007). Najvažniju ulogu u ovom regulatornom mehanizmu igraju CCAAT boksovi u enhancerskom regionu optimalnog promotora *SOX3* gena, mada mutacije sva tri boksa značajno smanjuju, kako bazalnu aktivnost, tako i inducibilnost promotora (Krstic et al., 2007).

U ovom radu pokazano je da se heterodimerni kompleks PBX1/MEIS1 vezuje za konsenzusno mesto u *SOX3* promotoru samo u prisustvu retinoične kiseline. Sledeći rezultati pokazuju da PBX1 i MEIS1 dovode do aktivacije *SOX3* gena u NT2/D1 ćelijama indukovanim retinoičnom kiselinom. Rezultati Western blot analize pokazuju značajno povećanje nivoa *SOX3* proteina nakon povećane ekspresije PBX1 i MEIS1 proteina u prisustvu retinoične kiseline (Slika 16). Funkcionalna analiza *SOX3* promotora potvrđuje ove rezultate. Mutacije u oba polumesta, u okviru PBX/MEIS konsenzusa, smanjuju odgovor *SOX3* promotora na retinoičnu kiselinu (Slika 18). Na osnovu ovih rezultata, može se zaključiti da PBX1 i MEIS1 proteini učestvuju u indukciji *SOX3* gena retinoičnom kiselinom. Iako mehanizam indukcije *SOX3* gena retinoičnom kiselinom nije u potpunosti razjašnjen, može se spekulirati o ulozi regulatornog elementa koji sadrži PBX/MEIS vezivno mesto u ovom procesu. EMSA analiza ukazuje da je MEIS1 prisutan u proteinskom kompleksu koji je formiran na regulatornom elementu *SOX3* promotora samo u reakcijama sa jedarnim proteinima iz indukovanih NT2/D1 ćelija (Slike 8 i 9). Ekspresija PBX1 i MEIS1 proteina značajno je povećana tokom indukcije ćelija retinoičnom kiselinom od 48h, što odgovara profilu ekspresije *SOX3* u ovim uslovima (Slika 14). Pošto retinoična kiselina aktivira ekspresiju PBX1 i MEIS1 u ranim fazama neuralne diferencijacije NT2/D1ćelija, logično je

pretpostaviti da ovi geni imaju regulatornu ulogu u opredeljivanju ćelija za proces neuralne diferencijacije. Takođe, može se pretpostaviti da proces opredeljivanja ovih ćelija uključuje aktivaciju *SOX3* gena.

U različitim model sistemima je pokazano da je ekspresija PBX1 i MEIS1 proteina povećana tokom neuralne diferencijacije indukovane retinoičnom kiselinom. U „microarray” analizama pokazano je da se ekspresija Meis1 proteina povećava 2,4 puta nakon 48h indukcije NT2/D1 ćelija retinoičnom kiselinom (Freemantle *et al.*, 2002). U P19 ćelijama, koje su mišiji homolog humanim NT2/D1 ćelijama, indukcija retinoičnom kiselinom dovodi do povećane ekspresije PBX1 i MEIS1 proteina (Knoepfler and Kamps, 1997; Qin *et al.*, 2004). Osim povećanja ekspresije, u istom model sistemu je detektovano značajno produženje poluživota sva tri PPX proteina prisutna u ovim ćelijama, PBX1/2/3 (Qin *et al.*, 2004). Ovo povećanje stabilnosti, nakon indukcije retinoičnom kiselinom, objašnjava se smanjenjem proteozomske degradacije PBX proteina i povećanjem vezivanja PBX i MEIS proteina (Qin *et al.*, 2004). Slični rezultati dobijeni su u *D. rerio* gde je pokazano da povećanje ekspresije MEIS1 proteina dovodi do povećane stabilnosti PBX proteina (Burglin, 1997).

Ovi literaturni podaci ukazuju da PBX1 i MEIS1, tranzijentnom aktivacijom *SOX3* gena, mogu učestvovati u regulaciji ranih faza neuralne diferencijacije NT2/D1 ćelija. Potencijalnu ulogu ovih proteina u regulaciji neurogeneze potvrđuju i brojni podaci koji ukazuju da PBX/MEIS heterodimeri ulaze u sastav aktivacionih kompleksa na promotorima gena uključenih u razviće nervnog sistema različitih organizama. Tako je pokazano da su PBX1 i MEIS1 kod žabe važni regulatori *Zic3* gena koji je primarni regulator neuralnog razvića (Nakata *et al.*, 1997; Brewster *et al.*, 1998; Kuo *et al.*, 1998). Takođe, povećanje ekspresije ovih proteina dovoljno je za indukciju ekspresije *Zic3* gena u naivnom ektodermu žabe (Kelly *et al.*, 2006).

Praćenje ekspresije *Pbx1* gena u embrionu pacova pokazuje da ovaj gen ima gotovo konstitutivnu ekspresiju, ali je najveći nivo ekspresije zabeležen u centralnom nervnom sistemu, i to već na stadijumu od 14 dana (Qin *et al.*, 2004). U embrionima miša, MEIS1 je okarakterisan kao rani marker progenitora granularnih ćelija (GCP-Granule cell progenitor) gde je njegova ekspresija detektovana već na stadijumu embrionalnog razvića od 10 dana (E10) (Salero and Hatten, 2007). Istraživanja na telencefalonu miša su pokazala da regionalno specifična ekspresija MEIS1 i MEIS2, od desetog dana embrionalnog razvića (E10) do rođenja, omogućava definisanje različitih regiona telencefalona tokom razvića (Toresson *et al.*, 2000). U poređenju sa MEIS, ekspresija PBX u telencefalonu je mnogo šira (manje specifična), ali je lokalizacija PBX u jedru u korelaciji sa ekspresijom MEIS (Toresson *et al.*, 2000).

U embrionima vinske mušice, homolog MEIS1 homothorax (HTH) interaguje sa extradenticlein (EXD) homologom PBX1 u jedru tokom organizacije senzornih organa u embrionalnom perifernom nervnom sistemu (Rieckhof *et al.*, 1997). Kao i kod miša, ektopička ekspresija *hth* u korelaciji je sa ektopičkom lokalizacijom EXD u jedru (Rieckhof *et al.*, 1997).

Iako dodijeni rezultati potvrđuju ulogu PBX1/MEIS1 heterodimera u aktivaciji *SOX3* gena tokom neuralne diferencijacije NT2/D1 ćelija, ne može se isključiti prisustvo drugih proteina u kompleksu formiranom na ispitivanom konsenzusnom mestu u *SOX3* promotoru. Najčešći partneri PBX i MEIS proteina na regulatornim sekvencama promotora ciljnih gena su HOX proteini (Moens and Selleri, 2006). Pokazano je da retinoična kiselina indukuje ekspresiju *Hox* gena u ćelijskim linijama embrionalnog karcinoma (Featherstone *et al.*, 1988; Popperl and Featherstone, 1993; Pratt *et al.*, 1993). Eksperimentalni podaci ukazuju da PBX i MEIS proteini preko interakcija koje ostvaruju sa HOX proteinima imaju ključnu ulogu u kontroli neuralne diferencijacije P19 ćelija (Knoepfler and Kamps, 1997; Qin *et al.*, 2004; Qin

et al., 2004). Smanjenje nivoa PBX proteina, korišćenjem siRNK, redukuje neuralnu diferencijaciju P19 ćelija indukovanu retinoičnom kiselinom (Qin *et al.*, 2004). Uloga HOXA2, PBX1 i MEIS1 proteina u neuralnoj diferencijaciji proučavana je eksperimentima povećane ekspresije ovih proteina u P19 ćelijama i pilećim embrionima (Yang *et al.*, 2008). U oba slučaja, promena profila ekspresije ova tri gena dovela je do smanjenja frekvencije ulaskâ ćelija u neuralnu diferencijaciju (Yang *et al.*, 2008). Primećeno je da, i u P19 ćelijama i u pilećim embrionima, redukcija neurogeneze nastaje samo u prisustvu PBX i MEIS proteina koji su kofaktori HOXA2 proteina (Yang *et al.*, 2008). U P19 ćelijama, inhibicija neurogeneze izazvana HOXA2 proteinom potpuno se ukida mutacijom domena ovog proteina kojim se ostvaruje dimerizacija HOXA2 i PBX1. Ovaj model regulacije neuralne diferencijacije P19 ćelija ukazuje da bi trebalo ispitati potencijalno prisustvo HOX proteina na promotoru *SOX3* gena (Yang *et al.*, 2008). Potencijalni trimerni kompleks na PBX/MEIS vezivnom mestu u *SOX3* promotoru mogao bi imati različite karakteristike u neindukovanim i indukovanim NT2/D1 ćelijama. Priroda do sada opisanih trimernih kompleksa PBX/MEI/HOX varira, kako u interakcijama pojedinačnih proteina sa DNK, tako i u međusobnim interakcijama članova kompleksa (Laurent *et al.*, 2008). Ove kombinacije određuju funkcionalne karakteristike kompleksa i njegovu ulogu u regulaciji transkripcije ciljnih gena (Laurent *et al.*, 2008).

Proučavanje uloge PBX1 i MEIS1 proteina u regulaciji ekspresije *SOX3* proteina dodatno komplikuje mogućnost da su ostali članovi TALE familije transkripcionih faktora uključeni u ovaj mehanizam preko istih regulatornih elementata u *SOX3* promotoru. Brojni članovi divergentne familije TALE homeodomenskih proteina često imaju preklapajuće profile ekspresije i mogu da formiraju različite heterodimerne komplekse na DNK, što doprinosi kompleksnosti mehanizama regulacije ciljnih gena (Knoepfler *et al.*, 1997).

5.4 Uloga transkripcionog faktora TGIF u regulaciji ekspresije humanog *SOX3* gena u NT2/D1 ćelijskoj liniji

Za razliku od transkripcionih aktivatora PBX i MEIS, TGIF je okarakterisan kao represor promotora ciljnih gena. MatInspector analiza ukazala je na prisustvo dva potencijalna vezivna mesta za transkripcioni faktor TGIF u promotoru *SOX3* gena. Prvo mesto nalazi se u FP2 zaštićenom regionu, u bazalnom promotoru, a drugo u distalnom delu optimalnog promotora *SOX3* gena. U cilju sveobuhvatne analize uloge TALE proteina u regulaciji ekspresije *SOX3* gena, oba mesta su analizirana u ovom radu.

Prvo mesto nalazi se na kodirajućem lancu DNK na poziciji -70 do -74 (Slika 19), i kao u mnogim do sada opisanim promotorima preklapa se, u suprotnoj orijentaciji sa MEIS vezivnim mestom na nekodirajućem lancu DNK. Rezultati dobijeni analizom ovog elementa ukazuju da ovo mesto ne vezuje transkripcioni faktor TGIF: "superšift" analiza je pokazala da TGIF nije prisutan u proteinskom kompleksu koji se formira na DNK probi koja sadrži ovo mesto (Slika 20), a mutacija ovog mesta dovodi do smanjenja aktivnosti promotora *SOX3* gena (Slika 18). Ovi, i ostali rezultati dobijeni ispitivanjem FP2 zaštićenog regiona, ukazuje da se na ispitivanoj poziciji, -70 do -74, nalazi funkcionalno MEIS1 vezivno mesto na komplementarnom lancu DNK.

Drugo potencijalno vezivno mesto za TGIF nalazi se u regionu -381 do -385 na kodirajućem DNK lancu (Slika 21). Na komplementarnom lancu DNK na ovoj poziciji MatInspector program nije pokazao prisustvo potencijalnog vezivnog mesta za MEIS proteine, iako nukleotidna sekvenca odgovara konsenzusu za vezivanje ovog transkripcionog faktora. To se može objasniti time da nukleotidne sekvence koje okružuju konsenzusnu sekvencu stvaraju kontekst koji ne omogućava vezivanje MEIS proteina u ovom regionu.

EMSA analiza ukazuje da se na probi koja obuhvata ispitivani region formira kompleks sa jedarnim proteinima iz NT2/D1 ćelija, a "superšift" analiza je potvrdila prisustvo

TGIF proteina u ovom kompleksu (Slika 22). Funkcionalni eseji pokazuju da povećana ekspresija TGIF proteina dovodi do inaktivacije *SOX3* promotora što ukazuje da TGIF ima ulogu represora na regulatornom elementu ovog promotora (Slika 24). Mutacija veznog mesta dovodi do aktivacije *SOX3* promotora, što potvrđuje represorsku funkciju TGIF proteina (Slika 25).

Prikazani rezultati takođe pokazuju da je ekspresija TGIF proteina u NT2/D1 ćelijama regulasana retinoičnom kiselinom. Naime, tokom prvih 48h indukcije beleži se smanjenje ekspresije TGIF proteina u ovim ćelijama (Slika 23). Ovo je u saglasnosti sa rezultatima dobijenim "microarray" analizom NT2/D1 ćelija koje su pod uticajem retinoične kiseline ušle u proces neurilne diferencijacije (Houldsworth et al., 2002). Zanimljivo, ova analiza je pokazala da od svih analiziranih homeoboks proteina samo TGIF pokazuje pad nivoa ekspresije tokom RA indukovane neuralne diferencijacije NT2/D1 ćelija (Houldsworth et al., 2002). Suprotni profili ekspresije *SOX3* i TGIF proteina tokom indukcije NT2/D1 ćelija retinoičnom kiselinom podržavaju ideju o represorskoj funkciji TGIF na promotoru *SOX3* gena.

Dobijeni rezultati su veoma interesantni kada se ima u vidu da je TGIF inhibitor signalnog puta retinoične kiseline (Bartholin et al., 2006) i da je, na osnovu sposobnosti da moduliše odgovor na dejstvo retinoične kiseline, ovaj protein uključen u regulaciju razvića (Bartholin et al., 2006). Zanimljivo je da je TGIF otkriven kao jedan od proteina koji se vezuju za specifičan element promotora *CrbpII* gena pacova (DR1 RXRE) koji je odgovoran za aktivaciju ovog gena retinoičnom kiselinom (Bertolino et al., 1995). Pokazano je da povećana ekspresija TGIF-a dovodi do represije aktivnosti reporterskog gena u prisustvu RA čak i pri povećanoj ekspresiji RXR-a (Bertolino et al., 1995). Ovaj element evolutivno je očuvan i funkcionalan i kod *CrbpII* gena miša (Bartholin et al., 2006). Međutim, kako ovaj element nije prisutan u promotoru humanog *CrbpII* gena, kao i da većina elemenata preko

kojih se odvija aktivacija gena retinoičnom kiselinom ne poseduje vezivna mesta za TGIF jasno je da ovo ne može biti generalni regulatorni mehanizam (Bartholin et al., 2006). Najnovija istraživanja pokazuju da TGIF ne može direktno da se veže za kanonski DR5 element preko kog RA ostvaruje svoju funkciju, ali da povećana ekspresija TGIF-a dovodi do represije transkripcije i sa DR1 i sa DR5 elemenata u promotorima ciljnih gena retinoične kiseline (Bartholin et al., 2006). Ovo ukazuje da je TGIF regulator ekspresije ciljnih gena retinoične kiseline (Bartholin et al., 2006). U tim slučajevima TGIF interaguje sa LBD (ligand binding domain) nuklearnog receptora RXR, a formiranje ovog kompleksa inhibirano je u prisustvu retinoične kiseline (Bartholin *et al.*, 2006). Zanimljivo je da TGIF može da interaguje sa RXR-om koji se već nalazi u heterodimernom kompleksu sa nekim drugim nuklearnim receptorom (VDR, PPAR, RAR) i da je to način na koji se ovaj protein integriše u kompleks (Bartholin et al., 2006). U kompleksu sa RXR-om TGIF regrutuje transkripcione represore za koje se inače vezuje (Melhuish and Wotton, 2000; Sharma and Sun, 2001; Wotton et al., 2001) i na taj način inhibira indukciju gena retinoičnom kiselinom (Bartholin et al., 2006).

Navedeni literaturni podaci ukazuju da transkripcioni faktor TGIF može biti uključen u više regulatornih mehanizama kojima je regulisana ekspresija *SOX3* gena tokom indukcije NT2/D1 ćelija retinoičnom kiselinom. Naša ranija istraživanja su pokazala da u optimalnom promotoru *SOX3* gena postoje dva regulatorna elementa preko kojih se ostvaruje aktivacija ovog gena retinoičnom kiselinom i to direktnom interakcijom RXR-a sa ovim elementima (Mojsin et al., 2006; Nikcevic et al., 2008). Takođe, MatInspector analiza promotora *SOX3* gena pokazala je da se u zaštićenim regionima nalaze potencijalna vezivna mesta za heterodimere RXR/VDR i RXR/PPAR. Bilo bi interesantno ispitati potencijalne interakcije TGIF-a sa ovim elementima i navedenim nuklearnim receptorima tokom indukcije NT2/D1 ćelija retinoičnom kiselinom. To bi pokazalo da li TGIF utiče na regulaciju ekspresije *SOX3*

gena samo preko konsenzusnog mesta u optimalnom promotoru opisanog u ovom radu, ili je uključen u još neke mehanizme regulacije ekspresije ovog gena.

5.5 Literaturni podaci o regulaciji *Sox3* gena drugih kičmenjaka

Kao što je ranije naglašeno, jedine dve studije regulacije ekspresije *Sox3* gena drugih kičmenjaka urađene su na mišu i žabi, a analizirana je transgena ekspresija većih genomskih regiona tokom embrionalnog razvića ovih organizama.

Analiza regulatornih elemenata odgovornih za ekspresiju *Sox3* gena miša rađena je korišćenjem transgenih reporterskih gena poređenjem profila ekspresije transgena i endogenog *Sox3* gena u embrionima (Brunelli *et al.*, 2003). Genomski region, dužine 8,3 kb, koji sadrži *Sox3* gen, 3,5 kb uzvodno i 3,5 kb nizvodno od otvorenog okvira čitanja (ORF-open reading frame) pokazao se dovoljnim da u transgenom mišu reprodukuje profil ekspresije endogenog *Sox3* gena tokom ranih faza neurogeneze. Međutim, 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).

Regulatorni elementi u regionu nizvodno od ORF-a *Sox3* gena, neophodni su za ekspresiju ovog gena u posteriornim regionima nervne cevi i u rombomerama 3 i 5, a kasnije i u 4 i 6. Ovaj profil ekspresije odgovara profilu nekih *Hox* gena (Whiting *et al.*, 1991; Studer *et al.*, 1994). Različiti regulatorni elementi odgovorni su za ekspresiju *Hox* gena u rombomerama zadnjeg mozga i u posteriornim regionima nervne cevi. Elementi koji regulišu ekspresiju *Hox* u nervnoj cevi odgovaraju na gradijent retinoične kiseline duž nervne cevi i sadrže vezivna mesta za RAR i RXR. U 3' regionu analiziranog genomskog regiona *Sox3* gena miša detektovan je veoma sličan region, koji takođe sadrži vezivna mesta za RAR i RXR

i čija delecija ukida ekspresiju *Sox3* u rombomerama i posteriornim regionima kičmene moždine. Ekspresija *Sox3* gena u NT2/D1, P19 i ES ćelijama je regulisana retinoičnom kiselinom, i to rastom u ranim fazama indukcije, a zatim padom ekspresije (Brunelli *et al.*, 2003). Ovo možda reflektuje odgovor na gradijent retinoične kiseline *in vivo*, koji se dešava u ranim fazama razvića.

Sekvence u regionu uzvodno od ORF-a *Sox3* gena miša neophodne su za ekspresiju ovog gena u mozgu i ventralnim regionima nervne cevi. Enhenserski element prisutan u 5' regionu ogovoran je za ekspresiju ovog gena duž dorzo-ventralne ose kičmene moždine i specifičnu ekspresiju u V2 interneuronima. U enhenseru su identifikovana potencijalna mesta za vezivanje transkripcionih faktora PAX6 i NKX2.5, koji su već opisani kao regulatorni proteini u ventralnim delovima nervne cevi (Brunelli *et al.*, 2003).

Zanimljivo je da pomenuti genomski region *Sox3* gena miša kao transgen u žabi uspeva da u najvećoj meri obezbedi ekspresiju koja odgovara endogenoj u najranijim fazama razvića žabe, koje se, bitno je naglasiti, umnogome razlikuje od neuralnog razvića miša (Streit and Stern, 1999; Harland, 2000). Ovo je posebno interesantno jer poređenje sekvenci van kodirajućeg regiona *Sox3* gena miša i žabe nije ukazalo na postojanje većih regiona koji pokazuju homologiju (Brunelli *et al.*, 2003). Ovo je u suprotnosti sa pravilom da konzervisani mehanizmi regulacije podrazumevaju postojanje dugih evolutivno očuvanih sekvenci. Jedino objašnjenje ovog fenomena je da samo nekoliko kratkih DNK sekvenci, koje se ne mogu detektovati pri poređenju dugih sekvenci, mogu biti odgovorne za evolutivnu očuvanost transgene ekspresije u mišu i žabi.

I kod miša i kod žabe genomski konstrukt uspeva da održi profil ekspresije koji odgovara endogenom otprilike do stadijuma 15, tj. neurule, ali ne uspeva da ga održi tokom narednih stadijuma razvića, blastule i gastrule (Brunelli *et al.*, 2003). Verovatno je da su elementi odgovorni za ekspresiju *Sox3* gena tokom procesa gastrulacije smešteni u distalnim

regionima na većoj udaljenosti od ORF-a, kao što je već pokazano za *Sox1*, *Sox2* i *Sox9* (Zappone *et al.*, 2000).

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). To podrazumeva da ovaj region sadrži elemente odgovorne za aktivaciju *Sox3* gena, ali i represorske elemente koji ograničavaju ekspresiju u specifičnim regionima. Deleciona analiza transgena pokazala je prisustvo dva enhancerska regiona, A1 na poziciji -746/-672 bp i A2 od -1550 do -746, i jednog represorskog R1 od -672 do -299 u odnosu na ATG (Rogers *et al.*, 2008). Analiza ovih regiona na prisustvo potencijalnih vezivnih mesta za transkripcione faktore nije otkrila potencijalne aktivatore u A1, ali su u A2 detektovana dva mesta za FKHD (forkhead) od kojih je distalno mesto neophodno za ekspresiju *Sox3* transgena u CNS-u. U R1 detektovano je po jedno funkcionalno vezivno mesto za Vent1 i Vent2 proteine koji su deo BMP signalnog puta (Rastegar *et al.*, 1999; Friedle and Knochel, 2002; Peiffer *et al.*, 2005), i koji se eksprimiraju u delovima ektoderma koji ne pripadaju neuroektodermu. Prisustvo ovih vezivnih mesta u represorskom regionu ukida ekspresiju *Sox3* u ektodermu i ograničava je na neuroektoderm. Međutim, poređenja sekvenci ovog regiona žabe, miša i čoveka nisu pokazala značajnu homologiju, tako da regulatorni elementi ranije opisani kod *Sox3* miša (u genomskom regionu od 8,3 kb) 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. Tako se na nivou paralognih *Sox2* i *Sox3* gena mogu pratiti dva modela indukcije neurogeneze, sa indukcijom ekspresije *Sox3* mehanizmom inhibicije BMP signalnog puta i regulacijom *Sox2* koja 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 otvorenog okvira čitanja ovog gena. Za razliku od *Sox2* gena kičmenjaka, gde je prisutna velika evolutivna očuvanost regulatornih elemenata, u slučaju *Sox3* gena je jasno da regulatorni mehanizmi njegove aktivacije nisu evolutivno očuvani. Ovo dodatno otežava ispitivanje regulacije ekspresije humanog *SOX3* gena i njegove uloge u neurogenezi.

Naša istraživanja predstavljaju prvu analizu regulatornih elemenata humanog *SOX3* gena. Ona su ukazala da je regulacija aktivnosti humanog *SOX3* gena u NT2/D1 ćelijama veoma kompleksna i da uključuje različite regulatorne mehanizme. U regulaciju su uključeni kako opšti transkripcioni faktori, Sp1, USF i NF-Y (Kovacevic Grujicic et al., 2005; Krstic et al., 2007), tako i faktori specifični za pojedine faze razvića organizma ili pojedina tkiva, poput ovde opisanih članova TALE familije i transkripcionih faktora MAZ (Kovacevic Grujicic et al., 2008) i ZBP-89 (neobjavljeni rezultati). Očigledno je da je u regulaciju tkivne i vremenske specifične ekspresije *SOX3* gena uključeno više različitih mehanizama, čijom koordinacijom se postiže njegova precizna aktivacija.

Dodatno usložnjavanje predstavljaju mehanizmi regulacije aktivnosti *SOX3* gena tokom indukcije NT2/D1 ćelija retinoičnom kiselinom. Naši prethodni rezultati pokazuju da je više regulatornih modula uključeno u aktivaciju *SOX3* gena retinoičnom kiselinom (Kovacevic Grujicic et al., 2005; Mojsin et al., 2006; Krstic et al., 2007; Nikcevic et al., 2008) i da su medijatori aktivnosti retinoične kiseline nuklearni receptor RXR (Mojsin et al., 2006; Nikcevic et al., 2008), opšti transkripcioni faktor NF-Y (Krstic et al., 2007) kao i ovde opisani članovi TALE familije transkripcionih faktora. Ovi rezultati, zajedno sa otkrićem regulatornih modula preko kojih se ostvaruje aktivacija *Sox3* gena miša retinoičnom kiselinom, ukazuju na veliku složenost mehanizama uključenih u aktivaciju ovog gena retinoičnom kiselinom.

Ovako kompleksna regulacija ne predstavlja iznenađenje kada se zna da aktivacija *Sox3* gena predstavlja jedan od najranijih događaja neuralne diferencijacije, a da je istovremeno retinoična kiselina jedan od važnih morfogena embrionalnog razvića kičmenjaka.

Novi potencijalni nivo kompleksnosti regulacije ekspresije SOX proteina kičmenjaka predstavljaju regulatorni mehanizmi u koje su uključene mikroRNK (miRNK). Ovi mehanizmi uključuju posttranskripcione događaje: degradaciju iRNK i prekidanje translacije (Pillai, 2005). Najnovija istraživanja na *Sox2* genu miša pokazuju da se više ciljnih sekvenci za miRNK nalazi u kodirajućem regionu ovog gena i da su neke od njih evolutivno očuvane (Tay et al., 2008). Ekspresija miRNK koje prepoznaju ove sekvence, miR-134, miR-296 i miR-470, povećana je tokom diferencijacije mišijih embrionalnih matičnih ćelija indukovanih retinoičnom kiselinom (Tay et al., 2008). Vezivanje ovih miRNK za ciljne sekvence u *Sox2* genu dovodi do pada njegove ekspresije, što je jedan od ranih događaja neuralne diferencijacije ćelija (Tay et al., 2008). Mutacije u ciljnim sekvencama onemogućavaju aktivnost miRNK čime se sprečava represija *Sox2* i odlaže ulazak ćelija u proces diferencijacije (Tay et al., 2008). Dalja istraživanja će pokazati da li je ovaj vid regulacije karakterističan i za ostale *Sox* gene, uključujući i *SOX3*, i da li je ovaj mehanizam evolutivno očuvan kod čoveka.

6. ZAKLJUČCI

1. "DNase I footprinting" analiza promotora humanog *SOX3* gena, uz korišćenje DNK fragmenata koji obuhvataju region promotora od -21 do -427 i jedarnih proteina, neindukovanih i retinoičnom kiselinom indukovanih NT2/D1 ćelija, pokazala je prisustvo 7 zaštićenih regiona. Četiri regiona pokazuju zaštitu na oba lanca DNK: FP1 (-27/-59), FP2 (-62/-135), FP3 (-156/-197) i FP4 (-279/-342). Preostala tri regiona su zaštićena samo na jednom DNK lancu, i to FP5 na kodirajućem lancu na poziciji -214 do -222, i dva regiona na nekodirajućem lancu FP6 (-242/-260) i FP7 (-361/-395). Regioni FP1 i FP2 pokazuju intenzivniju zaštitu u reakcijama sa jedarnim proteinima NT2/D1 ćelija indukovanih retinoičnom kiselinom.

2. Analiza sekvenci zaštićenih regiona na prisustvo potencijalnih vezivnih mesta za transkripcione faktore ukazala je na prisustvo konsenzusnih mesta za vezivanje proteina iz familije TALE transkripcionih faktora u regionima FP2 i FP7. U regionu FP2 prisutno je konsenzusno mesto za vezivanje heterodimera transkripcionih aktivatora PBX i MEIS (5' TGATTGACAG 3') dok su dva vezivna mesta za transkripcioni represor TGIF (5' TGTC A 3'), detektovana u FP2 i FP7 regionima. Poređenje sekvenci FP2 regiona čoveka, šimpanze, makaka majmuna, pacova i miša pokazalo je da je konsenzusno mesto za vezivanje heterodimera PBX/MEIS evolutivno očuvano po nukleotidnom sastavu i poziciji u promotorskim regionima svih analiziranih ortologa.

3. Regulatorni element *SOX3* promotora koji sadrži PBX/MEIS konsenzusno mesto vezuje jedarne proteine NT2/D1 ćelija. Pokazano je da se u kompleksima formiranim sa jedarnim proteinima neindukovanih ćelija nalazi PBX protein, dok se u kompleksima koje formiraju jedarni proteini ćelija indukovanih retinoičnom kiselinom nalaze oba proteina, PBX i MEIS. Prisustvo MEIS proteina u kompleksima formiranim sa jedarnim proteinima indukovanih ćelija potvrđeno je i Western blot analizom.

4. *In vitro* sintetisani PBX1 i MEIS1 proteini pojedinačno se ne vezuju za konsenzusno mesto, dok prisustvo oba proteina dovodi do formiranja heterodimera na ovom kontrolnom elementu. Koimunoprecipitacija je pokazala da PBX1 i MEIS1 proteini interaguju i u odsustvu DNK, a afinitet za heterodimerne interakcije ovih proteina se povećava nakon indukcije retinoičnom kiselinom.

5. Mutaciona analiza regulatornog elementa pokazala je da konsenzusna sekvenca u FP2 regionu sadrži elemente neophodne za vezivanje PBX i MEIS proteina i potvrdila specifičnost njihovog vezivanja. Takođe, funkcionalni eseji su pokazali da mutacije ovog vezivnog mesta dovode do pada aktivnosti *SOX3* promotora.

6. Tokom indukcije NT2/D1 ćelija retinoičnom kiselinom ekspresija PBX1 i MEIS1 proteina se povećava i prati profil ekspresije *SOX3*. Pokazano je da povećan nivo ekspresije PBX1 i MEIS1 proteina dovodi do aktivacije *SOX3* gena. Reakcije smanjene elektroforetske pokretljivosti su pokazale da povećana ekspresija PBX1 i MEIS1 proteina dovodi do formiranja kompleksa jačeg intenziteta na konsenzusnom mestu u promotoru *SOX3* gena. Western blot analiza je ukazala da povećana ekspresija PBX1 i MEIS1 aktivira ekspresiju endogenog *SOX3* proteina, dok su funkcionalni eseji pokazali da povećanje ekspresije ovih proteina dovodi do aktivacije *SOX3* promotora. Svi ovi rezultati ukazuju da su PBX1 i MEIS1 proteini medijatori aktivacije *SOX3* gena retinoičnom kiselinom.

7. Vezivno mesto u FP7 regionu ostvaruje interakcije sa transkripcionim faktorom TGIF iz jedarnih proteina NT2/D1 ćelija, a mutacija ovog mesta dovodi do povećanja aktivnosti *SOX3* promotora. Povećan nivo ekspresije TGIF proteina dovodi do gubitka aktivnosti *SOX3* promotora. Tokom indukcije NT2/D1 ćelija retinoičnom kiselinom u periodu od 48h ekspresija TGIF proteina se smanjuje i ovakav profil ekspresije suprotan je profilu ekspresije *SOX3* proteina. Ovi rezultati ukazuju da transkripcioni factor TGIF ostvaruje svoju represorsku funkciju na *SOX3* promotoru preko konsenzusnog mesta u FP7 regionu.

7. LITERATURA

- Abramovich C, Shen WF, Pineault N, Imren S, Montpetit B, Largman C, Humphries RK. Functional cloning and characterization of a novel nonhomeodomain protein that inhibits the binding of PBX1-HOX complexes to DNA. *J Biol Chem* 2000;275:26172-7.
- Alberti L, Carniti C, Miranda C, Roccatto E, Pierotti MA. RET and NTRK1 proto-oncogenes in human diseases. *J Cell Physiol* 2003;195:168-86.
- Albrecht AN, Kornak U, Boddlich A, Suring K, Robinson PN, Stiege AC, Lurz R, Stricker S, Wanker EE, Mundlos S. A molecular pathogenesis for transcription factor associated poly-alanine tract expansions. *Hum Mol Genet* 2004;13:2351-9.
- Amiel J, Laudier B, Attie-Bitach T, Trang H, de Pontual L, Gener B, Trochet D, Etchevers H, Ray P, Simonneau M, Vekemans M, Munnich A, Gaultier C, Lyonnet S. Polyalanine expansion and frameshift mutations of the paired-like homeobox gene PHOX2B in congenital central hypoventilation syndrome. *Nat Genet* 2003;33:459-61.
- Andrews PW. Retinoic acid induces neuronal differentiation of a cloned human embryonal carcinoma cell line in vitro. *Dev Biol* 1984;103:285-93.
- Andrews PW. Human teratocarcinomas. *Biochim Biophys Acta* 1988;948:17-36.
- Andrews PW. Teratocarcinomas and human embryology: pluripotent human EC cell lines. Review article. *Apmis* 1998;106:158-67; discussion 67-8.
- Asahara H, Dutta S, Kao HY, Evans RM, Montminy M. Pbx-Hox heterodimers recruit coactivator-corepressor complexes in an isoform-specific manner. *Mol Cell Biol* 1999;19:8219-25.
- Avilion AA, Nicolis SK, Pevny LH, Perez L, Vivian N, Lovell-Badge R. Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. *Genes Dev* 2003;17:126-40.
- Azcoitia V, Aracil M, Martinez AC, Torres M. The homeodomain protein Meis1 is essential for definitive hematopoiesis and vascular patterning in the mouse embryo. *Dev Biol* 2005;280:307-20.
- Barr FG. Chromosomal translocations involving paired box transcription factors in human cancer. *Int J Biochem Cell Biol* 1997;29:1449-61.
- Bartholin L, Powers SE, Melhuish TA, Lasse S, Weinstein M, Wotton D. TGIF inhibits retinoid signaling. *Mol Cell Biol* 2006;26:990-1001.
- Beranger F, Mejean C, Moniot B, Berta P, Vandromme M. Muscle differentiation is antagonized by SOX15, a new member of the SOX protein family. *J Biol Chem* 2000;275:16103-9.
- Bergstrom DE, Young M, Albrecht KH, Eicher EM. Related function of mouse SOX3, SOX9, and SRY HMG domains assayed by male sex determination. *Genesis* 2000;28:111-24.
- Bernard P, Tang P, Liu S, Dewing P, Harley VR, Vilain E. Dimerization of SOX9 is required for chondrogenesis, but not for sex determination. *Hum Mol Genet* 2003;12:1755-65.
- Berthelsen J, Kilstrup-Nielsen C, Blasi F, Mavilio F, Zappavigna V. The subcellular localization of PBX1 and EXD proteins depends on nuclear import and export signals and is modulated by association with PREP1 and HTH. *Genes Dev* 1999;13:946-53.
- Berthelsen J, Zappavigna V, Mavilio F, Blasi F. Prep1, a novel functional partner of Pbx proteins. *Embo J* 1998;17:1423-33.
- Bertolino E, Reimund B, Wildt-Perinic D, Clerc RG. A novel homeobox protein which recognizes a TGT core and functionally interferes with a retinoid-responsive motif. *J Biol Chem* 1995;270:31178-88.

- Bischof LJ, Kagawa N, Moskow JJ, Takahashi Y, Iwamatsu A, Buchberg AM, Waterman MR. Members of the meis1 and pbx homeodomain protein families cooperatively bind a cAMP-responsive sequence (CRS1) from bovine CYP17. *J Biol Chem* 1998;273:7941-8.
- Bowles J, Schepers G, Koopman P. Phylogeny of the SOX family of developmental transcription factors based on sequence and structural indicators. *Dev Biol* 2000;227:239-55.
- Brais B, Bouchard JP, Xie YG, Rochefort DL, Chretien N, Tome FM, Lafreniere RG, Rommens JM, Uyama E, Nohira O, Blumen S, Korczyn AD, Heutink P, Mathieu J, Duranceau A, Codere F, Fardeau M, Rouleau GA. Short GCG expansions in the PABP2 gene cause oculopharyngeal muscular dystrophy. *Nat Genet* 1998;18:164-7.
- Brendolan A, Ferretti E, Salsi V, Moses K, Quaggin S, Blasi F, Cleary ML, Selleri L. A Pbx1-dependent genetic and transcriptional network regulates spleen ontogeny. *Development* 2005;132:3113-26.
- Brewster R, Lee J, Ruiz i Altaba A. Gli/Zic factors pattern the neural plate by defining domains of cell differentiation. *Nature* 1998;393:579-83.
- Bruch J, Schulz WA, Haussler J, Melzner I, Bruderlein S, Moller P, Kemmerling R, Vogel W, Hameister H. Delineation of the 6p22 amplification unit in urinary bladder carcinoma cell lines. *Cancer Res* 2000;60:4526-30.
- Brunelli S, Silva Casey E, Bell D, Harland R, Lovell-Badge R. Expression of Sox3 throughout the developing central nervous system is dependent on the combined action of discrete, evolutionarily conserved regulatory elements. *Genesis* 2003;36:12-24.
- Burglin TR. Analysis of TALE superclass homeobox genes (MEIS, PBC, KNOX, Iroquois, TGIF) reveals a novel domain conserved between plants and animals. *Nucleic Acids Res* 1997;25:4173-80.
- Bylund M, Andersson E, Novitsch BG, Muhr J. Vertebrate neurogenesis is counteracted by Sox1-3 activity. *Nat Neurosci* 2003;6:1162-8.
- Calvo KR, Knoepfler P, McGrath S, Kamps MP. An inhibitory switch derepressed by pbx, hox, and Meis/Prep1 partners regulates DNA-binding by pbx1 and E2a-pbx1 and is dispensable for myeloid immortalization by E2a-pbx1. *Oncogene* 1999;18:8033-43.
- Cameron FJ, Sinclair AH. Mutations in SRY and SOX9: testis-determining genes. *Hum Mutat* 1997;9:388-95.
- Capellini TD, Di Giacomo G, Salsi V, Brendolan A, Ferretti E, Srivastava D, Zappavigna V, Selleri L. Pbx1/Pbx2 requirement for distal limb patterning is mediated by the hierarchical control of Hox gene spatial distribution and Shh expression. *Development* 2006;133:2263-73.
- Chambon P. A decade of molecular biology of retinoic acid receptors. *Faseb J* 1996;10:940-54.
- Chang CP, Brocchieri L, Shen WF, Largman C, Cleary ML. Pbx modulation of Hox homeodomain amino-terminal arms establishes different DNA-binding specificities across the Hox locus. *Mol Cell Biol* 1996;16:1734-45.
- Chang CP, de Vivo I, Cleary ML. The Hox cooperativity motif of the chimeric oncoprotein E2a-Pbx1 is necessary and sufficient for oncogenesis. *Mol Cell Biol* 1997;17:81-8.
- Chang CP, Jacobs Y, Nakamura T, Jenkins NA, Copeland NG, Cleary ML. Meis proteins are major in vivo DNA binding partners for wild-type but not chimeric Pbx proteins. *Mol Cell Biol* 1997;17:5679-87.
- Chang CP, Shen WF, Rozenfeld S, Lawrence HJ, Largman C, Cleary ML. Pbx proteins display hexapeptide-dependent cooperative DNA binding with a subset of Hox proteins. *Genes Dev* 1995;9:663-74.

- Classon M, Harlow E. The retinoblastoma tumour suppressor in development and cancer. *Nat Rev Cancer* 2002;2:910-7.
- Collignon J, Sockanathan S, Hacker A, Cohen-Tannoudji M, Norris D, Rastan S, Stevanovic M, Goodfellow PN, Lovell-Badge R. A comparison of the properties of Sox-3 with Sry and two related genes, Sox-1 and Sox-2. *Development* 1996;122:509-20.
- Collins C, Rommens JM, Kowbel D, Godfrey T, Tanner M, Hwang SI, Polikoff D, Nonet G, Cochran J, Myambo K, Jay KE, Froula J, Cloutier T, Kuo WL, Yaswen P, Dairkee S, Giovanola J, Hutchinson GB, Isola J, Kallioniemi OP, Palazzolo M, Martin C, Ericsson C, Pinkel D, Albertson D, Li WB, Gray JW. Positional cloning of ZNF217 and NABC1: genes amplified at 20q13.2 and overexpressed in breast carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:8703-8.
- Connor F, Wright E, Denny P, Koopman P, Ashworth A. The Sry-related HMG box-containing gene Sox6 is expressed in the adult testis and developing nervous system of the mouse. *Nucleic Acids Res* 1995;23:3365-72.
- Darby IA, Bisucci T, Raghoenath S, Olsson J, Muscat GE, Koopman P. Sox18 is transiently expressed during angiogenesis in granulation tissue of skin wounds with an identical expression pattern to Flk-1 mRNA. *Lab Invest* 2001;81:937-43.
- Denny P, Swift S, Brand N, Dabhade N, Barton P, Ashworth A. A conserved family of genes related to the testis determining gene, SRY. *Nucleic Acids Res* 1992;20:2887.
- Dignam JD, Lebovitz RM, Roeder RG. Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei. *Nucleic Acids Res* 1983;11:1475-89.
- Dong C, Wilhelm D, Koopman P. Sox genes and cancer. *Cytogenet Genome Res* 2004;105:442-7.
- Dubin RA, Coward P, Lau YF, Ostrer H. Functional comparison of the *Mus musculus molossinus* and *Mus musculus domesticus* Sry genes. *Mol Endocrinol* 1995;9:1645-54.
- Dunn TL, Mynett-Johnson L, Wright EM, Hosking BM, Koopman PA, Muscat GE. Sequence and expression of Sox-18 encoding a new HMG-box transcription factor. *Gene* 1995;161:223-5.
- Featherstone MS, Baron A, Gaunt SJ, Mattei MG, Duboule D. Hox-5.1 defines a homeobox-containing gene locus on mouse chromosome 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988;85:4760-4.
- Ferretti E, Marshall H, Popperl H, Maconochie M, Krumlauf R, Blasi F. Segmental expression of Hoxb2 in r4 requires two separate sites that integrate cooperative interactions between Prep1, Pbx and Hox proteins. *Development* 2000;127:155-66.
- Ferretti E, Schulz H, Talarico D, Blasi F, Berthelsen J. The PBX-regulating protein PREP1 is present in different PBX-complexed forms in mouse. *Mech Dev* 1999;83:53-64.
- Freemantle SJ, Kerley JS, Olsen SL, Gross RH, Spinella MJ. Developmentally-related candidate retinoic acid target genes regulated early during neuronal differentiation of human embryonal carcinoma. *Oncogene* 2002;21:2880-9.
- Friedle H, Knochel W. Cooperative interaction of Xvent-2 and GATA-2 in the activation of the ventral homeobox gene Xvent-1B. *J Biol Chem* 2002;277:23872-81.
- Friedman RS, Bangur CS, Zasloff EJ, Fan L, Wang T, Watanabe Y, Kalos M. Molecular and immunological evaluation of the transcription factor SOX-4 as a lung tumor vaccine antigen. *J Immunol* 2004;172:3319-27.
- Frierson HF, Jr., El-Naggar AK, Welsh JB, Sapinoso LM, Su AI, Cheng J, Saku T, Moskaluk CA, Hampton GM. Large scale molecular analysis identifies genes with altered expression in salivary adenoid cystic carcinoma. *Am J Pathol* 2002;161:1315-23.

- Gasca S, Canizares J, De Santa Barbara P, Mejean C, Poulat F, Berta P, Boizet-Bonhoure B. A nuclear export signal within the high mobility group domain regulates the nucleocytoplasmic translocation of SOX9 during sexual determination. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:11199-204.
- Geerts D, Revet I, Jorritsma G, Schilderink N, Versteeg R. MEIS homeobox genes in neuroblastoma. *Cancer Lett* 2005;228:43-50.
- Geerts D, Schilderink N, Jorritsma G, Versteeg R. The role of the MEIS homeobox genes in neuroblastoma. *Cancer Lett* 2003;197:87-92.
- Gehring WJ, Qian YQ, Billeter M, Furukubo-Tokunaga K, Schier AF, Resendez-Perez D, Affolter M, Otting G, Wuthrich K. Homeodomain-DNA recognition. *Cell* 1994;78:211-23.
- Giese K, Kingsley C, Kirshner JR, Grosschedl R. Assembly and function of a TCR alpha enhancer complex is dependent on LEF-1-induced DNA bending and multiple protein-protein interactions. *Genes Dev* 1995;9:995-1008.
- Goodfellow PN, Lovell-Badge R. SRY and sex determination in mammals. *Annu Rev Genet* 1993;27:71-92.
- Goudet G, Delhalle S, Biemar F, Martial JA, Peers B. Functional and cooperative interactions between the homeodomain PDX1, Pbx, and Prepl factors on the somatostatin promoter. *J Biol Chem* 1999;274:4067-73.
- Graham JD, Hunt SM, Tran N, Clarke CL. Regulation of the expression and activity by progestins of a member of the SOX gene family of transcriptional modulators. *J Mol Endocrinol* 1999;22:295-304.
- Graves JA. Evolution of the mammalian Y chromosome and sex-determining genes. *J Exp Zool* 1998;281:472-81.
- Gubbay J, Collignon J, Koopman P, Capel B, Economou A, Munsterberg A, Vivian N, Goodfellow P, Lovell-Badge R. 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* 1990;346:245-50.
- Gubbay J, Vivian N, Economou A, Jackson D, Goodfellow P, Lovell-Badge R. Inverted repeat structure of the Sry locus in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89:7953-7.
- Gudas LJ. Retinoids and vertebrate development. *J Biol Chem* 1994;269:15399-402.
- Gure AO, Stockert E, Scanlan MJ, Keresztes RS, Jager D, Altorki NK, Old LJ, Chen YT. Serological identification of embryonic neural proteins as highly immunogenic tumor antigens in small cell lung cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:4198-203.
- Hamel BC, Smits AP, Otten BJ, van den Helm B, Ropers HH, Mariman EC. Familial X-linked mental retardation and isolated growth hormone deficiency: clinical and molecular findings. *Am J Med Genet* 1996;64:35-41.
- Hargrave M, Karunaratne A, Cox L, Wood S, Koopman P, Yamada T. The HMG box transcription factor gene Sox14 marks a novel subset of ventral interneurons and is regulated by sonic hedgehog. *Dev Biol* 2000;219:142-53.
- Harland R. Neural induction. *Curr Opin Genet Dev* 2000;10:357-62.
- Harley VR, Lovell-Badge R, Goodfellow PN. Definition of a consensus DNA binding site for SRY. *Nucleic Acids Res* 1994;22:1500-1.
- Hartmann C, Johnk L, Kitange G, Wu Y, Ashworth LK, Jenkins RB, Louis DN. Transcript map of the 3.7-Mb D19S112-D19S246 candidate tumor suppressor region on the long arm of chromosome 19. *Cancer Res* 2002;62:4100-8.
- Hawley SH, Wunnenberg-Stapleton K, Hashimoto C, Laurent MN, Watabe T, Blumberg BW, Cho KW. Disruption of BMP signals in embryonic *Xenopus* ectoderm leads to direct neural induction. *Genes Dev* 1995;9:2923-35.

- Herzig S, Fuzesi L, Knepel W. Heterodimeric Pbx-Prep1 homeodomain protein binding to the glucagon gene restricting transcription in a cell type-dependent manner. *J Biol Chem* 2000;275:27989-99.
- Hiraoka Y, Ogawa M, Sakai Y, Kido S, Aiso S. The mouse Sox5 gene encodes a protein containing the leucine zipper and the Q box. *Biochim Biophys Acta* 1998;1399:40-6.
- Hisa T, Spence SE, Rachel RA, Fujita M, Nakamura T, Ward JM, Devor-Henneman DE, Saiki Y, Kutsuna H, Tessarollo L, Jenkins NA, Copeland NG. Hematopoietic, angiogenic and eye defects in Meis1 mutant animals. *Embo J* 2004;23:450-9.
- Houldsworth J, Heath SC, Bosl GJ, Studer L, Chaganti RS. Expression profiling of lineage differentiation in pluripotential human embryonal carcinoma cells. *Cell Growth Differ* 2002;13:257-64.
- Huang H, Rastegar M, Bodner C, Goh SL, Rambaldi I, Featherstone M. MEIS C termini harbor transcriptional activation domains that respond to cell signaling. *J Biol Chem* 2005;280:10119-27.
- Huang W, Chung UI, Kronenberg HM, de Crombrughe B. 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* 2001;98:160-5.
- Huang W, Zhou X, Lefebvre V, de Crombrughe B. Phosphorylation of SOX9 by cyclic AMP-dependent protein kinase A enhances SOX9's ability to transactivate a Col2a1 chondrocyte-specific enhancer. *Mol Cell Biol* 2000;20:4149-58.
- Imoto I, Sonoda I, Yuki Y, Inazawa J. Identification and characterization of human PKNOX2, a novel homeobox-containing gene. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;287:270-6.
- Iwabuchi H, Sakamoto M, Sakunaga H, Ma YY, Carcangiu ML, Pinkel D, Yang-Feng TL, Gray JW. Genetic analysis of benign, low-grade, and high-grade ovarian tumors. *Cancer Res* 1995;55:6172-80.
- Jacobs Y, Schnabel CA, Cleary ML. Trimeric association of Hox and TALE homeodomain proteins mediates Hoxb2 hindbrain enhancer activity. *Mol Cell Biol* 1999;19:5134-42.
- Jacobson EM, Li P, Leon-del-Rio A, Rosenfeld MG, Aggarwal AK. Structure of Pit-1 POU domain bound to DNA as a dimer: unexpected arrangement and flexibility. *Genes Dev* 1997;11:198-212.
- Jaw TJ, You LR, Knoepfler PS, Yao LC, Pai CY, Tang CY, Chang LP, Berthelsen J, Blasi F, Kamps MP, Sun YH. Direct interaction of two homeoproteins, homothorax and extradenticle, is essential for EXD nuclear localization and function. *Mech Dev* 2000;91:279-91.
- Kamachi Y, Uchikawa M, Kondoh H. Pairing SOX off: with partners in the regulation of embryonic development. *Trends Genet* 2000;16:182-7.
- Kamachi Y, Uchikawa M, Tanouchi A, Sekido R, Kondoh H. Pax6 and SOX2 form a co-DNA-binding partner complex that regulates initiation of lens development. *Genes Dev* 2001;15:1272-86.
- Kamps MP, Murre C, Sun XH, Baltimore D. A new homeobox gene contributes the DNA binding domain of the t(1;19) translocation protein in pre-B ALL. *Cell* 1990;60:547-55.
- Kanai Y, Kanai-Azuma M, Noce T, Saido TC, Shiroishi T, Hayashi Y, Yazaki K. 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* 1996;133:667-81.
- Katoh Y, Katoh M. Comparative genomics on SOX2 orthologs. *Oncol Rep* 2005;14:797-800.
- Kelly LE, Carrel TL, Herman GE, El-Hodiri HM. Pbx1 and Meis1 regulate activity of the *Xenopus laevis* Zic3 promoter through a highly conserved region. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;344:1031-7.

- Kido S, Hiraoka Y, Ogawa M, Sakai Y, Yoshimura Y, Aiso S. Cloning and characterization of mouse mSox13 cDNA. *Gene* 1998;208:201-6.
- Kim R, Trubetskoy A, Suzuki T, Jenkins NA, Copeland NG, Lenz J. Genome-based identification of cancer genes by proviral tagging in mouse retrovirus-induced T-cell lymphomas. *J Virol* 2003;77:2056-62.
- Knoepfler PS, Calvo KR, Chen H, Antonarakis SE, Kamps MP. Meis1 and pKnox1 bind DNA cooperatively with Pbx1 utilizing an interaction surface disrupted in oncoprotein E2a-Pbx1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:14553-8.
- Knoepfler PS, Kamps MP. The Pbx family of proteins is strongly upregulated by a post-transcriptional mechanism during retinoic acid-induced differentiation of P19 embryonal carcinoma cells. *Mech Dev* 1997;63:5-14.
- Kovacevic Grujicic N, Mojsin M, Krstic A, Stevanovic M. Functional characterization of the human SOX3 promoter: identification of transcription factors implicated in basal promoter activity. *Gene* 2005;344:287-97.
- Kovacevic Grujicic N, Yokoyama K, Stevanovic M. Trans-activation of the human SOX3 promoter by MAZ in NT2/D1 cells. *Arch Biol Sci* 2008;60:379-87.
- Kovacevic-Grujicic N, Mojsin M, Djurovic J, Petrovic I, Stevanovic M. Comparison of promoter regions of SOX3, SOX14 and SOX18 orthologs in mammals. *DNA Seq* 2008;19:185-94.
- Krstic A, Mojsin M, Stevanovic M. Regulation of SOX3 gene expression is driven by multiple NF-Y binding elements. *Arch Biochem Biophys* 2007;467:163-73.
- Kuhlbrodt K, Herbarth B, Sock E, Hermans-Borgmeyer I, Wegner M. Sox10, a novel transcriptional modulator in glial cells. *J Neurosci* 1998;18:237-50.
- Kuo JS, Patel M, Gamse J, Merzdorf C, Liu X, Apekin V, Sive H. Opl: a zinc finger protein that regulates neural determination and patterning in *Xenopus*. *Development* 1998;125:2867-82.
- Laumonnier F, Ronce N, Hamel BC, Thomas P, Lespinasse J, Raynaud M, Paringaux C, Van Bokhoven H, Kalscheuer V, Fryns JP, Chelly J, Moraine C, Briault S. Transcription factor SOX3 is involved in X-linked mental retardation with growth hormone deficiency. *Am J Hum Genet* 2002;71:1450-5.
- Laurent A, Bihan R, Omilli F, Deschamps S, Pellerin I. PBX proteins: much more than Hox cofactors. *Int J Dev Biol* 2008;52:9-20.
- Lee CJ, Appleby VJ, Orme AT, Chan WI, Scotting PJ. Differential expression of SOX4 and SOX11 in medulloblastoma. *J Neurooncol* 2002;57:201-14.
- Lefebvre V, Dumitriu B, Penzo-Mendez A, Han Y, Pallavi B. Control of cell fate and differentiation by Sry-related high-mobility-group box (Sox) transcription factors. *Int J Biochem Cell Biol* 2007;39:2195-214.
- Lefebvre V, Huang W, Harley VR, Goodfellow PN, de Crombrughe B. SOX9 is a potent activator of the chondrocyte-specific enhancer of the pro alpha1(II) collagen gene. *Mol Cell Biol* 1997;17:2336-46.
- Lefebvre V, Li P, de Crombrughe B. 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* 1998;17:5718-33.
- Li M, Pevny L, Lovell-Badge R, Smith A. Generation of purified neural precursors from embryonic stem cells by lineage selection. *Curr Biol* 1998;8:971-4.
- Linker C, Stern CD. Neural induction requires BMP inhibition only as a late step, and involves signals other than FGF and Wnt antagonists. *Development* 2004;131:5671-81.
- Love JJ, Li X, Case DA, Giese K, Grosschedl R, Wright PE. Structural basis for DNA bending by the architectural transcription factor LEF-1. *Nature* 1995;376:791-5.

- Lu Q, Knoepfler PS, Scheele J, Wright DD, Kamps MP. Both Pbx1 and E2A-Pbx1 bind the DNA motif ATCAATCAA cooperatively with the products of multiple murine Hox genes, some of which are themselves oncogenes. *Mol Cell Biol* 1995;15:3786-95.
- Lumsden A, Krumlauf R. Patterning the vertebrate neuraxis. *Science* 1996;274:1109-15.
- Lustig B, Behrens J. The Wnt signaling pathway and its role in tumor development. *J Cancer Res Clin Oncol* 2003;129:199-221.
- Maeda R, Ishimura A, Mood K, Park EK, Buchberg AM, Daar IO. Xpbx1b and Xmeis1b play a collaborative role in hindbrain and neural crest gene expression in *Xenopus* embryos. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:5448-53.
- Malki S, Nef S, Notarnicola C, Thevenet L, Gasca S, Mejean C, Berta P, Poulat F, Boizet-Bonhoure B. Prostaglandin D2 induces nuclear import of the sex-determining factor SOX9 via its cAMP-PKA phosphorylation. *Embo J* 2005;24:1798-809.
- Manavathi B, Acconcia F, Rayala SK, Kumar R. An inherent role of microtubule network in the action of nuclear receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:15981-6.
- Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schutz G, Umesono K, Blumberg B, Kastner P, Mark M, Chambon P, Evans RM. The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* 1995;83:835-9.
- Mann RS, Chan SK. Extra specificity from extradenticle: the partnership between HOX and PBX/EXD homeodomain proteins. *Trends Genet* 1996;12:258-62.
- Manzanares M, Bel-Vialar S, Ariza-McNaughton L, Ferretti E, Marshall H, Maconochie MM, Blasi F, Krumlauf R. Independent regulation of initiation and maintenance phases of *Hoxa3* expression in the vertebrate hindbrain involve auto- and cross-regulatory mechanisms. *Development* 2001;128:3595-607.
- Mark M, Ghyselinck NB, Wendling O, Dupe V, Mascrez B, Kastner P, Chambon P. A genetic dissection of the retinoid signalling pathway in the mouse. *Proc Nutr Soc* 1999;58:609-13.
- Mead PE, Brivanlou IH, Kelley CM, Zon LI. BMP-4-responsive regulation of dorsal-ventral patterning by the homeobox protein Mix.1. *Nature* 1996;382:357-60.
- Melhuish TA, Wotton D. The interaction of the carboxyl terminus-binding protein with the Smad corepressor TGIF is disrupted by a holoprosencephaly mutation in TGIF. *J Biol Chem* 2000;275:39762-6.
- Melichar HJ, Narayan K, Der SD, Hiraoka Y, Gardiol N, Jeannot G, Held W, Chambers CA, Kang J. Regulation of gammadelta versus alphabeta T lymphocyte differentiation by the transcription factor SOX13. *Science* 2007;315:230-3.
- Mertin S, McDowall SG, Harley VR. The DNA-binding specificity of SOX9 and other SOX proteins. *Nucleic Acids Res* 1999;27:1359-64.
- Milech N, Kees UR, Watt PM. Novel alternative PBX3 isoforms in leukemia cells with distinct interaction specificities. *Genes Chromosomes Cancer* 2001;32:275-80.
- Mizuseki K, Kishi M, Matsui M, Nakanishi S, Sasai Y. *Xenopus* Zic-related-1 and Sox-2, two factors induced by chordin, have distinct activities in the initiation of neural induction. *Development* 1998;125:579-87.
- Moens CB, Selleri L. Hox cofactors in vertebrate development. *Dev Biol* 2006;291:193-206.
- Mojsin M, Grujicic NK, Nikcevic G, Krstic A, Savic T, Stevanovic M. Mapping of the RXRalpha binding elements involved in retinoic acid induced transcriptional activation of the human SOX3 gene. *Neurosci Res* 2006;56:409-18.
- Monica K, Galili N, Nourse J, Saltman D, Cleary ML. PBX2 and PBX3, new homeobox genes with extensive homology to the human proto-oncogene PBX1. *Mol Cell Biol* 1991;11:6149-57.

- Morais da Silva S, Hacker A, Harley V, Goodfellow P, Swain A, Lovell-Badge R. Sox9 expression during gonadal development implies a conserved role for the gene in testis differentiation in mammals and birds. *Nat Genet* 1996;14:62-8.
- Moskow JJ, Bullrich F, Huebner K, Daar IO, Buchberg AM. Meis1, a PBX1-related homeobox gene involved in myeloid leukemia in BXH-2 mice. *Mol Cell Biol* 1995;15:5434-43.
- Muenke M, Beachy PA. Genetics of ventral forebrain development and holoprosencephaly. *Curr Opin Genet Dev* 2000;10:262-9.
- Nakamura T, Jenkins NA, Copeland NG. Identification of a new family of Pbx-related homeobox genes. *Oncogene* 1996;13:2235-42.
- Nakata K, Nagai T, Aruga J, Mikoshiba K. Xenopus Zic3, a primary regulator both in neural and neural crest development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:11980-5.
- Nason-Burchenal K, Takle G, Pace U, Flynn S, Allopenna J, Martin P, George ST, Goldberg AR, Dmitrovsky E. Targeting the PML/RAR alpha translocation product triggers apoptosis in promyelocytic leukemia cells. *Oncogene* 1998;17:1759-68.
- Neph S, Tompa M. MicroFootPrinter: a tool for phylogenetic footprinting in prokaryotic genomes. *Nucleic Acids Res* 2006;34:W366-8.
- Neuteboom ST, Murre C. Pbx raises the DNA binding specificity but not the selectivity of antennapedia Hox proteins. *Mol Cell Biol* 1997;17:4696-706.
- Nikcevic G, Savic T, Kovacevic-Grujicic N, Stevanovic M. Up-regulation of the SOX3 gene expression by RA: characterization of the novel promoter- response element and the retinoid receptors involved. *J Neurochem* 2008;
- Nourse J, Mellentin JD, Galili N, Wilkinson J, Stanbridge E, Smith SD, Cleary ML. Chromosomal translocation t(1;19) results in synthesis of a homeobox fusion mRNA that codes for a potential chimeric transcription factor. *Cell* 1990;60:535-45.
- Nowling T, Bernadt C, Johnson L, Desler M, Rizzino A. The co-activator p300 associates physically with and can mediate the action of the distal enhancer of the FGF-4 gene. *J Biol Chem* 2003;278:13696-705.
- Osaki E, Nishina Y, Inazawa J, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Ohsugi M, Tezuka T, Yoshida M, Semba K. Identification of a novel Sry-related gene and its germ cell-specific expression. *Nucleic Acids Res* 1999;27:2503-10.
- Oulad-Abdelghani M, Chazaud C, Bouillet P, Sapin V, Chambon P, Dolle P. Meis2, a novel mouse Pbx-related homeobox gene induced by retinoic acid during differentiation of P19 embryonal carcinoma cells. *Dev Dyn* 1997;210:173-83.
- Peers B, Sharma S, Johnson T, Kamps M, Montminy M. The pancreatic islet factor STF-1 binds cooperatively with Pbx to a regulatory element in the somatostatin promoter: importance of the FPWMK motif and of the homeodomain. *Mol Cell Biol* 1995;15:7091-7.
- Peiffer DA, Von Bubnoff A, Shin Y, Kitayama A, Mochii M, Ueno N, Cho KW. A Xenopus DNA microarray approach to identify novel direct BMP target genes involved in early embryonic development. *Dev Dyn* 2005;232:445-56.
- Penkov D, Tanaka S, Di Rocco G, Berthelsen J, Blasi F, Ramirez F. Cooperative interactions between PBX, PREP, and HOX proteins modulate the activity of the alpha 2(V) collagen (COL5A2) promoter. *J Biol Chem* 2000;275:16681-9.
- Pennisi D, Gardner J, Chambers D, Hosking B, Peters J, Muscat G, Abbott C, Koopman P. Mutations in Sox18 underlie cardiovascular and hair follicle defects in ragged mice. *Nat Genet* 2000;24:434-7.
- Penzel R, Oschwald R, Chen Y, Tacke L, Grunz H. Characterization and early embryonic expression of a neural specific transcription factor xSOX3 in *Xenopus laevis*. *Int J Dev Biol* 1997;41:667-77.

- Pera MF, Reubinoff B, Trounson A. Human embryonic stem cells. *J Cell Sci* 2000;113 (Pt 1):5-10.
- Pevny L, Placzek M. SOX genes and neural progenitor identity. *Curr Opin Neurobiol* 2005;15:7-13.
- Pevny LH, Sockanathan S, Placzek M, Lovell-Badge R. A role for SOX1 in neural determination. *Development* 1998;125:1967-78.
- Pillai RS. MicroRNA function: multiple mechanisms for a tiny RNA? *Rna* 2005;11:1753-61.
- Poellinger L, Roeder RG. Octamer transcription factors 1 and 2 each bind to two different functional elements in the immunoglobulin heavy-chain promoter. *Mol Cell Biol* 1989;9:747-56.
- Popperl H, Featherstone MS. Identification of a retinoic acid response element upstream of the murine Hox-4.2 gene. *Mol Cell Biol* 1993;13:257-65.
- Popperl H, Rikhof H, Chang H, Haffter P, Kimmel CB, Moens CB. IZARUS is a novel pbx gene that globally mediates hox gene function in zebrafish. *Mol Cell* 2000;6:255-67.
- Pratt MA, Langston AW, Gudas LJ, McBurney MW. Retinoic acid fails to induce expression of Hox genes in differentiation-defective murine embryonal carcinoma cells carrying a mutant gene for alpha retinoic acid receptor. *Differentiation* 1993;53:105-13.
- Pusch C, Hustert E, Pfeifer D, Sudbeck P, Kist R, Roe B, Wang Z, Balling R, Blin N, Scherer G. The SOX10/Sox10 gene from human and mouse: sequence, expression, and transactivation by the encoded HMG domain transcription factor. *Hum Genet* 1998;103:115-23.
- Qin P, Haberbusch JM, Soprano KJ, Soprano DR. Retinoic acid regulates the expression of PBX1, PBX2, and PBX3 in P19 cells both transcriptionally and post-translationally. *J Cell Biochem* 2004;92:147-63.
- Qin P, Haberbusch JM, Zhang Z, Soprano KJ, Soprano DR. Pre-B cell leukemia transcription factor (PBX) proteins are important mediators for retinoic acid-dependent endodermal and neuronal differentiation of mouse embryonal carcinoma P19 cells. *J Biol Chem* 2004;279:16263-71.
- Quandt K, Frech K, Karas H, Wingender E, Werner T. MatInd and MatInspector: new fast and versatile tools for detection of consensus matches in nucleotide sequence data. *Nucleic Acids Res* 1995;23:4878-84.
- Rastegar S, Friedle H, Frommer G, Knochel W. Transcriptional regulation of Xvent homeobox genes. *Mech Dev* 1999;81:139-49.
- Raverot G, Lejeune H, Kotlar T, Pugeat M, Jameson JL. X-linked sex-determining region Y box 3 (SOX3) gene mutations are uncommon in men with idiopathic oligoazoospermic infertility. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:4146-8.
- Remenyi A, Lins K, Nissen LJ, Reinbold R, Scholer HR, Wilmanns M. Crystal structure of a POU/HMG/DNA ternary complex suggests differential assembly of Oct4 and Sox2 on two enhancers. *Genes Dev* 2003;17:2048-59.
- Rex M, Orme A, Uwanogho D, Tointon K, Wigmore PM, Sharpe PT, Scotting PJ. Dynamic expression of chicken Sox2 and Sox3 genes in ectoderm induced to form neural tissue. *Dev Dyn* 1997;209:323-32.
- Rhee JW, Arata A, Selleri L, Jacobs Y, Arata S, Onimaru H, Cleary ML. Pbx3 deficiency results in central hypoventilation. *Am J Pathol* 2004;165:1343-50.
- Rieckhof GE, Casares F, Ryoo HD, Abu-Shaar M, Mann RS. Nuclear translocation of extradenticle requires homothorax, which encodes an extradenticle-related homeodomain protein. *Cell* 1997;91:171-83.
- Rizzoti K, Brunelli S, Carmignac D, Thomas PQ, Robinson IC, Lovell-Badge R. SOX3 is required during the formation of the hypothalamo-pituitary axis. *Nat Genet* 2004;36:247-55.

- Rizzoti K, Lovell-Badge R. SOX3 activity during pharyngeal segmentation is required for craniofacial morphogenesis. *Development* 2007;134:3437-48.
- Roessler E, Muenke M. Holoprosencephaly: a paradigm for the complex genetics of brain development. *J Inherit Metab Dis* 1998;21:481-97.
- Rogers CD, Archer TC, Cunningham DD, Grammer TC, Casey EM. Sox3 expression is maintained by FGF signaling and restricted to the neural plate by Vent proteins in the *Xenopus* embryo. *Dev Biol* 2008;313:307-19.
- Ryoo HD, Marty T, Casares F, Affolter M, Mann RS. Regulation of Hox target genes by a DNA bound Homothorax/Hox/Extradenticle complex. *Development* 1999;126:5137-48.
- Saitoh T, Katoh M. Expression of human SOX18 in normal tissues and tumors. *Int J Mol Med* 2002;10:339-44.
- Salemi M, Romano C, Ragusa L, Di Vita G, Salluzzo R, Oteri I, Trovato ML, Caraci F, Nicoletti F, Bosco P. A new 6-bp SOX-3 polyalanine tract deletion does not segregate with mental retardation. *Genet Test* 2007;11:124-7.
- Salero E, Hatten ME. Differentiation of ES cells into cerebellar neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:2997-3002.
- Salzberg A, Elias S, Nachaliel N, Bonstein L, Henig C, Frank D. A Meis family protein caudalizes neural cell fates in *Xenopus*. *Mech Dev* 1999;80:3-13.
- Sattler HP, Lensch R, Rohde V, Zimmer E, Meese E, Bonkhoff H, Retz M, Zwergel T, Bex A, Stoeckle M, Wullich B. Novel amplification unit at chromosome 3q25-q27 in human prostate cancer. *Prostate* 2000;45:207-15.
- Savare J, Bonneaud N, Girard F. SUMO represses transcriptional activity of the *Drosophila* SoxNeuro and human Sox3 central nervous system-specific transcription factors. *Mol Biol Cell* 2005;16:2660-9.
- Savelieva E, Belair CD, Newton MA, DeVries S, Gray JW, Waldman F, Reznikoff CA. 20q gain associates with immortalization: 20q13.2 amplification correlates with genome instability in human papillomavirus 16 E7 transformed human uroepithelial cells. *Oncogene* 1997;14:551-60.
- Scaffidi P, Bianchi ME. Spatially precise DNA bending is an essential activity of the sox2 transcription factor. *J Biol Chem* 2001;276:47296-302.
- Schepers GE, Bullejos M, Hosking BM, Koopman P. Cloning and characterisation of the Sry-related transcription factor gene Sox8. *Nucleic Acids Res* 2000;28:1473-80.
- Schepers GE, Teasdale RD, Koopman P. Twenty pairs of sox: extent, homology, and nomenclature of the mouse and human sox transcription factor gene families. *Dev Cell* 2002;3:167-70.
- Schlegel J, Stumm G, Scherthan H, Bocker T, Zirngibl H, Ruschoff J, Hofstadter F. Comparative genomic in situ hybridization of colon carcinomas with replication error. *Cancer Res* 1995;55:6002-5.
- Schlierf B, Friedrich RP, Roerig P, Felsberg J, Reifenberger G, Wegner M. Expression of SoxE and SoxD genes in human gliomas. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2007;33:621-30.
- Schlierf B, Ludwig A, Klenovsek K, Wegner M. Cooperative binding of Sox10 to DNA: requirements and consequences. *Nucleic Acids Res* 2002;30:5509-16.
- Schnabel CA, Selleri L, Jacobs Y, Warnke R, Cleary ML. Expression of Pbx1b during mammalian organogenesis. *Mech Dev* 2001;100:131-5.
- Selleri L, Depew MJ, Jacobs Y, Chanda SK, Tsang KY, Cheah KS, Rubenstein JL, O'Gorman S, Cleary ML. Requirement for Pbx1 in skeletal patterning and programming chondrocyte proliferation and differentiation. *Development* 2001;128:3543-57.

- Selleri L, DiMartino J, van Deursen J, Brendolan A, Sanyal M, Boon E, Capellini T, Smith KS, Rhee J, Popperl H, Grosveld G, Cleary ML. The TALE homeodomain protein Pbx2 is not essential for development and long-term survival. *Mol Cell Biol* 2004;24:5324-31.
- Shanmugam K, Green NC, Rambaldi I, Saragovi HU, Featherstone MS. PBX and MEIS as non-DNA-binding partners in trimeric complexes with HOX proteins. *Mol Cell Biol* 1999;19:7577-88.
- Sharma M, Sun Z. 5'TG3' interacting factor interacts with Sin3A and represses AR-mediated transcription. *Mol Endocrinol* 2001;15:1918-28.
- Shen JH, Ingraham HA. Regulation of the orphan nuclear receptor steroidogenic factor 1 by Sox proteins. *Mol Endocrinol* 2002;16:529-40.
- Shen WF, Montgomery JC, Rozenfeld S, Moskow JJ, Lawrence HJ, Buchberg AM, Largman C. AbdB-like Hox proteins stabilize DNA binding by the Meis1 homeodomain proteins. *Mol Cell Biol* 1997;17:6448-58.
- Shen WF, Rozenfeld S, Kwong A, Kom ves LG, Lawrence HJ, Largman C. HOXA9 forms triple complexes with PBX2 and MEIS1 in myeloid cells. *Mol Cell Biol* 1999;19:3051-61.
- Sinclair AH, Berta P, Palmer MS, Hawkins JR, Griffiths BL, Smith MJ, Foster JW, Frischauf AM, Lovell-Badge R, Goodfellow PN. A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature* 1990;346:240-4.
- Solomon NM, Nouri S, Warne GL, Lagerstrom-Fermer M, Forrest SM, Thomas PQ. Increased gene dosage at Xq26-q27 is associated with X-linked hypopituitarism. *Genomics* 2002;79:553-9.
- Steelman S, Moskow JJ, Muzynski K, North C, Druck T, Montgomery JC, Huebner K, Daar IO, Buchberg AM. Identification of a conserved family of Meis1-related homeobox genes. *Genome Res* 1997;7:142-56.
- Stevanovic M. Modulation of SOX2 and SOX3 gene expression during differentiation of human neuronal precursor cell line NTERA2. *Mol Biol Rep* 2003;30:127-32.
- Stevanovic M, Lovell-Badge R, Collignon J, Goodfellow PN. SOX3 is an X-linked gene related to SRY. *Hum Mol Genet* 1993;2:2013-8.
- Stolt CC, Schlierf A, Lommes P, Hillgartner S, Werner T, Kosian T, Sock E, Kessar N, Richardson WD, Lefebvre V, Wegner M. SoxD proteins influence multiple stages of oligodendrocyte development and modulate SoxE protein function. *Dev Cell* 2006;11:697-709.
- Streit A, Stern CD. Neural induction. A bird's eye view. *Trends Genet* 1999;15:20-4.
- Studer M, Popperl H, Marshall H, Kuroiwa A, Krumlauf R. Role of a conserved retinoic acid response element in rhombomere restriction of Hoxb-1. *Science* 1994;265:1728-32.
- Subramaniam N, Cairns W, Okret S. Glucocorticoids repress transcription from a negative glucocorticoid response element recognized by two homeodomain-containing proteins, Pbx and Oct-1. *J Biol Chem* 1998;273:23567-74.
- Subramaniam N, Champion J, Rafter I, Okret S. Cross-talk between glucocorticoid and retinoic acid signals involving glucocorticoid receptor interaction with the homeodomain protein Pbx1. *Biochem J* 2003;370:1087-95.
- Sudbeck P, Scherer G. Two independent nuclear localization signals are present in the DNA-binding high-mobility group domains of SRY and SOX9. *J Biol Chem* 1997;272:27848-52.
- Sudbeck P, Schmitz ML, Baeuerle PA, Scherer G. Sex reversal by loss of the C-terminal transactivation domain of human SOX9. *Nat Genet* 1996;13:230-2.

- Suh E, Chen L, Taylor J, Traber PG. A homeodomain protein related to caudal regulates intestine-specific gene transcription. *Mol Cell Biol* 1994;14:7340-51.
- Swift GH, Liu Y, Rose SD, Bischof LJ, Steelman S, Buchberg AM, Wright CV, MacDonald RJ. An endocrine-exocrine switch in the activity of the pancreatic homeodomain protein PDX1 through formation of a trimeric complex with PBX1b and MRG1 (MEIS2). *Mol Cell Biol* 1998;18:5109-20.
- Takamatsu N, Kanda H, Tsuchiya I, Yamada S, Ito M, Kabeno S, Shiba T, Yamashita S. A gene that is related to SRY and is expressed in the testes encodes a leucine zipper-containing protein. *Mol Cell Biol* 1995;15:3759-66.
- Tanabe Y, Jessell TM. Diversity and pattern in the developing spinal cord. *Science* 1996;274:1115-23.
- Tanaka S, Kamachi Y, Tanouchi A, Hamada H, Jing N, Kondoh H. Interplay of SOX and POU factors in regulation of the Nestin gene in neural primordial cells. *Mol Cell Biol* 2004;24:8834-46.
- Taniguchi K, Hiraoka Y, Ogawa M, Sakai Y, Kido S, Aiso S. Isolation and characterization of a mouse SRY-related cDNA, mSox7. *Biochim Biophys Acta* 1999;1445:225-31.
- Tay Y, Zhang J, Thomson AM, Lim B, Rigoutsos I. MicroRNAs to Nanog, Oct4 and Sox2 coding regions modulate embryonic stem cell differentiation. *Nature* 2008;
- Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998;282:1145-7.
- Thorsteinsdottir U, Kroon E, Jerome L, Blasi F, Sauvageau G. Defining roles for HOX and MEIS1 genes in induction of acute myeloid leukemia. *Mol Cell Biol* 2001;21:224-34.
- Tomioka M, Nishimoto M, Miyagi S, Katayanagi T, Fukui N, Niwa H, Muramatsu M, Okuda A. Identification of Sox-2 regulatory region which is under the control of Oct-3/4-Sox-2 complex. *Nucleic Acids Res* 2002;30:3202-13.
- Toresson H, Parmar M, Campbell K. Expression of Meis and Pbx genes and their protein products in the developing telencephalon: implications for regional differentiation. *Mech Dev* 2000;94:183-7.
- Tropepe V, Hitoshi S, Sirard C, Mak TW, Rossant J, van der Kooy D. Direct neural fate specification from embryonic stem cells: a primitive mammalian neural stem cell stage acquired through a default mechanism. *Neuron* 2001;30:65-78.
- Tsuda M, Takahashi S, Takahashi Y, Asahara H. Transcriptional co-activators CREB-binding protein and p300 regulate chondrocyte-specific gene expression via association with Sox9. *J Biol Chem* 2003;278:27224-9.
- Uchikawa M, Kamachi Y, Kondoh H. Two distinct subgroups of Group B Sox genes for transcriptional activators and repressors: their expression during embryonic organogenesis of the chicken. *Mech Dev* 1999;84:103-20.
- Ueda R, Yoshida K, Kawakami Y, Kawase T, Toda M. Immunohistochemical analysis of SOX6 expression in human brain tumors. *Brain Tumor Pathol* 2004;21:117-20.
- van de Wetering M, Oosterwegel M, van Norren K, Clevers H. Sox-4, an Sry-like HMG box protein, is a transcriptional activator in lymphocytes. *Embo J* 1993;12:3847-54.
- Wagner K, Mincheva A, Korn B, Lichter P, Popperl H. Pbx4, a new Pbx family member on mouse chromosome 8, is expressed during spermatogenesis. *Mech Dev* 2001;103:127-31.
- Wallis MC, Waters PD, Delbridge ML, Kirby PJ, Pask AJ, Grutzner F, Rens W, Ferguson-Smith MA, Graves JA. Sex determination in platypus and echidna: autosomal location of SOX3 confirms the absence of SRY from monotremes. *Chromosome Res* 2007;15:949-59.

- Wang Y, Yin L, Hillgartner FB. The homeodomain proteins PBX and MEIS1 are accessory factors that enhance thyroid hormone regulation of the malic enzyme gene in hepatocytes. *J Biol Chem* 2001;276:23838-48.
- Waskiewicz AJ, Rikhof HA, Hernandez RE, Moens CB. Zebrafish Meis functions to stabilize Pbx proteins and regulate hindbrain patterning. *Development* 2001;128:4139-51.
- Wegner M. From head to toes: the multiple facets of Sox proteins. *Nucleic Acids Res.* 1999;27:1409-20.
- Weiss J, Meeks JJ, Hurley L, Raverot G, Frassetto A, Jameson JL. Sox3 is required for gonadal function, but not sex determination, in males and females. *Mol Cell Biol* 2003;23:8084-91.
- Weiss J, Meeks JJ, Hurley L, Raverot G, Frassetto A, Jameson JL. Sox3 is required for gonadal function, but not sex determination, in males and females. *Mol. Cell. Biol.* 2003;23:8084-91.
- Weiss MA. Floppy SOX: mutual induced fit in hmg (high-mobility group) box-DNA recognition. *Mol Endocrinol* 2001;15:353-62.
- Werner MH, Huth JR, Gronenborn AM, Clore GM. Molecular basis of human 46X,Y sex reversal revealed from the three-dimensional solution structure of the human SRY-DNA complex. *Cell* 1995;81:705-14.
- Whiting J, Marshall H, Cook M, Krumlauf R, Rigby PW, Stott D, Allemann RK. Multiple spatially specific enhancers are required to reconstruct the pattern of Hox-2.6 gene expression. *Genes Dev* 1991;5:2048-59.
- Wicking C, Smyth I, Bale A. The hedgehog signalling pathway in tumorigenesis and development. *Oncogene* 1999;18:7844-51.
- Williams TM, Williams ME, Innis JW. Range of HOX/TALE superclass associations and protein domain requirements for HOXA13:MEIS interaction. *Dev Biol* 2005;277:457-71.
- Wilson M, Koopman P. Matching SOX: partner proteins and co-factors of the SOX family of transcriptional regulators. *Curr Opin Genet Dev* 2002;12:441-6.
- Wissmuller S, Kosian T, Wolf M, Finsch M, Wegner M. The high-mobility-group domain of Sox proteins interacts with DNA-binding domains of many transcription factors. *Nucleic Acids Res* 2006;34:1735-44.
- Wodarz A, Nusse R. Mechanisms of Wnt signaling in development. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1998;14:59-88.
- Won J, Yim J, Kim TK. Sp1 and Sp3 recruit histone deacetylase to repress transcription of human telomerase reverse transcriptase (hTERT) promoter in normal human somatic cells. *J Biol Chem* 2002;277:38230-8.
- Wong J, Farlie P, Holbert S, Lockhart P, Thomas PQ. Polyalanine expansion mutations in the X-linked hypopituitarism gene SOX3 result in aggresome formation and impaired transactivation. *Front Biosci* 2007;12:2085-95.
- Wood HB, Episkopou V. Comparative expression of the mouse Sox1, Sox2 and Sox3 genes from pre-gastrulation to early somite stages. *Mech Dev* 1999;86:197-201.
- Woods KS, Cundall M, Turton J, Rizotti K, Mehta A, Palmer R, Wong J, Chong WK, Al-Zyoud M, El-Ali M, Otonkoski T, Martinez-Barbera JP, Thomas PQ, Robinson IC, Lovell-Badge R, Woodward KJ, Dattani MT. Over- and underdosage of SOX3 is associated with infundibular hypoplasia and hypopituitarism. *Am J Hum Genet* 2005;76:833-49.
- Wotton D, Knoepfler PS, Laherty CD, Eisenman RN, Massague J. The Smad transcriptional corepressor TGIF recruits mSin3. *Cell Growth Differ* 2001;12:457-63.
- Wotton D, Lo RS, Swaby LA, Massague J. Multiple modes of repression by the Smad transcriptional corepressor TGIF. *J Biol Chem* 1999;274:37105-10.

- Wright E, Hargrave MR, Christiansen J, Cooper L, Kun J, Evans T, Gangadharan U, Greenfield A, Koopman P. The Sry-related gene Sox9 is expressed during chondrogenesis in mouse embryos. *Nat Genet* 1995;9:15-20.
- Wright EM, Snopek B, Koopman P. Seven new members of the Sox gene family expressed during mouse development. *Nucleic Acids Res* 1993;21:744.
- Wunderle VM, Critcher R, Ashworth A, Goodfellow PN. Cloning and characterization of SOX5, a new member of the human SOX gene family. *Genomics* 1996;36:354-8.
- Xia Y, Papalopulu N, Vogt PK, Li J. The oncogenic potential of the high mobility group box protein Sox3. *Cancer Res* 2000;60:6303-6.
- Yang X, Zhou Y, Barcarse EA, O'Gorman S. Altered neuronal lineages in the facial ganglia of Hoxa2 mutant mice. *Dev Biol* 2008;314:171-88.
- Yang Y, Hwang CK, D'Souza UM, Lee SH, Junn E, Mouradian MM. Three-amino acid extension loop homeodomain proteins Meis2 and TGIF differentially regulate transcription. *J Biol Chem* 2000;275:20734-41.
- Yuan H, Corbi N, Basilico C, Dailey L. Developmental-specific activity of the FGF-4 enhancer requires the synergistic action of Sox2 and Oct-3. *Genes Dev* 1995;9:2635-45.
- Zafarana G, Gillis AJ, van Gurp RJ, Olsson PG, Elstrodt F, Stoop H, Millan JL, Oosterhuis JW, Looijenga LH. Coamplification of DAD-R, SOX5, and EK11 in human testicular seminomas, with specific overexpression of DAD-R, correlates with reduced levels of apoptosis and earlier clinical manifestation. *Cancer Res* 2002;62:1822-31.
- Zappone MV, Galli R, Catena R, Meani N, De Biasi S, Mattei E, Tiveron C, Vescovi AL, Lovell-Badge R, Ottolenghi S, Nicolis SK. 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* 2000;127:2367-82.
- Zhang X, Friedman A, Heaney S, Purcell P, Maas RL. Meis homeoproteins directly regulate Pax6 during vertebrate lens morphogenesis. *Genes Dev* 2002;16:2097-107.
- Zile MH. Function of vitamin A in vertebrate embryonic development. *J Nutr* 2001;131:705-8.
- Zorn AM, Barish GD, Williams BO, Lavender P, Klymkowsky MW, Varmus HE. Regulation of Wnt signaling by Sox proteins: XSox17 alpha/beta and XSox3 physically interact with beta-catenin. *Mol Cell* 1999;4:487-98.





РД 20093



300153485

COBISS ©