

UNIVERZITET U BEOGRADU
BIOLOŠKI FAKULTET

Vladanka M. Vuković

**Epigenetički mehanizmi regulacije ekspresije
humanog gena *SOX3* i gena faktora
pluripotentnosti (*SOX2*, *OCT4* i *NANOG*)
tokom ranih faza neuralne diferencijacije
NTera2/D1 ćelija**

Doktorska disertacija

Beograd, 2020

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF BIOLOGY

Vladanka M. Vuković

Epigenetic mechanisms regulating the expression of human *SOX3* gene and pluripotency factors (*SOX2*, *OCT4* and *NANOG*) during the early stages of NTera2/D1 cells neural differentiation

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2020

MENTORI:

dr Marija Mojsin, viši naučni saradnik
Univerzitet u Beogradu,
Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo

akademik Milena Stevanović, naučni savetnik
Univerzitet u Beogradu,
Institut za molekularnu genetiku i genetičko
inženjerstvo
redovni profesor
Univerzitet u Beogradu - Biološki fakultet

KOMISIJA:

dr Marija Mojsin, viši naučni saradnik
Univerzitet u Beogradu,
Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo

akademik Milena Stevanović, naučni savetnik
Univerzitet u Beogradu,
Institut za molekularnu genetiku i genetičko
inženjerstvo
redovni profesor
Univerzitet u Beogradu - Biološki fakultet

dr Goran Brajušković, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu,
Biološki fakultet

Datum odbrane _____

Zahvalnica

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

Veliku zahvalnost dugujem svom mentoru Dr Mariji Mojsin za dragocenu pomoć koju mi je pružila prilikom izrade ove disertacije. Maki, hvala ti na svim zasađenim ćelijama, razvijenim blotovima, sugestijama, hvala za dopuštenje da budem svoja u pisanju, hvala za svaku mentorsku i prijateljsku reč.

Zahvaljujem se akademiku Mileni Stevanović na pruženoj prilici da svoju doktorsku disertaciju realizujem u Laboratoriji za humanu molekularnu genetiku pod njenim mentorstvom. Posebno hvala na tome što je svoje ogromno istraživačko iskustvo nesebično podelila i dala mi prostora da se razvijam i učim.

Dr Goranu Brajuškoviću zahvaljujem što je prihvatio da bude član komisije i pomogne u kritičkoj analizi i oceni ove disertacije. Hvala i na tome što je, tako jedinstven i svoj, uspeo da razbije povremeno sivilo studiranja.

Labu 04 hvala na pomoći u rešavanju eksperimentalnih problema i na lepoj atmosferi. Drago mi je što sam postala deo jednog kolektiva čije članove povezuje ne samo kolegijalnost već i prijateljstvo.

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

Posebno se zahvaljujem porodici iz koje sam potekla, kao i porodici čiji sam sada deo. Hvala za razumevanje i ljubav.

NASLOV: Epigenetički mehanizmi regulacije ekspresije humanog gena *SOX3* i gena faktora pluripotentnosti (*SOX2*, *OCT4* i *NANOG*) tokom ranih faza neuralne diferencijacije NTera2/D1 ćelija

SAŽETAK

Geni *SOX1* i *SOX3* i geni faktori pluripotentnosti (*SOX2*, *OCT4* i *NANOG*) predstavljaju ključne aktere u procesima održavanja pluripotentnosti, ćelijskog opredeljivanja i diferencijacije. Precizno koordinisana aktivnost ovih gena neophodna je za pravilan tok humane neuralne diferencijacije. U ovoj doktorskoj disertaciji analizirani su ekspresioni profili i epigenetički mehanizmi regulacije ekspresije pomenutih gena u ranim fazama neuralne diferencijacije NTera2/D1 ćelija indukovane retinoičnom kiselinom.

U ovom model sistemu *in vitro* neuralne diferencijacije detektovane su dinamične izmene u ekspresionim profilima gena *SOX1* i *SOX3* i gena faktora pluripotentnosti (*SOX2*, *OCT4* i *NANOG*) tokom ranih faza neuralne diferencijacije. Pokazano je da se ekspresija gena *SOX1* i *SOX3* aktivira odmah nakon indukcije neuralne diferencijacije ovih ćelija, čime je potvrđena njihova uloga ranih neuralnih markera. Ekspresija gena *SOX2*, *OCT4* i *NANOG*, koji formiraju jezgro regulatorne mreže odgovorne za održavanje pluripotentnosti, smanjuje se tokom inicijacije neuralne diferencijacije i izlaska NTera2/D1 ćelija iz stanja pluripotentnosti na osnovu čega je zaključeno da signali koji indukuju neuralnu diferencijaciju već u početnim stadijumima dovode do intenzivnih promena u „molekularnom miljeu“ ćelije.

U analizi epigenetičkih mehanizama uključenih u regulaciju ekspresije ispitivanih gena praćeni su metilacija DNK i dinamika izmene histonskih posttranslacionih modifikacija na njihovim regulatornim regionima, sa posebnim osvrtom na regulaciju ekspresije gena *SOX3*. Metodom metilacija-specifičnog PCR-a pokazano je da su promotori gena *SOX1* i *SOX3* hipometilovani kako u nediferenciranim NTera2/D1 ćelijama, tako i u ćelijama čija je neuralna diferencijacija indukovana retinoičnom kiselinom. Metodom bisulfitnog pirosekvenciranja DNK, koja predstavlja zlatni standard u merenju stepena metilacije, potvrđena je hipometilacija jednog od dva CpG ostrva u okviru promotora gena *SOX3* čime je potvrđeno da metilacija DNK nije mehanizam regulacije ekspresije ovog gena u ranim fazama neuralne diferencijacije NTera2/D1 ćelija.

Metodom hromatinske imunoprecipitacije analizirani su profili odabranih histonskih posttranslacionih modifikacija na regulatornim regionima gena *SOX3* i *SOX1* kao i gena faktora pluripotentnosti (*SOX2*, *OCT4* i *NANOG*). Pokazano je da su izmene u depoziciji aktivirajućih histonskih markera H3K4me3 i H2B-acetil na regulatornim regionima gena *SOX3* u korelaciji sa indukcijom ekspresije ovog gena u ranim fazama neuralne diferencijacije NTera2/D1 ćelija. Inicijacija neuralne diferencijacije praćena je smanjenjem prisustva H3K4me3 i H2B-acetil markera

na promotoru gena *SOX2*, dok nijedna od analiziranih histonskih modifikacija nije u korelaciji sa detektovanim ekspresionim profilom gena *SOX1*. *In silico* analizom sekvenci gena *SOX1* i *SOX3* pokazano je da su njihovi promotorski regioni u H1 liniji humanih embrionalnih matičnih ćelija bogati histonskim markerima tipičnim za gene sa slabom transkripcionom aktivnošću i bivalentnim promotorima, dok je promotor gena *SOX2* obeležen aktivirajućim histonskim modifikacijama. Navedeni rezultati ukazali su na značajne razlike u epigenetičkoj kontroli ekspresije gena članova *SOXB1* familije, uprkos postojanju međusobne funkcionalne redundantnosti.

U nastavku istraživanja detektovana je smanjena depozicija aktivirajućih histonskih markera H3K4me3, H2BK5ac i H2BK120ac na promotorima gena *OCT4* i *NANOG*, koja je u korelaciji sa represijom transkripcije ovih gena u ranim faza neuralne diferencijacije NTera2/D1 ćelija. Zaključeno je da izmene u histonskim markerima na regulatornim regionima gena faktora pluripotentnosti prethode izmenama u metilaciji DNK i predstavljaju primarni odgovor ćelija na signale koji indukuju neuralnu diferencijaciju.

Istraživanja prikazana u ovoj doktorskoj disertaciji dala su značajan doprinos rasvetljavanju epigenetičkih mehanizama regulacije ekspresije gena neophodnih za inicijaciju i progresiju procesa neurogeneze.

Ključne reči: *SOX3*, *SOX1*, *SOX2*, *OCT4*, *NANOG*, epigenetika, metilacija DNK, histonske modifikacije, NTera2/D1 ćelije, neuralna diferencijacija

Naučna oblast: Biologija

Uža naučna oblast: Molekularna biologija

TITLE: Epigenetic mechanisms regulating the expression of human *SOX3* gene and pluripotency factors (*SOX2*, *OCT4* and *NANOG*) during the early stages of NTera2/D1 cells neural differentiation

ABSTRACT

Human genes *SOX1* and *SOX3*, together with pluripotency factors (*SOX2*, *OCT4* and *NANOG*), have key roles in pluripotency maintenance, cell specification and differentiation and they act in a coordinate manner to regulate process of human neurogenesis. This doctoral dissertation provides an insight into the expression profiles and epigenetic regulation of these genes during the early phases of retinoic acid-induced neural differentiation of NTera2/D1 cells.

In this *in vitro* model system of human neurogenesis we have demonstrated that expression profiles of *SOX3* and *SOX1* genes and pluripotency factors (*SOX2*, *OCT4* and *NANOG*) are highly dynamic. It is shown that retinoic acid activates expression of *SOX1* and *SOX3*, confirming their roles as early neural markers in vertebrates. Expression of *SOX2*, *OCT4* and *NANOG*, which constitute core pluripotency regulatory circuitry, is reduced during the course of neural differentiation, suggesting that response to differentiation-inducing stimuli is followed by fast and intensive changes in cell transcriptome.

For the analyses of epigenetic mechanisms acting on regulatory regions of *SOX1* and *SOX3* genes and pluripotency factors, DNA methylation and histone modifications profiles were examined, with special emphasis on *SOX3* gene regulation. Using methylation-specific PCR it is shown that *SOX1* and *SOX3* gene promoters are hypomethylated in both undifferentiated NTera2/D1 cells and cells induced with retinoic acid. Bisulphite sequencing of the CpG island II in the promoter of *SOX3* gene further confirmed that DNA methylation is not a mechanism governing regulation of *SOX3* activity during the early stages of NTera2/D1 cell differentiation.

Selected histone posttranslational modifications profiles on the regulatory regions of *SOX1* and *SOX3* genes and pluripotency factors were analyzed using chromatin immunoprecipitation. Changes in abundance of active H3K4me3 and H2B-acetyl marks on *SOX3* regulatory regions are correlated with transcriptional activation of this gene. Furthermore, it is demonstrated that initiation of neural differentiation is accompanied by the decrease in H3K4me3 and H2B-acetyl marks on the promoter of *SOX2* gene, while none of the analyzed histone modifications was correlated with previously detected *SOX1* expression profile. *In silico* analyses demonstrated that histone profiles on the promoter regions of *SOX1* and *SOX3* genes in H1 human embryonal stem cells corresponds to bivalent genes with low transcriptional activity, while *SOX2* gene promoter is enriched with activating histone marks. Obtained results have demonstrated important differences in the epigenetic mechanisms regulating the expression of *SOXB1* family members, despite the existence of their functional redundancy.

Furthermore, detected silencing of *OCT4* and *NANOG* during the early phases of neural differentiation of NTERA2/D1 cells is shown to be associated with reduced deposition of activating H3K4me3, H2BK5ac and H2BK120ac marks on the promoters of these genes. These results suggested that the early response of pluripotency genes *OCT4* and *NANOG* to the differentiation-inducing stimuli is mediated by dynamic changes in chromatin marks, while DNA methylation is acquired in the later stages of neurogenesis.

Results presented in this doctoral dissertation elucidate the role of epigenetic mechanisms in the regulation of key factors that control initiation and progression of human neurogenesis.

Key words: *SOX3*, *SOX1*, *SOX2*, *OCT4*, *NANOG*, epigenetics, DNA methylation, histone modifications, NTERA2/D1 cells, neural differentiation

Scientific field: Biology

Scientific subfield: Molecular biology

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. SOX GENI	2
1.2. GEN SOX3	5
1.2.1. Struktura gena SOX3	5
1.2.2. Ekspresija i funkcije proteina SOX3	5
1.3. GEN SOX1	9
1.3.1. Struktura gena SOX1	9
1.3.2. Ekspresija i funkcije proteina SOX1	9
1.4. GEN SOX2	10
1.4.1. Struktura gena SOX2	10
1.4.2. Funkcije i ekspresija gena SOX2	11
1.5. GEN OCT4	14
1.6. GEN NANOG	15
1.7. ULOGA GENA SOX2, OCT4 I NANOG U ODRŽAVANJU PLURIPOTENTOSTI I ODREĐIVANJU SUDBINE ČELIJA	16
1.8. SIGNALNI PUT RETINOIČNE KISELINE	18
1.9. NT2/D1 ČELIJE	22
1.10. ULOGA GENA SOXB1 GRUPE U REGULACIJI PROCESA NEURALNE DIFERENCIJACIJE	25
1.11. EPIGENETIČKI MEHANIZMI REGULACIJE GENSKE EKSPRESIJE	28
1.11.1. Modifikacije molekula DNK	29
1.11.2. Histonske modifikacije	32
1.11.3. Nekodirajući molekuli RNK	34
2. CILJEVI RADA	36
3. MATERIJAL I METODE	37
3.1. EKSPERIMENTALNI MATERIJAL	37
3.1.1. NT2/D1 ćelijska linija	37
3.1.2. Antitela korišćena u ovom radu	37

3.1.3. Oligonukleotidi korišćeni u ovom radu	38
3.1.4. Komercijalni kitovi	40
3.1.5. Kompjuterski programi i baze podataka	40
3.2. EKSPERIMENTALNE METODE	41
3.2.1. Izolacija ukupnih ćelijskih proteina	41
3.2.2. Merenje koncentracije proteina po Bradfordu	42
3.2.3. Imunološka detekcija proteina (Western blot)	42
3.2.4. Imunofluorescentna citohemijska analiza	42
3.2.5. Izolacija ukupne RNK	43
3.2.6. Oslobođanje totalne RNK od ostataka genomske DNK	43
3.2.7. Sinteza komplementarne DNK (cDNK)	44
3.2.8. Semi-kvantitativni RT-PCR	44
3.2.9. Kvantitativni PCR u realnom vremenu (qPCR)	44
3.2.10. Izolacija genomske DNK	45
3.2.11. Bisulfitna konverzija genomske DNK	45
3.2.12. In silico analiza promotora humanog gena SOX3	46
3.2.13. Bisulfitno pirosekvenciranje (BSP)	46
3.2.14. Metilacija-specifičan PCR (MSP)	48
3.2.15. Hromatinska imunoprecipitacija (ChIP)	49
3.2.16. ChIP-qPCR	52
3.2.17. Statistička analiza	53
4. REZULTATI	54
4.1. Analiza ekspresije humanog gena SOX3 tokom ranih faza neuralne diferencijacije NT2/D1 ćelija	54
4.2. Analiza prisustva CpG ostrva u promotorskom regionu humanog gena SOX3	56
4.3. Analiza metilacionog statusa promotora humanog gena SOX3 tokom ranih faza neuralne diferencijacije NT2/D1 ćelija	57
4.4. Analiza profila modifikacija histona 3 (H3) na humanom genu SOX3 tokom ranih faza neuralne diferencijacije NT2/D1 ćelija	60
4.5. Analiza profila modifikacija histona 2B (H2B) na humanom genu SOX3 tokom ranih faza neuralne diferencijacije NT2/D1 ćelija	62
4.6. Analiza ekspresije humanog gena SOX1 tokom ranih faza neuralne diferencijacije NT2/D1 ćelija	65

4.7. Analiza metilacionog statusa promotora humanog gena <i>SOX1</i> tokom ranih faza neuralne diferencijacije NT2/D1 ćelija	66
4.8. Analiza profila modifikacija histona 3 (H3) i histona 2B (H2B) na humanom genu <i>SOX1</i> tokom ranih faza neuralne diferencijacije NT2/D1 ćelija	68
4.9. Analiza ekspresije humanog gena <i>SOX2</i> tokom ranih faza neuralne diferencijacije NT2/D1 ćelija	70
4.10. Analiza profila modifikacija histona 3 (H3) i histona 2B (H2B) na humanom genu <i>SOX2</i> tokom ranih faza neuralne diferencijacije NT2/D1 ćelija	71
4.11. Analiza ekspresije proteina OCT4 i NANOG tokom ranih faza neuralne diferencijacije NT2/D1 ćelija	73
4.12. Analiza profila modifikacija histona 3 (H3) i histona 2B (H2B) na humanom genu <i>OCT4</i> tokom ranih faza neuralne diferencijacije NT2/D1 ćelija	76
4.13. Analiza profila modifikacija histona 3 (H3) i histona 2B (H2B) na humanom genu <i>NANOG</i> tokom ranih faza neuralne diferencijacije NT2/D1 ćelija	78
4.14. <i>In silico</i> analiza odabranih histonskih modifikacija na humanim genima <i>SOX1</i> i <i>SOX3</i> i genima faktorima pluripotentnosti (<i>SOX2</i> , <i>OCT4</i> , <i>NANOG</i>) u H1 liniji humanih embrionalnih matičnih ćelija	80
5. DISKUSIJA	84
5.1. Dinamika ekspresije gena <i>SOX1</i> i <i>SOX3</i> i gena faktora pluripotentnosti (<i>SOX2</i> , <i>OCT4</i> , <i>NANOG</i>) u ranim fazama neuralne diferencijacije NT2/D1 ćelija indukovane retinoičnom kiselinom	84
5.2. Metilacija DNK kao mehanizam regulacije ekspresije <i>SOXB1</i> gena u ranim fazama neuralne diferencijacije NT2/D1 ćelija	86
5.3. Posttranslacione modifikacije histona kao mehanizam regulacije ekspresije <i>SOXB1</i> gena u ranim fazama neuralne diferencijacije NT2/D1 ćelija	89
5.4. Razlike u regulaciji ekspresije <i>SOXB1</i> gena u ranim fazama neuralne diferencijacije NT2/D1 ćelija	93
5.5. Epigenetička regulacija ekspresije gena <i>OCT4</i> i <i>NANOG</i> u ranim fazama neuralne diferencijacije NT2/D1 ćelija	95
6. ZAKLJUČCI	98

7. LITERATURA	99
8. PRILOZI	1
ИЗЈАВА О АУТОРСТВУ	6
ИЗЈАВА О КОРИШЋЕЊУ	8

Skraćenice:

a.k. – aminokiselina

bp – bazni parovi

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

CNS – centralni nervni sistem

ChIP – hromatinska imunoprecipitacija, eng. *chromatine immunoprecipitation*

DNK – dezoksiribonukleinska kiselina

dNTP – dezoksiribunokleotid

EKĆ – embrionalne karcinomske ćelije

EMĆ – embrionalne matične ćelije

H1 – histon 1

H3 – histon 3

H2B – histon 2B

H3K4m3 – trimetilacija lizina 4 na histonu 3

H3K27me3 – trimetilacija lizina 27 na histonu 3

H3K79me2 – dimetilacija lizina 79 na histonu 3

H2BK5ac – acetilacija lizina 5 na histonu 2B

H2BK16ac – acetilacija lizina 16 na histonu 2B

H2BK120ac – acetilacija lizina 120 na histonu 2B

iRNK – informaciona RNK

miRNK – mikro RNK

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

ncRNK – nekodirajuća RNK, eng. *noncoding RNA*

PCR – reakcija lančanog umnožavanja, eng. *Polymerase Chain Reaction*

PTM – posttranslaciona modifikacija

RK – retinoična kiselina

RNK – ribonukleinska kiselina

SD – standardna devijacija

TSS – start transkripcije, eng. *transcription start site*

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

1. UVOD

Neurogeneza predstavlja proces nastanka i oblikovanja nervnog sistema koji je precizno kontrolisan nizom kompleksnih mehanizama koji deluju kako tokom embriogeneze tako i u adultnom nervnom sistemu. Učesnici u ovim složenim regulatornim mrežama su brojni regulatorni proteini, komponentne signalnih puteva i epigenetički mehanizmi, koji stupaju u međusobne interakcije i, uz integraciju signala iz spoljašnje sredine, omogućavaju pravilnu, vremenski i prostorno koordinisanu progresiju procesa neuralne diferencijacije. Decenije istraživanja u ovoj oblasti rezultovale su razvojem pouzdanih *in vitro* i *in vivo* model sistema koji su istraživačima omogućili delimičan uvid u proces neurogeneze. Međutim, uprkos obilju podataka, ova oblast i dalje predstavlja izazov za savremenu nauku, budući da su mnoga pitanja i dalje bez odgovora. Među faktorima neophodnim za inicijaciju procesa neuralne diferencijacije prepoznati su geni članovi *SOXB1* (eng. *Sry-related HMG Box*) grupe gena, koji zajedno sa *OCT4* (eng. *Octamer-binding transcription factor 4*) i *NANOG* regulišu balans u održavanju stanja pluripotencnosti matičnih ćelija i inicijaciji procesa opredeljivanja i diferencijacije ćelija.

Predmet istraživanja ove doktorske disertacije je epigenetička regulacija ekspresije gena *SOX1* i *SOX3* kao i gena faktora pluripotencnosti (*SOX2*, *OCT4* i *NANOG*) u ranim fazama *in vitro* humane neuralne diferencijacije. U istraživanjima je korišćen *in vitro* model sistem humane neuralne diferencijacije – humane pluripotencne NTera2/D1 (NT2/D1) ćelije čija je neuralna diferencijacija indukovana retinoičnom kiselinom.

U prvom segmentu uvodnog dela ove teze opisani su geni *SOXB1* grupe, njihovo otkriće i karakterizacija, kao i ekspresija tokom embriogeneze, sa posebnim osvrtom na njihovu ulogu u razviću nervnog sistema. Dat je i kraći pregled patoloških stanja koja nastaju kao posledica narušene funkcije pomenutih gena. U nastavku je dat pregled literaturnih podataka o genima *OCT4* i *NANOG*, koji su, zajedno sa genom *SOX2*, posmatrani u svetlu njihove uloge u procesu održavanja pluripotencnosti.

U drugom segmentu uvodnog dela teze izloženi su dostupni podaci o signalnom putu retinoične kiseline i detaljnije je opisana indukcija neuralne diferencijacije NT2/D1 ćelija retinoičnom kiselinom kao model sistem za proučavanje humane *in vitro* neuralne diferencijacije. U nastavku, izneti su literaturni podaci koji ukazuju na značaj *SOXB1* gena u procesu neuralne diferencijacije, sa posebnim akcentom na mehanizme preko kojih ovi geni ostvaruju svoje uloge.

Imajući u vidu centralno pitanje koje je postavljeno na početku istraživanja u okviru ove doktorske disertacije: „Koji su epigenetički mehanizmi kontrole gena *SOXB1* i gena *OCT4* i *NANOG* u inicijalnim fazama neuralne diferencijacije?“, poslednji segment uvodnog dela posvećen je upravo epigenetičkoj kontroli genske ekspresije. Opisani su glavni epigenetički mehanizmi – modifikacije DNK, u prvom redu metilacija, i kovalentne modifikacije histona, odnosno histonski kod, sa kratkim osvrtom na uloge nekodirajućih molekula RNK u regulaciji genske ekspresije. Posebna pažnja posvećena je ulozi epigenetike u procesu opredeljivanja i diferencijacije matičnih ćelija ka neuralnim progenitorima i zrelim neuronima.

1.1. SOX GENI

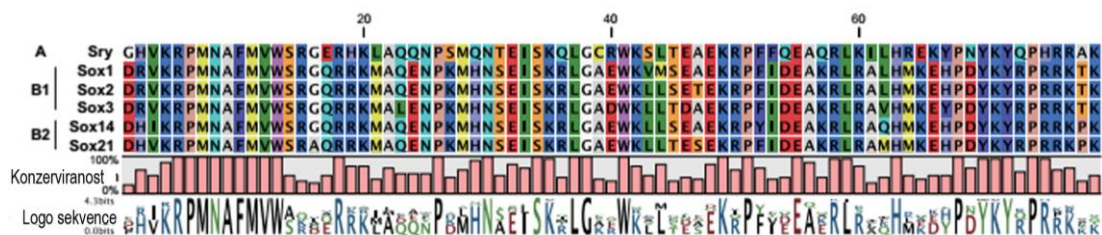
Gen *Sry/SRY*, opisan 1990. godine kao ključni faktor u determinaciji muškog pola, prvi je otkriveni član *SOX* genske familije (Sinclair *et al.*, 1990). Ostali *SOX* transkripcioni regulatori identifikovani su na osnovu visoke homologije u HMG boks (eng. *High Mobility Group*) domenu, DNK-vezujućem domenu *SOX* proteina (Gubbay *et al.*, 1990). Do danas je identifikovano 20 članova ove genske familije kod čoveka i miša (Bowles *et al.*, 2000). *SOX* proteini imaju važne uloge u procesima razvića, održavanja pluripotentnosti matičnih ćelija, ćelijskog opredeljivanja i diferencijacije, održavanja tkivne homeostaze i regeneracije (Kiefer, 2007). Narušena ekspresija i/ili funkcija ovih proteina tokom embriogeneze dovodi do teških urođenih sindroma, a u adultnom razviću do različitih patofizioloških stanja, u prvom redu maligne transformacije (pregledi dati u (Wegner, 1999, Dong *et al.*, 2004, Wegner, 2010, Kamachi & Kondoh, 2013, Abdelalim *et al.*, 2014, Hou *et al.*, 2017)). *SOX* proteini svoje uloge regulatora transkripcije ostvaruju vezivanjem za konsenzusnu DNK sekvencu – ATTGTT, i srodne motive, preko svog DNK-vezujućeg domena – HMG boksa koji interaguje sa malim žljebom DNK zavojnice, uzrokujući njegovo širenje i savijanje molekula DNK ka velikom žljebu (Remenyi *et al.*, 2003, Badis *et al.*, 2009, Kondoh & Kamachi, 2010).

Na osnovu aminokiselinske sekvence HMG boksa, *SOX* proteini sisara klasifikovani su u osam grupa, od A – H (**Tabela 1**) (Bowles *et al.*, 2000, Kamachi & Kondoh, 2013). *SOX* proteini, članovi iste grupe, kod sisara pokazuju visoku očuvanost u aminokiselinskoj (a.k.) sekvenci i izvan HMG boksa, kao i sličnosti u organizaciji proteinskih domena (Bowles *et al.*, 2000, Schepers *et al.*, 2002). Zbog sličnosti u strukturi i ekspresionim profilima, između članova iste grupe javlja se funkcionalna redundantnost, koja se ogleda u njihovoj sposobnosti da, u odsustvu jednog od članova grupe, nadomeste njene funkcije (Uchikawa *et al.*, 1999, Miyagi *et al.*, 2004). Ova biološka pojava značajno otežava praćenje efekata izostanka ili smanjenja funkcije pojedinačnih *SOX* proteina usled kompenzatornog efekta koji se ostvaruje aktivnošću drugih proteina, članova iste grupe.

Grupa	Proteini
A	SRY
B	SOX1, SOX2, SOX3 (podgrupa SOXB1)
	SOX14, SOX21 (podgrupa SOXB2)
C	SOX4, SOX11, SOX12
D	SOX5, SOX6, SOX13
E	SOX8, SOX9, SOX10
F	SOX7, SOX17, SOX18
G	SOX15
H	SOX30

Tabela 1. Podela proteina SOX familije. Preuzeto i izmenjeno iz (*Lefebvre et al., 2007*).

Dok grupi SOXA pripada isključivo SRY, članovi grupe B podeljeni su u 2 podgrupe, SOXB1 i SOXB2 (Bowles *et al.*, 2000). SOXB1 podgrupu čine SOX1, SOX2 i SOX3 (Bowles *et al.*, 2000). N-terminalni domeni ovih proteina su kratki, na njih se nastavljaju DNK-vezujući HMG boks domeni a duge C-terminalne sekvence sadrže transaktivacione domene (Kamachi *et al.*, 1998). Proteini SOX14 i SOX21, koji pripadaju SOXB2 podgrupi, sa članovima SOXB1 grupe, pored očuvanosti HMG boksa (**Slika 1**), dele očuvanost kratkih aminokiselinskih sekvenci na C-terminusu koje su označene kao sekvence homologne za B grupu (eng. *B homology group*). SOX14 i SOX21, međutim, u okviru svojih C-terminusa poseduju transrepresorski domen, pa su na osnovu toga proteini SOXB grupe podeljeni na aktivatore (SOXB1) i represore (SOXB2) transkripcije (Uchikawa *et al.*, 1999). Ova podela SOXB proteina na aktivatore i represore transkripcije (Uchikawa *et al.*, 1999) dovedena je u pitanje rezultatima novijih istraživanja. Naime, pokazano je da ektopična ekspresija proteina SOX14 u HeLa ćelijama povećava aktivnost CDKNaA/p21^{Waf1/Cip1} promotora i ekspresiju p21 proteina, što ukazuje na aktivatorsku ulogu ovog proteina (Stanisavljevic *et al.*, 2017). Takođe, u studiji Makridesa i saradnika na transgenim miševima pokazano je da SOX14 i SOX21 imaju različite biološke funkcije i deluju na različite ciljne gene tokom embrionalnog razvića (Makrides *et al.*, 2018). SOXB proteini predominantno imaju funkcije u određivanju i regulaciji neuronalnog fenotipa (Collignon *et al.*, 1996, Uchikawa *et al.*, 1999).



Slika 1. Poređenje sekvenci HMG boksa proteina SRY i proteina SOXB grupe miša. Nivo očuvanosti a.k. sekvenci je prikazan na liniji ispod sekvenci za svaku a.k. i iznosi od 0 do 100%. Preuzeto i izmenjeno iz (Kamachi & Kondoh, 2013)).

Proteini članovi SOXC, SOXE i SOXF grupa imaju sličnu strukturnu organizaciju, dužina im je 300-500 a.k. i poseduju C-terminalne transaktivacione domene (Bowles *et al.*, 2000). SOXC grupu (SOX4, SOX11 i SOX12) čine transkripcioni regulatori uključeni u razviće skeleta (Lefebvre & Bhattaram, 2016), oka i nervnog sistema kičmenjaka (Dy *et al.*, 2008, Pillai-Kastoori *et al.*, 2015), dok su članovi SOXE grupe (SOX8, SOX9 i SOX10) (Stolt & Wegner, 2010) eksprimirani u ranim fazama razvića perifernog nervnog sistema (PNS) i na kasnijim stadijumima razvića centralnog nervnog sistema (CNS) (pregled u (Weider & Wegner, 2017)). SOX9 ima ključne uloge u hondrogenezi (Lefebvre & de Crombrughe, 1998), diferencijaciji Sertolijevih ćelija (De Santa Barbara *et al.*, 1998), razviću folikula dlake (Vidal *et al.*, 2005), mrežnjače (Poche *et al.*, 2008), pluća (Perl *et al.*, 2005), pankreasa (Seymour *et al.*, 2007), srca (Lincoln *et al.*, 2007) i bubrega (Reginensi *et al.*, 2011), dok je SOX10 značajan faktor u procesu diferencijacije melanocita (Mollaaghababa & Pavan, 2003).

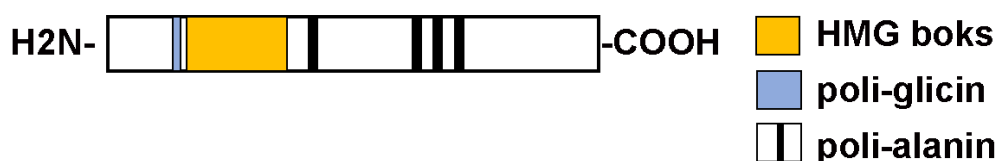
SOX7, SOX17 i SOX18, koji čine SOXF grupu, predstavljaju transkripcione regulatore sa ključnim ulogama u razviću kardiovaskularnog sistema (pregledi u (Francois *et al.*, 2010, Lilly *et al.*, 2017)). Do sada opisane funkcije SOXD proteina, kojima pripadaju SOX5, SOX6 i SOX13, uključuju regulaciju hondrogeneze, gliogeneze, melanogeneze, eritropoeze kao i razvoj neuralne kreste (pregledi u (Lefebvre, 2010, Ji & Kim, 2016)). O ulogama članova SOXG (SOX15) i SOXH (SOX30) grupa još uvek se malo zna. Literaturni podaci ukazuju da *Sox15*, pored *Sox1* i *Sox3*, može funkcionalno zameniti gen *Sox2* u mišjim embrionalnim matičnim ćelijama (Niwa *et al.*, 2016), ali je neophodna dalja analiza potencijalne uloge ovog gena u procesima održavanja pluripotentnosti. U novijim studijama pokazana je uloga SOX15 u održavanju identiteta humanih primordijalnih germinativnih ćelija (Pierson Smela *et al.*, 2019), dok je SOX30 okarakterisan kao važan faktor u procesu spermatogeneze (Han *et al.*, 2020). Izmenjena ekspresija ovih proteina detektovana je u različitim tipovima maligniteta (Thu *et al.*, 2014, Han, Liu, Jiang, *et al.*, 2015, Han, Liu, Xiao, *et al.*, 2015).

Izmenjena ekspresija *SOX* gena povezana je sa nastankom, progresijom i širenjem brojnih tipova maligniteta, što ih čini dobrim dijagnostičkim i prognostičkim markerima, kao i potencijalnim „metama“ različitih terapijskih pristupa (pregledi dati u (Higashijima & Kanki, 2019, Kumar & Mistri, 2019, Liang *et al.*, 2019, Mehta *et al.*, 2019)).

1.2. GEN SOX3

1.2.1. Struktura gena SOX3

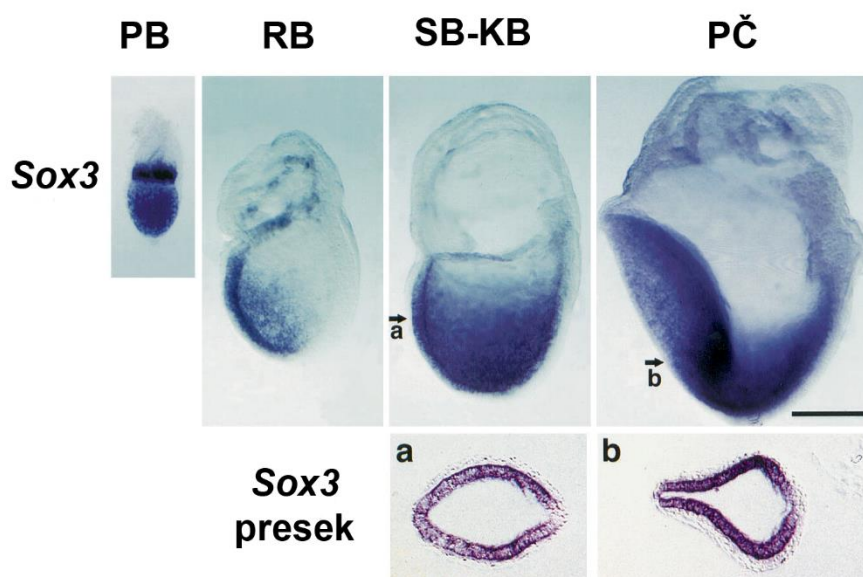
Humani gen *SOX3* (eng. *Sry-related HMG-box containing gene 3*) otkriven je i okarakterisan 1993. godine (Stevanovic *et al.*, 1993). Ovaj član *SOXB1* genske familije poseduje jedan egzon i lociran je u evolutivno visoko očuvanom regionu hromozoma X, na poziciji Xq27.1 (Stevanovic *et al.*, 1993, Graves, 1998, Katoh & Miyata, 1999). Protein kodiran ovim genom sadrži kratak N-terminalni domen sastavljen od 66 a.k., DNK-vezujući HMG boks domen dug 79 a.k. i C-terminalni region dug 229 a.k. koji sadrži 4 polialaninska trakta i ima transaktivatorsku ulogu (Stevanovic *et al.*, 1993, Kamachi *et al.*, 1998). Shematski prikaz strukture SOX3 proteina dat je na **Slici 2**. *SOX3* predstavlja najbližeg „srodnika“ gena *SRY*, sa kojim deli oko 90% homologije u a.k. sekvencama HMG boksa (Foster & Graves, 1994, Bowles *et al.*, 2000, Stevanovic, 2003, Graves, 2006). Evolutivne studije polnih hromozoma kao i komparativna analiza njihovih sekvenci omogućile su postavljanje hipoteze prema kojoj je gen *SRY* nastao tokom rane evolucije sisara mutacijom koja je dovela do sticanja nove funkcije (eng. *gain-of-function mutation*) proto-Y alela *SOX3*. Smatra se da je ova mutacija aktivirala ekspresiju proto-Y *SOX3* alela, što je rezultovalo pojavom novog vida determinacije pola kod placentarnih sisara (Foster & Graves, 1994, Graves, 2006).



Slika 2. Shematski prikaz strukture SOX3 proteina kičmenjaka. Preuzeto i izmenjeno iz (Collignon *et al.*, 1996).

1.2.2. Ekspresija i funkcije proteina SOX3

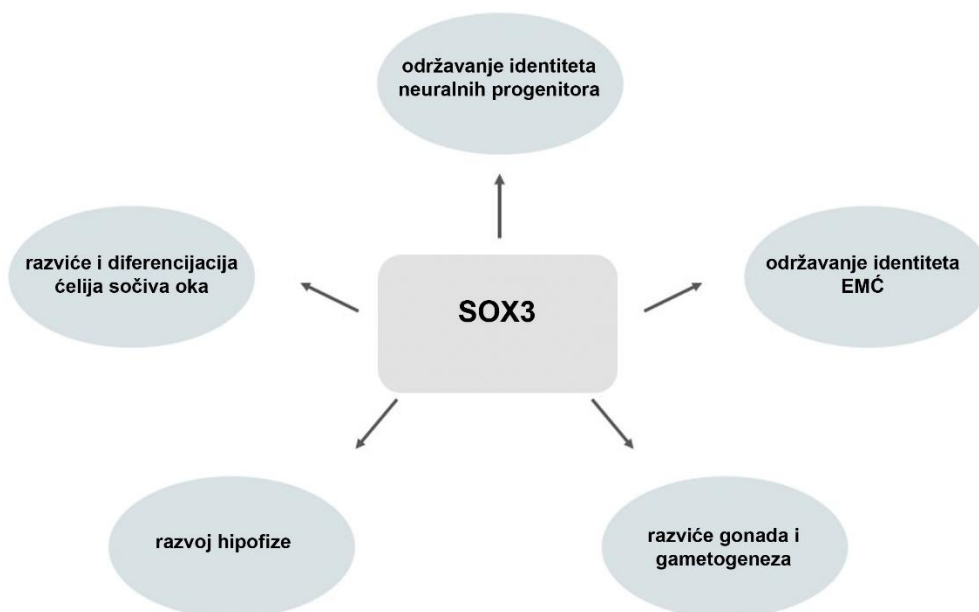
Najvažnije funkcije protein SOX3 ostvaruje tokom razvića, kroz kontrolu održavanja i samoobnavljanja populacija matičnih i progenitorskih ćelija, kontrolu opredeljivanja ćelija i njihove diferencijacije tokom neurogeneze (Lefebvre *et al.*, 2007). Ekspresija gena *Sox3* detektovana je u najranijim stadijumima embrionalnog razvića kičmenjaka i tokom formiranja CNS-a (Wood & Episkopou, 1999, Brunelli *et al.*, 2003). U embrionu miša, ekspresija gena *Sox3* detektovana je 6,5 dana od začeća u epiblastu i delu ekstraembrionalnog ektoderma na granici između embrionalnih i ekstraembrionalnih tkiva (**Slika 3**) (Wood & Episkopou, 1999). Nakon gastrulacije, njegova ekspresija biva utišana u ekstraembrionalnim tkivima i održava se u prednjem ektodermu epiblasta i u posteriornim regionima u blizini primitivne brazde (Wood & Episkopou, 1999). U danu 9,5 od začeća *Sox3* se detektuje u neuroektodermu kao i u olfaktornim plakodama i optičkoj vezikuli (Collignon *et al.*, 1996). Do dana 11,5 od začeća ekspresija se uočava u fetalnom mozgu i delu optičkog diska, da bi od 13,5 dana bila ograničena na endodermalni sloj u kome se nediferencirane progenitorske ćelije aktivno dele (Collignon *et al.*, 1996).



Slika 3. *In situ* hibridizacija korišćenjem *Sox3* riboprobe na embrionima miša tokom perioda 6,5 do 8 dana od dana začeća. Faze: PB – pre formiranja primitivne brazde, RB – faza rane primitivne brazde, SB-KB – srednja i kasna faza primitivne brazde, PČ – faza formiranja primitivnog čvora. Anteriorni deo embriona nalazi se sa leve strane, izuzev PB faze u kojoj se ne uočava anteriorno-posteriorna polarizacija embriona. Nivoi poprečnih preseka **a** i **b** označeni su strelicama i pokazuju da je ekspresija *Sox3* ograničena na ektodermalni sloj. Preuzeto i izmenjeno iz (Wood & Episkopou, 1999).

U mozgu novorođenih i adultnih miševa ekspresija gena *Sox3* održava se u subventrikularnim i subgranularnim zonama hipokampalnog dentatnog girusa, kao i u ne-neurogenim zonama adultnog mozga (ventromedijalni hipotalamus, dorzolateralni septum i sloj Purkinje ćelija u cerebelumu) (Wang *et al.*, 2006, Cheah & Thomas, 2015). Imajući u vidu ekspresioni profil gena *Sox3*, kao i brojne studije koje se bave analizom njegove funkcije kod kičmenjaka, ovaj gen označen je kao jedan od najranijih neuralnih markera koji determiniše i održava identitet neuralnih progenitora (Brunelli *et al.*, 2003, Bylund *et al.*, 2003, Rogers *et al.*, 2013). Korišćenjem neuralnih progenitora miša u studiji na celom genomu pokazano je da se SOX3 vezuje za evolutivno očuvane regulatorne sekvence – pojačivače (eng. *enhancers*) gena uključenih u razviće nervnog sistema (Rogers *et al.*, 2014). Pored navedenog, SOX3 je važan učesnik signalnih kaskada uključenih u razviće i diferencijaciju ćelija sočiva oka, kako je pokazano u eksperimentima na embrionima pileta i miša (Kamachi *et al.*, 1998, Kondoh *et al.*, 2004). Tokom razvića hipofize, ekspresija SOX3 detektovana je u ćelijama međumozga i infundibuluma, gde igra značajnu ulogu u morfogenezi i uspostavljanju hipotalamo-hipofizne ose (Rizzoti *et al.*, 2004). Takođe, SOX3 je kod pileta eksprimiran u primordijalnim germinativnim ćelijama oba pola, a kod miša u Sertolijevim ćelijama, i ima značajne funkcije u razviću gonada, sazrevanju oocita, diferencijaciji testisa i gametogenezi (Uchikawa *et al.*, 1999, Weiss *et al.*, 2003). Na **Slici 4** dat je shematski prikaz funkcija proteina SOX3 kod kičmenjaka.

Pored uloge gena *SOX3* u procesima razvića i diferencijacije, brojni dokazi upućuju na njegovu funkciju u održavanju identiteta humanih embrionalnih matičnih ćelija. Nakon utišavanja ekspresije gena *SOX2*, jednog od centralnih regulatora pluripotentnosti, ekspresija *SOX3* u humanim embrionalnim matičnim ćelijama se povećava, omogućavajući održavanje ćelija u pluripotentnom stanju, ali uz gubitak sposobnosti samoobnavljanja (Wang *et al.*, 2012). Takođe, pokazano je da u odsustvu gena *Sox2*, njegovu funkciju u reprogramiranju mogu uspešno preuzeti geni *Sox1* i *Sox3* tokom procesa generisanja indukovanih pluripotentnih matičnih ćelija od fibroblasta miša (Nakagawa *et al.*, 2008). Ova funkcionalna redundantnost SOXB1 proteina uzrokovana je njihovim strukturnim sličnostima, preklapajućim ekspresionim profilima i preklapajućim ciljnim genima (Miyagi *et al.*, 2009).



Slika 4. Shematski prikaz funkcija proteina SOX3 kod kičmenjaka. EMĆ – embrionalne matične ćelije.

Ključna uloga gena *Sox3* u procesima razvića potvrđena je u studijama na *Sox3* mutantima ili *knock-out* životinjama (životinje kod kojih je ciljno isključen gen *Sox3*). U studiji na miševima pokazano je da *knock-out* gena *Sox3* ne dovodi do povećane smrtnosti embriona, kao ni poremećaja u ponašanju i deficijencije hormona rasta (Weiss *et al.*, 2003). Međutim, primećena je redukcija težine testisa i aberantno sazrevanje germinativnih ćelija kod jedinki muškog pola, dok je kod heterozigotnih ženki detektovana atrezija folikula, prisustvo defektnih oocita i značajno smanjenje fertiliteta (Weiss *et al.*, 2003). Studija Camper-a i saradnika je pokazala da *Sox3-null* miševi muškog pola (životinje sa homozigotnom delecijom gena *Sox3*) karakteriše poremećaj rasta, brojne kraniofacijalne malformacije, generalna slabost organizma i rana letalnost (umiru do perioda odvajanja od majke) (Camper, 2004). Najuočljiviji defekti *Sox3* mutanata ispoljavaju se kroz narušenu morfogenezu i sazrevanje hipokampusa, *corpus callosum*-a i hipotalamusa (Rizzoti *et al.*, 2004). Interesantno je da, bez obzira na ekspresiju *Sox3* u progenitorskim ćelijama CNS-a tokom razvića (Brunelli *et al.*, 2003, Pevny & Placzek, 2005), delecija ovog gena rezultuje relativno blagim neuralnim

defektima, što se može objasniti funkcionalnom redundantnošću članova *SoxB1* grupe gena (Brunelli *et al.*, 2003, Ekonomou *et al.*, 2005, Pevny & Placzek, 2005). Novija istraživanja pokazala su da povećana ekspresija SOX2 može nadomestiti nedostatak SOX3 tokom razvića infundibuluma i ventralnog međumozga, i u velikoj meri umanjiti defekte u razvoju prednjeg režnja hipofize koji se javljaju kod *Sox3-null* miševa, ukazujući na funkcionalnu ekvivalentnost proteina SOX2 i SOX3 (Adikusuma *et al.*, 2017).

U skladu sa pomenutim funkcijama SOX3, detektovana su brojna oboljenja i sindromi u čijoj je osnovi narušena ekspresija i/ili funkcija ovog proteina (Hamel *et al.*, 1996, Lagerstrom-Fermer *et al.*, 1997, Hol *et al.*, 2000, Laumonnier *et al.*, 2002, Woods *et al.*, 2005). Kod čoveka, mutacije gena *SOX3* dovode do narušenog razvoja međumozga, infundibuluma i prednjeg režnja hipofize (Laumonnier *et al.*, 2002, Woods *et al.*, 2005). Gubitak funkcije (eng. *loss-of-function*) gena *SOX3*, nastao ekspanzijom prvog polialaninskog trakta, dovodi do promene u lokalizaciji izmenjenog SOX3 proteina, što rezultuje varijabilnom kliničkom slikom koju karakteriše kombinovana deficijencija hormona hipofize i smanjenje intelektualnih sposobnosti kod jednog broja nosioca mutacije (Laumonnier *et al.*, 2002, Woods *et al.*, 2005). Razviće hipotalamo-hipofizne ose je dozno-zavisno od SOX3 (Hamel *et al.*, 1996, Lagerstrom-Fermer *et al.*, 1997, Hol *et al.*, 2000). U familijama sa duplikacijama Xq26-q27 regiona, kod nosioca duplikacija javljaju se hipopituitarizam i mentalna retardacija (Hamel *et al.*, 1996, Lagerstrom-Fermer *et al.*, 1997, Hol *et al.*, 2000). U kliničkoj slici muškaraca nosilaca mutacije dominira deficijencija hormona rasta sa kombinovanom deficijencijom adrenokortikotropnog hormona, tireostimulirajućeg hormona ili gonadotropina (Hamel *et al.*, 1996, Lagerstrom-Fermer *et al.*, 1997, Hol *et al.*, 2000). Takođe, u literaturi su poznati slučajevi 46,XX pacijenata sa reverzijom pola u čijoj su osnovi heterozigotne duplikacije *SOX3* i/ili regiona koji ga okružuju (Sutton *et al.*, 2011, Moalem *et al.*, 2012, Mizuno *et al.*, 2014). Pretpostavlja se da ove duplikacije indukuju ektopičnu ekspresiju SOX3 u 46,XX gonadama, što preusmerava proces razvića ka formiranju testisa (Sutton *et al.*, 2011, Moalem *et al.*, 2012, Mizuno *et al.*, 2014).

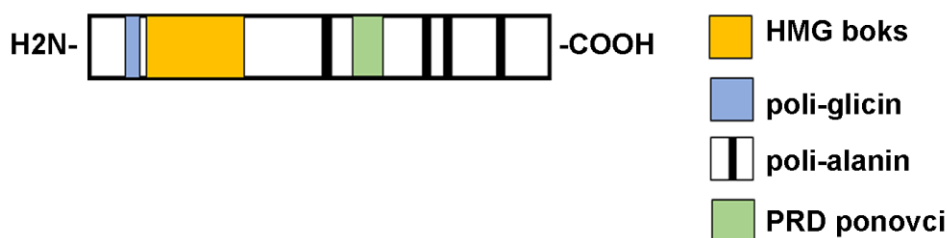
U pionirskim eksperimentima Xia i saradnika utvrđeno je da povećana ekspresija gena *SOX3* uzrokuje onkogenu transformaciju fibroblasta izolovanih iz embriona pileta (Xia *et al.*, 2000). Nakon ovih otkrića usledila je ekspanzija istraživanja uloge ovog gena u procesima nastanka i progresije različitih tipova kancera (Xia *et al.*, 2000). *SOX3* ima ulogu onkogene u karcinomima jednjaka i jajnika, osteosarkomu, T-limfomu i glioblastomu (Kim, Trubetskoy, *et al.*, 2003, Li *et al.*, 2013, Yan *et al.*, 2016, Qiu *et al.*, 2017, Marjanovic Vicentic *et al.*, 2019). Povećana ekspresija ovog gena povećava proliferaciju, vijabilnost, migraciju i invaziju ćelija glioblastoma, uz aktivaciju Hedgehog signalnog puta i supresiju autofagije u ovim ćelijama (Marjanovic Vicentic *et al.*, 2019). Sa druge strane, povećana ekspresija gena *SOX3* u ćelijama karcinoma dojke i melanoma promovise tranziciju mezenhimalnih u epitelijalne ćelije i inhibira njihovu migraciju i invaziju, ukazujući na tumor-supresorsku ulogu gena *SOX3* u ovim malignitetima (Acloque *et al.*, 2011).

Sva pomenuta istraživanja ukazuju na značaj gena *SOX3* u brojnim aspektima razvića i određivanja ćelijske sudbine, ističući neophodnost rasvetljavanja mehanizama kojima je transkripciona aktivnost ovog gena regulisana.

1.3. GEN SOX1

1.3.1. Struktura gena SOX1

Humani gen *SOX1* (eng. *Sry-related HMG-box containing gene 1*), koji zajedno sa *SOX2* i *SOX3* čini *SOXB1* gensku familiju, kloniran je 1997. godine na osnovu sličnosti sa HMG boksom *Sox1* gena miša (Malas *et al.*, 1997). Ovaj gen, sastavljen od jednog egzona, mapiran je na hromozomu 13q34 i kodira protein dužine 391 a.k. koji na svom C-terminalnom domenu poseduje polialaninske nizove i PRD His-Pro tip ponovaka (eng. *paired gene Drosophila*) (Frigerio *et al.*, 1986, Collignon *et al.*, 1996). Shematski prikaz strukture SOX1 proteina kičmenjaka dat je na **Slici 5**. Osnovne funkcije SOX1 transkripcionog regulatora vezane su za proces neurogeneze i ovaj protein je jedan od najranijih markera ovog procesa (Collignon *et al.*, 1996, Malas *et al.*, 1997, Pevny *et al.*, 1998).



Slika 5. Shematski prikaz strukture SOX1 proteina kičmenjaka. Preuzeto i izmenjeno iz (Collignon *et al.*, 1996)).

1.3.2. Ekspresija i funkcije proteina SOX1

Tokom embriogeze miša i pacova ekspresija proteina SOX1 prvi put se detektuje u kasnim fazama gastrulacije i ograničena je na ćelije antero-distalnog ektoderma, koje će tokom razvića dati primordijalni nervni sistem (Tam, 1989, Lawson *et al.*, 1991, Quinlan *et al.*, 1995, Tam & Zhou, 1996). Ekspresija SOX1 detektuje se u ćelijama nervne ploče i celom dužinom nervne cevi tokom ranog embrionalnog razvića miša i pacova (Pevny *et al.*, 1998). Slična uniformna ekspresija u ćelijama ranog neuroepitela pokazana je i za proteine SOX2 i SOX3, kao i za njihove proteinske ortologe kod vinske mušice, zebrice i ptica (Uwanogho *et al.*, 1995, Collignon *et al.*, 1996, Nambu & Nambu, 1996, Russell *et al.*, 1996, Vríz *et al.*, 1996, Wood & Episkopou, 1999). Ekspresija SOX1 u neuralnoj ploči i neuralnoj cevi detektuje se u mitotički aktivnim progenitorima koji još uvek nisu u potpunosti opredeljeni (Pevny *et al.*, 1998), dok smanjenje ekspresije SOX1 koincidira sa izlaskom neuroepitelijalnih ćelija iz stanja proliferacije (Pevny *et al.*, 1998). U kičmenoj moždini kod embriona pacova, ekspresija SOX1 se u potpunosti gubi u dorzalnim i ventralnim neuralnim ćelijama, koje prestaju da proliferišu i ulaze u fazu terminalne diferencijacije (Pevny *et al.*, 1998). Takođe, pokazano je da povećana ekspresija gena *Sox1* u P19 embrionalnim karcinomskim ćelijama miša indukuje neuralnu diferencijaciju ovih ćelija (Pevny *et al.*, 1998). Visok nivo ekspresije SOX1 detektovan je u neuronima ventralnog strijatuma velikog mozga, koji su odsutni u *Sox1-null* miševima kod kojih je isključen gen *Sox1*

(Economou *et al.*, 2005). Pokazano je da u nedostatku SOX1 nije narušena rana diferencijacija ovih neurona, već je onemogućen proces njihove migracije i maturacije (Economou *et al.*, 2005). U adultnom mozgu i diferenciranim neuronima ekspresija SOX1 je utišana, osim u vlaknastim ćelijama sočiva, gde SOX1 reguliše ekspresiju gena *Crystallin Gamma D (CRYGD)* i na taj način reguliše izduživanje vlaknastih ćelija oka (Nishiguchi *et al.*, 1998). Stoga se kod miševa homozigota za *Sox1* mutaciju detektuju abnormalnosti u razvoju sočiva oka (Nishiguchi *et al.*, 1998), kao i pojava spontanih epileptičnih napada uzrokovanih aberantnim razvojem ventralnog telencefalona i hiperekscitabilnošću olfaktornog korteksa (Malas *et al.*, 2003). Na **Slici 6** dat je shematski prikaz funkcija proteina SOX1 kod kičmenjaka.

Pored esencijalne uloge koju ima u procesu neurogeneze, SOX1 je prepoznat i kao deo kaskade uključene u proces nastanka i širenja tumora. Njegova tumorsupresorska uloga dokazana je u kanceru ovarijuma, grlića materice, hepatocelularnim i nazofaringealnim karcinomima, gde je njegov promotorski region hipermetilovan (Tsao *et al.*, 2012, Lin *et al.*, 2013, Guan *et al.*, 2014). Ovu funkciju SOX1 ostvaruje kroz interakciju sa β -kateninom, centralnim signalnim molekulom Wnt signalnog puta, čija aberantna aktivacija leži u osnovi brojnih maligniteta (Su *et al.*, 2009, Tsao *et al.*, 2012, Lin *et al.*, 2013, Guan *et al.*, 2014). Najnoviji eksperimentalni podaci pokazuju da je SOX1 visoko ekspresiran u matičnim ćelijama tumora glioma, gde utiče na proliferaciju, sposobnost samoobnavljanja i diferencijacije ovih ćelija, značajno doprinoseći nastanku i progresiji glioblastoma (Garcia *et al.*, 2017).

Imajući u vidu mnogobrojne studije kojima je pokazano da je gen *SOX1*, zajedno sa drugim članovima *SOXB1* familije, jedan od ključnih faktora razvića koji reguliše i održava plastičnost ćelija, neophodno je dalje rasvetljavanje mehanizama regulacije njegove ekspresije.

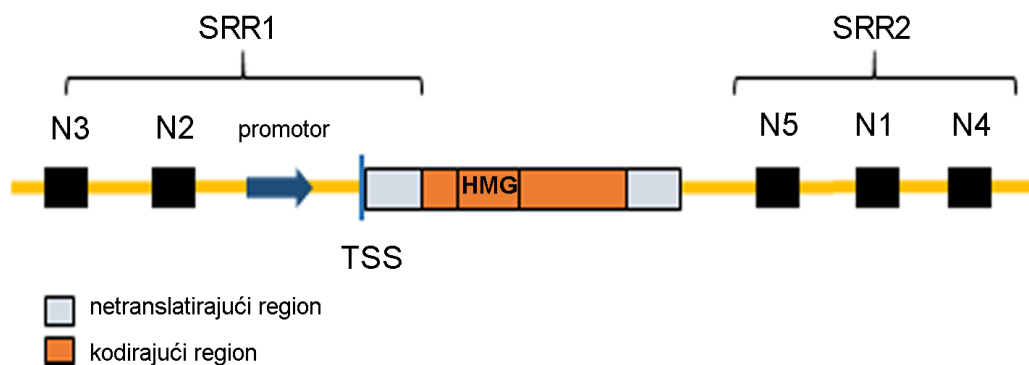


Slika 6. Shematski prikaz funkcija proteina SOX1 kod kičmenjaka.

1.4. GEN *SOX2*

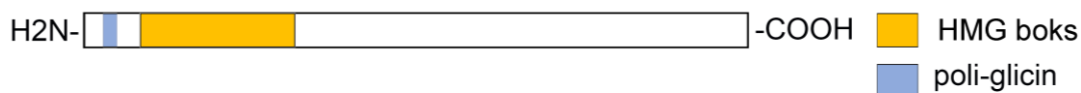
1.4.1. *Struktura gena SOX2*

Humani gen *SOX2* (eng. *Sry-related HMG-box containing gene 2*), takođe član *SOXB1* grupe transkripcionih regulatora, sadrži jedan egzon i lociran je na hromozomu 3q26.3-q27 (Stevanovic *et al.*, 1994). Na **Slici 7** shematski je prikazan *Sox2* genski lokus kičmenjaka i pojačivačke sekvence (N1-N5) koje formiraju dva *Sox2* regulatorna regiona – SRR1 i SRR2 (eng. *Sox2 Regulatory Regions 1 and 2*).



Slika 7. Shematski prikaz *Sox2* genskog lokusa. Prikazana je shema *Sox2* egzona i pojačivača N1-N5. SRR1 i SRR2 – *Sox2* regulatorni regioni 1 i 2. TSS – start transkripcije. Preuzeto i izmenjeno iz (Zhang & Cui, 2014).

Humani gen *SOX2* kodira protein od 317 a.k. (Stevanovic *et al.*, 1994). Shematski prikaz strukture *SOX2* proteina kičmenjaka dat je na **Slici 8**. Preuzeto i izmenjeno iz (Weina & Utikal, 2014).



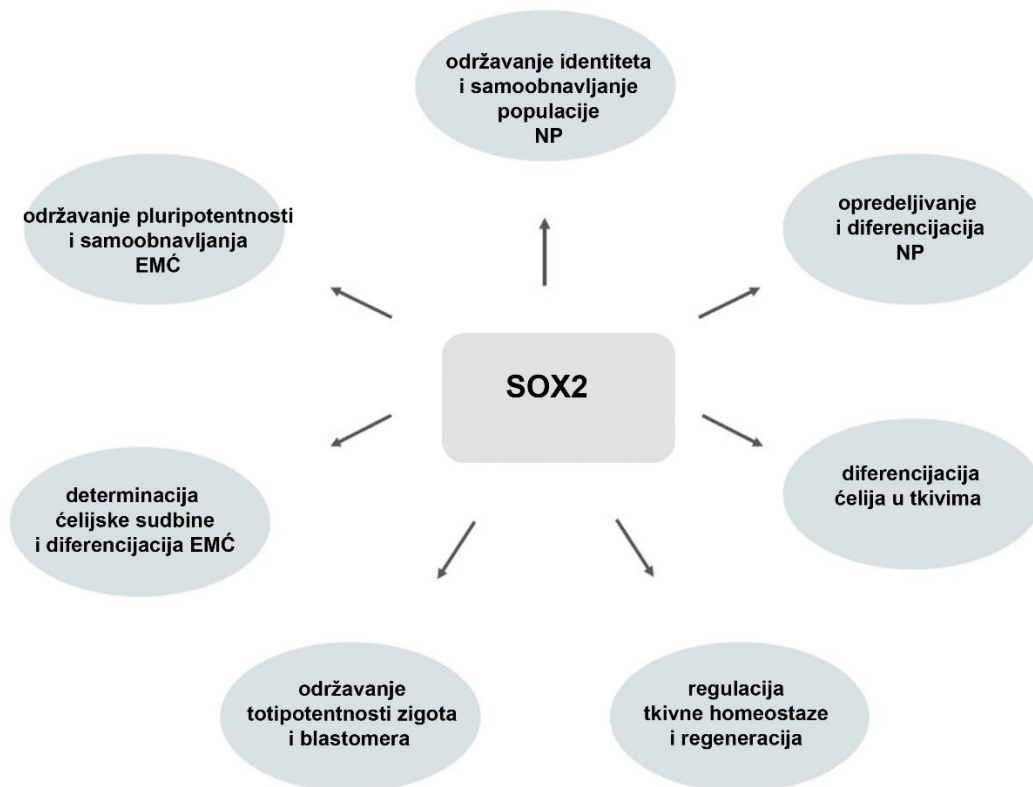
Slika 8. Shematski prikaz strukture proteina *SOX2* kičmenjaka. Preuzeto i izmenjeno iz (Weina & Utikal, 2014).

1.4.2. Funkcije i ekspresija gena *SOX2*

Zahvaljujući postojanju funkcionalne redundantnosti između članova *SOXB1* familije gena, *SOX2* deli funkcije sa genima *SOX1* i *SOX3* (Uchikawa *et al.*, 1999, Miyagi *et al.*, 2004). Sa druge strane, *SOX2* zajedno sa *OCT4* i *NANOG* čini jezgro mreže faktora regulatora pluripotentosti (Loh & Lim, 2011, Festuccia *et al.*, 2013), pa je stoga njegove funkcije neophodno pratiti sa oba aspekta.

U brojnim studijama utvrđene su višestruke funkcije ovog gena u regulaciji različitih razvojnih i fizioloških procesa (Collignon *et al.*, 1996, Rogers *et al.*, 2009, Sarkar & Hochedlinger, 2013, Zhang & Cui, 2014). Gen *SOX2* eksprimiran je u neuroepitelijalnim prekursorskim ćelijama tokom embrionalnog razvića i u adultnom CNS-u, gde ima ključne uloge u održavanju identiteta progenitora, obezbeđivanju uslova za preživljavanje i samoobnavljanje populacije progenitora, kao i za njihovo opredeljivanje i diferencijaciju tokom neurogeneze (Collignon *et al.*, 1996, Rogers *et al.*, 2013). *SOX2* ima ključne uloge u procesima održavanja pluripotentosti i samoobnavljanja matičnih ćelija, kao i u determinaciji ćelijske sudbine i diferencijaciji (Sarkar & Hochedlinger, 2013, Zhang & Cui, 2014). Takođe, ovaj transkripcioni regulator neophodan je za održavanje totipotentosti zigota i blastomera na najranijim, preimplantacionim stadijumima embrionalnog razvića (Pan & Schultz, 2011), kao i za diferencijaciju ćelija u tkivima tokom kasnijih faza razvića (Sarkar & Hochedlinger,

2013, Zhang & Cui, 2014). U odraslim jedinkama, SOX2 je neophodan za regulaciju tkivne homeostaze i regeneraciju (Sarkar & Hochedlinger, 2013). Na **Slici 9** dat je shematski prikaz funkcija proteina SOX2 kod kičmenjaka.



Slika 9. Shematski prikaz funkcija proteina SOX2 kod kičmenjaka.

NP – neuralni progenitori, EMĆ – embrionalne matične ćelije.

Tokom embriogeneze miša, SOX2 je inicijalno detektovan u ćelijama na stadijumu morule, da bi u kasnijim fazama bio eksprimiran u ćelijama unutrašnje mase blastocista (eng. *ICM, inner cell mass*) i epiblastu (Avilion *et al.*, 2003), što ukazuje na važne funkcije ovog gena u održavanju pluripotentnih embrionalnih ćelija, kako je detaljnije opisano u odeljku 1.7. Homozigotna delecija gena *Sox2* za posledicu ima letalnost embriona na ranim stupnjevima razvića usled nemogućnosti formiranja pluripotentnog epiblasta, dok su efekti na formiranje trofoektoderma značajno manji (Avilion *et al.*, 2003). Stoga je *Sox2* definisan kao esencijalni faktor za održavanje pluripotentnosti matičnih ćelija ranog embriona i gen od kritične važnosti za embrionalno razviće (Avilion *et al.*, 2003). Nakon gastrulacije, ekspresija SOX2 ograničena je na budući neuroektoderm, senzorne plakode, brahijalne lukove, endoderm digestivnog sistema i primordijalne germinativne ćelije (Wood & Episkopou, 1999, Avilion *et al.*, 2003, Yabuta *et al.*, 2006). SOX2 je neophodan za formiranje i razvoj kore velikog mozga (Pevny & Lovell-Badge, 1997) i njegova ekspresija je detektovana u ćelijama neuralne tube u ranim stadijumima razvića CNS-a (Avilion *et al.*, 2003). U kasnijim fazama embrionalnog razvića ekspresija SOX2 ograničena je na ventrikularni sloj neuronalnog korteksa, gde su locirane neuralne matične ćelije (Graham *et al.*, 2003, Sarkar & Hochedlinger, 2013).

Protein SOX2 ima važnu ulogu u održavanju tkivne homeostaze u adultnim organizmima (Arnold *et al.*, 2011). Naime, u studiji na adultnim miševima ekspresija SOX2 detektovana je u neurogenim zonama mozga, retini, jeziku, traheji, epitelu bronhija, testisima, cerviksu, epitelu sočiva, u želudačnim žlezdama i skvamoznom epitelu jednjaka upravo u adultnim matičnim ćelijama lociranim u navedenim tkivima (Arnold *et al.*, 2011). U pomenutoj studiji, generisani su *Sox2-TK* transgeni miševi kod kojih je u endogeni *Sox2* lokus „insertovan“ gen za timidin kinazu. Nakon tretmana ganciklovirom dolazi do masovne smrti SOX2+ ćelija, što je za posledicu imalo poremećaje u homeostazi tkiva koji su rezultovali smrću eksperimentalnih životinja (Arnold *et al.*, 2011).

U velikoj studiji koja je autorima 2012. godine donela Nobelovu nagradu iz medicine, SOX2 je okarakterisan kao jedan od faktora reprogramiranja somatskih ćelija (Takahashi & Yamanaka, 2006, Takahashi *et al.*, 2007). Indukovane pluripotentne matične ćelije se mogu generisati od brojnih tipova somatskih ćelija ektopičnom ekspresijom transkripcionih faktora regulatora pluripotentnosti (Takahashi & Yamanaka, 2006, Takahashi *et al.*, 2007). U ove svrhe najčešće je korišćen koktel transkripcionih regulatora OCT4, SOX2, KLF4 i c-Myc (Takahashi *et al.*, 2007). Ovi faktori obezbeđuju reprogramiranje opredeljenih i terminalno diferenciranih ćelija u stanje pluripotentnosti i proliferativne aktivnosti, čineći ih pandanom embrionalnim matičnim ćelijama (Takahashi & Yamanaka, 2006, Takahashi *et al.*, 2007). Analizom profila genske ekspresije na nivou jedne ćelije tokom njenog reprogramiranja pokazano je da je aktivacija endogenog gena *Sox2* rani događaj u ovom procesu, i predstavlja okidač kaskade promena koje nastaju u transkriptomu i rezultuju nastankom indukovanih pluripotentnih matičnih ćelija (Buganim *et al.*, 2012).

Imajući u vidu kompleksne funkcije gena *SOX2*, kako tokom embrionalnog razvića tako i kod odraslih jedinki, brojni su poremećaji i patološka stanja koja se dovode u vezu sa narušenom ekspresijom i/ili funkcijom ovog gena. Brojne studije ukazuju na onkogenu prirodu gena *SOX2* u različitim tipovima maligniteta, u prvom redu tumora mozga (pregled u (Mansouri *et al.*, 2016)). Uloga SOX2 u malignitetima odlikava se kroz promociju ćelijske proliferacije i preživljavanja i/ili supresiju diferencijacije malignih ćelija (Bass *et al.*, 2009, Sarkar & Hochedlinger, 2013). Literaturni podaci ukazuju na pozitivnu korelaciju između ekspresije SOX2 i povećanog invazionog kapaciteta ćelija tumora neuralnog porekla i melanoma (Ikushima *et al.*, 2009, Laga *et al.*, 2010). Visok nivo SOX2 proteina jedna je od molekularnih karakteristika matičnih ćelija tumora (Castillo & Sanchez-Cespedes, 2012, Drakulic *et al.*, 2015), koje su odgovorne za nastanak, rast, progresiju, metastaze i rezistenciju tumorskih ćelija na lekove (Weina & Utikal, 2014). Pored uloge SOX2 u malignoj transformaciji ćelija, u kliničkoj praksi su poznati slučajevi osoba nosioca mutacija u ovom genu koje imaju poremećaje u tkivima ektodermalnog i endodermalnog porekla, anoftalmiju, fistule u traheji i jednjaku, gubitak sluha i poremećaje u razviću moždanih struktura (Kelberman *et al.*, 2006, Williamson *et al.*, 2006). Dodatno, poslednjih godina se intenzivno radi na izučavanju veze između gena *SOX2* i Alchajmerove bolesti, što je inicirano otkrićem da je kod APP (eng. *amyloid precursor protein*) transgenog mišjeg modela ove bolesti (transgeni miš koji prekomerno eksprimira mutirani oblik APP) nivo SOX2 značajno snižen u mozgu, kao i da je nivo ekspresije SOX2 u korelaciji sa stadijumom bolesti (Crews *et al.*, 2010). SOX2, zajedno sa proteinima SOX1 i SOX21, predložen je kao jedan od biomarkera za detekciju ranih poremećaja u adultnoj neurogenezi u različitim životinjskim modelima (Zaletel *et al.*, 2018).

Imajući u vidu neke od nabrojanih funkcija, SOX2 se sa pravom može nazvati centralnim regulatorom brojnih ćelijskih procesa. Pored važnosti rasvetljavanja molekularnih mehanizama kojima SOX2 ostvaruje svoje mnogobrojne uloge, neophodna su dodatna istraživanja načina regulacije i kontrole ekspresije ovog gena, kao i identifikacija njegovih „partnera“ i kofaktora sa kojima interaguje i formira komplekse kojima se održava identitet matičnih ćelija i osigurava pravilan tok ćelijskog opredeljivanja i diferencijacije.

1.5. GEN *OCT4*

OCT4 (eng. *octamer-binding transcription factor 4*) predstavlja izoformu *OCT4A*, proteina kodiranog genom *POU5F1* (eng. *POU class 5 homeobox1*), lociranom na humanom hromozomu 6 (Tantin, 2013, Zhao, 2013). *OCT4* je član oktamer-vezujuće familije POU transkripcionih faktora koji se vezuju za konsenzus sekvencu ATGCAAT preko svojih evolutivno očuvanih DNK-vezujućih domena – POU domena (Tantin, 2013, Zhao, 2013). Prvobitno, ekspresija *OCT4* detektovana je u oocitama, ranom embrionu i u embrionalnim karcinomskim ćelijama (Lenardo *et al.*, 1989, Scholer *et al.*, 1989, Okamoto *et al.*, 1990), da bi se kasnije došlo do saznanja da *OCT4* ima funkciju ključnog regulatora u toku preimplantacionog perioda razvića (Nichols *et al.*, 1998). U studiji autora Takahashi i Yamanaka, pokazano je da je *OCT4* jedan od 4 faktora koji čine minimalni set proteina neophodnih za reprogramiranje somatskih tipova ćelija u indukovane pluripotentne matične ćelije (Takahashi & Yamanaka, 2006). Nakon ovog otkrića, istraživački fokus je sa uloge gena *OCT4* u održavanju populacije matičnih ćelija usmeren na procese uspostavljanja pluripotentnosti, odnosno na molekularne mehanizme kojima *OCT4* doprinosi uspostavljanju programa genske ekspresije kojima se reguliše pluripotentnost i rana diferencijacija (pregled u (Jerabek *et al.*, 2014)).

Tokom embrionalnog razvića miša i čoveka *OCT4* je visoko eksprimiran u neoplođenim oocitama sve do stupnja morule (Rosner *et al.*, 1990, Palmieri *et al.*, 1994, Nichols *et al.*, 1998, Hansis *et al.*, 2000). Tokom formiranja blastocista u ćelijama koje diferenciraju u trofoektoderm dolazi do brzog utišavanja ekspresije *OCT4*, dok je nivo ovog proteina u ćelijama unutrašnje ćelijske mase blastocista i dalje veoma visok (Palmieri *et al.*, 1994). Tokom embriogeneze miša i čoveka ekspresija *OCT4* brzo opada nakon gastrulacije i biva ograničena na primordijalne germinativne ćelije (Goto *et al.*, 1999, Kehler *et al.*, 2004). U eksperimentima sa tkivno specifičnim utišavanjem ekspresije *OCT4* pokazano je da je ovaj protein neophodan i za održavanje populacija adultnih matičnih ćelija (Lengner *et al.*, 2007).

Zahvaljujući navedenim istraživanjima, *OCT4* je danas definisan kao gen koji svoje funkcije ostvaruje na najranijim stadijumima embriogeneze u procesima indukcije i održavanja pluripotentnosti, kao i opredeljivanja embrionalnih matičnih ćelija (pregled u (Jerabek *et al.*, 2014)). Ključna uloga proteina *OCT4* u razviću potvrđena je eksperimentima sa *OCT4*-deficijentnim embrionima miša kod kojih su DNK-vezujući i C-terminalni transaktivacioni domeni ovog proteina deletirani, i kod kojih je detektovan zastoj u razvoju tokom preimplantacionog perioda razvića embriona (Nichols *et al.*, 1998). Kod mutantnih miševa uočeni su poremećaji u najranijim fazama ćelijskog opredeljivanja između unutrašnje ćelijske mase blastocista i trofoektoderma (Nichols *et al.*, 1998). U *in vitro* propagaciji blastocisti nosioci ove mutacije diferencirali su u

velike trofoblastne ćelije, potvrđujući esencijalnu ulogu proteina OCT4 u održavanju i samoobnavljanju embrionalnih matičnih ćelija (Nichols *et al.*, 1998). Interesantno je da je precizna kontrola nivoa OCT4 neophodna i za determinaciju sudbine embrionalnih matičnih ćelija (Niwa *et al.*, 2000, Lengner *et al.*, 2007). Naime, pokazano je da je za održavanje fenotipa matičnih ćelija neophodan tačno određen nivo OCT4 ekspresije; smanjena ekspresija OCT4, kako je pomenuto, vodi u diferencijaciju u ćelije trofoektoderma, dok povećana doza ovog proteina indukuje diferencijaciju u primitivni endoderm ili mezoderm (Niwa *et al.*, 2000, Lengner *et al.*, 2007).

1.6. GEN *NANOG*

Transkripcioni faktor *NANOG* zajedno sa OCT4 i SOX2 čini osnovnu regulatornu mrežu koja kontroliše procese samoobnavljanja i pluripotentnosti (Chambers *et al.*, 2003, Mitsui *et al.*, 2003). Ovaj faktor, okarakterisan kao protein koji aktivira represore i suprimira aktivatore diferencijacije, čime obezbeđuje potencijal za samoobnavljanje matičnih ćelija, svoje ime dobio je po keltskoj zemlji mladosti, Tír nan Óg. U humanom genomu detektovano je 11 pseudogena (*NANOGP1-NANOGP11*), homologih inicijalno identifikovanom genu *NANOG1* (Booth & Holland, 2004). Najveći broj ovih pseudogena poseduje rane stop kodone i smatrani su nefunkcionalnim. Izuzetak čine *NANOGP2* i *NANOGP8*. *NANOGP2* nastao je tandemskom duplikacijom gena *NANOG1* i ekspimiran je u hematopoetskim matičnim ćelijama i ćelijama B-ćelijskog limfoma sa translokacijom t(4;11) (q21;q23) (Eberle *et al.*, 2010). Protein kodiran pseudogenom *NANOGP8* od proteina *NANOG* razlikuje se u samo jednoj a.k. i ima ključnu ulogu u nastanku pojedinih tipova tumora (Zhang *et al.*, 2006, Fairbanks *et al.*, 2012).

Humani gen *NANOG* lociran je na hromozomu 12p13 i kodira protein dužine 305 a.k. koji se sastoji iz 3 funkcionalna domena: N-terminalnog domena, homeodomena i C-terminalnog transaktivacionog domena (Chambers *et al.*, 2003, Mitsui *et al.*, 2003, Oh *et al.*, 2005). C-terminalni domen sadrži region neophodan za dimerizaciju *NANOG* proteina koja je ključna za funkciju održavanja matičnosti (Mullin *et al.*, 2008, Wang *et al.*, 2008). Ovaj region, zajedno sa homeodomonom, značajan je za transport proteina iz citoplazme u jedro, dok N-terminalni domen reguliše transaktivacionu funkciju proteina (Chang *et al.*, 2009).

NANOG je heterogeno ekspimiran u ćelijama unutrašnje ćelijske mase blastocista (Chambers *et al.*, 2003, Mitsui *et al.*, 2003). Tokom embriogeneze miša ekspresija je utišana u epiblastu pre implantacije, a nakon implantacije biva reaktivirana u posteriornom epiblastu (Chambers *et al.*, 2003, Mitsui *et al.*, 2003). *Nanog* iRNK je na stadijumu somitogeneze nedetektibilna, što koincidira sa trenutkom gubitka pluripotentnosti (Guo *et al.*, 2010). *NANOG* je identifikovan kao faktor kritičan za kontrolu samoobnavljanja embrionalnih matičnih ćelija uzvodno od LIF/STAT3 signalizacije, kako je zaključeno na osnovu eksperimenata sa *Nanog*-deficijentnim embrionima miša kod kojih izostaje nastanak epiblasta i nastaju ćelije endodermalnog fenotipa (Mitsui *et al.*, 2003). Ova otkrića potvrđena su i eksperimentima sa utišavanjem ekspresije *NANOG* proteina u embrionalnim matičnim ćelijama miša, što za posledicu ima njihovu diferencijaciju u ekstraembrionalne endodermalne ćelijske linije (Mitsui *et al.*, 2003). Ekspresija gena *NANOG* kod adulta ograničena je na tkivo testisa, a nizak nivo ekspresije uočen je i u ćelijama tankog creva, štitne žlezde i

cerviksa (Hoei-Hansen *et al.*, 2005, Mato Prado *et al.*, 2015). Međutim, u većini adultnih tkiva ekspresija gena *NANOG* je utišana (Booth & Holland, 2004, Chang *et al.*, 2009, Fairbanks *et al.*, 2012, Lee, Folger, *et al.*, 2014).

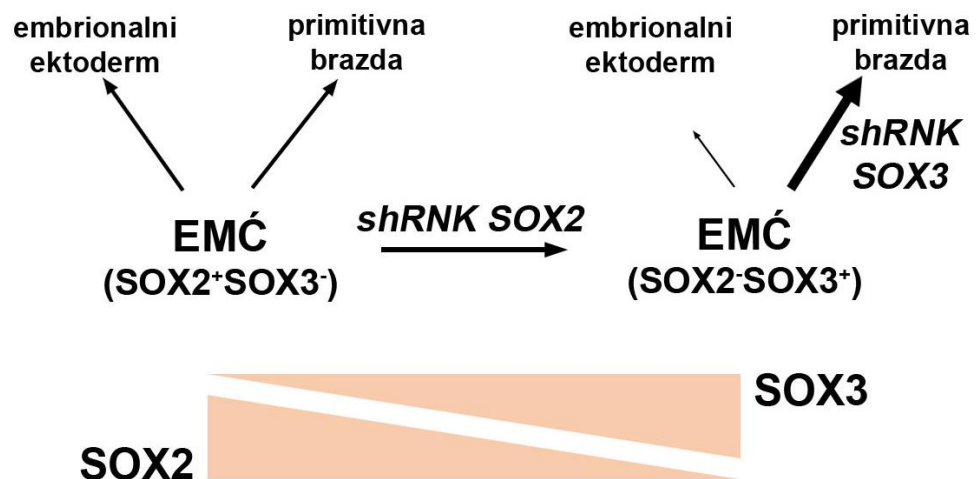
Ekspresija proteina *NANOG* detektovana je i u brojnim tipovima tumora, gde se dovodi u vezu sa hemorezistencijom, sposobnošću metastaziranja i lošim postoperativnim tokom (pregledi dati u (Gawlik-Rzemieniewska & Bednarek, 2016, Wong & Cheung, 2016)). Uloga ovog gena, kao i njegovih najbližih partnera *OCT4* i *SOX2*, u procesima nastanka i progresije maligniteta predmet je intenzivnih istraživanja koja za cilj imaju rasvetljavanje mehanizama kojima narušena regulacija ekspresije i funkcija faktora pluripotentnosti doprinosi nastanku i širenju tumora (Gawlik-Rzemieniewska & Bednarek, 2016, Wong & Cheung, 2016, Hepburn *et al.*, 2019). Međutim, dodatni pravac istraživanja ostaje sagledavanje kompleksne mreže koja usmerava procese embrionalnog razvića i ćelijske diferencijacije, a u čijoj osnovi leže interakcije *OCT4*, *SOX2* i *NANOG* proteina i njihovih partnera, komponenti signalnih puteva i faktora epigenetičke mašinerije.

1.7. ULOGA GENA *SOX2*, *OCT4* I *NANOG* U ODRŽAVANJU PLURIPOTENTOSTI I ODREĐIVANJU SUDBINE ĆELIJA

Pluripotentnost matičnih ćelija, odnosno njihov potencijal za opredeljivanje u različite tipove ćelija, održava se kroz proces samoobnavljanja i praćen je inhibicijom diferencijacije i promocijom proliferacije ovih ćelija (Posfai *et al.*, 2014, Hassani *et al.*, 2018). Na molekularnom nivou, održavanje stanja pluripotentnosti matičnih ćelija zavisi od kompleksne mreže transkripcionih faktora, čiji su centralni “igrači“ *SOX2*, *OCT4* i *NANOG* (Chen *et al.*, 2008, Loh & Lim, 2011, Rizzino, 2013).

U brojnim studijama korišćene su najsavremenije metode za analizu kompleksne mreže faktora uključenih u održavanje pluripotentnosti, što je rezultovalo obiljem eksperimentalnih podataka čija je analiza dovela do nekoliko važnih zaključaka (Orkin *et al.*, 2008, Macarthur *et al.*, 2009, Ng & Surani, 2011, Young, 2011, Li & Izpisua Belmonte, 2018). Naime, pokazano je da jezgro ove mreže čine *OCT4*, *SOX2* i *NANOG* koji su vezani za stotine potencijalnih regulatornih elemenata u genomu, uključujući i njihove sopstvene promotore, i na taj način formiraju gustu kooperativnu mrežu i povratne regulatorne petlje (Adamo *et al.*, 2011, Hackett & Surani, 2014, Li & Izpisua Belmonte, 2018). Kolokalizovani centralni regulatori *OCT4*, *SOX2* i *NANOG* formiraju platformu za regrutovanje dodatnih faktora koji integrišu signale iz drugih transkripcionih mreža, signalnih puteva, koaktivatora i korepresora regulatornih molekula RNK i epigenetičkih mehanizama (Adamo *et al.*, 2011, Hackett & Surani, 2014, Li & Izpisua Belmonte, 2018). U ovakvom sistemu, fluktuacije u nivou centralnih transkripcionih faktora pluripotentnosti bivaju balansirane regulatornom redundantnošću ili pozitivnim povratnim spregama, što rezultuje stabilizacijom pluripotentnog stanja, ili pak bivaju iskorišćene za inicijaciju diferencijacije u prisustvu odgovarajućeg indukujućeg signala (Boyer *et al.*, 2005). Ovaj fini balans nastaje kao posledica protein-DNK i protein-protein interakcija (Boyer *et al.*, 2005). Pokazano je da je za uspostavljanje i/ili održavanje pluripotentnosti ćelija neophodan kritični nivo *OCT4* proteina, koji zatim može biti smanjen bez gubitka osobine samoobnavljanja ćelija (Radzishchanskaya *et al.*, 2013). Takođe, ćelije koje eksprimiraju *OCT4* na ovom nivou uspešno se mogu *in vitro* diferencirati, dok ćelije sa niskom ekspresijom *OCT4* ne

mogu ući u proces diferencijacije usled nemogućnosti da utišaju gene faktore pluripotentnosti i aktiviraju gene neophodne za ćelijsku specifikaciju (Niwa *et al.*, 2000, Radzisceuskaya *et al.*, 2013, Radzisceuskaya & Silva, 2014). Ćelije kojima je ukinuta ekspresija proteina NANOG i dalje poseduju sposobnost samoobnavljanja, iako sa povećanom incidencom spontane diferencijacije u odnosu na *wild type* ćelije (*wt*, ćelije tipičnog fenotipa i genotipa) (Chambers *et al.*, 2007), i brojni primarni ciljni geni proteina NANOG ostaju eksprimirani i u njegovom odsustvu (Silva & Smith, 2008). Stoga, smatra se da je uloga ovog faktora da suprimira diferencijaciju pluripotentnih ćelija pre nego da aktivira proces samoobnavljanja (Silva & Smith, 2008). Sa druge strane, kako je pokazano na humanim embrionalnim matičnim ćelijama, kao i na matičnim ćelijama miša, SOX2 nije neophodan za proces samoobnavljanja, zahvaljujući kompenzatornom mehanizmu koji se ostvaruje povećanjem ekspresije gena *SOX3* nakon utišavanja gena *SOX2* (Wang *et al.*, 2012, Corsinotti *et al.*, 2017). Ćelije sa niskom ekspresijom *SOX2* i visokom ekspresijom *SOX3* ostaju pluripotentne, ali spontano ulaze u proces diferencijacije (Wang *et al.*, 2012). Istovremeno utišavanje ekspresije *SOX2* i *SOX3* rezultuje gubitkom sposobnosti samoobnavljanja i diferencijacijom u mezoderm i endoderm (Wang *et al.*, 2012). Na **Slici 10.** dat je shematski prikaz međusobnog odnosa gena *SOX2* i *SOX3* u procesima održavanja pluripotentnosti i određivanja ćelijske sudbine.



Slika 10. Shematski prikaz međusobnog odnosa ekspresije gena *SOX2* i *SOX3* u procesima održavanja pluripotentnosti i određivanja ćelijske sudbine embrionalnih matičnih ćelija. Embrionalne matične ćelije sa visokom ekspresijom *SOX2* i niskom ekspresijom *SOX3* (EMC *SOX2*⁺*SOX3*⁻) imaju značajnu sposobnost samoobnavljanja i potencijal da diferenciraju u ćelijske linije neuroektoderma i primitivne brazde. U embrionalnim matičnim ćelijama sa utišanom ekspresijom gena *SOX2* (*shRNK SOX2*) indukuje se ekspresija gena *SOX3*. Ovako nastale embrionalne matične ćelije (EMC *SOX2*⁻*SOX3*⁺) zadržavaju pluripotentnost, ali imaju redukovani kapacitet samoobnavljanja. Istovremeno utišavanje ekspresije gena *SOX3* (*shRNK SOX3*) u ovim ćelijama inicira njihovo opredeljivanje ka ćelijama primitivne brazde. Preuzeto i izmenjeno iz Wang (2012).

Studije na embrionalnim matičnim ćelijama miša i čoveka pokazale su da se OCT4 i *SOX2* kao heterodimeri kooperativno vezuju za brojne regulatorne elemente

(Chew *et al.*, 2005, Rodda *et al.*, 2005). Vezivna mesta za NANOG se u velikoj meri preklapaju sa OCT4/SOX2 vezivnim mestima (Chen *et al.*, 2008). Deo ovih regulatornih elemenata pripada protein-kodirajućim i mikroRNK (miRNK) genima (Chen *et al.*, 2008, Marson *et al.*, 2008). Mesta okupirana sa sva 3 centralna regulatora pluripotentnosti najčešće imaju funkciju pojačivača i transkripcija sa ovih gena uslovljena je barem jednim članom SOX2-OCT4-NANOG grupe (Chew *et al.*, 2005, Matoba *et al.*, 2006, Chen *et al.*, 2008). OCT4 i NANOG vezuju i regrutuju brojne koaktivatore, kao što su p300 i medijatorski kompleks i PAF1 (eng. *RNA polymerase II-associated factor 1*) (Conaway *et al.*, 2005, Malik & Roeder, 2005, Chen *et al.*, 2008, Ding *et al.*, 2009, Zhong & Jin, 2009). Druga grupa gena na čijim su regulatornim elementima vezani OCT4-SOX2-NANOG su geni odgovorni za ćelijsku diferencijaciju i specifikaciju koji su u embrionalnim matičnim ćelijama reprimirani. Ova represija ostvaruje se kroz interakciju sa SetDB1 (eng. *SET Domain Bifurcated 1*) i Polycomb (PcG) grupom proteina – hromatinskih regulatora, kao i kroz regrutovanje korepresora kao što su DAX1 (eng. *Dosage-sensitive sex reversal 1*), CNOT3 (eng. *CCR4-NOT transcription complex subunit 3*) i TRIM28 (eng. *Tripartite motif-containing 28*) (Boyer *et al.*, 2005, Boyer *et al.*, 2006, Lee *et al.*, 2006, Loh *et al.*, 2006, Marson *et al.*, 2008, Pasini *et al.*, 2008, Bilodeau *et al.*, 2009, Hu *et al.*, 2009, Sun *et al.*, 2009).

Aktivacija diferencijacije matičnih ćelija praćena je dramatičnim izmenama u opisanoj regulatornoj mreži (Feldman *et al.*, 2006, Fujita *et al.*, 2008, Tay *et al.*, 2008). Mehanizmi koji doprinose gubitku matičnosti uključuju utišavanje ekspresije gena *OCT4* (Feldman *et al.*, 2006), proteolitičku degradaciju NANOG od strane kaspaze-3 (Fujita *et al.*, 2008) i redukciju nivoa *OCT4*, *NANOG* i *SOX2* iRNK posredovanu preko miRNK (Tay *et al.*, 2008). Ulazak ćelije u opredeljena stanja praćen je aktivacijom seta gena specifičnih za datu ćelijsku liniju, procesovanjem *Let-7* regulatorne miRNK (Viswanathan *et al.*, 2008), aktivacijom „pionirskih“ transkripcionih faktora koji su pojačivačke sekvence održavali u stanju pripremljenom za transkripciju (Zaret *et al.*, 2008), kao i modifikacijom medijatorskog kompleksa (Deato & Tjian, 2007, Ho & Crabtree, 2010, Taatjes, 2010).

Kompleksnost mehanizama i brojnost faktora uključenih u procese održavanja matičnosti i indukcije diferencijacije otežavaju potpuno razumevanje pomenutih procesa. Dodatno rasvetljavanje mehanizama kontrole gena faktora pluripotentnosti neophodno je u cilju razrešavanja „genetičke slagalice“ koja stoji iza stanja matičnosti i opredeljivanja, a u cilju potencijalne kontrole navedenih procesa.

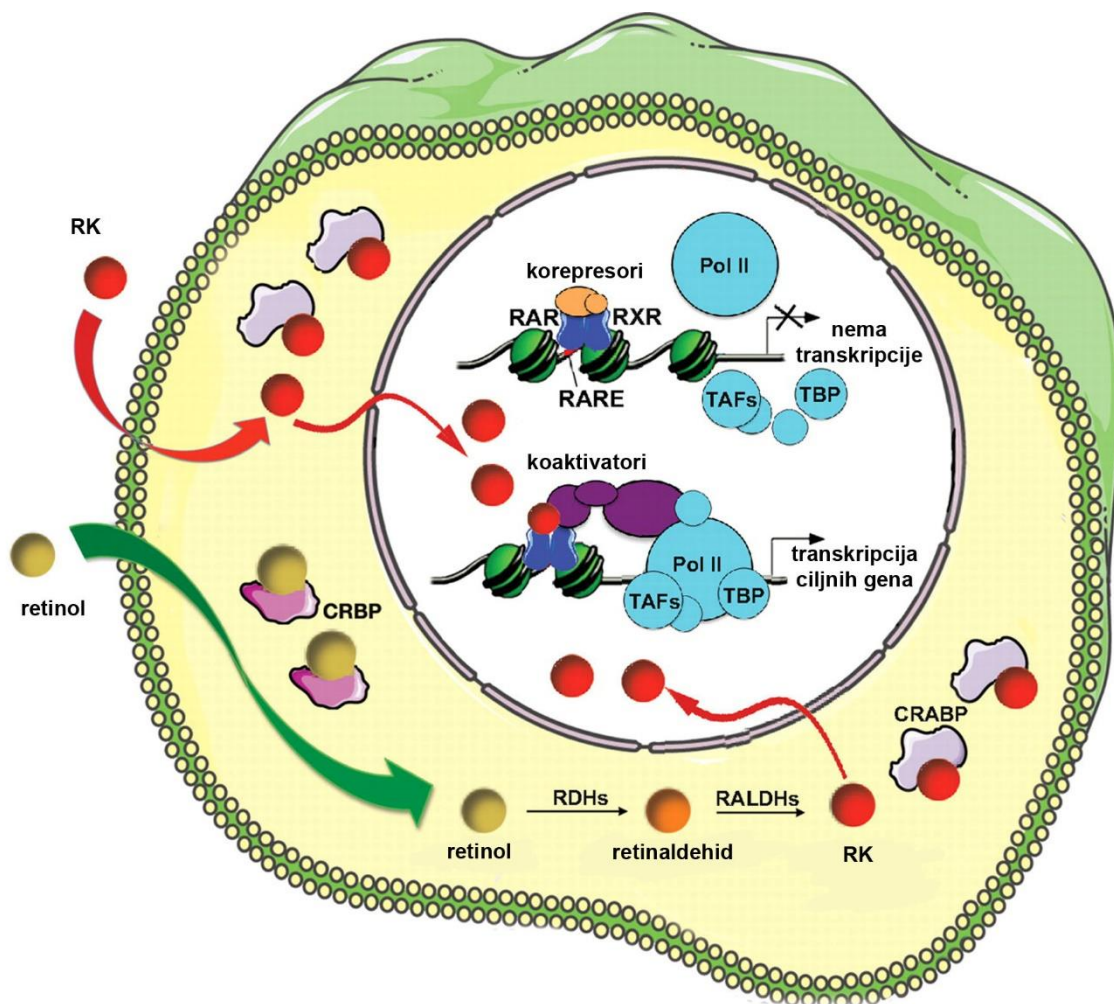
1.8. SIGNALNI PUT RETINOIČNE KISELINE

Vitamin A (eng. *all-trans retinol*, retinol kod koga su sve dvostruke veze u *trans* poziciji) i njegovi aktivni metaboliti, retinoidi, regulišu brojne procese tokom razvika kičmenjaka kroz kontrolu ćelijske proliferacije, diferencijacije i apoptoze (Gudas, 1994, Dolle, 2009, Mark *et al.*, 2009, Mezquita & Mezquita, 2019, Thompson *et al.*, 2019). Dva tipa transkripcionih faktora, receptora retinoične kiseline, RAR (eng. *retinoic acid receptor*) (izoforme RAR α , β i γ) i retinoidni X receptori-RXR (eng. *retinoid X receptor*) (izoforme RXR α , β i γ), posreduju u ostvarivanju većine funkcija biološki aktivne forme retinoične kiseline – *all-trans* retinoične kiseline i njenih specifičnih metabolita (Dolle, 2009, Mark *et al.*, 2009, Thompson *et al.*, 2019). Unutar ćelije, retinoična kiselina se transportuje u jedro vezana za CRABP2 (eng. *cellular retinoic*

acid binding protein 2) (Delva *et al.*, 1999, Schug *et al.*, 2007), gde se vezuje za RAR α (eng. *retinoic acid receptor α*), β (eng. *retinoic acid receptor β*) i γ (eng. *retinoic acid receptor γ*). RAR receptori sa RXR receptorima formiraju heterodimerni kompleks koji se vezuje za DNK (Delva *et al.*, 1999, Schug *et al.*, 2007, Rochette-Egly, 2020). U prisustvu agonista retinoične kiseline ovaj kompleks menja konformaciju, aktivirajući transkripciju ciljnih gena (Delva *et al.*, 1999, Schug *et al.*, 2007). Aktivacija transkripcije jedan je od prvih koraka u procesu diferencijacije indukovanom retinoičnom kiselinom i inicirana je vrlo brzo po dodavanju retinoične kiseline medijumu za gajenje ćelija (LaRosa & Gudas, 1988, Langston & Gudas, 1992). Geni koji predstavljaju rane, primarne targete retinoične kiseline poseduju regulatorne elemente pojačivače-RARE (eng. *retinoic acid response elements*) za koje se vezuju RXR/RAR heterodimeri (LaRosa & Gudas, 1988, Langston & Gudas, 1992, Rochette-Egly, 2020). Poznati su geni koji imaju kompleksne RARE elemente, kao i oni koji ih ne poseduju već su indirektno regulisani retinoičnom kiselinom i predstavljaju sekundarne ciljne gene koji generišu sekundarni odgovor na retinoičnu kiselinu (pregled u (Gudas & Wagner, 2011)). Mehanizam aktivacije transkripcije ciljnih gena retinoične kiseline posredovan je vezivanjem retinoičnom kiselinom-aktiviranih RXR/RAR kompleksa za heterohromatin, regrutacijom ATP-zavisnih SWI/SNF (eng. *Swich/Sucrose Non-Fermentable*) remodelujućih kompleksa i vezivanjem proteina NF1 (eng. *neurofibromin 1*) koji stabilizuje otvorenu strukturu nukleozoma, čime se omogućava vezivanje RNK polimeraze II (Li *et al.*, 2010). Ova sposobnost agonista retinoične kiseline da izmene strukturu RXR/RAR kompleksa i olakšaju njegovo vezivanje za kompaktni hromatin u blizini primarnih ciljnih gena, za posledicu ima uspostavljanje epigenetičke modifikacije na ovim genima koje su specifične za ćelijsku liniju (Mongan & Gudas, 2007). Ove retinoičnom kiselinom-indukovane epigenetičke modifikacije finalno rezultuju izmenjenom aktivnošću transkripcionih faktora u okviru transkripcionih mreža regulisanih retinoičnom kiselinom- (Mongan & Gudas, 2007). Interakcijama RXR/RAR kompleksa sa drugim proteinima, koaktivatorima i korepresorima, obezbeđuje se fina regulacija ćelijskog odgovora na retinoičnu kiselinu i integrišu se signali iz drugih signalnih puteva (Gaillard *et al.*, 2006, Santos & Kim, 2010, Rochette-Egly, 2020). Stoga, signalizacija posredovana retinoičnom kiselinom predstavlja esencijalni, rani signal koji inicira kaskadu događaja koji vode opredeljivanju i diferencijaciji ćelija na različitim stadijumima pluripotentnosti (Gaillard *et al.*, 2006, Santos & Kim, 2010, Chatagnon *et al.*, 2015). Represija gena posredovana retinoičnom kiselinom je manje ispitana. Pokazano je da gajenje embrionalnih matičnih ćelija u medijumu sa retinoičnom kiselinom dovodi do povećane ekspresije GCNF (eng. *germ cell nuclear factor*) koji reprimira gene faktore pluripotentnosti *Sox2*, *Oct4* i *Nanog* (Gu *et al.*, 2005, Akamatsu *et al.*, 2009), čija je smanjena aktivnost jedan od osnovnih markera početka diferencijacije (Niwa *et al.*, 2000). Shematski prikaz signalizacije posredovane retinoičnom kiselinom prikazan je na **Slici 11**.

Takođe, pokazano je da se RXR za svoje ciljne sekvence može vezivati kao homodimer (Ijpenberg *et al.*, 2004) ili u kompleksu sa drugim unutarćelijskim receptorima, kao što su receptori tireoidnog hormona (eng. TRs, *Thyroid hormone receptors*), receptori vitamina D (eng. VDRs, *vitamin D receptors*), peroksizomalni proliferator-aktivirani receptor (eng. PPAR, *peroxisome proliferator-activated receptor*), farnezoid X-aktivirani receptor (eng. FXR, *farnesoid X-activated receptor*) i brojni drugi (Laudet V, 2002, Lefebvre *et al.*, 2010). Rezultujući heterodimeri ostvaruju svoje funkcije u regulaciji genske ekspresije, na taj način integrišući različite signalne

puteve (Germain *et al.*, 2006). RXR homodimeri se vezuju za RE (eng. *response element*) kod kojih su polumesta razdvojena 1 bp (DR-1), dok se heterodimerni kompleksi sa RXR-om vezuju za elemente u kojima su vezivna polumesta razdvojena sa 1-5 bp (DR-1 do DR-5) (Laudet V, 2002). Stoga konfiguracija ovih RE određuje selektivnost i specifičnost RXR homo/heterodimera (Glass, 1994, Laudet V, 2002).



Slika 11. Shematski prikaz signalnog puta retinoične kiseline. RK – retinoična kiselina, RAR – eng. *retinoic acid receptor*, RXR – eng. *retinoid X receptor*, RARE – eng. *retinoic acid response elements*, POLII – RNK polimeraza II, TBP – eng. *TATA-binding protein*, TAF – eng. *TATA-binding protein associated factor*, CRABP2 - eng. *cellular retinoic acid binding protein 2*, RDH – retinol dehidrogenaza, RALDH – retinaldehid dehidrogenaza. Preuzeto i izmenjeno iz Rhinn (2012).

Dugo je poznata činjenica da su retinoidi neophodni za pravilan tok embriogeneze, a mehanizmi njihovog dejstva ispitani su u VAD (eng. *vitamin A deficiency*) životinjskim modelima kod kojih postoji potpuno odsustvo vitamina A i retinoidne signalizacije (Dong & Zile, 1995, Zile, 2004). Kod *wt* životinja embrioni koriste majčine depoe vitamina A za metabolizam retinoida, dok kod VAD modela ovakvi depoi ne postoje (Dong & Zile, 1995, Zile, 2004). VAD majka ostaje zdrava sve

dok joj se retinoična kiselina dodaje u vidu dodataka u ishranu (Dong & Zile, 1995, Zile, 2004). Embrion, međutim, ne može da koristi retinoide u ovom obliku i stoga se embriogeneza odigrava u odsustvu retinoidne signalizacije (Dong & Zile, 1995, Zile, 2004). VAD embrioni prepelice preživljavaju samo do 4. dana embriogeneze, usled letalnih oštećenja u nervnom i kardiovaskularnom sistemu (Zile, 2004). Ove malformacije se u potpunosti prevazilaze dodavanjem retinoične kiseline *in ovo* ili kultivacijom embriona u prisustvu retinoične kiseline pre stupnja od 5 somita, što jasno ukazuje na esencijalnu ulogu signalizacije posredovane retinoičnom kiselinom u ovom stadijumu razvoja embriona. Uloga retinoične kiseline u embriogenezi evolutivno je očuvana, kako je pokazano kod glodara (Li *et al.*, 2012) i svinja (Hale, 1935) rodjenih od VAD majki.

Signalizacija posredovana retinoičnom kiselinom uključena je u razviće CNS-a (Maden, 2002). Kod nižih kičmenjaka neophodna je za generisanje odgovarajućeg broja primarnih neurona, kao i za njihovo ispravno pozicioniranje (Sharpe & Goldstone, 2000). Prilikom embrionalnog razvića CNS-a kičmenjaka, retinoična kiselina ima važnu ulogu u obrazovanju anteriorno-posteriorne i dorzo-ventralne ose (Cunningham *et al.*, 1994), pri čemu su glavna mesta njenog dejstva prednji mozak i anteriorni delovi kičmene moždine (Glover *et al.*, 2006). Takođe, retinoična kiselina reguliše razvoj interneurona i motoneurona duž dorzo-ventralne ose (Sockanathan & Jessell, 1998). Nadalje, opisane su značajne uloge retinoične kiseline u adultnom mozgu (Christie *et al.*, 2008). Pokazano je da se retinoična kiselina sintetiše u regionima mozga koji kod odraslih jedinki prolaze kroz aktivno remodelovanje (bazalne ganglije, olfaktorni bulbus, hipokampus i aferentni slušni neuroni) (Dev *et al.*, 1993). Važno je napomenuti da visoki nivoi retinoične kiseline i asociраних proteina u dentatnom girusu hipokampusa impliciraju učešće ovih molekula u region-specifičnoj neurogenezi (Jacobs *et al.*, 2006). Pokazano je da retinoična kiselina u dentatnom girusu značajno doprinosi ranim fazama neuronalne diferencijacije (Jacobs *et al.*, 2006). Pored uloge u razviću CNS-a, retinoična kiselina je neophodna za morfogenezu i diferencijaciju oka, bubrega, kardiovaskularnog sistema, pluća i udova (pregledi dati u (Rhinn & Dolle, 2012, Das *et al.*, 2014, Thompson *et al.*, 2019)).

Retinoična kiselina je potentan agens za indukciju diferencijacije embrionalnih matičnih ćelija, čiji je kapacitet za spontanu *in vitro* diferencijaciju ograničen (Tighe & Gudas, 2004). Pokazano je da se dodavanjem retinoične kiseline u medijum u kome se gaje brzo proliferišuće embrionalne matične ćelije miša generišu neuralni progenitori sa karakteristikama radijalnih glijalnih ćelija tipičnih za CNS u razvoju (Bibel *et al.*, 2004, Plachta *et al.*, 2004). U ovim uslovima dobijene su uniformne populacije ćelija koje eksprimiraju neuralni marker PAX6 (eng. *Paired box 6*), a koje nakon dalje *in vitro* kultivacije mogu nastaviti proces diferencijacije do stadijuma neurona čije su elektrofiziološke karakteristike i sinaptički kontakti slični onima kod piramidalnih neurona prednjeg mozga (Bibel *et al.*, 2004, Plachta *et al.*, 2004). Kada se transplantiraju u neuralnu cev embriona pileta, embrionalna tela (grupacije pluripotentnih matičnih ćelija nastale pod dejstvom retinoične kiseline) doprinose nastanku interneurona i motoneurona kičmene moždine (Bibel *et al.*, 2004, Plachta *et al.*, 2004). Slični rezultati dobijeni su i prilikom diferencijacije embrionalnih karcinomskih ćelija, o čemu će više reći biti u narednom odeljku.

Mehanizmi neuralne diferencijacije indukovane retinoičnom kiselinom su kompleksni i zahtevaju interakciju velikog broja proteina i signalnih puteva (Xu *et al.*, 1999, Mongan & Gudas, 2007, Perissi *et al.*, 2010). Jedan od važnih aspekata dejstva

retinoične kiseline jeste interakcija sa PcG proteinima, koji formiraju velike komplekse za utišavanje gena sa ključnim ulogama u procesu diferencijacije i embrionalnog razvića (Gillespie & Gudas, 2007a, b, Sessa *et al.*, 2007). PcG proteini SUZ12 (eng. *Polycomb Repressive Complex 2 Subunit*) i EZH2 (eng. *Enhancer of Zeste homolog 2*) deluju kao globalni regulatori održavanja epigenetički reprimiranog stanja i u embrionalnim matičnim ćelijama aktivno utišavaju gene važne za ćelijsko opredeljivanje i diferencijaciju (Simon & Kingston, 2009). U nediferenciranim matičnim ćelijama primarni ciljni geni retinoične kiseline, kao što su *Hoxa1* (eng. *Homeobox A1*), *Cyp26a1* (eng. *Cytochrome P450 Family 26 Subfamily A member 1*), *RARβ2*, obeleženi su PcG kompleksima (Gillespie & Gudas, 2007b). Nakon dodavanja retinoične kiseline medijumu za gajenje ćelija, dolazi do brze disocijacije PcG proteina sa ciljnih gena retinoične kiseline, što ukazuje na funkcionalne i antagonističke veze između retinoidne signalizacije i reprimirajućih kompleksa, čime se održavaju karakteristike matičnih ćelija (Gillespie & Gudas, 2007a, b).

Signalni put retinoične kiseline uključen je u regulaciju ekspresije gena *SOX3* (Stevanovic, 2003). Kako je prethodno pokazano, 2 dana nakon dodavanja retinoične kiseline medijumu za gajenje NT2/D1 ćelija dolazi do porasta nivoa ekspresije ovog gena (Stevanovic, 2003). Regulacija ekspresije gena *SOX3* posredovana retinoičnom kiselinom ostvaruje se preko DR-3-like RXR RE elementa (Nikcevic *et al.*, 2008) i atipičnog RA/RXR RE (Mojsin *et al.*, 2006). Takođe, identifikovani su transkripcioni faktori, regulatori ekspresije gena *SOX3*, uključeni u modulaciju efekta retinoične kiseline na aktivaciju *SOX3* u inicijalnim fazama neuralne diferencijacije NT2/D1 ćelija: NF-Y (eng. *Nuclear transcription factor Y*), PBX1 (eng. *Pre-B-cell leukemia transcription factor 1*), i MEIS1 (eng. *Myeloid ecotropic viral integration site-1*), (Kovacevic Grujicic *et al.*, 2005, Krstic *et al.*, 2007, Nikcevic *et al.*, 2008, Mojsin & Stevanovic, 2009).

Usled kompleksne uloge retinoida u razviću CNS-a i drugih sistema organa, narušena retinoidna signalizacija dovodi se u vezu sa brojnim oboljenjima, među kojima su Alchajmerova i Parkinsonova bolest kao i poremećaji metabolizma kao što su dijabetes, gojaznost i metabolički sindrom (Das *et al.*, 2014, Das *et al.*, 2019). Takođe, poslednjih godina pokazan je značaj retinoida kao hemoterapeutika koji mogu indukovati diferencijaciju i/ili apoptozu tumorskih ćelija, a poseduju i značajne antiproliferativne i antioksidativne aktivnosti, te stoga predstavljaju agense sa potencijalnom primenom u lečenju različitih tipova maligniteta (pregled u (Das *et al.*, 2014, Ni *et al.*, 2019)). Zahvaljujući ulozi retinoidne signalizacije u neurogenezi, neuronalnoj plastičnosti, kontroli motornih i kognitivnih funkcija, pokazano je da dodatak retinoične kiseline ishrani poboljšava funkcije mozga oslabljene starenjem (Etchamendy *et al.*, 2001, Olson & Mello, 2010, Colas *et al.*, 2020).

1.9. NT2/D1 ĆELIJE

Zahvaljujući svojim jedinstvenim karakteristikama, tumori germinativnih ćelija (GCT, eng. *germ cell tumors*) već decenijama su u istraživačkom fokusu brojnih grupa (Stevens, 1967, 1984, Oosterhuis *et al.*, 1997, Donovan & de Miguel, 2003, Nappi *et al.*, 2019). Ovi tumori pokazuju visoku senzitivnost na hemoterapiju cisplatinom (Einhorn, 2002, Chovanec *et al.*, 2018, Singh *et al.*, 2019). Genetičke aberacije različitih tipova tumora germinativnih ćelija precizno su definisane, što olakšava dijagnostiku i

terapiju ovih maligniteta (pregledi u (Oosterhuis & Looijenga, 2005, Chovanec *et al.*, 2018, Leao *et al.*, 2019)). Tumorske ćelije zadržavaju osobine matičnih ćelija što ih čini jednim totipotentim tumorima (Honecker *et al.*, 2006) i mnoge ćelije GCT imaju sposobnost diferencijacije (Andrews, 1984). Na osnovu histologije tumora i kliničkih karakteristika GCT su podeljeni u seminome i neseminome (Oosterhuis & Looijenga, 2005). Na osnovu histoloških karakteristika, postoji više tipova neseminoma tumora koji odgovaraju pojedinim stadijumima embrionalnog razvića (Oosterhuis & Looijenga, 2005). Embrionalne karcinomske ćelije predstavljaju matične ćelije neseminoma GCT (Honecker *et al.*, 2006). Izučavanje *in vitro* diferencijacije embrionalnih karcinomskih ćelija omogućilo je detaljan uvid u procese opredeljivanja matičnih ćelija (Honecker *et al.*, 2006). Najviše korišćena i najbolje okarakterisana humana embrionalna karcinomska ćelijska linija je NTera-2cl.D1 (NT2/D1) (Andrews, 1984, Andrews *et al.*, 1984, Andrews *et al.*, 1990, Pleasure *et al.*, 1992, Pleasure & Lee, 1993, Miyazono *et al.*, 1995, Hartley *et al.*, 1999, Przyborski *et al.*, 2000, Satoh & Kuroda, 2000, Stevanovic, 2003, Megiorni *et al.*, 2005, Goodfellow *et al.*, 2011). Neuralna diferencijacija NT2/D1 indukovana retinoičnom kiselinom predstavlja robustan, reproducibilan i pouzdan model sistem *in vitro* humane neurogeneze (Andrews, 1984, Dmitrovsky *et al.*, 1990, Leypoldt *et al.*, 2001).

Ćelijska linija NTera2 dobijena je subkloniranjem iz linije Tera2 izolovane iz tumora pluća nastalog metastazom testikularnog teratokarcinoma (Andrews *et al.*, 1984). NT2/D1 ćelije po svojoj morfologiji, imunofenotipskim karakteristikama i ekspresiji specifičnih markera pokazuju veliku sličnost sa humanim embrionalnim matičnim ćelijama (Pleasure & Lee, 1993, Przyborski *et al.*, 2000). Imunofluorescentnim bojenjem nediferenciranih NT2/D1 ćelija pokazani su visoki nivoi ekspresije nestina i vimentina, intermedijarnih filamenata karakterističnih za neuroepitelijalne matične ćelije, kao i prisustvo MAP1b (eng. *Microtubule-associated protein 1b*) proteina, markera asociranog sa mikrotubulama i eksprimiranog u humanom germinativnom neuroepitelu (Pleasure & Lee, 1993). Takođe, NT2/D1 ćelije na svojoj površini eksprimiraju polizilovan NCAM (PSA-NCAM, eng. *polysialylated Neural Cell Adhesion Molecule*) i N-kadherin, koji se pojavljuju veoma rano u neuroepitelu CNS-a u razvoju i čije je prisustvo u obrnutoj korelaciji sa stadijumom zrelosti neuralnih ćelija (Pleasure & Lee, 1993). Nediferencirane NT2/D1 ćelije na svojoj površini takođe eksprimiraju antigene markere embrionalnih karcinomskih ćelija SSEA3 (eng. *Stage-specific embryonic antigen 3*), SSEA4 (eng. *Stage-specific embryonic antigen 4*) i TRA-1-60 (eng. *T cell receptor alpha locus* ili *Podocalyxin*) (Pleasure & Lee, 1993), dok ih visoka ekspresija markera plutipotentnosti SOX2, OCT4 i NANOG čini sličnim humanim embrionalnim matičnim ćelijama (Andrews, 1984, Pleasure & Lee, 1993, Hart *et al.*, 2004). Nakon indukcije NT2/D1 ćelija retinoičnom kiselinom dolazi do njihovog opredeljivanja i diferencijacije u sva 3 ćelijska tipa neuralnih ćelija CNS-a – neurone, astrocite i oligodendrocite (Misiuta *et al.*, 2006). Tretman retinoičnom kiselinom praćen je dramatičnim izmenama u ekspresionom profilu gena u NT2/D1 ćelijama (Andrews *et al.*, 1990). U prva 2 dana tretmana dolazi do gubitka ekspresije SSEA3, SSEA4 i TRA-1-60 markera (Pleasure & Lee, 1993), kao i dramatičnog smanjenja nivoa markera pluripotentnosti SOX2, OCT4 i NANOG (Houldsworth *et al.*, 2002, Przyborski *et al.*, 2003, Deb-Rinker *et al.*, 2005). Paralelno, dolazi do povećanja ekspresije pro-neuralnih gena (Przyborski *et al.*, 2000, Przyborski *et al.*, 2003). U prvoj fazi neuralne diferencijacije (3 dana indukcije retinoičnom kiselinom) dolazi do tranzijentnog porasta nivoa nestina, intermedijarnog filamena tipičnog za proliferišuće neuralne progenitore,

što ukazuje da se populacija neuralnih progenitora pojavljuje ubrzo nakon počeka tretmana pluripotentnih NT2/D1 ćelija retinoičnom kiselinom (Przyborski *et al.*, 2000, Przyborski *et al.*, 2003). U drugoj fazi (od 7-14 dana indukcije retinoičnom kiselinom) dolazi do akumulacije iRNK za nestin, što se podudara sa fazom u kojoj opredeljene prekursorske ćelije izlaze iz ćelijskog ciklusa (Przyborski *et al.*, 2003). Treću fazu karakteriše porast nivoa sinaptofizina i neuron-specifične enolaze (NSE, eng. *Neuron-specific Enolase*), markera terminalno diferenciranih neurona, koji se javljaju sa zakašnjenjem u odnosu na ekspresiju neuroD1 (eng. *Neuronal Differentiation 1*), što dokazuje da je diferencijacija NT2/D1 ćelija progresivna i postepena (Przyborski *et al.*, 2003). Nakon "pionirskih" studija Przyborskog i saradnika, usledile su brojne analize u kojima su identifikovani geni čija je ekspresija izmenjena po indukciji diferencijacije NT2/D1 ćelija retinoičnom kiselinom, uz detaljnu karakterizaciju transkriptoma i proteoma ovih ćelija (Leypoldt *et al.*, 2001, Megiorni *et al.*, 2005, Honecker *et al.*, 2014). Svi rezultati jasno su dokazali da se ključni događaji koji iniciraju neuralnu diferencijaciju NT2/D1 ćelija odigravaju brzo po dodavanju retinoične kiseline (Pleasure & Lee, 1993, Przyborski *et al.*, 2000, Leypoldt *et al.*, 2001, Przyborski *et al.*, 2003, Deb-Rinker *et al.*, 2005, Megiorni *et al.*, 2005, Honecker *et al.*, 2014), što pluripotentne ćelije uvodi u ireverzibilno opredeljivanje i diferencijaciju do zrelih neurona i ne-neuronalnih ćelijskih tipova nakon 2-4 nedelje tretmana retinoičnom kiselinom (Pleasure & Lee, 1993, Guillemain *et al.*, 2000, Przyborski *et al.*, 2000, Przyborski *et al.*, 2003). Terminalno diferencirani neuroni (NT2-N) manjih su dimenzija u poređenju sa nediferenciranim NT2/D1 ćelijama i rastu u višeslojnim grupama koje su međusobno povezane ćelijskim nastavcima (Andrews, 1988, Pleasure *et al.*, 1992, Guillemain *et al.*, 2000). Takođe, NT2-N eksprimiraju brojne citoskeletne proteine i površinske i sinaptičke/sekretorne molekule karakteristične za zrele humane neurone (Sheridan & Maltese, 1998, Satoh & Kuroda, 2000, Megiorni *et al.*, 2005, Tegenge *et al.*, 2009), formiraju funkcionalne sinapse i generišu akcione potencijale (Hartley *et al.*, 1999, Podrygajlo *et al.*, 2010, Coyle *et al.*, 2011). Pokazano je da NT2-N eksprimiraju, sekretuju i pokazuju receptivnost na neurotransmitere (Coyle *et al.*, 2011).

Neuralna diferencijacija NT2/D1 ćelija praćena je smanjenjem proliferativnog kapaciteta i gubitkom tumorogenog potencijala (Andrews, 1984, Kurie *et al.*, 1993, Spinella *et al.*, 1999). Pluripotentne NT2/D1 ćelije transplantirane u subarahnoidni prostor i površinski neokorteks, kao i u lateralne komore, jetru i mišiće glodara formiraju letalne tumore (Miyazono *et al.*, 1995). Međutim, pluripotentne NT2/D1 ćelije transplantirane u bazalne ganglije nastavljaju da proliferišu, paralelno sa diferencijacijom velikog broja ovih ćelija u ćelije slične nezrelim neuronima (Miyazono *et al.*, 1995). Sa druge strane, u eksperimentima transplantacije NT2-N u mozak adultnih i novorođenih miševa nije detektovana pojava tumora, kao ni reverzija neurona u ćelije sa malignim potencijalom ni godinu dana nakon intervencije (Trojanowski *et al.*, 1993). Dodatno, određen broj studija bavio se potencijalnom upotrebom NT2-N kao ćelijske terapije u lečenju povreda mozga, ishemije mozga i neurodegenerativnih bolesti (Dunnnett *et al.*, 1997, Borlongan *et al.*, 1998a, b, Hurlbert *et al.*, 1999, Saporta *et al.*, 1999, Willing *et al.*, 1999, Baker *et al.*, 2000, Kondziolka *et al.*, 2000, Lee *et al.*, 2000, Saporta *et al.*, 2002, Willing, Zigova, *et al.*, 2002, Kondziolka *et al.*, 2003, Stille *et al.*, 2004, Kondziolka *et al.*, 2005). Transplantacija NT2-N u mozak ishemičnih pacova rezultovala je značajnim poboljšanjem stanja, a neželjeni efekti nisu detektovani (Borlongan *et al.*, 1998a, b, Saporta *et al.*, 1999, Willing, Saporta, *et al.*, 2002). NT2-N graftovi uspešno su korišćeni i u animalnim modelima Hantingtonove i Parkinsonove

bolesti (Dunnett *et al.*, 1997, Hurlbert *et al.*, 1999, Willing *et al.*, 1999, Baker *et al.*, 2000, Willing, Zigova, *et al.*, 2002), kao i u povredama kičmene moždine miša i pacova (Lee *et al.*, 2000, Saporta *et al.*, 2002). Takođe, NT2-N transplantati korišćeni su u fazama I i II kliničkih istraživanja na pacijentima koji su pretrpeli moždani udar u oblasti bazalnih ganglija (Kondziolka *et al.*, 2000, Kondziolka *et al.*, 2003, Stillely *et al.*, 2004, Kondziolka *et al.*, 2005). Iako je u obe studije došlo do poboljšanja u motoričkim funkcijama pacijenata-recipientata NT2-N transplantata, zbog nereprezentativnog uzorka nisu izvedeni statistički značajni zaključci (Kondziolka *et al.*, 2000, Kondziolka *et al.*, 2003, Stillely *et al.*, 2004, Kondziolka *et al.*, 2005). Takođe, oštećenja uzrokovana ishemijom retko su ograničena na striatum mozga, i stoga je neophodna dalja analiza potencijalne upotrebe NT2-N transplanata kod ovakvih pacijenata, kao i procena uspešnosti u terapiji ove patologije (Banerjee *et al.*, 2000).

Imajući u vidu veliki broj studija u kojima su NT2/D1 ćelije proučavane i korišćene kako za analizu procesa neuralne diferencijacije, tako i za potencijalnu primenu njihovih diferenciranih ćelijskih derivata u terapiji brojnih patologija CNS-a, ova ćelijska linija predstavlja nezamenljiv, dobro okarakterisan i pouzdan *in vitro* model sistem humane neurogeneze. Dugogodišnje uspešno korišćenje ovog sistema u razvojnim, neurobiološkim i kliničkim studijama potvrđuje opravdanost upotrebe NT2/D1 linije u rasvetljavanju mehanizama koji leže u osnovi procesa neuralne diferencijacije, uključujući analizu genske ekspresije, signalnih puteva, epigenetičkih mehanizama i kompleksnih regulatornih mreža kojima se humana neurogeneza usmerava i održava.

In vitro diferencijacija NT2/D1 ćelija indukovanih retinoičnom kiselinom praćena je promenama u ekspresionim profilima gena *SOXB1* grupe. Literaturni podaci pokazuju da su u nediferenciranim NT2/D1 ćelijama eksprimirani svi članovi ove grupe gena a da tokom četiri nedelje neuralne diferencijacije indukovane retinoičnom kiselinom imaju veoma dinamične ekspresione profile (Stevanovic, 2003, Sikorska *et al.*, 2008, Popovic *et al.*, 2014). Ekspresija *SOX1* je visoka u nediferenciranim NT2/D1 ćelijama, opada nakon prve nedelje diferencijacije, tranzijentno raste u 2. nedelji da bi usledio pad do kraja 4. nedelje diferencijacije. Ekspresioni profil *SOX2* karakteriše visok nivo ekspresije tokom sve 4 nedelje sa pikom u 2. nedelji diferencijacije. Ekspresija *SOX3* pokazuje nizak nivo u nediferenciranim NT2/D1 ćelijama koji tranzijentno raste u 1. nedelji diferencijacije a zatim pada da bi na kraju 4. nedelje pao ispod nivoa ekspresije u nediferenciranim NT2/D1 ćelijama (Stevanovic, 2003, Popovic *et al.*, 2014). Zanimljivo je da u studiji Sikorske i saradnika nije detektovana ekspresija *SOX2* u NT2-N neuronima dobijenim *in vitro* diferencijacijom NT2/D1 ćelija (Sikorska *et al.*, 2008). Takođe, studija Klajn i saradnika je pokazala da na završnim stadijumima diferencijacije zreli neuroni NT2-N i zreli astrociti NT2-A ne eksprimiraju *SOX2* (Klajn *et al.*, 2014). Ovi rezultati ukazuju da je za dostizanje finalnih stadijuma neuralne diferencijacije neophodno utišavanje gena *SOX2*.

1.10. ULOGA GENA *SOXB1* GRUPE U REGULACIJI PROCESA NEURALNE DIFERENCIJACIJE

Razviće CNS-a predstavlja kompleksan proces zasnovan na integraciji spoljašnjih i unutrašnjih signala uz vremenski i prostorno koordinisanu aktivnost velikog broja transkripcionih regulatora i komponenti epigenetičke mašinerije, koji

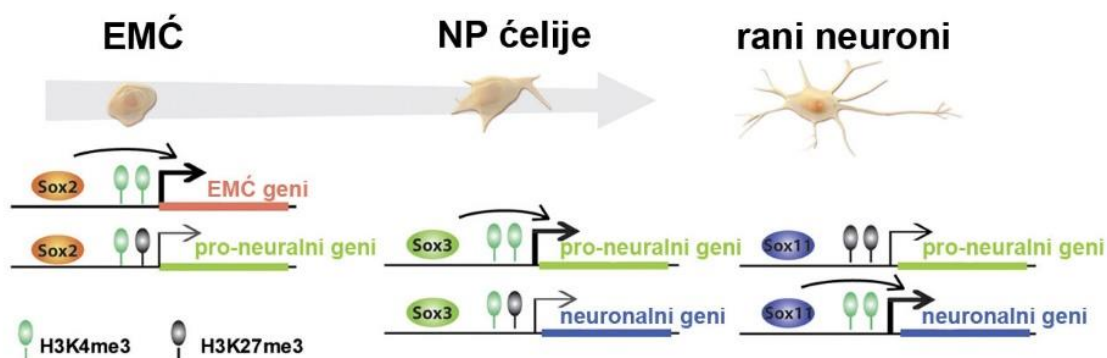
rezultuje diferencijacijom multipotentnih samoobnavljajućih progenitorskih ćelija u neurone, oligodendrocite i astrocite (Pearson & Doe, 2004). SOXB1 grupa proteina nalazi se među ključnim regulatornim komponentama koje definišu identitet neuralnih progenitora (pregledi dati u (Pevny & Placzek, 2005, Reiprich & Wegner, 2015)).

Tokom evolucije, ekspresija *SoxB1* (*Sox1*, *Sox2* i *Sox3*) grupe gena usko je specijalizovana i ograničena na ćelijske tipove opredeljene ka neuralnoj diferencijaciji. *Sox1*, *Sox2* i *Sox3* ortolozi kod *Drosophila*-e, *Amphioxus*-a, *Xenopus*-a, *Danio rerio* i *Aves* eksprimirani su u ćelijama koje imaju sposobnost formiranja neuralnog primordijuma, a zatim se njihova ekspresija ograničava na ćelije sa neuralnim identitetom (Uwanogho *et al.*, 1995, Nambu & Nambu, 1996, Russell *et al.*, 1996, Penzel *et al.*, 1997, Rex *et al.*, 1997, Streit *et al.*, 1997, Mizuseki *et al.*, 1998, Cremazy *et al.*, 2000, Holland *et al.*, 2000). Kod miša, pokazana je pan-ektodermalna ekspresija SOX2 i SOX3 proteina duž proksimalno-distalne ose embrionalnog cilindra (Collignon *et al.*, 1996, Wood & Episkopou, 1999). Inicijacija ekspresije SOX1 proteina u ektodermalnim ćelijama opredeljenim ka neuralnoj diferencijaciji koincidira sa indukcijom neuralnog ektoderma i odvija se paralelno sa ograničavanjem ekspresije SOX2 i SOX3 proteina na iste ćelijske tipove (Pevny *et al.*, 1998). U embrionima pileta pre neuralne indukcije, SOX3 se inicijalno eksprimira širom ektoderma u ćelijama kompetentnim da diferenciraju u nervno tkivo, da bi nakon procesa neuralne indukcije došlo do dramatičnog porasta ekspresije SOX2 proteina u ćelijama neuralnog ektoderma (Uchikawa *et al.*, 2003, Linker & Stern, 2004). U embrionima *Xenopus*-a proteini SOX2 i SOX3 takođe definišu novo-indukovanu nervnu ploču (Mizuseki *et al.*, 1998, Hardcastle & Papalopulu, 2000). Kod *Drosophila*-e, ortolog gena *Sox2* (*Dichaete*) eksprimiran je u sincicijalnom blastodermu, da bi se do stadijuma rane gastrulacije ekspresija održala u neuroblastima novoformirane nervne cevi (Nambu & Nambu, 1996, Russell *et al.*, 1996). *SoxNeuro*, ortolog *SoxB1* gena, kod *Drosophila*-e pokazuje dinamičan ekspresioni profil, označavajući budući ventro-lateralni ektoderm, a u kasnijim fazama cefalične i ventralne neurogene regione (Cremazy *et al.*, 2000). Svi navedeni podaci ukazuju na evolutivno očuvanu ulogu *SoxB1* familije gena u razviću CNS-a.

Ključne uloge SOXB1 faktora u određivanju neuralnog identiteta dokazane su kako u *in vivo* tako i u *in vitro* eksperimentima. U embrionima *Xenopus*-a ektopična ekspresija *Sox2* u kombinaciji sa FGF (eng. *Fibroblast Growth Factor*) faktorom inicira neuralnu diferencijaciju ektoderma (Mizuseki *et al.*, 1998), dok injeciranje dominantno negativne forme *Sox2* inhibira neuralnu diferencijaciju i u celim embrionima i u delovima tkiva gde je neuralna indukcija već inicirana utišavanjem BMP (eng. *Bone Morphogenetic Protein*) signalizacije (Mizuseki *et al.*, 1998). Takođe, u *in vitro* studiji Pevny i saradnika pokazano je da je ektopična ekspresija *Sox1* dovoljna za inicijaciju neuralne diferencijacije embrionalnih karcinomskih P19 ćelija miša u odsustvu retinoične kiseline (Pevny *et al.*, 1998). U skladu sa ovim rezultatima, detektovano je da ekspresija SOX1 i SOX2 promovise diferencijaciju embrionalnih matičnih ćelija u neuroektoderm (Zhao *et al.*, 2004).

U brojnim studijama pokazano je da je za tranziciju iz pluripotentnih matičnih ćelija u diferencirane neuronalne ćelijske tipove neophodno sekvencijalno i koordinisano delovanje članova *Sox* familije gena (Avilion *et al.*, 2003, Bylund *et al.*, 2003, Bergsland *et al.*, 2011, Buitrago-Delgado *et al.*, 2018). Uloga SOXB1 proteina ostvaruje se kako kroz njihove funkcije kao transkripcionih aktivatora (Kamachi *et al.*, 2001, Bylund *et al.*, 2003, Graham *et al.*, 2003) tako i kroz njihovu osobinu da deluju

kao arhitektonske komponente hromatina, koje menjaju lokalnu strukturu nukleozoma i regulišu dostupnost DNK sekvenci (Ferrari *et al.*, 1992). U studiji Bergsland i saradnika praćeno je vezivanje SOX2, SOX3 i SOX11 proteina na nivou celog genoma tokom neuralne diferencijacije embrionalnih matičnih ćelija miša u neuralne progenitorske ćelije, sve do stadijuma ranih neurona (Bergsland *et al.*, 2011). Rezultati pomenute studije pokazali su da se SOX2 protein u embrionalnim matičnim ćelijama, pored regulacije gena neophodnih za održavanje pluripotentnosti, vezuje i za regulatorne elemente brojnih utišanih pro-neuralnih gena, obeleženih bivalentnim H3K27me3 i H3K4me3 histonskim markerima (elementi u genomu obeleženi kombinacijom reprimirajućih H3K27me3 i aktivirajućih H3K4me3 histonskih markera, prisutni u blizini gena spremnih za brzu aktivaciju po dejstvu odgovarajućeg signala iz spoljašnje sredine) (Bergsland *et al.*, 2011). Pro-neuralni geni su na ovaj način preselektovani za kasnije vezivanje i aktivaciju od strane SOX3 proteina, koja je praćena uklanjanjem reprimirajućeg H3K27me3 markera u neuralnim progenitorskim ćelijama (Bergsland *et al.*, 2011). Aktivirajući H3K4me3 marker na ovim genima biva zamenjen reprimirajućom H3K27me3 modifikacijom u kasnijim fazama neuralne diferencijacije, što se ostvaruje vezivanjem proteina SOX11 (Bergsland *et al.*, 2011). Drugu grupu gena regulisanih aktivnošću proteina SOX3 u neuralnim progenitorskim ćelijama čine bivalentni utišani neuronalni i glijalni geni, čiji regulatorni elementi postaju monovalentni H3K4me3⁺ domeni (domeni obeleženi sa H3K4me3 modifikacijom) nakon vezivanja i aktivacije od strane SOX11, na stupnju ranih neurona (Bergsland *et al.*, 2011). Shematski prikaz sekvencijalne aktivnosti SOX proteina u procesima neuralne diferencijacije dat je na **Slici 12**. Ovim je jasno pokazana uloga SOX proteina kao “pionirskih faktora“ koji promovišu lokalne epigenetičke promene i sprečavanjem preuranjene aktivacije neuralnih gena osiguravaju vremenski koordinisanu progresiju neuralne diferencijacije.



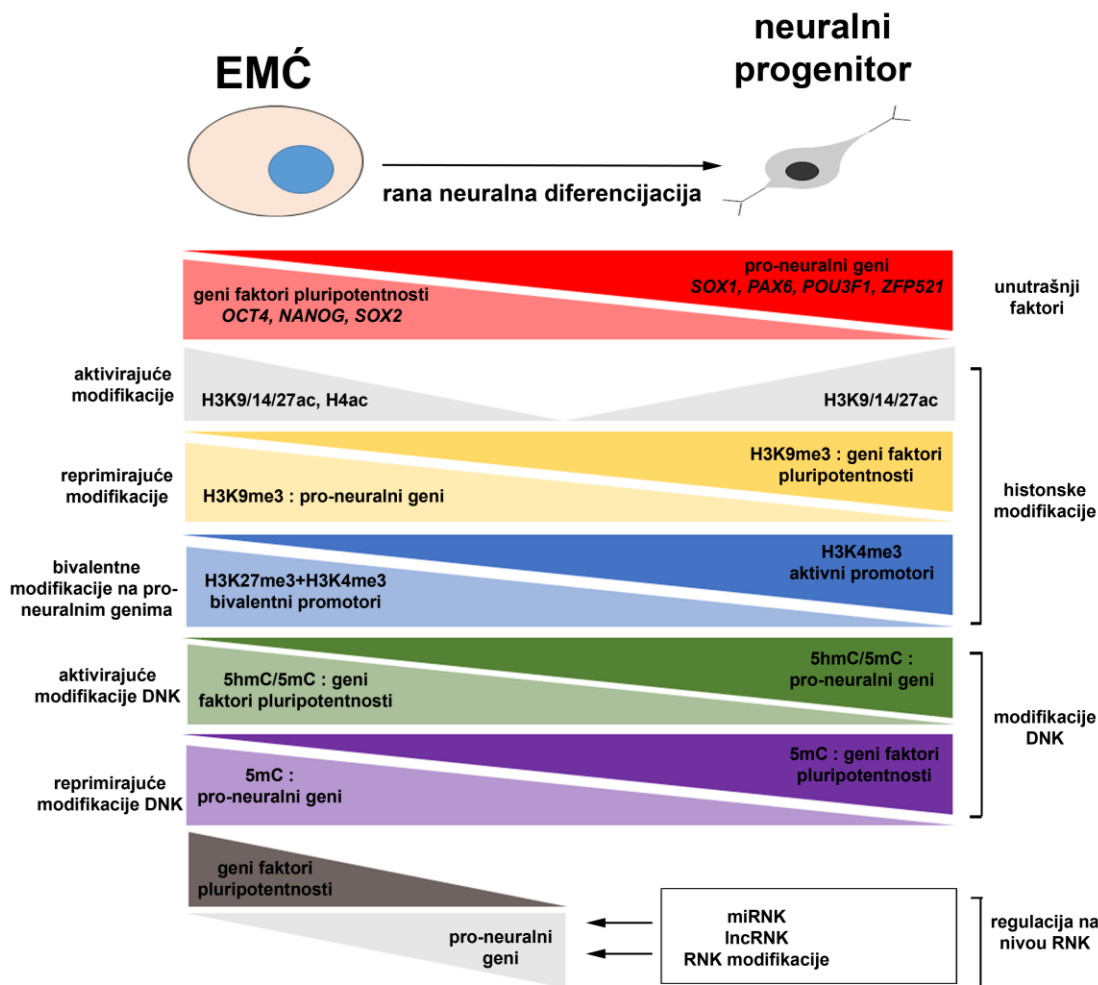
Slika 12. Shematski prikaz vremenski koordinisane aktivnosti SOX proteina i histonskih modifikacija (H3K4me3 i H3K27me3) na ciljnim genima tokom neuralne diferencijacije embrionalnih matičnih ćelija. EMĆ – embrionalne matične ćelije, NP – neuralni progenitori. Preuzeto i izmenjeno iz Bergsland (2011).

¹ u daljem tekstu histonska posttranslaciona modifikacija obeležena znakom “+“ označava prisustvo navedene modifikacije u ispitivanom regionu. Histonska posttranslaciona modifikacija obeležena znakom “-“ označava odustvo navedene modifikacije u datom regionu.

1.11. EPIGENETIČKI MEHANIZMI REGULACIJE GENSKE EKSPRESIJE

Oplođena jajna ćelija, zigot, prolazi kompleksni razvojni put u nizu precizno regulisanih ćelijskih deoba (Dettlaff, 1964). Raznovrsne ćelije novonastalog složenog organizma, koje se međusobno razlikuju kako po morfologiji tako i po funkciji, odlikuju se identičnim genetičkim kodom. Identitet svake ćelije definisan je razlikama u genskoj ekspresiji, koja je pod kontrolom epigenetičkih mehanizama (Barros & Offenbacher, 2009, Delcuve *et al.*, 2009). Termin „epigenetika“ prvi put je upotrebljen 1942. godine od strane Waddington-a kao modus kontrole fenotipa genotipom tokom procesa razvića, a ova kovanica potiče od grčke reči „epi“ što znači „iznad“ genetike (Waddington, 1959). Epigenetika se definiše kao nasledno programiranje genske ekspresije kojom se kontrolišu ćelijska morfologija i identitet, bez promena u sekvenci DNK (Delcuve *et al.*, 2009). Skup svih epigenetičkih markera definiše epigenom jedne ćelije (Bernstein *et al.*, 2007). Višedecenijski rad u ovoj oblasti rezultovao je obiljem podataka koji su epigenetiku pozicionirali u žižu kontrole procesa razvića sisara (Barber & Rastegar, 2010), diferencijacije embrionalnih matičnih ćelija (Delcuve *et al.*, 2009, Olynik & Rastegar, 2012) i brojnih patofizioloških stanja (Choo, 2011, John & Rougeulle, 2018).

U brojnim studijama pokazano je da ključnu ulogu u određivanju sudbine matičnih ćelija ima represija razvojnih gena koji definišu specifične ćelijske tipove (Azulara *et al.*, 2006, Cacci *et al.*, 2017, Podobinska *et al.*, 2017). Tokom procesa opredeljivanja matičnih ćelija ka neuralnim ćelijskim tipovima, pro-neuralni geni su aktivirani dok geni pluripotentnosti bivaju utišani (Pleasure *et al.*, 1992, Przyborski *et al.*, 2000, Przyborski *et al.*, 2003, Deb-Rinker *et al.*, 2005, Azulara *et al.*, 2006, Wang *et al.*, 2012, Cacci *et al.*, 2017, Podobinska *et al.*, 2017). Proces neurogeneze strogo je kontrolisan kooperativnim delovanjem kompleksnih epigenetičkih faktora koji uključuju modifikacije DNK, histonske markere i nekodirajuće RNK (pregledi dati u (Olynik & Rastegar, 2012, Qiao *et al.*, 2016, Cacci *et al.*, 2017, Podobinska *et al.*, 2017, Gokbuget & Blelloch, 2019)). Na **Slici 13** dat je shematski prikaz epigenetičkih modifikacija koje prate proces opredeljivanja embrionalnih matičnih ćelija ka neuralnim progenitorima.



Slika 13. Shematski prikaz epigenetičkih mehanizama regulacije neuralne diferencijacije embrionalnih matičnih ćelija. Histonske modifikacije, metilacija DNK i molekuli RNK uključeni su u procese regulacije ekspresije gena faktora pluripotencnosti i pro-neuralnih gena. EMĆ – embrionalne matične ćelije, miRNK – mikro RNK, lncRNK – duge nekodirajuće RNK. Preuzeto i izmjenjeno iz Qiao (2015).

1.11.1. Modifikacije molekula DNK

Modifikacije molekula DNK od ključnog su značaja za genomski imprinting (Li *et al.*, 1993), inaktivaciju X-hromozoma (Mohandas *et al.*, 1981), regulaciju genske ekspresije (Suzuki & Bird, 2008, Delcuve *et al.*, 2009) i održavanje epigenetičke memorije (Bird, 2002). Metilacija DNK (5mC) na 5' ugljenikovom atomu citozinskih ostataka u okviru CpG dinukleotida, je osnovni epigenetički mehanizam stabilnog utišavanja gena (Suzuki & Bird, 2008, Delcuve *et al.*, 2009). Ostali DNK markeri, kao što su 5-hidroksimetilcitozin (5hmC), 5-formilcitozin (5fC) i 5-karboksilcitozin (5caC) predstavljaju međuprodukte demetilacije DNK koji korelišu sa transkripciono aktivnim stanjem molekula DNK (Qiao *et al.*, 2016).

U humanim somatskim ćelijama 5mC čini oko 70-80% svih CpG dinukleotida u genomu (Ehrlich *et al.*, 1982). Genom kičmenjaka karakteriše prisustvo CpG ostrva, odnosno nemetilovanih GC-bogatih regiona koji se odlikuju velikom relativnom gustoćom CpG dinukleotida i lokalizovani su na 5'-regulatornim regionima brojnih gena

(Bird, 1986). Kompjuterske analize humanog genoma daju predikcije o prisustvu 29.000 CpG ostrva i oko 60% gena asociраниh sa CpG ostrvima, od kojih je većina nemetilovana na svim stadijumima razvića i u svim tkivima, bez obzira na nivo ekspresije posmatranog gena (Antequera & Bird, 1993, Lander *et al.*, 2001, Venter *et al.*, 2001). Mali, ali značajan procenat CpG ostrva metilovan je tokom razvića, što za posledicu ima stabilnu represiju asociranog promotora (Jaenisch *et al.*, 1982). Ova programirana metilacija uključena je u genomski imprinting i inaktivaciju X-hromozoma i dešava se u germinativnim ćelijama ranog embriona (Jaenisch *et al.*, 1982). Postoje dokazi da se *de novo* metilacija dešava i u adultnim somatskim ćelijama tokom starenja ili u maligno transformisanim ćelijama (Antequera *et al.*, 1990).

Mehanizmi kojima metilacija citozina dovodi do utišavanja genske ekspresije su kompleksni. Pretpostavlja se da je vezivanje transkripcionih faktora za metilovanu DNK otežano usled strukturnih i konformacionih promena ovog regiona (Watt & Molloy, 1988, Tate & Bird, 1993). Takođe, dolazi do direktnog vezivanja reprimirajućih proteinskih kompleksa i MBD (eng. *methyl-CpG-binding*) proteina za metilovane citozine, što sprečava inicijaciju transkripcije (Hendrich & Bird, 1998, Wade, 2001, Zachariah & Rastegar, 2012). Prvi identifikovani član ove grupe faktora je MeCP2 (eng. *methyl-CpG-binding protein 2*) čije mutacije za posledicu imaju razvoj Retovog sindroma (Meehan *et al.*, 1992, Amir *et al.*, 1999). MeCP2 je jedarni protein ekspimiran u brojnim tkivima i ćelijskim tipovima, ali je njegova uloga prvenstveno vezana za sazrevanje neurona CNS-a i formiranje dendrita (Rastegar *et al.*, 2009, Squillaro *et al.*, 2012, Zachariah & Rastegar, 2012). MeCP2 je uključen u brojne ćelijske procese, sa funkcijom aktivatora ili represora, zavisno od proteinskih partnera, kao što su HDAC1 (eng. *Histone Deacetylase 1*), HDAC2 (eng. *Histone Deacetylase 2*), mSin3A (eng. *SIN3 transcription regulator family member A*), CoREST (eng. *Ret1 silencing transcription factor corepressor*) (Jones *et al.*, 1998, Nan *et al.*, 1998, Ballas & Mandel, 2005, Chahrour *et al.*, 2008). Metilacija DNK ostvaruje se aktivnošću enzima DNK metiltransferaza (DNMT, eng. *DNA methyltransferase*) (Okano *et al.*, 1999). Do sada su poznata 3 tipa ovih enzima: DNMT1, koja održava obrazac metilacije DNK kroz mitotičke deobe; DNMT2, sa slabom metiltransferaznom aktivnošću; DNMT3a i DNMT3b, uključene u *de novo* metilaciju koja se odvija dodavanjem metil grupa na prethodno nemetilovanu DNK (Okano *et al.*, 1999, Bestor, 2000, Delcuve *et al.*, 2009, Zachariah & Rastegar, 2012). Delecija *Dnmt1* ili *Dnmt3a/3b* za posledicu ima ranu smrtnost embriona, što ukazuje na esencijalnu ulogu ovih enzima u procesima razvića (Okano *et al.*, 1999). DNMT3a/3b su neophodne za održanje pluripotentnosti embrionalnih matičnih ćelija koja se ostvaruje uspostavljanjem obrazaca metilacije specifičnih za matične ćelije (Azuara *et al.*, 2006, Kobayashi & Kikyo, 2015), kao i za neuralnu diferencijaciju ovih ćelija koja je omogućena metilacijom gena faktora pluripotentnosti (Li *et al.*, 2007).

Demetilacija DNK, koja je katalizovana TET (eng. *Ten-eleven translocation*) proteinima (TET1, TET2 i TET3) čiji je prvi korak konverzija 5mC u 5hmC, esencijalna je za opredeljivanje pluripotentnih ka neuralnim tipovima ćelija. Pokazano je da su 5hmC i TET1 prisutni na bivalentno obeleženim promotorima u embrionalnim matičnim ćelijama (Dawlaty *et al.*, 2011, Xu *et al.*, 2011), kao i da TET1 reguliše specifikaciju neuralnih ćelija i promovise aktivnu demetilaciju DNK u adultnom mozgu i embrionalnim matičnim ćelijama miša (Guo *et al.*, 2011, Koh *et al.*, 2011, Xu *et al.*, 2011). Takođe, globalna tranzicija iz „5mC bogatih“ embrionalnih matičnih ćelija u „5hmC bogate“ neuralne progenitore detektovana je tokom procesa neuralne

diferencijacije humanih embrionalnih matičnih ćelija, i TET proteinima posredovano generisanje 5hmC je važan mehanizam aktivacije specifičnih neuralnih markera (Qiao, Wang, Wang, *et al.*, 2015). Članovi TET proteinske familije eksprimirani su tkivno-specifično i za regulaciju ciljnih gena neophodna je njihova interakcija sa specifičnim partnerima (Xu *et al.*, 2012, Yu *et al.*, 2013, Perera *et al.*, 2015). Na nivou hromatina dolazi do složenih interakcija između DNK markera i histonskih modifikacija koje rezultuju izmenama u epigenetičkom pejzažu matičnih ćelija tokom procesa njihovog opredeljivanja (Delcuve *et al.*, 2009, Olynik & Rastegar, 2012).

Značajna uloga metilacije DNK jeste označavanje seta aktivnih promotora u embrionu, koji se potencijalno mogu reaktivirati tokom razvića i u adultnim organizmima (Boyes & Bird, 1992). Istovremeno, regulatorni regioni neaktivni u embrionu bivaju metilovani i njihov reprimiran status se održava tokom procesa razvića (Boyes & Bird, 1992). Nivo represije može biti slab ili jak, što zavisi od stepena metilacije DNK (Boyes & Bird, 1992). CpG ostrva koja su tokom embriogeneze utišana drugim mehanizmima takođe stiču visok stepen metilacije DNK, što rezultuje ireverzibilnim utišavanjem genske ekspresije (Boyes & Bird, 1992). Međutim, kada je stepen metilacije CpG ostrva nizak, kao što je slučaj u većem delu genoma, represija je najčešće slaba i može biti prevaziđena u prisustvu jakih aktivatora (Bird, 2002).

Jedan od važnih laboratorijskih pristupa kojima se prevazilazi metilacija DNK jeste upotreba demetilacionih agenasa, od kojih su najčešće korišćeni analozi nukleozida citozina -5-azacitidin (5-azaC) i 5-aza-2'-deoksicitidin (5-aza-2'-dC). 5-azaC se dugi niz godina koristi kao hemoterapeutik u akutnoj mijeloidnoj leukemiji (Sorm *et al.*, 1964, Cihak, 1974), dok je svoju primenu kao demetilujući agens našao i u brojnim *in vitro* studijama. Produkti metabolizma 5-azaC bivaju ugrađeni u molekule DNK i kao azaCG dinukleotidi prepoznati od strane enzima DNMT (Taylor & Jones, 1982, Santi *et al.*, 1984). Kovalentna veza koja nastaje između DNMT i DNK blokira rad enzima, a istovremeno predstavlja signal za degradaciju zarobljene DNMT što za posledicu ima smanjen stepen metilacije DNK (Taylor & Jones, 1982, Santi *et al.*, 1984). Brojne studije pokazuju da 5-azaC i njegovi derivati mogu biti korišćeni za *in vitro* diferencijaciju ćelija (Musch *et al.*, 2010, Qian *et al.*, 2012). U studiji Qian Q. i saradnika pokazano je da 5-azaC indukuje diferencijaciju mezenhimskih matičnih ćelija u kardiomiocite mehanizmom koji uključuje aktivaciju ERK kinaze (eng. *extracellular signal-regulated kinases*) (Qian *et al.*, 2012). Takođe, pokazano je da tretman NT2/D1 ćelija drugim analogom citidina, 2'-deoksi-5-azacitidinom, aktivira neuralnu diferencijaciju kaspaza-zavisnom degradacijom faktora pluripotentnosti (Musch *et al.*, 2010).

Poslednjih godina metilacija DNK nalazi se u fokusu brojnih istraživačkih grupa koje analiziraju proces reprogramiranja diferenciranih ćelija do indukovanih pluripotentnih matičnih ćelija. Kako je pokazano, u procesu reprogramiranja somatskih ćelija dolazi do „brisanja“ epigenetičkih markera tipičnih za diferencirane ćelije i uspostavljanja „epigenetičkog pejzaža“ nalik onom koji karakteriše embrionalne matične ćelije (Mikkelsen *et al.*, 2008). Međutim, rezultati brojnih studija ukazali su na postojanje značajnih razlika u epigenomima indukovanih pluripotentnih matičnih ćelija i embrionalnih matičnih ćelija (Deng *et al.*, 2009, Kim *et al.*, 2010, Bock *et al.*, 2011, Lister *et al.*, 2011, van den Hurk *et al.*, 2016), pri čemu se najznačajnije razlike uočavaju na nivou metilacije DNK i nastaju ili kao posledica nepotpune demetilacije genoma somatske ćelije ili procesom *de novo* metilacije koja rezultuje pojavom aberantno metilovanih genskih lokusa (Mikkelsen *et al.*, 2008). Utvrđeno je da se

inhibicijom DNMT korišćenjem 5-azaC parcijalno reprogramirane ćelije mogu brzo i efikasno konvertovati u indukovane pluripotentne matične ćelije, što sugeriše da nedovoljan stepen demetilacije, ili pak postojanje *de novo* metilacije na genima faktorima pluripotentnosti predstavljaju barijeru u procesu reprogramiranja (Mikkelsen *et al.*, 2008). Još jedan od problema koji otežava generisanje indukovanih pluripotentnih matičnih ćelija je rezidualna aktivnost gena uključenih u diferencijaciju somatskih ćelija, koja je uzrokovana nepotpunom metilacijom promotora (Lister *et al.*, 2011, Ohi *et al.*, 2011). Ovakva epigenetička memorija rezultujućih indukovanih pluripotentnih matičnih ćelija favorizuje njihovu diferencijaciju ka ćelijskim linijama poreklom od donorskog tkiva, dok se kapacitet za opredeljivanje ka drugim ćelijskim linijama značajno smanjuje (Kim *et al.*, 2010, Polo *et al.*, 2010). U cilju prevazilaženja epigenetičke barijere i efikasnijeg generisanja indukovanih pluripotentnih matičnih ćelija neophodno je pre svega rasvetliti dinamiku izmena epigenetičkih markera na genima faktorima pluripotentnosti i genima odgovornim za ćelijsko opredeljivanje i diferencijaciju, kao i mehanizme kojima se ova dinamika reguliše. Poznavanje ovih procesa doprinelo bi razvoju strategija za reprogramiranje somatskih ćelija do stabilnih indukovanih pluripotentnih matičnih ćelija, što bi potencijalno rezultovalo upotrebom ove tehnologije u biomedicinskim istraživanjima i kliničkoj praksi (Liu *et al.*, 2020).

1.11.2. Histonske modifikacije

Epigenetička informacija zapisana je u strukturi hromatina, koji predstavlja kompleks DNK i DNK-vezanih histona (Delcuve *et al.*, 2009, Olynik & Rastegar, 2012). Osnovna građivna i funkcionalna jedinica hromatina je nukleozom, sačinjen od 146 bp duge DNK obmotane oko histonskog oktamera (Kornberg, 1974). Ovaj oktamer čine 2 histona 3 (H3) i 2 histona 4 (H4), koji formiraju tetramer, i 2 dimera histona 2A (H2A) i 2B (H2B). Nukleozomi su povezani tzv. *linker* DNK vezanom za histon 1 (H1), formirajući strukturu sličnu perlama na žici (Olins & Olins, 1974). Viši nivoi organizacije hromatina podrazumevaju pakovanje nukleozoma u vlakna dijametra 10-30 nm, zavisno od kompaktnosti hromatina (Fussner *et al.*, 2010). Finalno, hromozomi su načinjeni od hromatinskih vlakana i njima pridruženih proteina, čime je omogućena kondenzacija i relaksacija hromatina (Bassett *et al.*, 2009, Fussner *et al.*, 2010). Kompaktnost hromatina od presudnog je značaja za dostupnost molekula DNK transkripcionim faktorima, te se relaksirani euhromatin dovodi u vezu sa eksprimiranim delovima genoma, dok je čvrsto pakovani heterohromatin karakterističan za transkripciono neaktivne gene (Horvath *et al.*, 2001, Bassett *et al.*, 2009). Sredinskim faktorima indukovane izmene u histonskim markerima i molekulu DNK omogućavaju tranziciju između otvorenog i zatvorenog hromatina, čineći ga izuzetno dinamičnom strukturom (Bannister & Kouzarides, 2011).

Plastičnost hromatina omogućena je postojanjem histonskih varijanti, post-translacionih histonskih modifikacija i delovanjem nekodirajućih molekula RNK (Delcuve *et al.*, 2009, Olynik & Rastegar, 2012). Za sve histone, sa izuzetkom H4, identifikovane su histonske varijante koje strukturno i funkcionalno utiču na jedarni hromatin (Talbert & Henikoff, 2010). Ove histonske varijante eksprimirane su ili u S fazi DNK replikacije (H3.1 i H2A.1) ili u drugim fazama ćelijskog ciklusa (H2AZ i H3.3) (Mizuguchi *et al.*, 2004, Boulard *et al.*, 2007, Elsaesser *et al.*, 2010, Goldberg *et al.*, 2010, Szenker *et al.*, 2011). Epigenetička informacija se dodatno usložnjava

postojanjem post-translacionih kovalentnih modifikacija (PTM) histonskih proteina, koje uključuju acetilaciju, metilaciju, fosforilaciju, ubikvitinaciju, sumoilaciju i ADP-ribozilaciju (pregled dat u (Kouzarides, 2007)). Histonske PTM najčešće se nalaze na N-terminalnim repovima histona, ali retko se mogu naći i na a.k. ostacima u jezgru histonskih proteina (Delcuve *et al.*, 2009, Barber & Rastegar, 2010), kao što je slučaj kod H3K56 acetilacije (Tjeertes *et al.*, 2009) i H3Y41 fosforilacije (Dawson *et al.*, 2009). Proteini epigenetičke „mašinerije“ uključuju „pisače“, koji vrše depoziciju kovalentnih grupa, „brisače“, koji uklanjaju pomenute grupe, i „čitače“ koji vrše interpretaciju deponovanih markera i posreduju ili olakšavaju prevođenje ovih oznaka u „jezik“ transkripcije (Delcuve *et al.*, 2009). Efekat PTM, zavisno od njihovog broja i tipa a.k. na kojoj se nalaze, može biti čvršća interakcija između histona i DNK, koja za ishod ima represiju transkripcione aktivnosti, ili slabljenje ovih interakcija, što rezultuje ogoljavanjem DNK kojoj RNK Polimeraza i elementi transkripcione mašinerije olakšano pristupaju (pregledi dati u (Jenuwein & Allis, 2001, Delcuve *et al.*, 2009)). Dodavanje acetil grupa lizinu 9 (K9) i 14 (K14) na H3, i lizinu 16 (K16) na H4 vrše enzimi K-histon acetiltransferaze (KAT) (Roth *et al.*, 2001), a njihovo uklanjanje dešava se aktivnošću enzima histonskih deacetilaza (HDAC) (Zhang *et al.*, 2002, de Ruijter *et al.*, 2003). Pozitivno naelektrisani lizinski ostaci stupaju u čvrste interakcije sa negativno naelektrisanim molekulom DNK, povećavajući kompaktnost nukleozoma (Delcuve *et al.*, 2009). Kovalentno vezivanje acetil grupa eliminiše pozitivnu šaržu lizina, kontakti između histona i DNK se relaksiraju, što rezultuje otvorenom hromatinskom strukturom i dostupnošću datog genomskog lokusa faktorima koji indukuju transkripcionu aktivaciju (Tse *et al.*, 1998, Wang *et al.*, 2001). Fosforilacija histona se najčešće odigrava dodavanjem negativno naelektrisane fosfatne grupe na hidroksilnu grupu serina (S) ili treonina (T), čime se hromatin dekonduzuje (Rossetto *et al.*, 2012). Primer ove modifikacije je H3S10 fosforilacija koja je asocirana sa inicijacijom transkripcije brojnih gena (Chadee *et al.*, 1999). Metilacija histona katalizovana je lizin metiltransferazama (KMT), i odigrava se na lizinskim (K) i argininskim (R) reziduama histona (Delcuve *et al.*, 2009). U zavisnosti od stepena metilacije i tipa a.k. koja biva metilovana, ishod modifikacije je različit. H3K4me3 markira aktivne gene, dok H3K9me3 i H3K27me3 označavaju heterohromatinske regione (Delcuve *et al.*, 2009). Takođe, na lizinskim ostacima histona H2A (K119) i H2B (K120) detektovana je ubikvitinacija, koja održava hromatin u otvorenom stanju (Delcuve *et al.*, 2009, Calvanese & Fraga, 2012). Na N-terminusima histona detektovano je prisustvo sumoilovanih i ADP-ribozilovanih rezidua, koji su takođe uključeni u regulaciju genske transkripcije (Delcuve *et al.*, 2009).

Sve deponovane histonske modifikacije formiraju histonski kod, čija je važna osobina dinamičnost (Strahl & Allis, 2000, Jenuwein & Allis, 2001). Prisustvo jedne modifikacije na nekoj a.k. rezidui onemogućava depoziciju druge hemijske grupe na istoj poziciji (Strahl & Allis, 2000, Jenuwein & Allis, 2001). Takođe, modifikacija jedne a.k. može uticati na označavanje druge a.k. istom ili različitom hemijskom grupom, čime se histonski kod usložnjava (Strahl & Allis, 2000, Jenuwein & Allis, 2001). Pored komunikacije između samih histonskih PTM, ovi markeri interaguju sa hemijskim grupama na molekulu DNK (5mC i 5hmC), na taj način diktirajući stepen transkripcione aktivnosti genskog lokusa (Delcuve *et al.*, 2009).

U embrionalnim matičnim ćelijama, visoko aktivni geni odgovorni za održavanje pluripotentnosti obeleženi su aktivirajućim histonskim markerima, kao što je H3K9ac i H3K27ac (Qiao, Wang, Yang, *et al.*, 2015, Ziller *et al.*, 2015, Bhanu *et al.*,

2016, Festuccia *et al.*, 2017, De Clerck *et al.*, 2019). PcG grupa proteina ima esencijalnu ulogu u uspostavljanju bivalentnih hromatinskih domena koji reprimiraju gene ključne za razviće i održavaju pluripotentnost matičnih ćelija (Mikkelsen *et al.*, 2007, Coskun *et al.*, 2012, Festuccia *et al.*, 2017). Ovi bivalentni geni, među kojima su *Sox1*, *Ngn2* (eng. *Neurogenin 2*), *Pax6* i *Ascl1* (eng. *Achaete-scute homolog 1*), obeleženi su kombinacijom inhibitornih H3K27me3 i aktivirajućih H3K4me3 markera, i spremni su za aktivaciju nakon pojave odgovarajućeg signala (Azuares *et al.*, 2006, Bernstein *et al.*, 2006, Boyer *et al.*, 2006, Festuccia *et al.*, 2017). Tokom neuralne diferencijacije embrionalnih matičnih ćelija, ne-neuralni geni postaju nedostupni transkripcionim faktorima usled gubitka aktivirajućih histonskih oznaka, kao što je H3K9ac (Qiao, Wang, Yang, *et al.*, 2015), odnosno postaju utišani u neuralnim progenitorima. Sa druge strane, bivalentno obeleženi pro-neuralni geni bivaju meta histonskih modifikatora čijom aktivnošću bivalentna struktura postaje H3K27me3-/H3K4me3+, što rezultuje aktivacijom ovih gena (Mikkelsen *et al.*, 2007) i promovisanjem neuralne diferencijacije. Histonske demetilaze (KDM6B, KDM7A, LSD1) (Hirabayashi & Gotoh, 2010, Huang *et al.*, 2010) i metiltransferaze (Ezh2 i G9a) (Tachibana *et al.*, 2002, Lee *et al.*, 2007) od ključnog su značaja za ranu embriogenezu i proces neuralne diferencijacije. Takođe, deacetilacija genoma posredovana HDAC enzimima neohodna je za transkripcionu represiju u ranim fazama neuralne diferencijacije (Ware *et al.*, 2009). Inhibicija HDAC aktivnosti primenom valproične kiseline i trihostatina A rezultuje održavanjem pluripotentnosti i koristi se u generisanju indukovanih pluripotentnih matičnih ćelija (Ware *et al.*, 2009).

1.11.3. Nekodirajući molekuli RNK

Kompleksnost epigenoma dodatno je naglašena postojanjem nekodirajućih molekula RNK (ncRNK, eng. *noncoding RNA*), koji se dele u dve grupe. U grupu kratkih (<200 nt) nekodirajućih RNK spadaju miRNK (eng. *microRNA*), siRNK (eng. *short interfering RNA*) i piRNK (eng. *piwiRNA*) dok su duge nekodirajuće RNK (lncRNK, eng. *long noncoding RNA*) dužine preko 200 nt (Peschansky & Wahlestedt, 2014, Hombach & Kretz, 2016)

U grupu lncRNK spadaju molekuli izrazito male konzerviranosti koji su veoma različiti po svojoj strukturi, funkciji i poreklu (Ulitsky *et al.*, 2011, Dahariya *et al.*, 2019). Ove RNK često su transkribovane sa protein-kodirajućih sekvenci, ali je pokazano da su neke grupe transkribovane sa intronskih sekvenci, transpozabilnih elemenata ili intergenskih regiona (Louro *et al.*, 2008, Kapusta *et al.*, 2013). lncRNK imaju 5'-metilguanozin kapu, 3'-polyA-rep i podležu splajsovanju (Mercer & Mattick, 2013). U CNS-u, lncRNK su uključene u procese neurogeneze, homeostaze, ćelijskog odgovora na stres i regulaciju plastičnosti sinapsi (Qureshi *et al.*, 2010). Jedan od mehanizama kontrole procesa neurogeneze predstavlja formiranje kompleksa između lncRNK i transkripcionih faktora na promotorskim regionima gena faktora neurogeneze (Ng *et al.*, 2013). Pokazano je da lncRNK *RMST* (*rhabdomyosarcoma 2-associated transcript*) u kompleksu sa SOX2 reguliše ekspresiju gena faktora neurogeneze i da utišavanje ekspresije *RMST* smanjuje efikasnost vezivanja proteina SOX2 za regulatorne regione ovih gena i smanjuje njihovu transkripcionu aktivnost (Ng *et al.*, 2013). Takođe, lncRNK u interakciji sa RNK-vezujućim proteinima regulišu ekspresiju faktora pluripotentnosti, kako je pokazano na primeru *TUNA* lncRNK (*Tcl1 Neuron*

Associated LincRNA), koja je uključena u regulaciju ekspresije gena *Nanog*, *Sox2* i *Fgf4* (Lin *et al.*, 2014). Drugi mehanizmi kojima lncRNK ostvaruju svoje funkcije podrazumevaju interakcije sa komponentama signalnih puteva (Winzi *et al.*, 2018), degradaciju miRNK i RNK-vezujućih proteina (Hansen *et al.*, 2013, Memczak *et al.*, 2013) i remodelovanje hromatina (Bond *et al.*, 2009, Ng *et al.*, 2012, Chalei *et al.*, 2014). Pokazano je da lncRNK mogu interagovati sa DNMT1 (Ng *et al.*, 2012), MeCPB2 (Bond *et al.*, 2009) i komponentama PRC2 kompleksa (Ng *et al.*, 2012), čime se kroz izmenu metilacionog statusa ili regrutovanje hromatinskih modifikatora ostvaruje regulacija ekspresije gena neophodnih za održavanje procesa pluripotentnosti i neuralne diferencijacije (Peschansky & Wahlestedt, 2014).

Uloge malih nekodirajućih molekula RNK u procesima regulacije genske ekspresije podrazumevaju kontrolu transkripcije ili stabilnosti iRNK, a deo svojih funkcija ostvaruju interakcijom sa drugim epigenetičkim faktorima (Peschansky & Wahlestedt, 2014). Najbolje proučene su miRNK, duge 20-23 nukleotida koje najčešće prepoznaju ciljnu iRNK zahvaljujući komplementarnosti sa njenim 3'-UTR (netranslatirajuća sekvenca, eng. *untranslated region*) regionom (Bartel, 2009, Fabian & Sonenberg, 2012), ređe 5'-UTR regionom (Zhou *et al.*, 2009). Vezivanje miRNK za UTR region ciljne iRNK aktivira miRNK-indukovani utišavajući kompleks (miRISC, eng. *miRNA-induced silencing complex*) preko kog miRNK deluje kao represor genske ekspresije blokiranjem translacije ili indukcijom degradacije ciljne iRNK (Fabian & Sonenberg, 2012). Ovaj proces odvija se aktivnošću endoribonukleaze Dicer, koja iseca dvolančane molekule RNK, i takodje je uključena u nastanak siRNK (Watanabe *et al.*, 2008). Mehanizmi regulacije genske ekspresije putem siRNK takođe podrazumevaju inhibiciju translacije i/ili degradaciju ciljne iRNK, ali, za razliku od miRNK, za čiju je aktivnost neophodna komplementarnost u sekvenci dužine 2-7 nukleotida, siRNK zahtevaju veću komplementarnost sekvence sa ciljnom iRNK (Okamura *et al.*, 2008). Poslednja klasa malih nekodirajućih molekula RNK, piRNK, je Dicer-nezavisna grupa shRNK molekula koji formiraju komplekse sa *piwi* podklasom Argonaut proteina i utišavaju transpozone i druge transkripte prepisane sa repetitivnih sekvenci (Siomi *et al.*, 2011).

Pored pomenutih mehanizama delovanja miRNK, pokazana je i njihova interakcija sa drugim komponentama epigenetičke "mašinerije" (pregled u (Peschansky & Wahlestedt, 2014)). Naime, literaturni podaci ukazuju da se određene miRNK transkribuju sa ciljnih gena PRC2 kompleksa, a zatim ovaj kompleks stabilizuju u blizini starta transkripcije, što za posledicu ima represiju transkripcije pomenutih gena (Kanhere *et al.*, 2010). Takođe, ekspresija samih komponenti PRC kompleksa regulisana je preko miRNK, što je od ključnog značaja za formiranje heterohromatina i njegovo održavanje tokom sukcesivnih ćelijskih deoba (Hall *et al.*, 2002), kao i za procese ćelijske diferencijacije (Juan *et al.*, 2009) i onkogeneze (Sander *et al.*, 2008, Varambally *et al.*, 2008). U brojnim studijama pokazano je da neke od miRNK aktiviraju ekspresiju ciljnih gena putem demetilacije njihovih regulatornih regiona. Ovu funkciju miRNK ostvaruju interakcijom sa DNMT1 i DNMT3 (Fabbri *et al.*, 2007, Garzon *et al.*, 2009), kao i sa proteinima modifikatorima hromatina, kako je pokazano u *in vitro* i *in vivo* eksperimentima (Lagos *et al.*, 2010, Alvarez-Saavedra *et al.*, 2011, Humphries *et al.*, 2019). Pomenuti rezultati ukazuju na kompleksnost epigenoma, koja se odslikava kroz interakciju i međuzavisnost različitih epigenetičkih faktora, što omogućava finu kontrolu genske ekspresije.

2. CILJEVI RADA

Geni *SOX1* i *SOX3* zajedno sa genima faktorima pluripotencnosti (*SOX2*, *OCT4* i *NANOG*) stupaju u kompleksne interakcije kojima se regulišu procesi održavanja pluripotencnosti, ćelijskog opredeljivanja i diferencijacije, što je od ključnog značaja za pravilan tok neuralne diferencijacije. Precizna kontrola ekspresije pomenutih gena u toku procesa neurogeneze ostvaruje se na više nivoa, transkripcionim regulatorima i signalnim putevima, kao i epigenetičkim mehanizmima. Osnovni cilj ove doktorske disertacije predstavlja rasvetljavanje uloge metilacije DNK i histonskih modifikacija u regulaciji ekspresije gena *SOX1* i *SOX3* i gena faktora pluripotencnosti (*SOX2*, *OCT4* i *NANOG*) tokom ranih faza neuralne diferencijacije NT2/D1 ćelija.

U svrhu realizacije navedenog cilja istraživanja definisani su sledeći specifični ciljevi:

1. Ispitati ekspresione profile gena *SOX3* i *SOX1* i gena faktora pluripotencnosti (*SOX2*, *OCT4* i *NANOG*) tokom ranih faza neuralne diferencijacije NT2/D1 ćelija
2. Ispitati metilacioni status promotorskih regiona humanih gena *SOX1* i *SOX3* tokom ranih faza neuralne diferencijacije NT2/D1 ćelija. Ispitati profile odabranih histonskih modifikacija deponovanih na različitim regionima humanog gena *SOX3*, kao i na genima *SOX2*, *SOX1*, *OCT4* i *NANOG* tokom ranih faza neuralne diferencijacije NT2/D1 ćelija *in vitro*
3. *In silico* analizom ispitati profile odabranih histonskih modifikacija na humanim genima *SOX3* i *SOX1* i genima faktorima pluripotencnosti (*SOX2*, *OCT4* i *NANOG*)u H1 ćelijskoj liniji humanih embrionalnih matičnih ćelija i neuralnim progenitorima poreklom od H1 ćelijske linije

3. MATERIJAL I METODE

3.1. EKSPERIMENTALNI MATERIJAL

3.1.1. NT2/D1 ćelijska linija

U ovom radu korišćena je permanentna ćelijska linija humanog testikularnog karcinoma NT2/D1 dobijena ljubaznošću Prof Peter W. Andrews-a, University of Sheffield, Sheffield, UK. (Andrews, 1984, Andrews *et al.*, 1984, Andrews, 1988). NT2/D1 ćelije gajene su u DMEM-u (eng. Dulbecco's Modified Eagle Medium) sa visokim sadržajem glukoze (4.5 g/l) (Invitrogen™, NY, USA), 10% FBS-a (eng. Fetal Bovine Serum) (Invitrogen™, NY, USA) i 2mM L-glutaminom (Invitrogen™, NY, USA) na 37°C i 10% CO₂ (Andrews, 1984).

U eksperimentima praćenja ranih faza neuralne diferencijacije NT2/D1 ćelije su gajene u medijumu sa 10 µM all-*trans* retinoičnom kiselinom (Sigma-Aldrich, MO, USA) u periodu od 2, 4 i 7 dana.

U eksperimentima praćenja efekta 5-azacitidina (5-azaC, Acros Organics, USA) na ekspresiju odabranih gena NT2/D1 ćelije su gajene 24h u medijumu sa 1 µmol/L 5-azaC.

3.1.2. Antitela korišćena u ovom radu

Tabela 2. Primarna antitela korišćena u Western blot (WB) i imunocitohemijskoj (ICH) analizi

Antitelo	Proizvođač i šifra	korišćeno razblaženje
Zečje anti-SOX3	Abcam, Cambridge, UK; ab42471	1:2000 za WB
Zečje anti-SOX2	Active Motif, La Hulpe, Belgium; 39824	1:3000 za WB
Zečje anti-OCT4A	Cell Signaling, Technology Denvers, MA, USA; 2840	1:1000 za WB i 1:100 za ICH
Zečje anti-kaspaza-3(<i>dobijeno ljubaznošću dr Nataše Anastasov (Helmholtz Zentrum München, Minhen, Nemačka)</i>)	Cell Signaling, Technology Denvers, MA, USA; 9662	1:1000 za WB
Zečje anti- NANOG	Abcam, Cambridge, UK; 109250	1:1000 za WB i 1:250 za ICH
Mišje anti- α -Tubulin	Calbiochem, MA, USA; CP06	1:30000 za WB
Mišje anti-GAPDH	Abcam, Cambridge, UK; ab9484	1:5000 za WB
Mišje anti- Oct3/4	Santa Cruz Biotechnology, Texas, USA; sc-5279	1:100 za ICH

Tabela 3. Sekundarna antitela korišćena u *Western blot* (WB) i imunocitohemijskoj (ICH) analizi

Antitelo	Proizvođač	korišćeno razblaženje
HRP-konjugovano anti-zečji-IgG	Amersham Biosciences, NJ, USA	1:10000 za WB
HRP-konjugovano anti-mišji IgG	Amersham Biosciences, NJ, USA	1:10000 za WB
HRP-konjugovano anti-zečji-IgG	Active motif, CA, USA	1:5000 za WB
HRP-konjugovano anti-mišji-IgG	Active motif, CA, USA	1:5000 za WB
Alexa Fluor 594- biotinizovana kozja anti-zečja IgG	Vector, Burlingame, CA, USA	1:5000 za ICH
DyLight 488 [®] streptavidin	Vector, Burlingame, CA, USA	1:1000 za ICH

Tabela 4. Antitela korišćena u eksperimentima hromatinske imunoprecipitacije (ChIP)

Antitelo	Proizvođač i šifra
Zečje anti-H3K4me3	Active motif, CA, USA; 39159
Zečje anti-H3K79me2	Abcam, Cambridge, UK; 3594
Zečje anti-H2BK16ac	Active Motif, CA, USA; 39121
Zečje anti-H2BK120ac	Active Motif, CA, USA; 39119
Zečje anti-H2BK5ac	Active Motif, CA, USA; 39123
Zečje anti-H3	Abcam, Cambridge, UK; 1791
Zečje anti-H2B	Abcam, Cambridge, UK; 1790
Mišje anti-Flag	Sigma Aldrich, MO, USA; F3165

3.1.3. Oligonukleotidi korišćeni u ovom radu

Oligonukleotidi su u ovom radu korišćeni u reakcijama lančanog polimeraznog umnožavanja (PCR), PCR reakcijama specifičnim za metilacioni status DNK (eng. MSP, *methylation-specific PCR*), reakcijama semi-kvantitativnog PCR-a kojima je prethodila reverzna transkripcija (qRT-PCR), kvantitativnog PCR-a u realnom vremenu (qPCR) i sekvenciranja.

Tabela 5. Oligonukleotidi korišćeni u radu

Naziv	Sekvenca
Oligonukleotidi korišćeni u MSP reakcijama za humane gene <i>SOX1</i> i <i>SOX3</i>	
SOX3 MSPM F	5'-GTAGATTGTGAATGCGATTTGTTC-3'
SOX3 MSPM R	5'-GATAAAAAACCCTAAAACCTCCGTC-3'
SOX3 MSPU F	5'-GGTAGATTGTGAATGTGATTTGTTT-3'
SOX3 MSPU R	5'-ACAATAAAAAACCCTAAAACCTCCAT-3'
SOX1 MSPM F	5'-AATTTTTTATTTGCGAGTCGAATC-3'
SOX1 MSPM R	5'-AAAACCTAAAACATAAACGACCG-3'
SOX1 MSPU F	5'-GAAATTTTTTATTTGTGAGTTGAATTG-3'
SOX1 MSPU R	5'-AAAACCTAAAACATAACAACCAAA-3'
Oligonukleotidi korišćeni za umnožavanje bisulfitno konvertovanog CpG ostrvca u promotoru humanog gena <i>SOX3</i>	
MetSOX3 F2	5'-AAGGGGTTTAGTTAGAGTTTA-3'
MetSOX3 R2	5'-AATCTCCAAAAAACTATAACAT-3'
Oligonukleotidi korišćeni za pirosekvenciranje PCR produkta dobijenog umnožavanjem bisulfitno konvertovanog CpG ostrvca u promotoru humanog gena <i>SOX3</i>	
SEQ3	5'-TTTAGGTAGATTGTGAATG-3'
SEQ4	5'-TTGGTTTATAGGTTTTTAAG-3'
Oligonukleotidi korišćeni u semikvantitativnim RT-PCR reakcijama	
SOX1 F	5'-GCACCACTACGACTTAGTCCG-3'
SOX1 R	5'-AGACCTAGATGCCAACAATTGG-3'
Oligonukleotidi korišćeni u qPCR reakcijama	
SOX3 new F	5'-GGGGAGGGCTGAAAGTTTTG-3'
SOX3 new R	5'-ACACAGCGATTCCCAGCCTA-3'
SOX2 F695	5'-CCCCTGGCATGGCTCTTGGC-3'
SOX2 R845	5'-TCGGCGCCGGGAGATACAT-3'
GAPDH F	5'-GGACCTGACCTGCCGTCTAG-3'
GAPDH R	5'-CCACCACCCTGTTGCTGTAG-3'
SOX3 up R	5'-GCAGTCCTGAAGCCTGTCTC-3'

SOX3 up F	5'-GCGTCTCCAAGAAGCTCTCC-3'
ChipSOX3F	5'-AGGGCTCCCCGAACCTTT-3'
ChipSOX3R	5'-GCTGGGCCCCTTATATACCT-3'
SOX3 down F	5'-TGGAGAACCCCAAGATGCAC-3'
SOX3 down R	5'-CTTGGCCTCGTCGATGAATG-3'
SOX1 prom F	5'-ACCCCTCCCCATTCTTCTCT-3'
SOX1 prom R	5'-CAGGTCGGTCTCCATCATCA-3'
SOX2 prom F	5'-GCCCCCTTTCATGCAAAACC-3'
SOX2 prom R	5'-CTCTGCCTTGACAACCTCCTG-3'
Chip OCT F	5'-GGTTTTCCCCTTCCACAGAC-3'
Chip OCT R	5'-GGGACTACTCAACCCCTCTCT-3'
Chip Nanog F	5'-TCCCCACCTAGTCTGGGTTAC-3'
Chip Nanog R	5'-AGGCAACCAGCTCAGTCCAG-3'

3.1.4. Komercijalni kitovi

Za natrijum-bisulfitnu konverziju genomske DNK izolovane iz neindukovanih i NT2/D1 ćelija čija je neuralna diferencijacija indukovana retinoičnom kiselinom 2, 4 i 7 dana korišćen je DNA Methylation-Lightning™ Kit (Zymo Research Corporation, CA, USA). Za direktnu natrijum-bisulfitnu konverziju koja je prethodila MSP reakcijama korišćen je DNA Methylation-Direct™ Kit (Zymo Research Corporation, CA, USA). Umnožavanje bisulfitno konvertovanog 2.CpG ostrvca u okviru promotora gena *SOX3* urađeno je kitom KAPA 2G Fast HotStart Ready mix (KAPA Biosystems, MA, USA). Totalna RNK za potrebe RT-PCR i qPCR reakcija izolovana je reagensom TRI reagent® (Ambion, Invitrogen, USA), a qPCR reakcije urađene su korišćenjem SYBR Green PCR master mix (Applied Biosystems, MA, USA).

3.1.5. Kompjuterski programi i baze podataka

Za dizajniranje oligonukleotida korišćenih u RT-PCR i qPCR analizama korišćen je program Primer3 (dostupan na <http://bioinfo.ut.ee/primer3/>). Za proveru oligonukleotidnih sekvenci korišćen je program In Silico PCR dostupan na <http://genome.ucsc.edu> (GRCh37/hg19).

Za detekciju CpG ostrva u okviru promotora humanog gena *SOX3* i dizajn oligonukleotida za MSP i bisulfitno pirosekvenciranje korišćen je program MethPrimer (Li & Dahiya, 2002). Za kvantifikaciju rezultata dobijenih u *Western blot* eksperimentima korišćen je kompjuterski program ImageJ (Schneider *et al.*, 2012).

Za prikaz histonskih modifikacija na genima grupe *SOXB1* i genima faktorima pluripotentnosti *OCT4* i *NANOG* u humanim H1 embrionalnim matičnim ćelijama korišćen je UCSC pretraživač genoma i ENCODE podaci, pri čemu je odabrana GRCh37/hg19 verzija genoma (<http://genome.ucsc.edu>, ENCODE Consortium, Broad Institut i Bernstein Lab, Massachusetts General Hospital/Harvard Medical School, (Consortium, 2012)). GEO pristupni brojevi (eng. *GEO accession numbers*) za svaki od korišćenih setova podataka prikazani su u **Tabeli 6**. Za bioinformatičku analizu ekspresije *SOXB1* gena i odabranih histonskih PTM na ovim genima u H1 liniji humanih embrionalnih matičnih ćelija i neuralnim progenitorima poreklom iz H1 ćelija korišćeni su podaci sa <http://www.roadmapepigenomics.org/>. Neobrađeni podaci su korišćenjem Galaxy platforme (Afgan *et al.*, 2018) pretvoreni u bigwig format, i zatim vizuelizovani u UCSC pretraživaču genoma.

Tabela 6. GEO pristupni brojevi ENCODE setova podataka korišćenih u radu

Ispitivana histonska modifikacija	GEO pristupni broj
H2A.Z	GSM1003579
H3K4me1	GSM733782
H3K4me2	GSM733670
H3K4me3	GSM733657
H3K9ac	GSM733773
H3K9me3	GSM1003585
H3K27me3	GSM733748
H3K36me3	GSM733725
H3K79me2	GSM1003547
H4K20me1	GSM733687

3.2. EKSPERIMENTALNE METODE

3.2.1. Izolacija ukupnih ćelijskih proteina

U cilju analize ekspresije proteina od interesa izolovani su ukupni ćelijski proteini iz neindukovanih NT2/D1 ćelija kao i iz NT2/D1 ćelija tretiranih 10 $\mu\text{mol/L}$ retinoičnom kiselinom u trajanju od 2, 4 i 7 dana, odnosno tretiranih 1 $\mu\text{mol/L}$ 5-azaC u periodu od 24 sata.

Prikupljeni talozi ćelija resuspendovani su u odgovarajućoj zapremini (1 ml/ 10^7 ćelija) pufera za lizu (50 mM TrisHCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 5 $\mu\text{g/ml}$ PMSF, 1 $\mu\text{g/ml}$ aprotinin, 1 $\mu\text{g/ml}$ leupeptin, 1 $\mu\text{g/ml}$ pepstatin A) i inkubirani na ledu 30 minuta, a zatim centrifugirani u mikrofugi (Centrifuga 5417R, Eppendorf, Germany)

15 min/11000 rpm/4^o C. Dobijeni supernatanti su prebacivani u nove tube i čuvani na -80^oC do upotrebe.

3.2.2. Merenje koncentracije proteina po Bradfordu

Koncentracija proteina je merena Bradford metodom (Bradford, 1976), koja se zasniva na kolorimetrijskom određivanju nepoznate koncentracije proteina u uzorku na osnovu standardne krive dobijene merenjem apsorbance standarda poznate koncentracije. Standardi za merenje koncentracije dobijeni su rastvaranjem BSA (eng. Bovin serum albumin) (Sigma-Aldrich, MO, USA) u ddH₂O u sledećim koncentracijama: 1, 2, 4, 6, 8, 10 i 20 µg/ml. Uzorci su pripremljeni tako što je 1 µl ukupnog ćelijskog lizata rastvoreno u 799 µl ddH₂O nakon čega je dodano 200 µl "BioRad Protein Assay Dye" reagensa (Bio-Rad Laboratories, Inc., CA, USA). Apsorbancija je merena na spektrofotometru na talasnoj dužini od 595 nm.

3.2.3. Imunološka detekcija proteina (Western blot)

Western blot je metoda koja se koristi za kvalitativnu i kvantitativnu analizu proteina (Liu *et al.*, 2014). Proteini su elektroforetski razdvojeni u 10% denaturišućem poliakrilamidnom gelu (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970) u odgovarajućem puferu (25 mM Tris, 190 mM glicin, 0.1% SDS u ddH₂O) pri naponu od 90 V dok su uzorci putovali u gelu za koncentrovanje i naponu od 160 V dok su uzorci putovali u gelu za razdvajanje uzoraka. Proteini su iz gela prebačeni na PVDF membranu (Immobilone-P, Millipore, MA, USA) polusuvim elektrotransferom (Biometra GmbH, Germany) (Liu *et al.*, 2014). Blokada nespecifičnog vezivanja vršena je inkubacijom membrane u 5% nemasnom mleku preko noći na 4^oC. Membrane su inkubirane sa primarnim antitelom u razblaženju naznačenom u **Tabeli 2**, u trajanju od 1 h na sobnoj temperaturi ili preko noći na 4^oC, u zavisnosti od korišćenog antitela. Membrane su potom isprane TBST puferom (50 mM Tris, 150 mM NaCl i 0,05% Tween 20), a zatim inkubirane 1 h sa odgovarajućim sekundarnim antitelom u razblaženju naznačenom u **Tabeli 3**, na sobnoj temperaturi. Nakon ponovnog ispiranja u TBST puferu, signali su vizuelizovani korišćenjem ECL sistema za detekciju proteina na membrani (Millipore, MA, USA). Za kontrolu količine proteina u svakom uzorku nanetom na gel korišćeni su proteini GAPDH ili α -Tubulin prilikom detekcije u *Western blot* analizi.

3.2.4. Imunofluorescentna citohemijska analiza

Imunofluorescentna citohemijska analiza zasnovana je na vezivanju specifičnih primarnih antitela za membranske, citosolne i nuklearne proteine, koji se vizuelizuju korišćenjem sekundarnog i/ili tercijernog antitela konjugovanog fluorohromom. Ova metoda omogućava detekciju ekspresije i lokalizacije proteina u ćelijama.

NT2/D1 ćelije zasade su na pokrovna stakla i gajene u odgovarajućim uslovima, u odsustvu retinoične kiseline ili tokom tretmana 2, 4 i 7 dana u prisustvu 10 µmol/L retinoične kiseline, nakon čega su isprane PBS-om i fiksirane 4% paraformaldehidom (PFA) (Merck, NJ, USA) 20 min na sobnoj temperaturi.

Permeabilizacija ćelija urađena je tretmanom 0,1% Tritonom X-100 (Sigma Aldrich, MO, USA) u trajanju od 15 min, nakon čega je nespecifično vezivanje blokirano inkubacijom sa 10% normalnim kozjim serumom (Invitrogen™, NY, USA) i 1% BSA u PBS puferu u trajanju od 1 h na sobnoj temperaturi. Primarna antitela rastvarana su u 1% BSA, 0,05% Tween® 20 (Sigma-Aldrich MO, USA) u PBS puferu u odgovarajućim razblaženjima (**Tabela 2**), aplicirana na pokrovna stakla i inkubirana preko noći na 4°C. Narednog dana pokrovna stakla su isprana 3 puta po 10 min u 0.05% Tween 20 u PBS-u, a zatim inkubirana sa biotinizovanim anti-zečjim IgG u razblaženju naznačenom u **Tabeli 2**, 1h na sobnoj temperaturi. Nakon toga apliciran je streptavidin konjugovan sa Cy3 bojom (Jackson ImmunoResearch, Cambridge, UK; 1:500 u PBS-u) i inkubacija je trajala 1h na sobnoj temperaturi. Jedra su vizuelizovana bojenjem 0.1mg/ml diaminofenilindolom (DAPI, Sigma Aldrich, MO, USA). Pokrovna stakla su agensom Mowiol zalepljena na staklenu pločicu i preparati su analizirani korišćenjem Leica TCS SP8 konfokalnog mikroskopa (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) i programa TCS SP8 (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany).

3.2.5. Izolacija ukupne RNK

RNK je izolovana iz netretiranih NT2/D1 ćelija i ćelija tretiranih retinoičnom kiselinom 2, 4 i 7 dana, kao i ćelija tretiranih 1 µmol/L 5-azaC u trajanju od 24h. Nakon tripsinizacije i ispiranja PBSom ćelije su resuspendovane u odgovarajućoj količini TRI reagent® reagensa, prema uputstvima proizvođača (Ambion, Invitrogen, USA), a nakon kratke homogenizacije pipetiranjem homogenati su inkubirani 5min na sobnoj temperaturi. Potom je dodat hloroform (60 µl/300 µl TRI reagent® reagensa), smeša je dobro promućkana i inkubirana 10 min na sobnoj temperaturi. Posle centrifugiranja 15 min/11600 rpm na 4°C, izdvojena je vodena faza a RNK je iz nje precipitirana izopropanolom (150 µl/300 µl TRI reagent® reagensa). Nakon temeljnog mešanja usledila je inkubacija od 10 min i centrifugiranje 8min/11600 rpm na 4°C. Talog RNK opran je 75% etanolom (300 µl/300 µl TRI reagent® reagensa) i ponovo staložen centrifugiranjem 5 min/7000 rpm na sobnoj temperaturi. Nakon sušenja na sobnoj temperaturi, precipitirana RNK rastvorena je u 50 µl ddH₂O oslobođene od nukleaza.

Za merenje koncentracije i proveru čistoće izolovane RNK korišćen je NanoVue aparat, verzija 4282 V1.7.3 (GE Healthcare, IL, USA). Provera kvaliteta izolovane RNK urađena je elektroforetskim razdvajanjem na 1% agaroznom gelu i bojenjem etidijum bromidom.

3.2.6. Oslobađanje totalne RNK od ostataka genomske DNK

Tretman totalne RNK enzimom DNKaza I (eng. *Deoxyribonuclease*) radi uklanjanja ostataka genomske DNK i uklanjanje ovog enzima nakon završene reakcije urađeno je kitom DNA-free Kit (Ambion, Invitrogen, USA) prema uputstvima proizvođača. Ukratko, 5 µg izolovane RNK tretirano je DNKazom I (2U) u prisustvu DNKaza I pufera u ukupnoj zapremini od 25 µl. Reakciona smeša je inkubirana 30 minuta na 37°C. Po isteku inkubacije, reakcionoj smeši je dodat resuspendovani DNKaza I inaktivacioni reagens. Nakon toga reakciona smeša je inkubirana 2 minuta na sobnoj temperaturi a zatim staložena centrifugiranjem 90 sek/13000 rpm na sobnoj

temperaturi. Nakon centrifugiranja, supernatant je čuvan na -80°C i korišćen za sintezu cDNK.

3.2.7. Sinteza komplementarne DNK (cDNK)

Reakcija reverzne transkripcije na prečišćenom uzorku totalne RNK urađena je u reakcionoj smeši koja je sadržala 125 ng oligonukleotida (Random hexamers, Applied Biosystems, MA, USA), 2.5 U reverzne transkriptaze (MuLV, Applied Biosystems, MA, USA), 10 U inhibitora RNKaza (Applied Biosystems, MA, USA), 1.5 mM mix nukleotida (dNTP mix, Applied Biosystems, MA, USA), odgovarajući reakcioni pufer za reverznu transkriptazu (Applied Biosystems, MA, USA), 5 mM MgCl₂ (Applied Biosystems, MA, USA), i 1 µg izolovane RNK prethodno tretirane DNazom I (odeljak 3.2.6.) i ddH₂O. Reakcija se odvijala u PCR aparatu (Applied Biosystems, MA, USA) po programu: 10 min na 25°C, 40 min na 40°C, 5 min na 99°C i 5 min na 5°C.

3.2.8. Semi-kvantitativni RT-PCR

U reakcijama semi-kvantitativnog RT-PCR-a kao matrica je korišćena prethodno sintetisana cDNK. Amplifikacija je rađena korišćenjem KAPA 2G Fast HotStart Ready Mix-a i oligonukleotida specifičnih za gen *SOX1* (*SOX1 F* i *SOX1 R*), dok je za relativnu kvantifikaciju korišćen *GAPDH* (*GAPDH F* i *GAPDH R*) (**Tabela 5**). Reakcije su se odvijale u PCR aparatu po sledećem programu: 10 min na 95°C; (15 sekundi na 95°C, 15 sekundi na 60°C, 15 sekundi na 72°C) 20-35 ciklusa. Dobijeni PCR produkti razdvojeni su na 2% agaroznom gelu. Dobijeni fragmenti vizuelizovani su bojenjem etidijum bromidom i kvantifikovani ImageJ programom (Schneider *et al.*, 2012), a vrednosti dobijene za *SOX1* normalizovane u odnosu na vrednosti *GAPDH* odgovarajućeg uzorka.

3.2.9. Kvantitativni PCR u realnom vremenu (qPCR)

qPCR je tehnika koja omogućava amplifikaciju i istovremenu kvantifikaciju molekula DNK od interesa (Higuchi *et al.*, 1993). SYBR Green boja se vezuje za dvolančanu DNK i nakon ekscitacije emituje fluorescentni signal određene talasne dužine. Kako se PCR produkti amplifikuju i akumuliraju, intenzitet fluorescentnog signala se povećava, odnosno, količina fluorescencije je proporcijalna količini PCR produkta.

cDNK iz neindukovanih NT2/D1 ćelija i ćelija tretiranih 2, 4 i 7 dana retinoičnom kiselinom, odnosno 5-azaC, poslužile su kao matrice u qPCR reakcijama. Reakcije su rađene korišćenjem Power SYBR Green PCR master mix (Applied Biosystems, MA, USA) i oligonukleotida specifičnih za gene od interesa (Tabela 4). Isti uzorci korišćeni su kao matrice u qPCR reakcijama uz prisustvo oligonukleotida specifičnih za *GAPDH* (*GAPDH F* i *GAPDH R*) (**Tabela 5**), koji je korišćen kao referentni gen. Reakcije su rađene u aparatu ABI Prism 7500 Sequence Detection System (Applied Biosystems, MA, USA), prema programu: 2 min na 50°C; 10 min na 95°C; (15 sekundi na 95°C, 1 min na 60°C) -40 ciklusa. Svaka reakcija je rađena u triplikatu i za svaki uzorak u obzir je uzimana srednja vrednost. Relativni nivo

ekspresije analiziranih gena je određen pomoću komparativnog algoritma za kvantifikaciju. $\Delta\Delta C_t$ vrednost, koja predstavlja razliku između C_t vrednosti ispitivanog gena i C_t vrednosti za *GAPDH*, inkorporisana je u formulu $2^{-\Delta\Delta C_t}$ čime je dobijen stepen razlike u ekspresiji između dva uzorka. Ekspresija ispitivanih gena je predstavljena relativno u odnosu na ekspresiju u neindukovanim ćelijama, kojima je dodeljena vrednost 1.

3.2.10. Izolacija genomske DNK

Genomska DNK je izolovana iz neindukovanih ćelija i NT2/D1 ćelija čija je neuralna diferencijacija indukovana tretmanom 10 $\mu\text{mol/L}$ retinoičnom kiselinom u trajanju od 2, 4 i 7 dana. Izolacija je rađena po metodi opisanoj od strane Favaloro i saradnika (Favaloro *et al.*, 1980). Ukratko, 1×10^7 ćelija je tripsinizovano, resuspendovano u PBS-u i centrifugirano 20 sek/13000 rpm na sobnoj temperaturi. Talozi su resuspendovani u TSM/NP40 puferu (140 mM NaCl, 10 mM Tris pH 7,4, 1,5 mM MgCl₂, 0,5% NP40), inkubirani 3 minuta na ledu i staloženi centrifugiranjem 20 sek/13000 rpm na 4°C. Talozi ćelija su resuspendovani u NDB puferu (eng. *nuclei dropping buffer*) čiji je sastav 75 mM NaCl, 24 mM EDTA, 0,2 mg/ml proteinaze K (Sigma Aldrich, MO, USA), 0,5% SDS, i u njemu su ćelije lizirane preko noći na 37°C uz mešanje. Nakon lize, dodata je ista zapremina fenola i nakon 1-2h mešanja i centrifugiranja 5 min/5000 rpm na 4°C, izvojena je vodena faza kojoj je dodata ista zapremina smeše hloroform:izoamil alkohol (24:1), uz mešanje 30 minuta. Nakon centrifugiranja 5 min/5000 rpm na 4°C vodena faza je prebačena u novu tubu i genomska DNK je precipitirana dodavanjem 1/10 zapremina 3M natrijum acetata i 1 zapremine izopropanola. Genomska DNK izdvojena je uz pomoć zatopljene staklene kapilare, resuspendovana u 3 ml TE pufera (10 mM Tris HCl, 1 mM EDTA) u kom je inkubirana preko noći na -20°C. Sledećeg dana genomska DNK je ponovo precipitirana dodavanjem 1/2 zapremine 7,5 M amonijum acetata i 2 zapremine etanola; uz pomoć zatopljene staklene kapilare izdvojena je DNK i resuspendovana u 500 μl TE pufera.

Za merenje koncentracije izolovane DNK korišćen je NanoVue aparat.

3.2.11. Bisulfitna konverzija genomske DNK

Najveći broj tehnika za detekciju metilacije DNK oslanja se na proces bisulfitne konverzije (Clark *et al.*, 1994). Ovaj proces uključuje 3 koraka:

1. sulfonacija – vezivanje bisulfita na dvolančanu vezu između ugljenika na pozicijama 5 i 6 i nastanak citozin sulfonata
2. hidrolitička deaminacija rezultujućeg derivata, čime nastaje uracil sulfonat
3. alkalna desulfonacija – uklanjanje sulfonatne grupe alkalnim tretmanom, čime nastaje uracil (U).

Ovim tretmanom C (citozin) se deaminuje u U (uracil), dok je 5-metil citozin (5mC) zaštićen od bisulfitom-posredovane deaminacije. U nizvodnim PCR reakcijama, U se umnožava kao timin (T) dok se 5mC umnožava kao C, čime je omogućeno razlikovanje nemetilovanih od metilovanih CG dinukleotida (Patterson *et al.*, 2011).

Za bisulfitnu konverziju genomske DNK izolovane iz neindukovanih i NT2/D1 ćelija tretiranih retinoičnom kiselinom 2, 4 i 7 dana korišćen je EZ DNA Methylation – Lightning Kit, prema uputstvu proizvođača (Zymo Research Corporation, CA, USA).

Ukratko, smeša DNK i Lightning Conversion reagensa inkubirana je na 98°C 8 minuta, a zatim na 54°C 60 minuta u PCR aparatu, nakon čega je uzorak stavljen na led. Uzorak je nakon toga zajedno sa M-Binding puferom nanet na Zymo-Spin IC kolonicu, opran M-Wash puferom, i inkubiran u L-Desulphonation puferu na sobnoj temperaturi 15-20 minuta. Nakon ponovnog pranja M-Wash puferom, bisulfitno konvertovana DNK je eluirana sa kolone M-Elution puferom. Nakon konverzije pomenutom metodom uspešnost reakcije se procenjuje na 100%, prema uputstvu proizvođača. Bisulfitno konvertovana DNK čuvana je na -20°C do upotrebe.

3.2.12. *In silico* analiza promotora humanog gena SOX3

Za predikciju CpG ostrva i dizajn oligonukleotida za MSP i bisulfitno pirosekvenciranje sekvenca promotora humanog gena *SOX3* dužine 713 bp (Kovacevic Grujicic *et al.*, 2005) analizirana je programom MethPrimer (Li & Dahiya, 2002).

Prilikom unosa sekvence, program generiše dva tipa sekvence, jednu bisulfitno modifikovanu i metilovanu, u kojoj su svi C, osim 5mC, konvertovani u T; drugu bisulfitno modifikovanu i nemetilovanu, u kojoj su svi C, uključujući i 5mC, konvertovani u T. Program koristi algoritam koji prati GC sastav i odnos između detektovanih i očekivanih CG dinukleotida (Li & Dahiya, 2002). CpG ostrvo definiše se kao DNK sekvenca duga najmanje 200 bp sa GC sastavom >50% i detektovanim/očekivanim odnosom CG dinukleotida >0,6 (Gardiner-Garden & Frommer, 1987). Za predikciju oligonukleotida za nizvodne reakcije MethPrimer koristi Primer3 algoritme (Li & Dahiya, 2002), a zavisno od tipa nizvodne analize moraju biti zadovoljeni i dodatni uslovi. Naime, oligonukleotidi za bisulfitno pirosekvenciranje ne smeju sadržati nijedan CG dinukleotid, kako bi se izbeglo preferencijalno umnožavanje metilovane ili nemetilovane DNK (Li & Dahiya, 2002). Takođe, parovi oligonukleotida predviđenih za ovu analizu moraju obuhvatiti što veći broj CG dinukleotida (Li & Dahiya, 2002). Sa druge strane, oligonukleotidi za MSP dizajnirani su tako da jedan par prajmera odgovara metilovanoj sekvenci (M) dok drugi odgovara nemetilovanoj sekvenci (N). Za ovu analizu oligonukleotidi treba da sadrže bar 1, a poželjno je i više, CG dinukleotida na svom 3'-kraju (Li & Dahiya, 2002). Takođe, M i N parovi oligonukleotida u svojoj sekvenci sadrže identične CG dinukleotide, kao i identične tačke topljenja (Li & Dahiya, 2002).

Prema navedenim kriterijumima u okviru promotora humanog gena *SOX3* detektovana su 2 CpG ostrva na pozicijama -219bp/-5bp (prvo ostrvo) i +7 bp/+230bp (drugo ostrvo). Ujedno, definisani su i odabrani oligonukleotidi za bisulfitno pirosekvenciranje i MSP na regionu koji obuhvata 2. CpG ostrvo u okviru promotora humanog gena *SOX3*. Region koji obuhvata prvo CpG ostrvo nije bio pogodan za umnožavanje zbog homopolimernih nizova nastalih nakon procesa bisulfitne konverzije DNK te stoga nije mogao biti analiziran nijednom od ove dve metode.

3.2.13. *Bisulfitno pirosekvenciranje (BSP)*

Kvantifikacija metilacije DNK od izuzetnog je značaja kako u fundamentalnim istraživanjima tako i u ispitivanjima i dijagnostici patoloških stanja. Među brojnim tehnikama koje se koriste u ovoj oblasti istraživanja zlatni standard predstavlja bisulfitno pirosekvenciranje (BSP), koje omogućava precizno merenje stepena

metilacije uz visoku rezoluciju i reproducibilnost (Tost & Gut, 2007b, a). Pirosekvenciranje je metod sekvenciranja putem sinteze prilikom kog se kvantitativno prati ugradnja nukleotida u rastući DNK lanac (Tost & Gut, 2007b, a). Samo kada je dodati nukleotid komplementaran ponuđenoj DNK matrici dolazi do njegove ugradnje i oslobađanja pirofosfata koji se u nizu enzimskih reakcija prevodi u bioluminometrijski (svetlosni) signal. Svetlosni signali se detektuju CCD kamerom i predstavljaju u formi pirograma (Tost & Gut, 2007b, a). Prilikom BSP analize meri se stepen metilacije na svakom pojedinačnom CG dinukleotidu fragmenta koji je dobijen umnožavanjem bisulfitno konvertovane DNK (Tost & Gut, 2007b, a). U PCR reakciji koriste se oligonukleotidi komplementarni sekvenci bisulfitno konvertovane DNK, od kojih je uzvodni (eng. *forward*) oligonukleotid obeležen biotinom, što omogućava vezivanje sintetisanog produkta za streptavidinom obložene kuglice prilikom procesa pirosekvenciranja (Tost & Gut, 2007b, a). Oligonukleotidi moraju biti odabrani tako da u svom sastavu ne sadrže nijedan CG dinukleotid, čime se postiže umnožavanje nezavisno od metilacionog statusa ciljnog regiona (Tost & Gut, 2007b, a). Kao što je prethodno pomenuto, prilikom bisulfitne konverzije nemetilovani C deaminuju se u U (odnosno T), dok su metilovani C (5mC) zaštićeni, pa se stoga u ovoj hemijskoj reakciji razlike u metilacionom statusu prevode u razlike u sekvenci, odnosno C/T polimorfizme na pozicijama sa varijabilnim stepenom metilacije (Tost & Gut, 2007b, a). Stoga je procenat metilacije definisan kao odnos visine pika koji odgovara metilovanom nukleotidu (C) i sume pikova koji odgovaraju metilovanom i nemetilovanom nukleotidu (C+T) (Tost & Gut, 2007b, a).

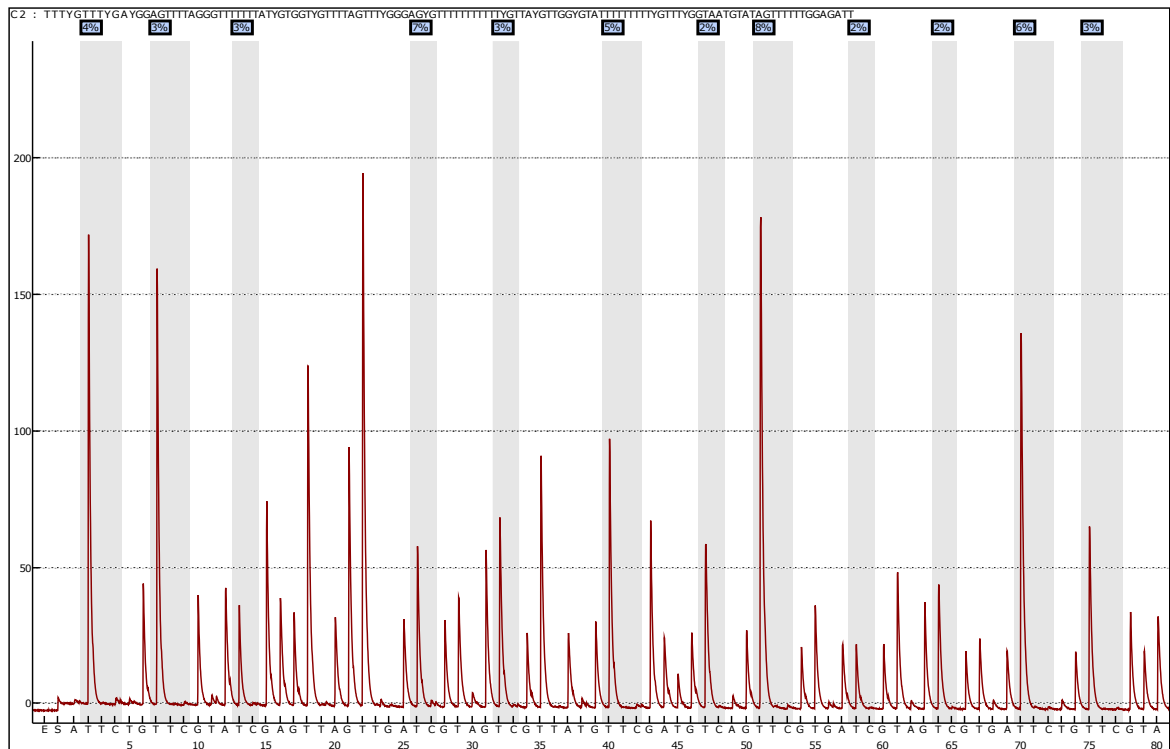
3.2.13.1. PCR umnožavanje bisulfitno konvertovanog promotora humanog gena *SOX3*

PCR reakcija umnožavanja 2. CpG ostrva u okviru promotora humanog gena *SOX3* urađena je korišćenjem KAPA 2G Fast HotStart Ready Mix u zapremini 60 µl. Kao matrica za sintezu korišćene su bisulfitno konvertovane genomske DNK izolovane iz neindukovanih i NT2/D1 ćelija indukovanih retinoičnom kiselinom 2, 4 i 7 dana. PCR reakcije su se odvijale prema programu: (20 sekundi na 95°C; 20 sekundi na 50–55°C, 2 min na 60°C)40 ciklusa. Za uspostavljanje i optimizaciju PCR reakcija korišćeni su neobeleženi oligonukleotidi (MetSOX3F2 i MetSOX3R2, **Tabela 5**). Nakon uspešnog umnožavanja produkta, naredni korak podrazumevao je PCR reakcije na istim matricama uz korišćenje MetSOX3R2 i MetSOX3F2 (**Tabela 5**) oligonukleotida obeleženih biotinom na 5'-krajevima. Produkti su provereni elektroforezom na 2% agaroznom gelu i bojenjem etidijum bromidom.

3.2.13.2. Pirosekvenciranje

Pirosekvenciranje biotinom obeleženih PCR produkata urađeno je u Genome Centre-u, na Queen Mary Univerzitetu u Londonu na aparatu Pyromark MD system, Biotage (Qiagen, Nemačka). Za sekvenciranje 2. CpG ostrva u okviru promotora humanog gena *SOX3* korišćeni su oligonukleotidi SEQ3 i SEQ4 čije su sekvence navedene u **Tabeli 5**. Na **Slici 14** prikazan je reprezentativni deo dobijenog pirograma.

Procenat metilacije pojedinačnih CG dinukleotida izračunat je kao odnos visine pika za C nukleotid i sume pikova za C i T nukleotide na istom CG dinukleotidu. Ukupni metilacioni status 2. CpG ostrva određeni su kao prosečna vrednost procenata metilacije svakog pojedinačnog CG dinukleotida.



Slika 14. Reprezentativni deo pirograma. Sekvenca prikazana u gornjem delu pirograma predstavlja sekvencu analiziranog regiona u okviru 2. CpG ostrva promotora humanog gena *SOX3*. C baza u okviru CG dinukleotida je označena sa Y. Sekvenca prikazana u donjem delu pirograma predstavlja redosled dNTP-ova dodanih u reakciju, a pikovi su definisani kao svetlosni signal koji se emituje prilikom ugradnje komplementarnog dNTP-a. U plavim pravougaonicima iznad pirograma predstavljen je procenat metilacije za dati dinukleotid.

3.2.14. Metilacija-specifičan PCR (MSP)

Metilacija-specifičan PCR (MSP) je jednostavan, specifičan i senzitivna metoda za određivanje metilacionog statusa regiona bogatih CG dinukleotidima. Ova metoda omogućava istovremenu detekciju metilovanog i nemetilovanog produkta uz korišćenje iste matrice, a zasnovana je na PCR reakcijama u kojima se koriste oligonukleotidi koji omogućavaju diskriminaciju metilovane od nemetilovanih sekvenci bisulfitno konvertovane DNK (Herman *et al.*, 1996).

U ovom radu su za MSP analizu 2. CpG ostrva u promotoru humanog gena *SOX3* korišćeni *SOX3* MSPM F i *SOX3* MSPM R oligonukleotidi za umnožavanje metilovanih sekvenci, dok su *SOX3* MSPU F i *SOX3* MSPU R korišćeni za umnožavanje nemetilovanih sekvenci (**Tabela 5**). Oba uzvodna (F) oligonukleotida obuhvatala su 4 CG dinukleotida, dok su oba nizvodna (R, eng. *reverse*) oligonukleotida obuhvatala 7 CG dinukleotida.

Za MSP analizu promotora humanog gena *SOX1* korišćeni su *SOX1* MSPM F i *SOX1* MSPM R oligonukleotidi za umnožavanje metilovanih sekvenci, dok su *SOX1* MSPU F i bp do *SOX31* MSPU R (**Tabela 5**) korišćeni za umnožavanje nemetilovanih sekvenci. Oligonukleotidi su dizajnirani korišćenjem programa *MethPrimer*, prema kriterijumima navedenim u odeljku 3.2.12. Za dizajniranje oligonukleotida korišćena je sekvenca koja obuhvata 1022 bp (-788 bp/+234 bp) promotora gena *SOX1*. Oba uzvodna oligonukleotida obuhvatala su 7 CG dinukleotida, dok su oba nizvodna oligonukleotida obuhvatala 9 CG dinukleotida.

Za bisulfitnu konverziju direktno iz neindukovanih i NT2/D1 ćelija indukovanih retinoičnom kiselinom 2, 4 i 7 dana korišćen je EZ DNA Methylation-Direct Kit prema uputstvima proizvođača. Ukratko, 1×10^5 ćelija inkubirano je u M-Digestion puferu sa Proteinazom K na 50°C, 20 minuta. Nakon taloženja centrifugiranjem 5 min/11600 rpm supernatanti su odvojeni i inkubirani sa CT Conversion Reagent, najpre 8 minuta na 98°C a zatim 3,5h na 64°C. Uzorak je zatim nanet na Zymo-Spin IC kolonu sa M-Binding puferom, a zatim centrifugiran 30 sekundi na 14700 g na sobnoj temperaturi. Usledilo je pranje M-Wash puferom i inkubacija u M-Desulphonation puferu na sobnoj temperaturi 20 minuta. Nakon ponovnog pranja M-Wash puferom, bisulfitno konvertovana DNK je eluirana sa kolone M-Elution puferom.

Za umnožavanje bisulfitno konvertovane DNK korišćen je KAPA 2G Fast HotStart Ready Mix, a PCR reakcija se odvijala po sledećem programu: 5 min na 95°C; (30 sekundi na 95°C, 20 sekundi na 60°C, 2 min na 72°C)-35 ciklusa. PCR produkti su vizualizovani elektroforetskim razdvajanjem na 2% agaroznom gelu i bojenjem etidijum bromidom.

3.2.15. Hromatinska imunoprecipitacija (ChIP)

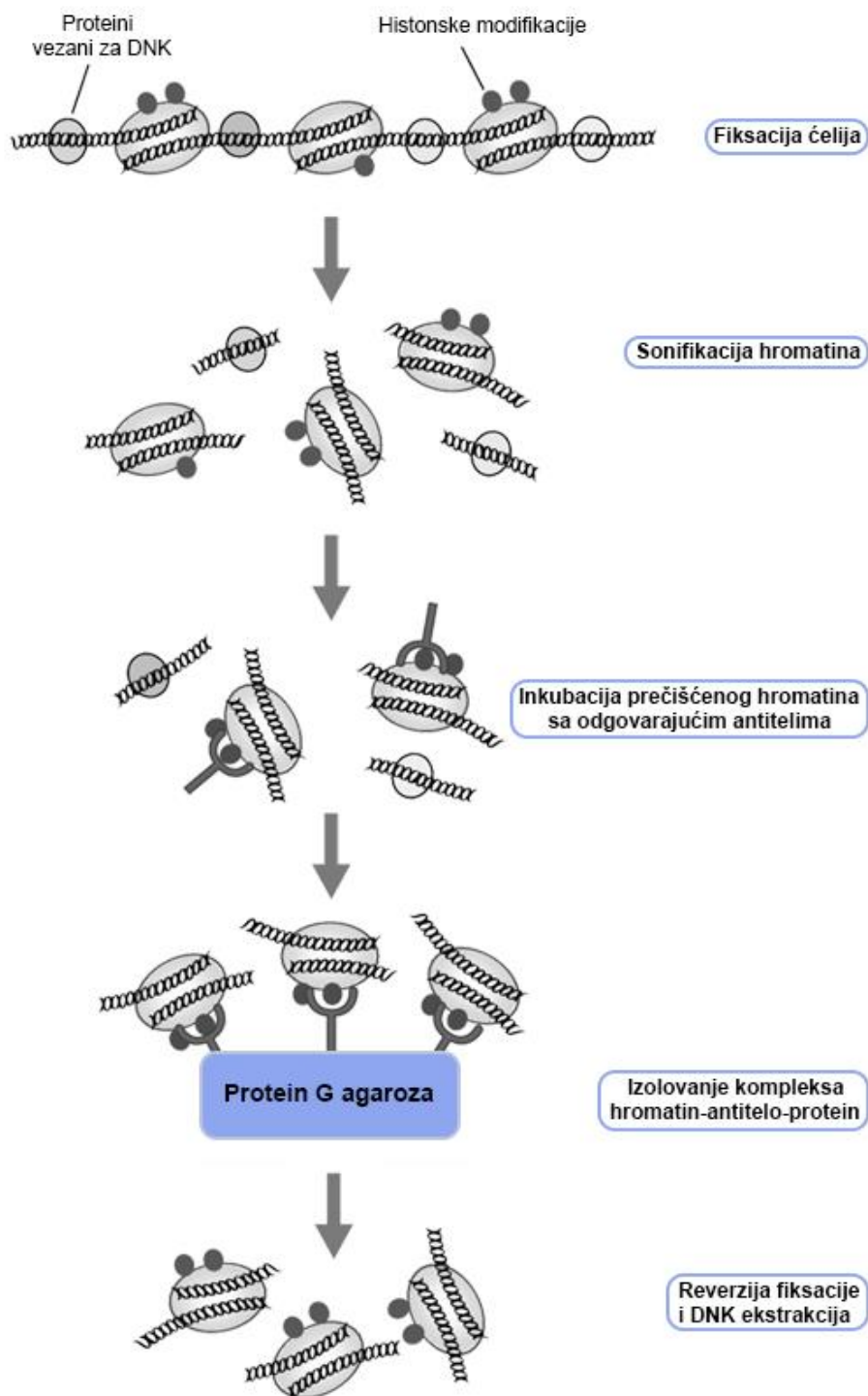
Hromatinska imunoprecipitacija (ChIP) predstavlja eksperimentalnu tehniku kojom se ispituju interakcije proteina i DNK u *in vivo* uslovima, a bazirana je na imunoprecipitaciji proteina od interesa korišćenjem specifičnih antitela (Gilmour & Lis, 1984, Solomon *et al.*, 1988). ChIP se rutinski koristi za detekciju interakcija transkripcionih faktora/regulatora sa ciljnim regionima u genomu, kao i za ispitivanje histona i histonskih modifikacija prisutnih u regionima od interesa.

Shematski prikaz ChIP metode dat je na **Slici 15**. Ukratko, u ovoj tehnici se korišćenjem formaldehida obezbeđuje fiksacija hromatina, koja podrazumeva stabilizaciju protein-protein i protein-DNK interakcija. Nakon izolacije fiksiranog hromatina sledi njegova fragmentacija sonifikacijom, a zatim prečišćavanje eliminacijom velikih fragmenata koji otežavaju dalje analize. Inkubacijom sonifikovanog i prečišćenog hromatina sa antitelom od interesa dolazi do formiranja kompleksa hromatin-antitelo, koji se zatim precipitiraju korišćenjem protein G agaroze. Imunoprecipitirani uzorci bivaju podvrgnuti reverznoj fiksaciji koja se odvija na visokim temperaturama, kada dolazi do raskidanja veza protein-DNK i do oslobađanja fragmenata DNK na kojima je bio vezan protein od interesa. Nakon ekstrakcije, ova DNK koristi se u daljim analizama, kao što su qPCR ili sekvenciranje (Kim & Dekker, 2018).

Pored inkubacije sa antitelom od interesa, deo hromatina iz istog uzoraka ćelija se paralelno inkubira i sa anti-Flag antitelom. DNK izolovana iz uzoraka imunoprecipitiranih sa anti-Flag antitelom koristi se kao negativna kontrola reakcije

ChIP-a. Supernatanti izolovani iz ovih uzoraka koriste se kao "Input reakcije", odnosno predstavljaju pozitivnu kontrolu. Prilikom ChIP analize histonskih PTM neophodno je i korišćenje antitela za ukupni histon čija se modifikacija analizira. Time se omogućava normalizacija obogaćivanja (zastupljenosti) ciljne sekvence DNK u uzorku imunoprecipitiranom antitelom za histonsku PTM (npr. H3Kme3) u odnosu na zastupljenost iste sekvence u uzorku imunoprecipitiranom sa ukupnim histonom (npr, H3) (Testa *et al.*, 2005, Nardini *et al.*, 2013).

U ovom radu korišćen je protokol opisan u radu Testa i autora (Testa *et al.*, 2005). Neindukovane i NT2/D1 ćelije indukovane retinoičnom kiselinom tokom 2, 4 i 7 dana fiksirane su u rastvoru 1% formaldehida u DMEM-u 10 minuta na sobnoj temperaturi, a zatim isprane hladnim PBS-om. Reakcija fiksacije zaustavljena je inkubacijom ćelija u hladnom 0,125 mM rastvoru glicina u PBS-u. Ćelije su zatim odvojene od podloge suda za gajenje, staložene centrifugiranjem i čuvane na -20°C do upotrebe.



Slika 15. Shematski prikaz reakcije hromatinske imunoprecipitacije.

Na početku eseja, talozi su otopljeni na ledu i resuspendovani u puferu za lizu (5 mM Pipes pH 8,0, 85 mM KCl, 0,5% NP-40, koktel inhibitora proteaza, Roche, Switzerland) i inkubirani na ledu, 30 minuta. Ćelije su zatim homogenizovane, a jedra su staložena centrifugiranjem 10 min/5000 rpm/4°C. Dobijeni talozi resuspendovani su u puferu za sonifikaciju (50 mM Tris pH 8,0, 10 mM EDTA, 0,1% SDS, 0,5 % deoksiholna kiselina, koktel inhibitora proteaza). Hromatin je sonifikovan u Bioruptor

sonifikatoru (Diagenode, NJ, USA) do fragmenata prosečne dužine 500-1500 bp. Sonifikovani hromatin proveren je na 1% agaroznom gelu. Protein G agaroz (KPL, Seracare, MA, USA) je oprana 2 puta u puferu za imunoprecipitaciju (50 mM Tris pH 8,0, 10 mM EDTA, 0,1% SDS, 0,5% deoksiholna kiselina, 150 mM LiCl, koktel inhibitora proteaza) a zatim preko noći inkubirana sa BSA i DNK izolovanom is sperme lososa (Sigma Aldrich) na temperaturi 4°C u cilju blokiranja nespecifičnog vezivanja. Sonifikovani hromatin prečišćen je od velikih fragmenata inkubacijom sa protein G agarozom u puferu za imunoprecipitaciju, na temperaturi 4°C u trajanju od 2 h.

U narednom koraku, prečišćeni hromatin je inkubiran sa odgovarajućim antitelima (**Tabela 4**) na 4°C preko noći na rotirajućem točku. Antitela su korišćena u koncentracijama preporučenim od strane proizvođača. U slučaju da takva preporuka nije postojala, korišćeno je 5 µg antitela po uzorku. Kao kontrola korišćeno je anti-Flag antitelo (Sigma Aldrich, MO, USA). Nakon inkubacije, prečišćena protein G agaroz inkubirana je sa kompleksima hromatin-antitela na 4°C na rotirajućem točku, 4 h. Po isteku ovog vremena, kompleksi hromatin-antitelo-protein G agaroz staloženi su centrifugiranjem, a supernatant dobijen u reakciji sa anti-Flag antitelom korišćen je kao pozitivna kontrola-“Input DNK“ reakcija. Kompleksi su zatim 5 puta oprani RIPA puferom (10 mM Tris pH 8,0, 1 mM EDTA, 0,5 mM EGTA, 0,1% SDS, 0,1% deoksiholna kiselina, 140 mM NaCl, 1% Triton X-100, koktel inhibitora proteaza, 1 mM PMSF), pri čemu je prvo pranje podrazumevalo inkubaciju od 30 minuta na rotirajućem točku na +4°C. Nakon pranja u RIPA puferu, kompleksi su oprani u LiCl puferu (0,25 M LiCl, 0,5% NP-40, 0,5% deoksiholna kiselina, 10 mM Tris pH 8,0, 1 mM EDTA), a zatim u TE puferu (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8,0). Prilikom poslednjeg centrifugiranja uklonjeni su svi ostaci pufera, a zatim su kompleksi resuspendovani u 100 µl TE pufera uz dodatak Rnaze A (Sigma Aldrich, MO, USA). Reverzija fiksacije odvijala se prekononoćnom inkubacijom uzoraka na 65°C. Narednog dana u uzorke je dodat SDS do finalne koncentracije 0,5% i 20 µg Proteinaze K, a zatim je usledila inkubacija na 50°C 3 h. Ekstrakcija DNK urađena je dodavanjem jednake zapremine smeše fenol:hlороform:izoamilakohol (u odnosu 25:24:1) u uzorak. Vodena faza je razdvojena centrifugiranjem i iz nje je DNK precipitirana smešom 3M Na-acetata, etanola i tRNK (Sigma Aldrich, MO, USA) preko noći na -20°C. Nakon inkubacije, DNK je staložena centrifugiranjem a talozi su oprani 70% etanolom, osušeni i resuspendovani u ddH₂O.

3.2.16. ChIP-qPCR

DNK uzorci iz ChIP eksperimenata korišćeni su kao matrice u reakcijama qPCR-a. Reakcije su rađene u ukupnoj zapremini od 10 µl u prisustvu oligonukleotida specifičnih za gene od interesa. Oligonukleotidi korišćeni u qPCR reakcijama navedeni su u **Tabeli 5**, a dizajnirani su korišćenjem *online* dostupnog programa Primer3 (dostupan na <http://bioinfo.ut.ee/primer3/>) i provereni korišćenjem In-Silico PCR programa dostupnog na <http://genome.ucsc.edu> (GRCh37/hg19). Reakcije su se odvijale u aparatu ABI Prism 7500 Sequence Detection System (Applied Biosystems, MA, USA) prema programu: 2 min na 50°C; 10 min na 95°C; (15 sekundi na 95°C, 1 min na 60°C)-40 ciklusa. Svaka reakcija je rađena u triplikatu i za svaki uzorak u obzir je uzimana srednja vrednost Ct. Relativno obogaćivanje² predstavljeno je kao porast signala u uzorku imunoprecipitiranom antitelom od interesa u odnosu na uzorak istog

hromatina imunoprecipitiranog anti-Flag antitelom (negativna kontrola reakcije). Kao pozitivna kontrola (Input) korišćena je DNK izolovana iz supernatanta uzorka imunoprecipitiranog anti-Flag antitelom. Ct vrednost Input uzorka takođe je inkorporisana u formulu za izračunavanje relativnog obogaćivanja. Relativno obogaćivanje² izračunato je korišćenjem formule $2^{\Delta Ct_x} / 2^{\Delta Ct_b}$, gde je $\Delta Ct_x = Ct_{input} - Ct_x$ uzorka i $\Delta Ct_b = Ct_{input} - Ct_{Flag At}$ (Nardini *et al.*, 2013). Ovako dobijene vrednosti relativnog obogaćivanja za svaku pojedinačnu histonsku PTM (npr. H3K4me3) normalizovane su u odnosu na vrednosti relativnog obogaćivanja odgovarajućeg ukupnog histona (u ovom primeru H3) za isti hromatin. U cilju poređenja profila odabranih histonskih modifikacija tokom neuralne diferencijacije NT2/D1 ćelija, vrednostima relativnog obogaćivanja u neindukovanim ćelijama dodeljena je vrednost 1, dok su ostali uzorci normalizovani u odnosu na ovu vrednost (Rank *et al.*, 2010). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost dobijena iz 3 ChIP eseja (biološki replikati).

3.2.17. Statistička analiza

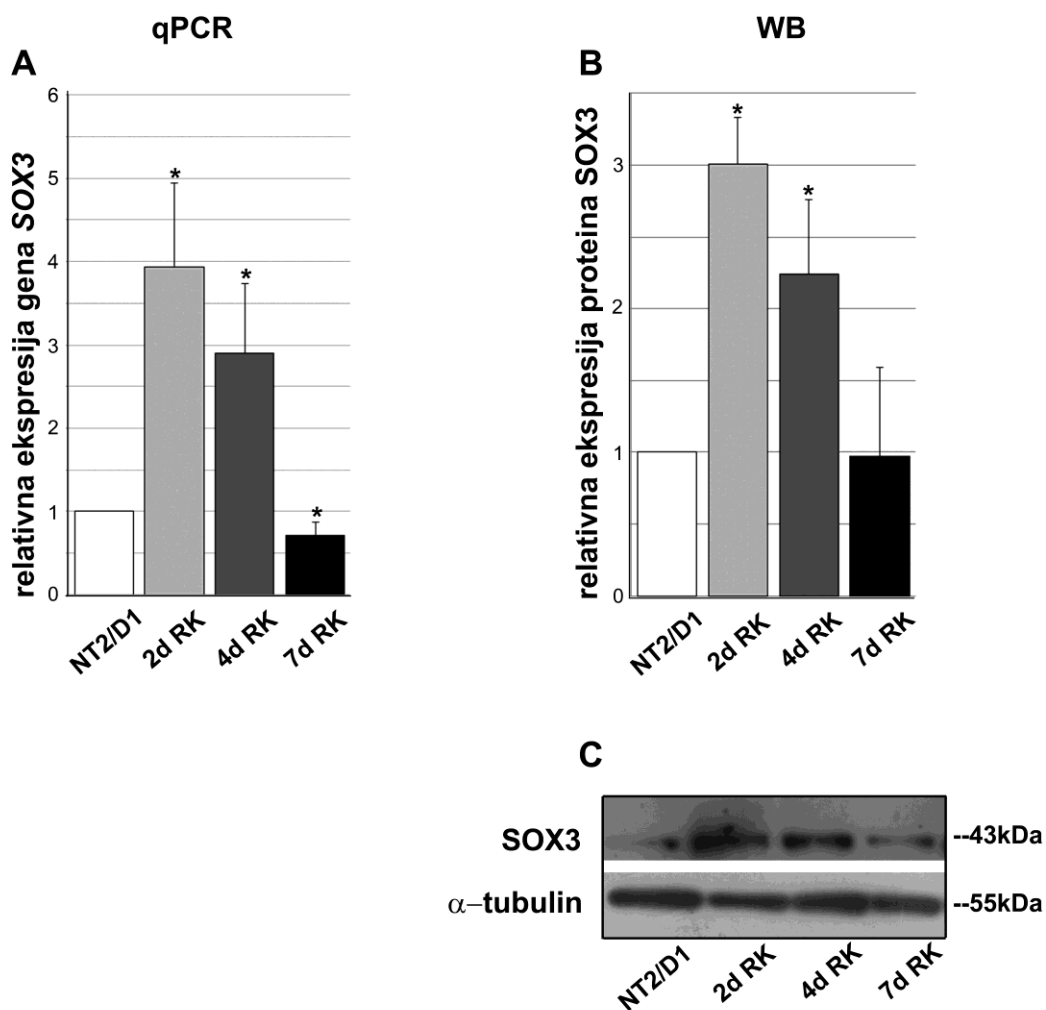
Svi rezultati prikazani su kao srednja vrednost \pm standardna devijacija (SD) i analizirani su Studentovim *t*-testom. Verovatnoća $p < 0.05$ smatrana je statistički značajnom i obeležena je zvezdicom (*).

²zbog usklađenosti sa literaturom na engleskom jeziku termin *fold enrichment* preveden je kao *obogaćivanje* i predstavlja porast signala u ChIP uzorcima u odnosu na signal iz kontrolnih uzoraka

4. REZULTATI

4.1. Analiza ekspresije humanog gena *SOX3* tokom ranih faza neuralne diferencijacije NT2/D1 ćelija

SOX3 predstavlja jedan od najranijih neuralnih markera kičmenjaka, koji je predominantno eksprimiran u proliferišućim ćelijama neuralnog epitela CNS-a. (Collignon *et al.*, 1996, Wood & Episkopou, 1999). Inicijalne faze neuralne indukcije praćene su dramatičnim povećanjem nivoa ekspresije gena *Sox3*, kako je pokazano na primeru razvića nervnog sistema pileta (Uwanogho *et al.*, 1995). Kasnije faze neuralne indukcije karakterišu se padom ekspresije *Sox2* i *Sox3*, što koincidira sa tranzicijom ćelija iz faze proliferacije u fazu diferencijacije (Uwanogho *et al.*, 1995), ukazujući na važnost prostorno i vremenski zavisne regulacije ekspresije gena *Sox3*. Prethodno je pokazano da tretman NT2/D1 ćelija retinoičnom kiselinom indukuje porast nivoa *SOX3* transkripta, sa maksimalnim nivoom ekspresije 48 h nakon indukcije (Stevanovic, 2003). U cilju detaljnijeg ispitivanja ekspresionog profila gena *SOX3* tokom ranih faza neuralne diferencijacije NT2/D1 ćelija (prva nedelja indukcije), u ovom radu analizirane su neindukovane NT2/D1 ćelije i ćelije tretirane retinoičnom kiselinom tokom 2, 4 i 7 dana. Tehnikama qPCR-a i *Western blot*-a detektovan je nizak nivo *SOX3* iRNK (**Slika 16 A**), odnosno *SOX3* proteina u nediferenciranim NT2/D1 ćelijama (**Slika 16 B**). U skladu sa prethodnim studijama, tretman ćelija retinoičnom kiselinom doveo je do statistički značajnog porasta ekspresije gena *SOX3* (**Slika 16 A, B**). Najveći nivo ekspresije gena *SOX3* detektovan je drugog dana indukcije (2d RK), 4 puta veći na nivou iRNK, odnosno 3 puta na nivou proteina, u odnosu na neindukovane NT2/D1 ćelije. U daljem toku neuralne diferencijacije detektovano je smanjenje nivoa ekspresije gena *SOX3*, da bi se nivo ekspresije nakon 7 dana tretmana retinoičnom kiselinom (7d RK) izjednačio sa nivoom detektovanim u nediferenciranim NT2/D1 ćelijama (**Slika 16 A, B**). Dobijeni profil ukazao je da se ekspresija gena *SOX3* dinamično menja tokom ranih faza neuralne diferencijacije NT2/D1 ćelija, i da je stoga u datim vremenskim intervalima neophodno ispitati mehanizme kojima je ovaj gen regulisan.

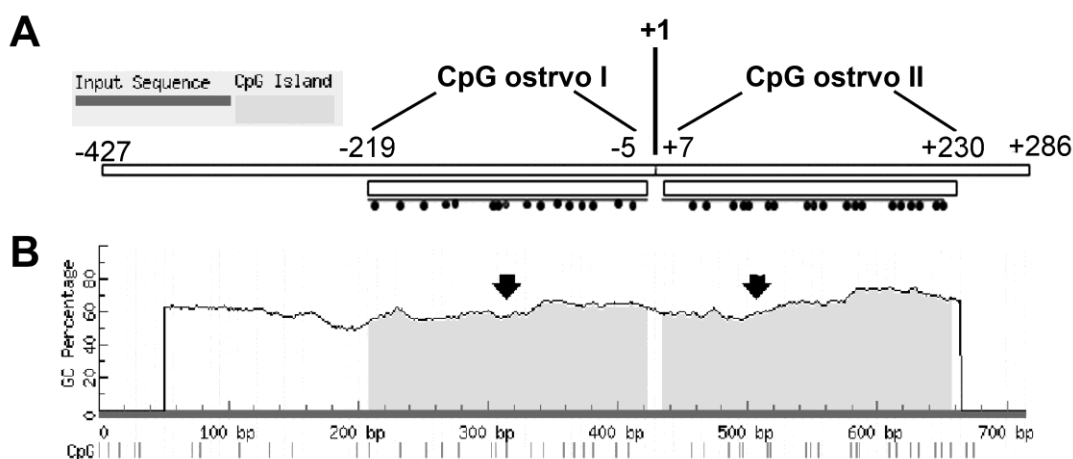


Slika 16. Analiza ekspresije humanog gena *SOX3* tokom ranih faza neuralne diferencijacije NT2/D1 ćelija. (A) qPCR analiza relativne ekspresije gena *SOX3* tokom ranih faza neuralne diferencijacije NT2/D1 ćelija indukovanih retinoičnom kiselinom tokom 2, 4 i 7 dana. Relativni nivo ekspresije gena *SOX3* izražen je u odnosu na ekspresiju *GAPDH* u istom uzorku i normalizovan u odnosu na nivo u netretiranim NT2/D1 ćelijama. Na grafiku su prikazane srednje vrednosti \pm S.D. iz najmanje tri nezavisne neuralne diferencijacije NT2/D1 ćelija; * $P < 0.05$. (B) *Western blot* analiza relativne ekspresije proteina *SOX3* tokom ranih faza neuralne diferencijacije NT2/D1 ćelija indukovanih retinoičnom kiselinom tokom 2, 4 i 7 dana. Relativni nivo proteina *SOX3* izražen je u odnosu na α -tubulin i normalizovan u odnosu na nivo u netretiranim NT2/D1 ćelijama. Na grafiku su prikazane srednje vrednosti \pm S.D. iz najmanje tri nezavisne neuralne diferencijacije NT2/D1 ćelija; * $P < 0.05$. (C) Reprezentativni primer *Western blot* analize ekspresije *SOX3* proteina tokom ranih faza neuralne diferencijacije NT2/D1 ćelija indukovanih retinoičnom kiselinom 2, 4 i 7 dana. α -tubulin je korišćen kao kontrola količine proteina u svakoj reakciji.

4.2. Analiza prisustva CpG ostrva u promotorskom regionu humanog gena *SOX3*

Imajući u vidu da je metilacija DNK jedan od ključnih mehanizama regulacije ekspresije faktora uključenih u kontrolu razvića, kao i značaj gena *SOX3* u procesima održavanja pluripotentnosti i opredeljivanja i diferencijacije ćelija, od izuzetne je važnosti ispitati metilacioni status promotorskog regiona ovog gena tokom ranih faza neuralne diferencijacije. U tu svrhu, u nastavku ovog rada je analiziran metilacioni status 713 bp duge sekvence promotorskog regiona humanog gena *SOX3* (-427bp do +286bp u odnosu na start transkripcije (TSS, eng. *transcription start site*)) (Kovacevic Gruzicic et al., 2005).

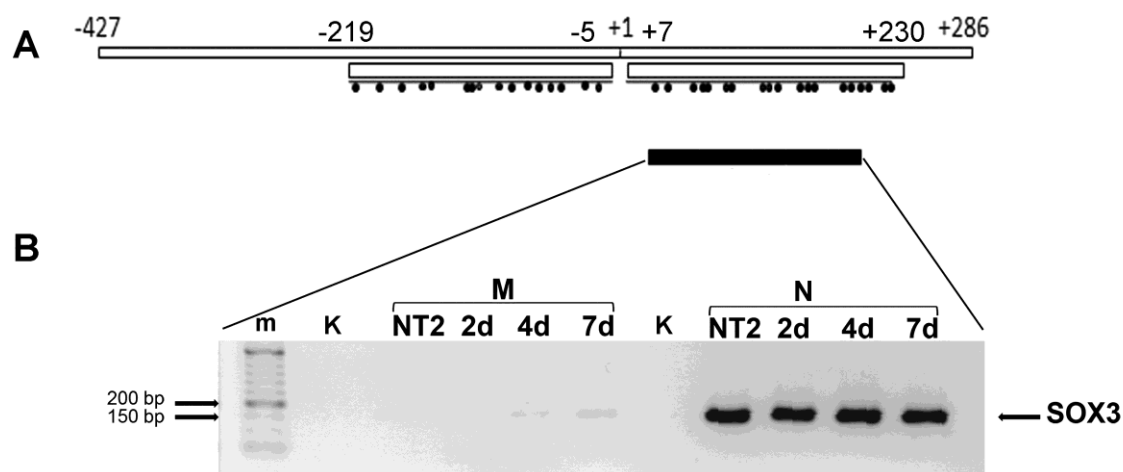
In silico analiza navedene sekvence u *online*-dostupnom programu *MethPrimer* (Li & Dahiya, 2002) ukazala je na prisustvo 2 CpG ostrva u 5'-regulatornom regionu humanog gena *SOX3* čiji metilacioni status može uticati na transkripcionu aktivnost gena *SOX3* (Slika 17). Prvo CpG ostrvo nalazi se na poziciji od -219bp do -5bp u odnosu na *SOX3* TSS i obuhvata 17 CG dinukleotida, dok se drugo CpG ostrvo nalazi na poziciji od +7bp do +230bp u odnosu na *SOX3* TSS i obuhvata 22 CG dinukleotida i završava se nizvodno od start kodona humanog gena *SOX3* (Slika 17).



Slika 17. *MethPrimer* analiza promotorskog regiona humanog gena *SOX3*. (A) Shematski prikaz promotorskog regiona humanog gena *SOX3* sa označenim CpG ostrvima. Brojevi (-427/+286) predstavljaju pozicije nukleotida na krajevima analizirane sekvence u odnosu na *SOX3* TSS (+1). Dva CpG ostrva prikazana su kao beli pravougaonici, a pojedinačni CG dinukleotidi predstavljeni su crnim tačkama. Brojevima su označene pozicije CpG ostrva I (-219bp/-5bp), kao i CpG ostrva II (+7bp/+230bp) u odnosu na *SOX3* TSS. (B) Lokalizacija CpG ostrva u okviru promotora humanog gena *SOX3* definisana *MethPrimer* programom. Strelice pokazuju sivo označene regione CpG ostrva I i II.

4.3. Analiza metilacionog statusa promotora humanog gena *SOX3* tokom ranih faza neuralne diferencijacije NT2/D1 ćelija

U cilju praćenja metilacionog profila promotora humanog gena *SOX3* tokom ranih faza neuralne diferencijacije pristupilo se bisulfitnoj konverziji DNK izolovane iz neindukovanih NT2/D1 ćelija i NT2/D1 ćelija tretiranih retinoičnom kiselinom 2, 4 i 7 dana, nakon čega je usledio metilacija-specifičan PCR (MSP). Oligonukleotidi korišćeni u MSP reakcijama dizajnirani su u programu *MethPrimer* prema kriterijumima prethodno opisanim u odeljku 3.2.14. Primena MSP analize za CpG ostrvo I nije bila moguća zbog specifičnosti analizirane sekvence DNK i nemogućnosti dizajniranja odgovarajućeg seta oligonukleotida, dok je CpG ostrvo II uspešno amplifikovano (**Slika 18 B**). Kako je prikazano na **Slici 18 B**, u reakcijama sa oligonukleotidima koji odgovaraju metilovanoj DNK dobijena je mala količina produkta (na **Slici 18 B** označeni kao M), što ukazuje na nisku zastupljenost metilovanih sekvenci. Sa druge strane, produkti PCR reakcija sa oligonukleotidima koji odgovaraju nemetilovanoj DNK (na **Slici 18 B** označeni kao N) dobijeni su u visokom prinosu. Ovi rezultati ukazali su da je CpG ostrvo II *SOX3* promotora hipometilovano kako u nediferenciranim NT2/D1 ćelijama, tako i tokom inicijalnih faza retinoičnom kiselinom-indukovane neuralne diferencijacije.

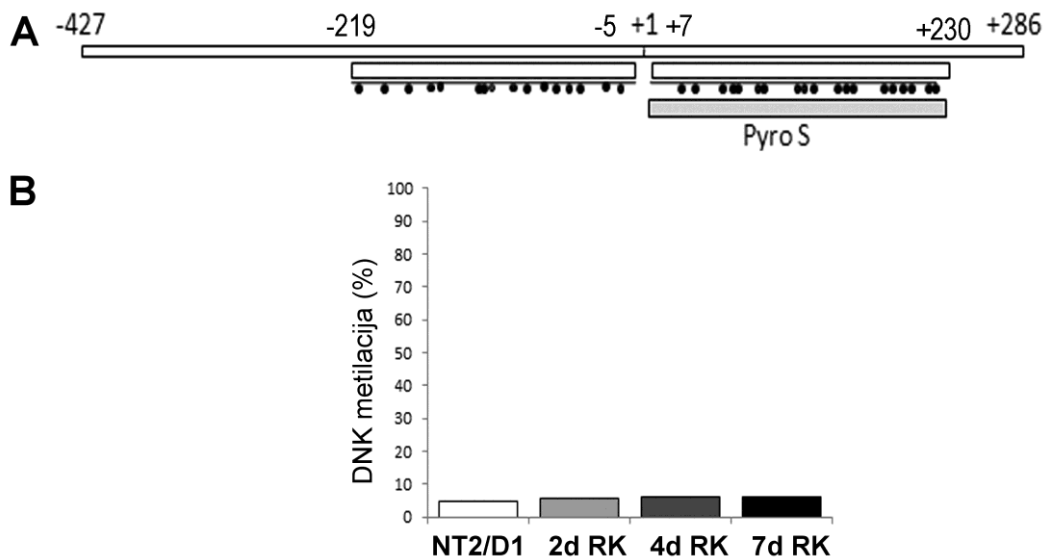


Slika 18. Analiza metilacionog statusa CpG ostrva II u okviru promotorskog regiona humanog gena *SOX3* tokom ranih faza neuralne diferencijacije NT2/D1 ćelija tehnikom metilacija-specifičnog PCR-a (MSP). (A) Shematski prikaz promotora humanog gena *SOX3*. Brojevi (-427/+286) predstavljaju pozicije nukleotida na krajevima analizirane sekvence u odnosu na TSS (+1). Dva CpG ostrva prikazana su kao beli pravougaonici, a pojedinačni CG dinukleotidi predstavljani su crnim tačkama. Brojevima su označene pozicije CpG ostrva I (-219bp/-5bp), kao i CpG ostrva II (+7bp/+230bp) u odnosu na *SOX3* TSS. Crni pravougaonik označava analizirani region *SOX3* promotora. (B) MSP analiza metilacije CpG ostrva II promotora *SOX3* gena u netretiranim NT2/D1 ćelijama i ćelijama tretiranim retinoičnom kiselinom u označenim vremenskim intervalima (2, 4 i 7 dana). PCR produkti koji odgovaraju metilovanoj (M) i nemetilovanoj (N) DNK prikazani su na gelu. Na levoj strani gela su markeri za 200 bp i 150 bp. Na desnoj strani gela je označen *SOX3* gen. U grupi M (metilovanoj DNK) su prikazani slabi PCR produkti za NT2, 2d, 4d i 7d. U grupi N (nemetilovanoj DNK) su prikazani jaki PCR produkti za NT2, 2d, 4d i 7d.

ciljnoj sekvenci razdvojeni su elektroforetski na agaroznom gelu. m – marker molekulske težine, K – vodena kontrola.

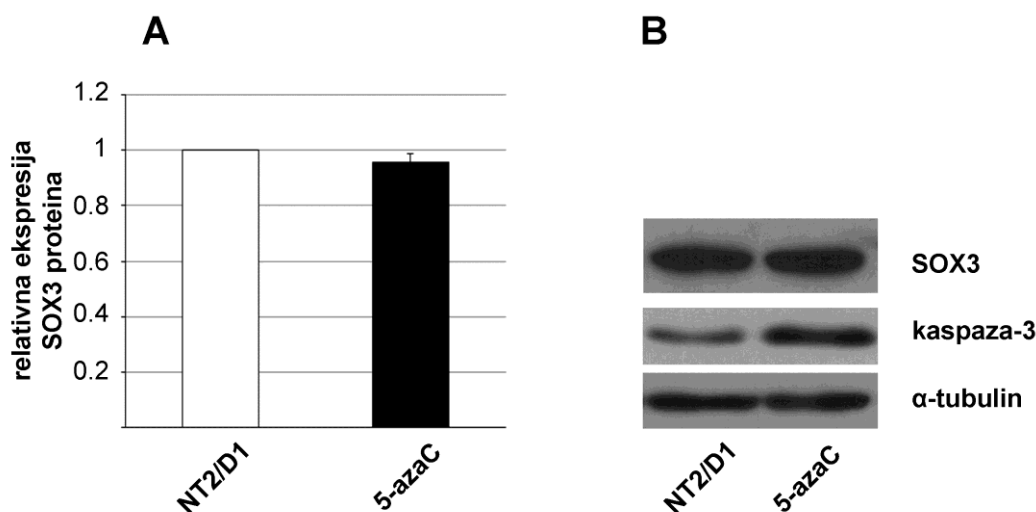
U svrhu preciznijeg definisanja metilacionog profila *SOX3* promotora, pristupilo se bisulfitnom pirosekvenciranju (BSP). Ova tehnika omogućava analizu metilacionog statusa svakog pojedinačnog CG dinukleotida u okviru ispitivane sekvence. I u ovoj analizi, ispitivanje CpG ostrva I *SOX3* promotora nije bila moguća usled specifičnosti DNK sekvence u naznačenom regionu. Naime, nakon bisulfitne konverzije DNK, u ovom GC bogatom regionu dolazi do formiranja homopolimera i sekundarnih struktura koje sprečavaju optimalnu amplifikaciju i pirosekvenciranje CpG ostrva I humanog *SOX3* promotora. Iz navedenih razloga, BSP metodom analizirano je samo CpG ostrvo II. DNK izolovana iz nediferenciranih NT2/D1 ćelija i NT2/D1 ćelija tretiranih retinoičnom kiselinom tokom 2, 4 i 7 dana bisulfitno je konvertovana i korišćena kao matrica za umnožavanje CpG ostrva II *SOX3* promotora. Biotinom obeleženi produkti analizirani su pirosekvenciranjem. Kako je detaljnije objašnjeno u odeljku 3.2.13., razlike u metilacionom statusu pojedinačnih CG dinukleotida se u nizu hemijskih reakcija prevode u razlike u sekvenci, odnosno C/T izmene na pozicijama sa varijabilnim stepenom metilacije. Procenat metilacije svakog pojedinačnog CG dinukleotida definisan je kao odnos visine pika koji odgovara metilovanom nukleotidu (C) i sume pikova koji odgovaraju metilovanom i nemetilovanom nukleotidu (C+T) (Tost & Gut, 2007b). Procenat metilacije pojedinačnih CG dinukleotida izračunat je kao odnos visine pika za C nukleotid i sume pikova za C i T nukleotide na istom CG dinukleotidu i predstavljen na pirogramu. Nakon analize pirograma, ukupni metilacioni status CpG ostrva II određen je kao prosečna vrednost procenata metilacije svakog pojedinačnog CG dinukleotida.

Kako je prikazano na **Slici 19 B**, prosečni stepen metilacije ne prelazi 10% u svim analiziranim vremenskim intervalima. Analizirani region je stoga hipometilovan u nediferenciranim NT2/D1 ćelijama, a nizak stepen metilacije očuvan je i nakon indukcije neuralne diferencijacije ovih ćelija. Navedenom analizom potvrđeni su rezultati dobijeni u MSP reakcijama, i izveden je zaključak da metilacija promotorskog regiona gena *SOX3* nije u korelaciji sa prethodno detektovanim dinamičnim promenama u ekspresiji *SOX3* tokom inicijalnih faza neuralne diferencijacije NT2/D1 ćelija.



Slika 19. Analiza metilacionog statusa CpG ostrva II u okviru promotorskog regiona humanog gena *SOX3* tokom ranih faza neuralne diferencijacije NT2/D1 ćelija tehnikom bisulfitnog pirosekvenciranja (BSP). (A) Shematski prikaz promotora humanog gena *SOX3*. Brojevi (-427/+286) predstavljaju pozicije nukleotida na krajevima analizirane sekvence u odnosu na TSS (+1). Dva CpG ostrva prikazana su kao beli pravougaonici, a pojedinačni CG dinukleotidi predstavljani su crnim tačkama. Brojevima su označene pozicije CpG ostrva I (-219bp/-5bp), kao i CpG ostrva II (+7bp/+230bp) u odnosu na *SOX3* TSS. Sivi pravougaonik označava analizirani region *SOX3* promotora. **(B)** Analiza metilacije CpG ostrva II *SOX3* promotora u netretiranim NT2/D1 ćelijama i ćelijama tretiranim retinoičnom kiselinom u označenim vremenskim intervalima (2, 4 i 7 dana). Stubići označavaju srednju vrednost metilacije CpG ostrva II za odabrane vremenske intervale. Ukupni metilacioni status CpG ostrva II određen je kao prosečna vrednost procenata metilacije svakog pojedinačnog CG dinukleotida, na osnovu pirograma dostavljenih od Genome Centra, Queen Mary Univerziteta u Londonu.

Radi provere dobijenih rezultata, NT2/D1 ćelije tretirane su 5-azacitidinom (5-azaC), hemijskim analogom nukleozida citidina koji dovodi do globalne demetilacije DNK, (Taylor & Jones, 1982, Santi *et al.*, 1984) nakon čega je praćen efekat na ekspresiju *SOX3* proteina (**Slika 20, A i B**). U cilju potvrde efikasnosti tretmana 5-azaC, porast nivoa ekspresije proteina kaspaza-3 korišćen je kao pozitivna kontrola (**Slika 20 B**). U skladu sa prethodno dobijenim rezultatima koji ukazuju na hipometilovan status *SOX3* promotora, 5-azaC tretman NT2/D1 ćelija nije doveo do značajnih promena u nivou ekspresije *SOX3* proteina (**Slika 20**). Izostankom povećanja *SOX3* ekspresije nakon tretmana NT2/D1 ćelija demetilujućim agensom dodatno je potvrđen hipometilovan status *SOX3* promotora, kao i prethodni zaključak da metilacija promotorskog regiona nije mehanizam regulacije ekspresije gena *SOX3* u inicijalnim fazama neuralne diferencijacije.



Slika 20. Efekat tretmana NT2/D1 ćelija 5-azaC na ekspresiju SOX3 proteina. (A) Količina SOX3 proteina u tretiranim ćelijama normalizovana je na α -tubulin i prikazana relativno u odnosu na netretirane NT2/D1 ćelije (kojima je dodeljena vrednost 1). Stubići predstavljaju srednje vrednosti \pm S.D. iz najmanje 3 nezavisne neuralne diferencijacije. (B) Reprezentativni primer *Western blot* analize ekspresije SOX3 proteina tokom ranih faza neuralne diferencijacije NT2/D1 ćelija indukovanih retinoičnom kiselinom 2, 4 i 7 dana. α -tubulin je korišćen kao kontrola količine proteina u svakoj reakciji. Porast nivoa ekspresije kaspaze-3 u tretiranim ćelijama korišćen je kao pozitivna kontrola efikasnosti tretmana 5-azaC.

4.4. Analiza profila modifikacija histona 3 (H3) na humanom genu *SOX3* tokom ranih faza neuralne diferencijacije NT2/D1 ćelija

Rezultati brojnih studija ukazuju na značaj histonskih kovalentnih PTM u kontroli dinamike nukleozoma tokom procesa indukovane diferencijacije ćelija (McCool *et al.*, 2007, Mikkelsen *et al.*, 2007, Cruickshank *et al.*, 2010, Bhanu *et al.*, 2016, Buschbeck & Hake, 2017). S obzirom na značajnu ulogu *SOX3* u procesu razvicia nervnog sistema, kao i na prethodno utvrđen hipometilovan status promotorskog regiona ovog gena, analiza epigenetičkih mehanizama koji regulišu njegovu ekspresiju u početnim stupnjevima neuralne diferencijacije NT2/D1 ćelija nastavljena je ispitivanjem odabranih histonskih PTM deponovanih na regulatornim regionima gena *SOX3*. Regioni za analizu odabrani su nakon vizualizacije humanog gena *SOX3* u UCSC Genome Browser-u (<http://genome.ucsc.edu/index.html>), tako da obuhvataju minimalni promotor gena *SOX3* (definisani u radu (Kovacevic Grujicic *et al.*, 2005)), region koji obuhvata kodirajuću sekvencu gena *SOX3* i region uzvodno od TSS, a imajući u vidu parametre za dizajn oligonukleotida definisane programom *Primer3* (Slika 21 A). Stoga su za analizu odabrani sledeći regioni:

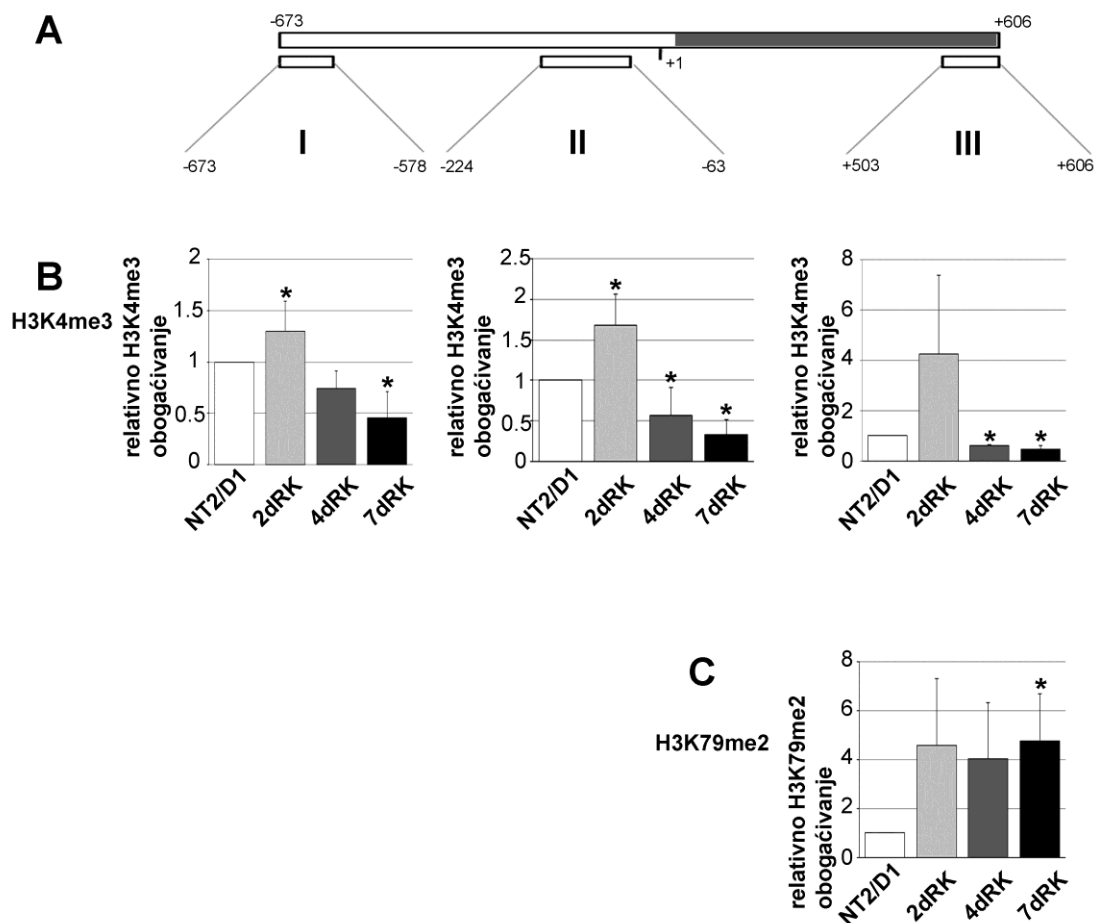
1. region I (-673/-578 bp u odnosu na *SOX3* TSS)
2. region II (region -160/+6 bp u odnosu na *SOX3* TSS, koji obuhvata minimalni promotor gena *SOX3*)

3. region III (region +503/+606 bp u odnosu na *SOX3* TSS, koji se nalazi u okviru kodirajućeg regiona gena *SOX3*)

Ukratko, hromatin izolovan iz NT2/D1 ćelija čija je neuralna diferencijacija indukovana retinoičnom kiselinom tokom 2, 4 i 7 dana fragmentisan je sonifikacijom, a zatim imunoprecipitiran antitelima za histonske PTM (anti-H3K4me3 i anti-H3K79me2) i ukupni histon H3. Fragmenti DNK izolovani iz imunoprecipitiranih uzoraka predstavljali su matricu u qPCR reakcijama amplifikacije pomenutih regiona humanog gena *SOX3*. Vrednosti relativnog obogaćivanja (zastupljenosti) ciljne sekvence DNK za svaku pojedinačnu histonsku PTM (H3K4me3 i H3K79me2) normalizovane su u odnosu na vrednosti relativnog obogaćivanja ukupnog histona H3 za isti hromatinski uzorak. U cilju poređenja profila odabranih histonskih modifikacija tokom neuralne diferencijacije NT2/D1 ćelija, vrednostima relativnog obogaćivanja u neindukovanim ćelijama dodeljena je vrednost 1, dok su ostali uzorci normalizovani u odnosu na ovu vrednost. Metodološki pristup detaljnije je opisan u odeljcima 3.2.15 i 3.2.16.

U regionu I (uzvodno od *SOX3* TSS-a) (**Slika 21 B**, grafik levo) kao i u regionu II (region minimalnog promotora gena *SOX3*) tokom diferencijacije (**Slika 21 B**, srednji grafik) detektovano je povećano prisustvo tj. obogaćivanje H3K4me3 modifikacijom. Nakon 2 dana tretmana retinoičnom kiselinom nivo H3K4me3 markera raste u odnosu na netretirane NT2/D1 ćelije, nakon čega u daljem toku neuralne diferencijacije dolazi do statistički značajnog pada prisustva H3K4me3 (**Slika 21 B**, grafik levo i srednji grafik). Ovakvi profili odgovaraju prethodno detektovanom ekspresionom profilu gena *SOX3* (**Slika 16**), ukazujući na potencijalnu vezu između H3K4me3 i transkripcione aktivnosti gena *SOX3*. Takođe, u regionu III (kodirajući region gena *SOX3*) detektovan je sličan profil H3K4me3 modifikacije, sa istim trendom obogaćivanja u danu 2 indukcije retinoičnom kiselinom (**Slika 21 B**, grafik desno). Ovakav rezultat u skladu je sa literaturnim podacima koji ukazuju da je aktivacija genske transkripcije praćena promenom distribucije H3K4me3 na promotoru i kodirajućem delu sekvence što uzrokuje porast nivoa navedenog markera u kodirajućem regionu gena (Okitsu *et al.*, 2010).

U daljem toku analize, ispitan je profil depozicije markera H3K79me2 na regionu III (kodirajući region gena *SOX3*). Pokazano je da je ova modifikacija povezana sa učešćem RNK Pol II u fazi elongacije transkripcije (Zentner & Henikoff, 2013, Jonkers *et al.*, 2014). Nakon indukcije neuralne diferencijacije primećen je trend pojačanog obogaćivanja ovom modifikacijom, što je u saglasnosti sa podacima koji ukazuju da je H3K79me2 prisutna u regionima egzona i da pospešuje fazu elongacije (Jonkers *et al.*, 2014). Interesantno je da je kodirajući region gena *SOX3* bogat ovim markerom i u danu 7 tretmana retinoičnom kiselinom (**Slika 21 C**), odnosno u fazi sa najnižom ekspresijom *SOX3* (**Slika 16**).



Slika 21. Profili modifikacija histona 3 (H3) na humanom genu *SOX3* tokom ranih faza neuralne diferencijacije NT2/D1 ćelija. (A) Shematski prikaz regiona od -673 do +606 humanog gena *SOX3* sa analiziranim regionima I, II i III. Pozicije analiziranih regiona naznačene su u odnosu na TSS. Kodirajući region označen je sivo. (B) Rezultati ChIP-qPCR analiza za modifikaciju H3K4me3 koji odgovaraju regionima označenim na panelu A. (C) Rezultati ChIP-qPCR analiza za modifikaciju H3K79me2 koji odgovaraju regionu označenom na panelu A. Obogaćivanje je izračunato relativno u odnosu na Flag i normalizovano na H3. Obogaćivanju u nediferenciranim NT2/D1 ćelijama dodeljena je vrednost 1 i ostali uzorci su normalizovani u odnosu na ovaj uzorak. Svaki ChIP eksperiment ponovljen je 3 puta (biološki replikati) dok su qPCR reakcije rađene kao duplikati. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SD, *P<0.05.

4.5. Analiza profila modifikacija histona 2B (H2B) na humanom genu *SOX3* tokom ranih faza neuralne diferencijacije NT2/D1 ćelija

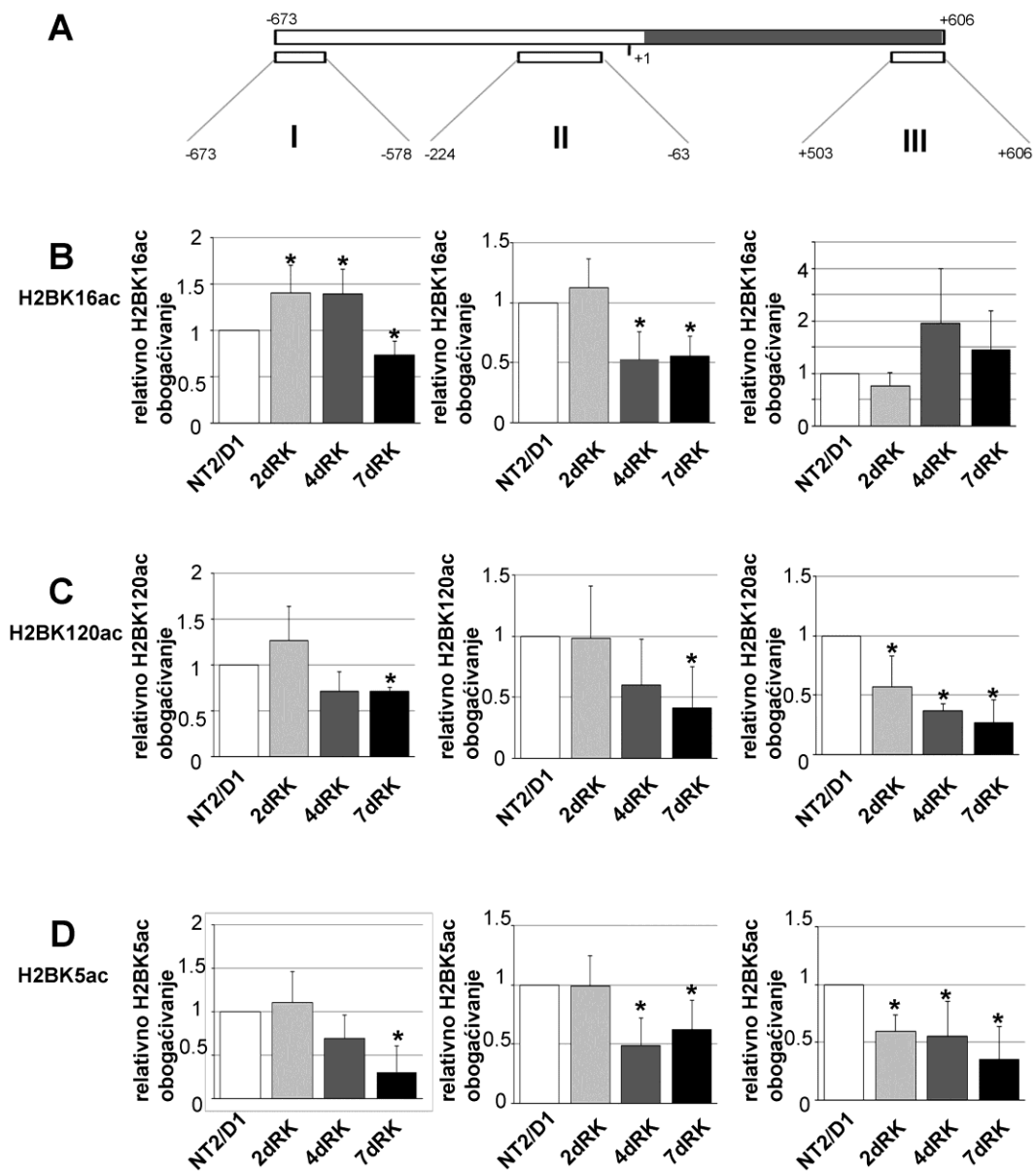
Ispitivanje histonskih markera na humanom genu *SOX3* nastavljeno je analizom odabranih H2B modifikacija primenom ChIP-qPCR-a na način opisan u odeljcima 3.2.15 i 3.2.16. Ispitani su nivoi acetilacije lizina 5, 16 i 120 na histonu H2B tokom inicijalnih faza neuralne diferencijacije NT2/D1 ćelija indukovanih retinoičnom kiselinom tokom 2, 4 i 7 dana. Vrednosti relativnog obogaćivanja (zastupljenosti) ciljne

sekvence DNK za svaku pojedinačnu histonsku PTM (H2BK5ac, H2BK16ac i H2BK120ac) normalizovane su u odnosu na vrednosti relativnog obogaćivanja ukupnog histona H2B za isti hromatinski uzorak. U cilju poređenja profila odabranih histonskih modifikacija tokom neuralne diferencijacije NT2/D1 ćelija, vrednostima relativnog obogaćivanja u neindukovanim ćelijama dodeljena je vrednost 1, dok su ostali uzorci normalizovani u odnosu na ovu vrednost.

Iz literature je poznato da acetilacija lizinskih ostataka neutrališe negativno naelektrisanje histona, što za posledicu ima lokalnu relaksaciju hromatina i olakšan pristup molekulu DNK, odnosno olakšanu aktivaciju transkripcije (Grunstein, 1997, Legube & Trouche, 2003). Promene distribucije H2BK16ac i H2BK120ac na regionu I (uzvodno od TSS-a) korelišu sa ekspresionim profilom *SOX3*, sa najvećim prisustvom pomenutih markera u danu 2 neuralne diferencijacije (**Slika 22 B-D**, paneli levo). Za sva 3 analizirana markera na ovom regionu detektovano je smanjenje 7. dana indukcije diferencijacije, u fazi sa minimumom ekspresije gena *SOX3* (**Slika 22 B-D**, paneli levo).

Sa druge strane, na regionu II (region minimalnog promotora gena *SOX3*) detektovano je statistički značajno smanjenje prisustva H2BK16ac, H2BK120ac i H2BK5ac modifikacija u danima 4 i 7 neuralne diferencijacije NT2/D1 ćelija (**Slika 22 B-D**, srednji paneli). Nasuprot očekivanjima, u danu 2 tretmana retinoičnom kiselinom kada nivo ekspresije gena *SOX3* dostiže svoj maksimum nije detektovan porast acetilacije histona H2B.

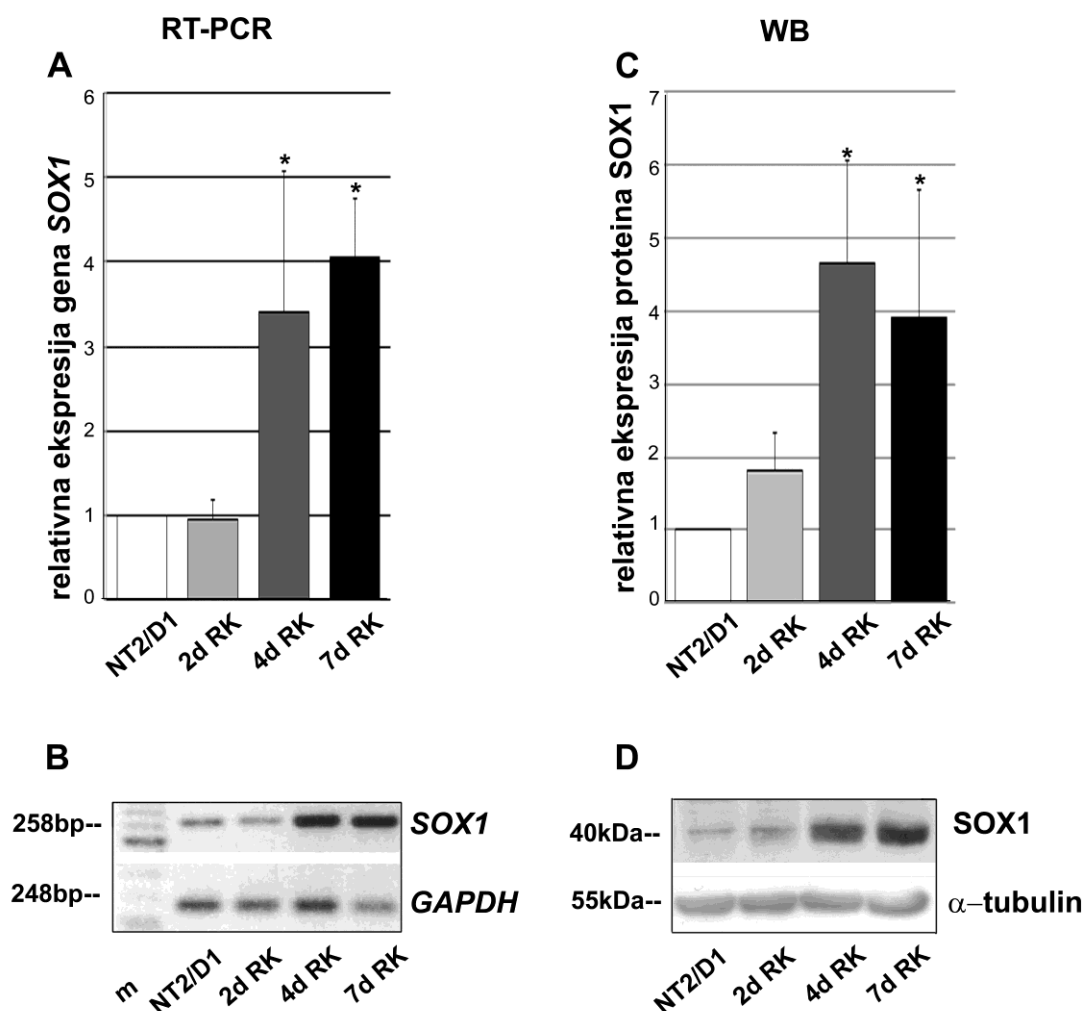
Distribucija H2B-acetil markera na regionu III (kodirajući region gena *SOX3*) ne odgovara ekspresionom profilu gena *SOX3*, slično rezultatima dobijenim za region II (region minimalnog promotora) (**Slika 22 B-D**, paneli desno). Modifikacije H2BK120ac i H2BK5ac najmanje su zastupljene u 7. danu indukcije retinoičnom kiselinom, dok za H2BK16ac nisu uočene statistički značajne promene. Imajući u vidu navedene rezultate, zaključeno je da je acetilacija H2B histona u regionu I (uzvodno od TSS-a) potencijalno spregnuta sa promenama u ekspresiji gena *SOX3* do kojih dolazi nakon indukcije neuralne diferencijacije NT2/D1 ćelija retinoičnom kiselinom.



Slika 22. Profili modifikacija histona 2B (H2B) na humanom genu *SOX3* tokom ranih faza neuralne diferencijacije NT2/D1 ćelija. (A) Shematski prikaz regiona od -673 do +606 humanog gena *SOX3* sa analiziranim regionima I, II i III. Pozicije analiziranih regiona naznačene su u odnosu na TSS. Kodirajući region označen je sivo. Rezultati ChIP-qPCR analiza za modifikacije H2BK16ac (B), H2BK120ac (C) i H2BK5ac (D) koji odgovaraju regionima označenim na panelu A. Obogaćivanje je izračunato relativno u odnosu na Flag i normalizovano na H2B. Obogaćivanju u nediferenciranim NT2/D1 ćelijama dodeljena je vrednost 1 i ostali uzorci su normalizovani u odnosu na ovaj uzorak. Svaki ChIP eksperiment ponovljen je 3 puta (biološki replikati) dok su qPCR reakcije rađene kao duplikati. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SD, * $P < 0.05$.

4.6. Analiza ekspresije humanog gena *SOX1* tokom ranih faza neuralne diferencijacije NT2/D1 ćelija

Brojne studije pokazale su da je *SOX1* jedan od markera neuralne diferencijacije čija se transkripcija aktivira indukcijom diferencijacije (Pevny *et al.*, 1998, Baharvand *et al.*, 2007, Abranches *et al.*, 2009). U ovoj studiji, ekspresioni profil gena *SOX1* tokom inicijalnih faza neuralne diferencijacije NT2/D1 ćelija ispitan je tehnikama RT-PCR-a i *Western blot*-a. U nediferenciranim NT2/D1 ćelijama detektovan je nizak nivo ekspresije *SOX1* iRNK (Slika 23 A, B) i *SOX1* proteina (Slika 23 C, D). U danu 4 indukcije retinoičnom kiselinom dolazi do statistički značajnog porasta ekspresije gena *SOX1* od oko 4 puta u odnosu na neindukovane NT2/D1 ćelije (Slika 23). Ekspresija se održava na visokom nivou i u danu 7 neuralne diferencijacije (Slika 23). Dobijeni rezultati potvrđuju da gen *SOX1* odgovara aktivacijom na inicijaciju diferencijacije NT2/D1 ćelija.

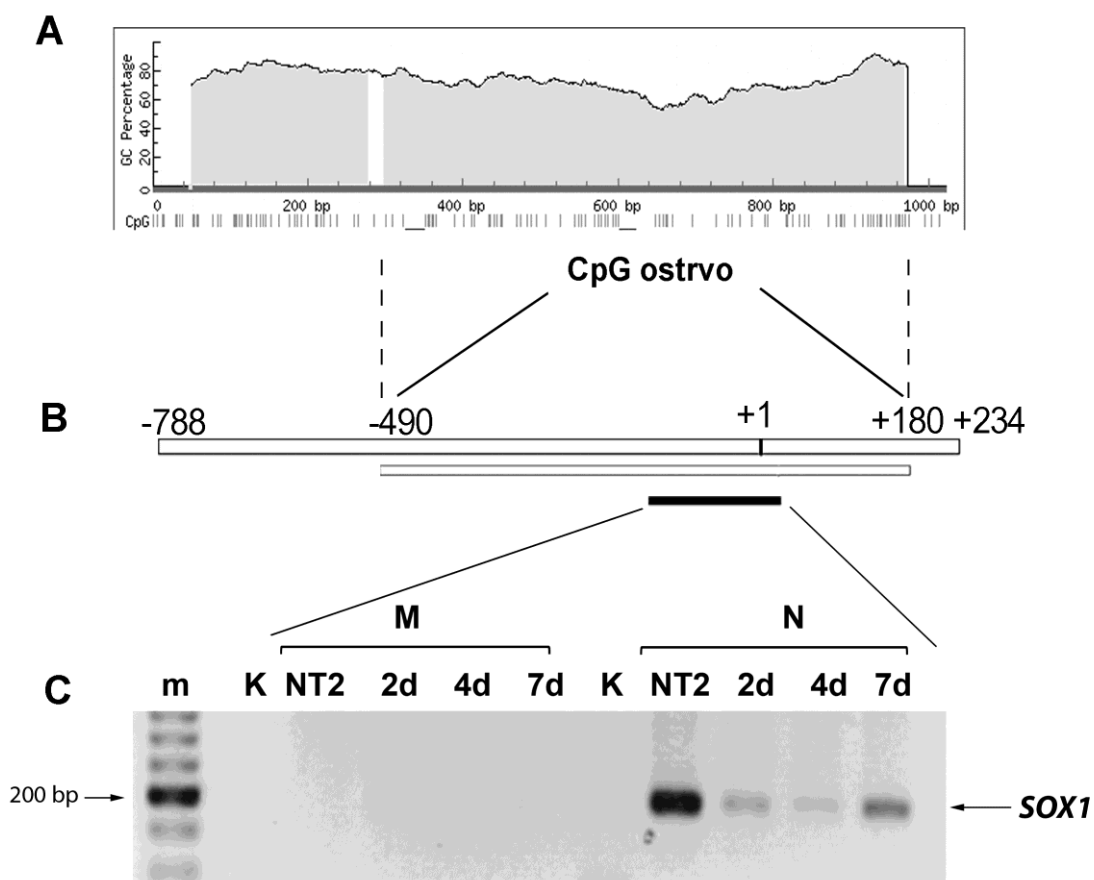


Slika 23. Analiza ekspresije humanog gena *SOX1* tokom ranih faza neuralne diferencijacije NT2/D1 ćelija. (A) RT-PCR analiza relativne ekspresije gena *SOX1* iRNK tokom ranih faza neuralne diferencijacije NT2/D1 ćelija indukovanih

retinoičnom kiselinom tokom 2, 4 i 7 dana. Relativni nivo ekspresije *SOX1* izražen je u odnosu na ekspresiju *GAPDH* i normalizovan u odnosu na nivo ekspresije u netretiranim NT2/D1 ćelijama. Na grafiku su prikazane srednje vrednosti \pm S.D. iz najmanje tri nezavisne neuralne diferencijacije NT2/D1 ćelija; * $P < 0.05$. **(B)** Reprezentativni primer RT-PCR analize ekspresije gena *SOX1* tokom ranih faza neuralne diferencijacije NT2/D1 ćelija indukovane retinoičnom kiselinom tokom 2, 4 i 7 dana. *GAPDH* je korišćen kao kontrola količine cDNK unete u svaku reakciju. **(C)** *Western blot* analiza relativne ekspresije proteina SOX1 tokom ranih faza neuralne diferencijacije NT2/D1 ćelija indukovanih retinoičnom kiselinom tokom 2, 4 i 7 dana. Relativni nivo proteina SOX1 izražen je u odnosu na α -tubulin i normalizovan u odnosu na nivo u netretiranim NT2/D1 ćelijama. Na grafiku su prikazane srednje vrednosti \pm S.D. iz najmanje tri nezavisne neuralne diferencijacije NT2/D1 ćelija; * $P < 0.05$. **(D)** Reprezentativni primer *Western blot* analize ekspresije SOX1 proteina tokom ranih faza neuralne diferencijacije NT2/D1 ćelija indukovanih retinoičnom kiselinom tokom 2, 4 i 7 dana. α -tubulin je korišćen kao kontrola količine proteina u svakoj reakciji.

4.7. Analiza metilacionog statusa promotora humanog gena *SOX1* tokom ranih faza neuralne diferencijacije NT2/D1 ćelija

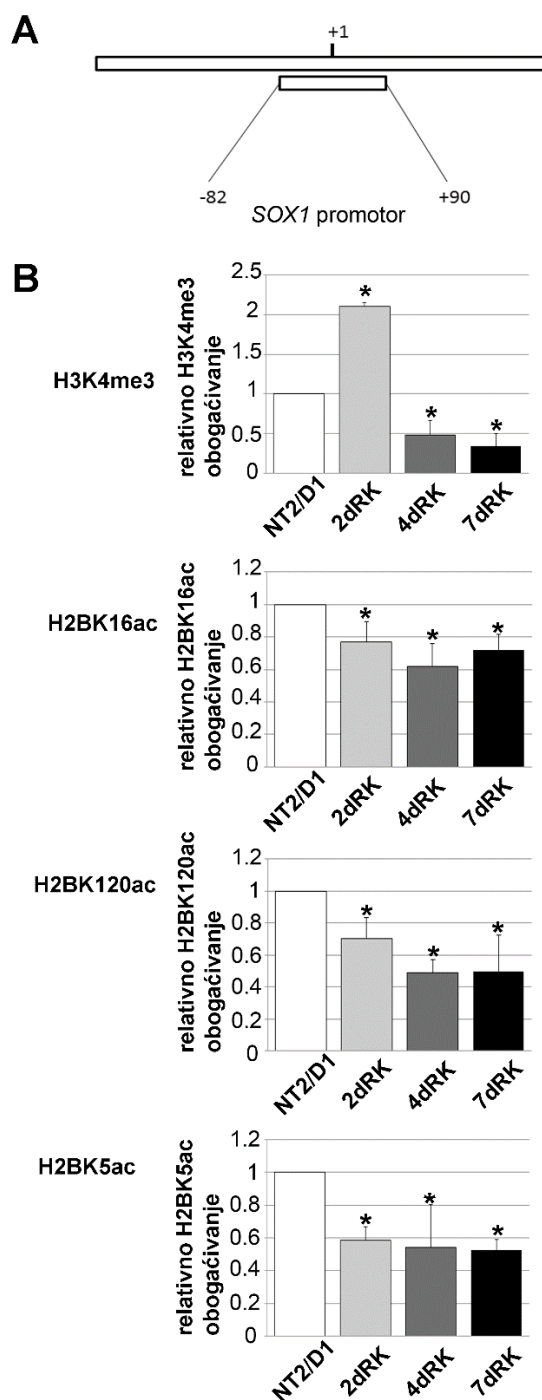
Analiza metilacionog statusa humanog gena *SOX1* ograničena je na studije u različitim tipovima maligniteta gde *SOX1* ima ulogu tumor supresora, uključujući hepatocelularni karcinom (Tsao *et al.*, 2012), kancer cerviksa (Lin *et al.*, 2013) i nazofaringealni karcinom (Tsao *et al.*, 2012, Lin *et al.*, 2013, Guan *et al.*, 2014), dok u tumorima glioblastoma ima ulogu onkogena (Marjanovic Vicentic *et al.*, 2019). Pretraga literature nije dala relevantne podatke za metilacione profile *SOX1* u procesu neuralne diferencijacije. Stoga se pristupilo MSP analizi metilacionog statusa promotora humanog gena *SOX1* u prethodno definisanim vremenskim intervalima neuralne diferencijacije NT2/D1 ćelija indukovane retinoičnom kiselinom. Metodologijom opisanom u odeljku 3.2.14. programom *MethPrimer* analizirana je DNK sekvenca -788 bp do +234 bp u odnosu na *SOX1* TSS (**Slika 24 A, B**). Detektovano je CpG ostrvo na poziciji -490 bp do +180 bp, koje obuhvata *SOX1* TSS (**Slika 24 A, B**). MPS analiza je pokazala da su, korišćenjem seta oligonukleotida koji umnožavaju nemetilovanu promotorsku sekvencu *SOX1*, detektovani produkti (na **Slici 24 C** označeni kao N), dok produkti amplifikacije oligonukleotidima koji umnožavaju metilovanu sekvencu nisu detektovani (na **Slici 24 C** označeni kao M). Izveden je zaključak da je promotor humanog gena *SOX1* nemetilovan u nediferenciranim NT2/D1 ćelijama i da se nizak nivo metilacije DNK održava i nakon indukcije neuralne diferencijacije.



Slika 24. Analiza metilacionog statusa promotorskog regiona humanog gena *SOX1*. (A) Lokalizacija CpG ostrva u okviru promotora humanog gena *SOX1* definisana *MethPrimer* programom. (B) Shematski prikaz analiziranog *SOX1* promotorskog regiona. Brojevi (-788/+234) predstavljaju pozicije nukleotida na krajevima analizirane sekvence u odnosu na *SOX1* TSS (+1). CpG ostrvo prikazano je kao beli pravougaonik. Brojevima su označene pozicije CpG ostrva (-490bp/+180). (C) MSP analiza metilacije CpG ostrva *SOX1* promotora u netretiranim NT2/D1 ćelijama i ćelijama tretiranim retinoičnom kiselinom u označenim vremenskim intervalima (2, 4 i 7 dana). PCR produkti koji odgovaraju metilovanoj (M) i nemetilovanoj (N) ciljnoj sekvenci razdvojeni su elektroforetski na agaroznom gelu. m – marker molekulske težine, K – vodena kontrola.

4.8. Analiza profila modifikacija histona 3 (H3) i histona 2B (H2B) na humanom genu *SOX1* tokom ranih faza neuralne diferencijacije NT2/D1 ćelija

Imajući u vidu da je promotor gena *SOX1* nemetilovan u svim ispitivanim vremenskim intervalima, dalja istraživanja usmerena su na analizu profila odabranih histonskih PTM na promotorskom regionu ovog gena tokom inicijacije neuralne diferencijacije NT2/D1 ćelija indukovanih retinoičnom kiselinom tokom 2, 4 i 7 dana metodologijom opisanom u odeljcima 3.2.15 i 3.2.16. Region za analizu odabran je vizualizacijom humanog gena *SOX1* korišćenjem UCSC Genome Browser-a (<http://genome.ucsc.edu/index.html>) (Consortium, 2012), a imajući u vidu parametre za dizajn oligonukleotida definisane programom *Primer3*. Ispitivanje zastupljenosti H3K4me3 modifikacije pokazalo je da u danu 2 indukovane neuralne diferencijacije dolazi do pojačane depozicije ovog markera na analiziranom promotoru (**Slika 25 B**). U narednim danima tretmana retinoičnom kiselinom dolazi do smanjenja nivoa markera H3K4me3, što sugeriše da promena u depoziciji ove histonske PTM na posmatranom regionu nije u korelaciji sa transkripcionom aktivacijom gena *SOX1*. Takođe, uočeno je da je proces neuralne diferencijacije praćen značajnim padom prisustva H2B-acetil markera (**Slika 25 B**). Dobijeni podaci ukazuju da acetilacija histona H2B u regionu promotora gena *SOX1* ne doprinosi njegovoj aktivaciji indukovanoj retinoičnom kiselinom.

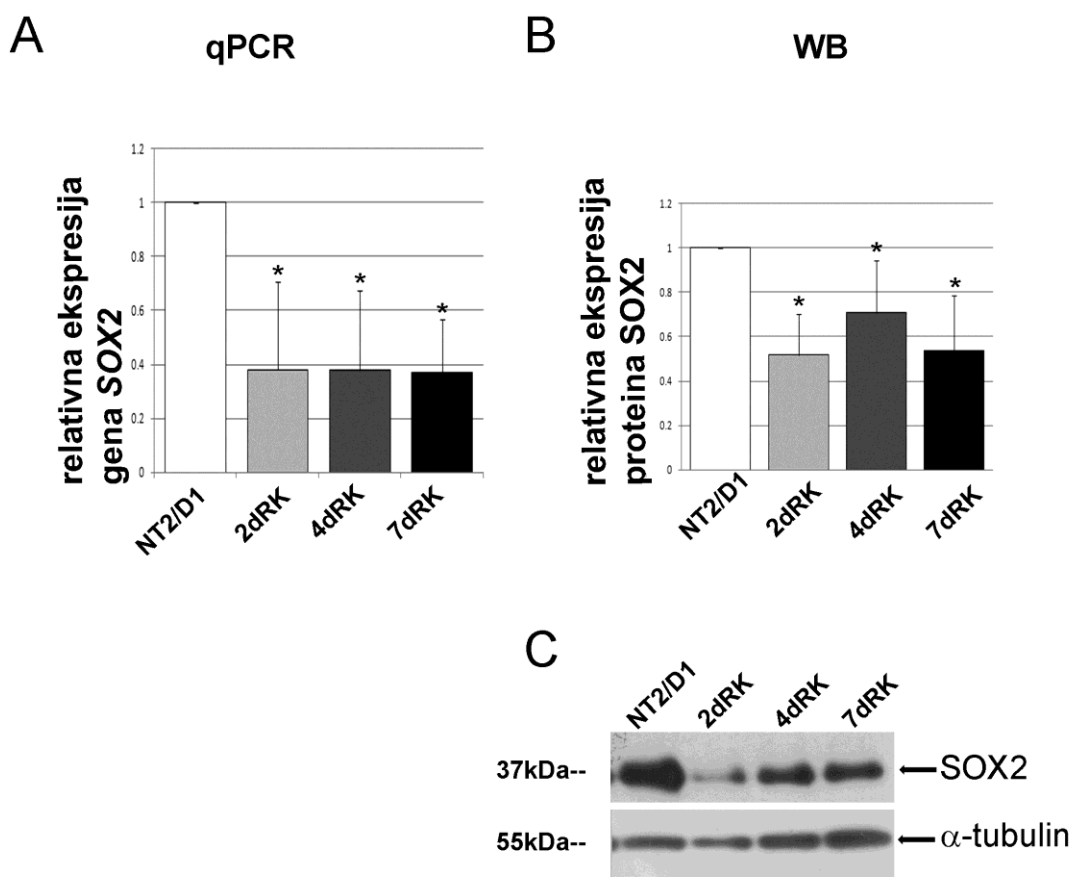


Slika 25. Profili modifikacija histona 3 (H3) H3 i 2B (H2B) na humanom genu *SOX1* tokom ranih faza neuralne diferencijacije NT2/D1 ćelija. (A) Shematski prikaz analiziranog regiona (-82 do +90, u odnosu na TSS) humanog gena *SOX1*. (B) Rezultati ChIP-qPCR analiza za modifikacije H3K4me3, H2BK16ac, H2BK120ac i H2BK5ac. Relativno obogaćivanje je izračunato u odnosu na Flag reakciju i normalizovano na H3/H2B. Obogaćivanju u nediferenciranim NT2/D1 ćelijama dodeljena je vrednost 1 i ostali uzorci su normalizovani u odnosu na ovaj uzorak. Svaki ChIP eksperiment ponovljen je 3 puta (biološki replikati) dok su qPCR reakcije radene kao duplikati. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SD, * $P < 0.05$.

4.9. Analiza ekspresije humanog gena *SOX2* tokom ranih faza neuralne diferencijacije NT2/D1 ćelija

Humani gen *SOX2* predstavlja jedan od ključnih faktora pluripotentnosti i samoobnavljanja (Graham *et al.*, 2003, Wegner, 2010, Rogers *et al.*, 2013). Pokazano je da je *Sox2* eksprimiran u neuroepitelijalnim prekursorskim ćelijama miša kako tokom razvića CNS-a, tako i u adultnom mozgu, gde reguliše identitet, preživljavanje i opredeljivanje progenitorskih ćelija (Collignon *et al.*, 1996, Rogers *et al.*, 2013).

U ovoj studiji, ekspresija gena *SOX2* ispitana je tokom ranih faza neuralne diferencijacije NT2/D1 ćelija indukovanih retinoičnom kiselinom. Detektovan je visok nivo ekspresije gena *SOX2* u nediferenciranim ćelijama (**Slika 26**), što ukazuje na pluripotentno stanje neindukovanih NT2/D1 ćelija. Dva dana nakon početka tretmana retinoičnom kiselinom dolazi do statistički značajnog smanjenja ekspresije gena *SOX2* koje se održava i u narednim danima tretmana (**Slika 26**) sa manjim fluktuacijama na proteinskom nivou (**Slika 26 B**). Ovi rezultati ukazuju na gubitak pluripotentnosti i aktivaciju neuralnog programa diferencijacije ovih ćelija (Stevanovic, 2003). Interesantno je i zapažanje da ni u poslednjem analiziranom danu indukcije retinoičnom kiselinom (7. dan) ne dolazi do potpunog gubitka ekspresije *SOX2* (**Slika 26**).



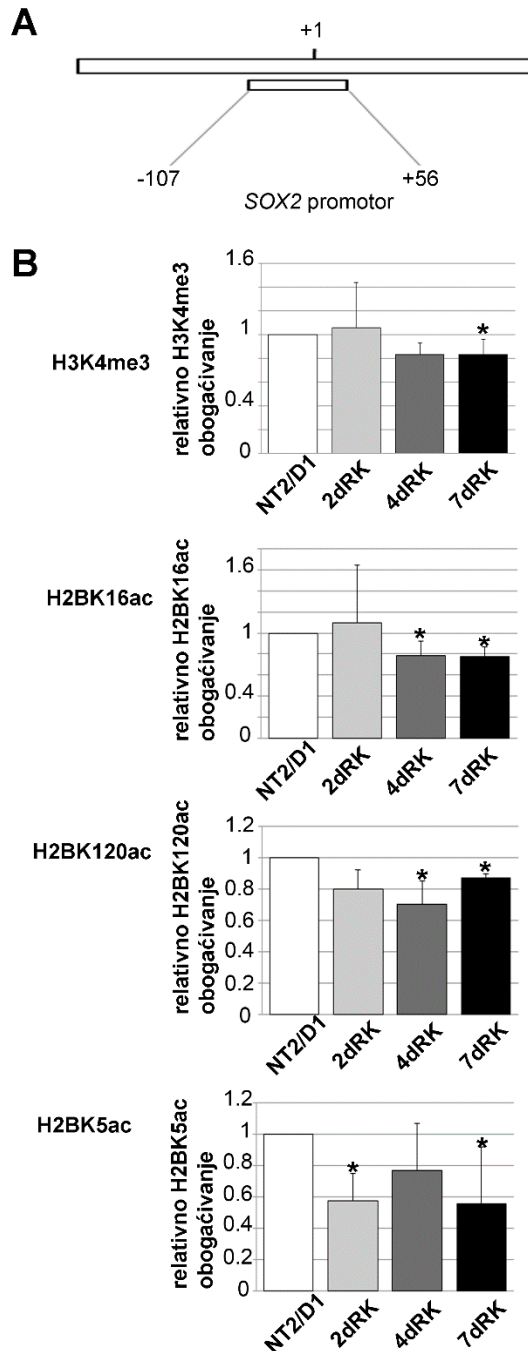
Slika 26. Analiza ekspresije humanog gena *SOX2* tokom ranih faza neuralne diferencijacije NT2/D1 ćelija. (A) qPCR analiza relativne ekspresije gena *SOX2* tokom ranih faza neuralne diferencijacije NT2/D1 ćelija indukovanih retinoičnom

kiselinom tokom 2, 4 i 7 dana. Relativni nivo ekspresije *SOX2* izražen je u odnosu na nivo ekspresije *GAPDH* i normalizovan u odnosu na nivo u netretiranim NT2/D1 ćelijama. Na grafiku su prikazane srednje vrednosti \pm S.D. iz najmanje tri nezavisne neuralne diferencijacije NT2/D1 ćelija; $*P < 0.05$. **(B)** *Western blot* analiza relativne ekspresije proteina *SOX2* tokom ranih faza neuralne diferencijacije NT2/D1 ćelija indukovanih retinoičnom kiselinom tokom 2, 4 i 7 dana. Relativni nivo proteina *SOX2* izražen je u odnosu na α -tubulin i normalizovan u odnosu na nivo u netretiranim NT2/D1 ćelijama. Na grafiku su prikazane srednje vrednosti \pm S.D. iz najmanje tri nezavisne neuralne diferencijacije NT2/D1 ćelija; $*P < 0.05$. **(C)** Reprezentativni primer *Western blot* analize ekspresije *SOX2* proteina tokom ranih faza neuralne diferencijacije NT2/D1 ćelija indukovanih retinoičnom kiselinom tokom 2, 4 i 7 dana. α -tubulin je korišćen kao kontrola količine proteina u svakoj reakciji.

4.10. Analiza profila modifikacija histona 3 (H3) i histona 2B (H2B) na humanom genu *SOX2* tokom ranih faza neuralne diferencijacije NT2/D1 ćelija

Imajući u vidu pad ekspresije gena *SOX2* koji prati inicijalnu fazu neuralne diferencijacije NT2/D1 ćelija indukovanih retinoičnom kiselinom, naredni korak u ovoj studiji predstavljalo je ispitivanje epigenetičkih mehanizama kojima je aktivnost pomenutog gena regulisana. Imajući u vidu literaturne podatke koji ukazuju da regulatorni regioni *SOX2* ostaju nemetilovani celim tokom neuralne diferencijacije embrionalnih karcinomskih ćelija (Sikorska *et al.*, 2008, Barrand & Collas, 2010), ispitane su odabrane histonske PTM na histonima H3 i H2B i utvrđeni njihovi profili na promotoru gena *SOX2* u već definisanim eksperimentalnim uslovima. Region za analizu odabran je vizualizacijom humanog gena *SOX2* korišćenjem UCSC Genome Browser-a (<http://genome.ucsc.edu/index.html>) (Consortium, 2012), a imajući u vidu parametre za dizajn oligonukleotida definisane programom *Primer3*.

Inicijacija neuralne diferencijacije praćena je blagim, statistički značajnim padom prisustva H3K4me3, H2BK16ac i H2BK120ac na promotorskom regionu gena *SOX2* (**Slika 27 B**). Najizraženije promene vidljive su na nivou H2BK5ac markera koji se pojačano uklanja sa *SOX2* promotora u danu 2 indukcije retinoičnom kiselinom (**Slika 27 B**). Ovaj trenutak koincidira sa najnižom ekspresijom *SOX2* (**Slika 26**), što ukazuje na moguću vezu između deacetilacije H2BK5 rezidue i odgovora gena na indukciju retinoičnom kiselinom. Takođe, izostanak promene depozicije H2BK5ac modifikacije na promotoru *SOX3* u danu 2 neuralne diferencijacije (**Slika 22**), implicira postojanje razlika u epigenetičkoj regulaciji ekspresije ova dva gena.

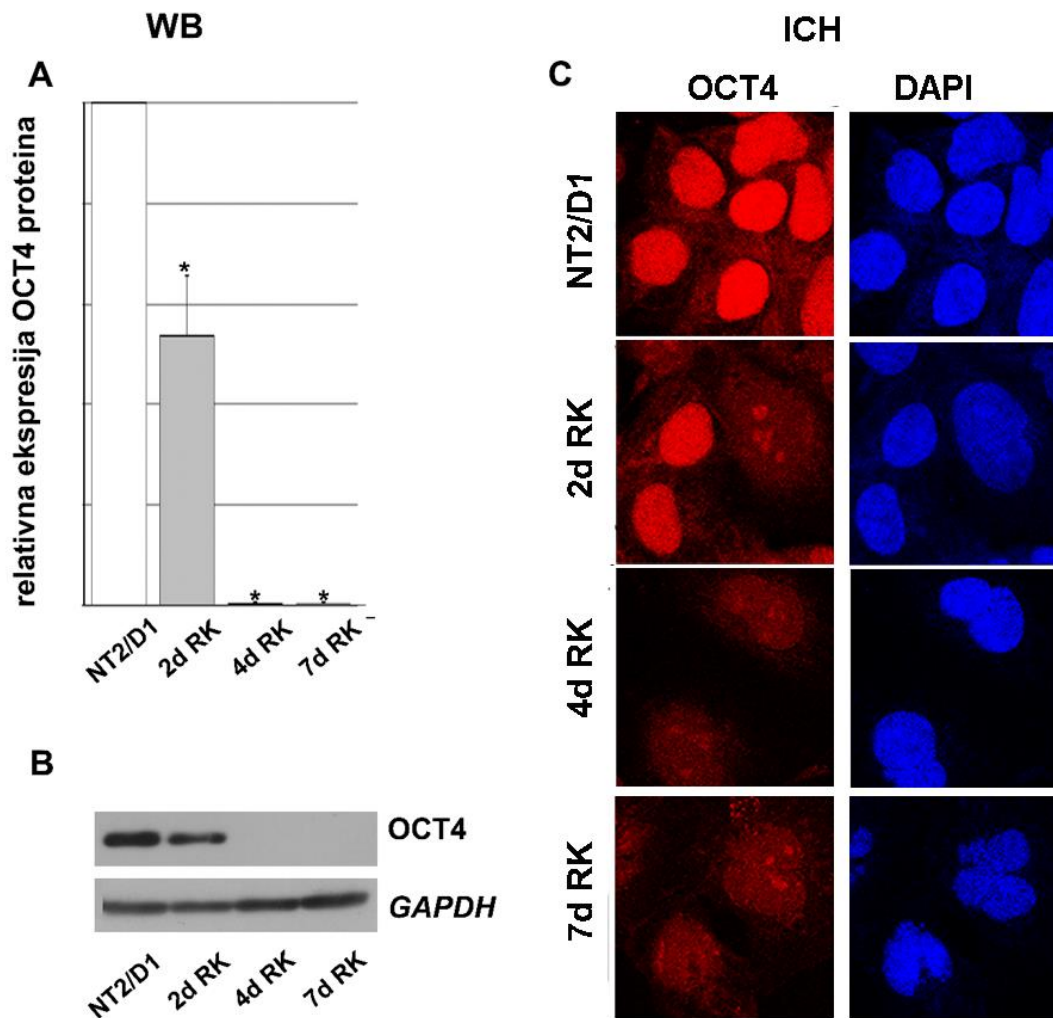


Slika 27. Profili modifikacija histona 3 (H3) i histona 2B (H2B) na humanom genu *SOX2* tokom ranih faza neuralne diferencijacije NT2/D1 ćelija. (A) Shematski prikaz humanog gena *SOX2* sa analiziranim regionom čija je pozicija naznačena u odnosu na TSS. (B) Rezultati ChIP-qPCR analiza za modifikacije H3K4me3, H2BK16ac, H2BK120ac i H2BK5ac. Relativno obogaćivanje je izračunato u odnosu na Flag reakciju i normalizovano na H3/H2B. Obogaćivanju u nediferenciranim NT2/D1 ćelijama dodeljena je vrednost 1 i ostali uzorci su normalizovani u odnosu na ovaj uzorak. Svaki ChIP eksperiment ponovljen je 3 puta (biološki replikati) dok su qPCR reakcije rađene kao duplikati. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SD, *P<0.05

4.11. Analiza ekspresije proteina OCT4 i NANOG tokom ranih faza neuralne diferencijacije NT2/D1 ćelija

Centralni „igrači“ u miljeu transkripcionih faktora koji kontrolišu procese samoobnavljanja i pluripotentnosti su *SOX2*, *OCT4* i *NANOG* (Boyer et al., 2005, Loh & Lim, 2011). Ova studija, kao i studije drugih autora (Houldsworth *et al.*, 2002, Stevanovic, 2003, Deb-Rinker *et al.*, 2005), pokazala je da su rane faze neuralne diferencijacije praćene dramatičnim promjenama u ekspresiji regulatora pluripotentnosti, kao i neuralnih markera. Imajući u vidu, sa jedne strane, značaj markera pluripotentnosti i sa druge strane ulogu *SOXB1* gena u pravilnoj aktivaciji pro-neuralnog programa, bilo je interesantno ispitati pomenute profile histonskih PTM i na genima *OCT4* i *NANOG*.

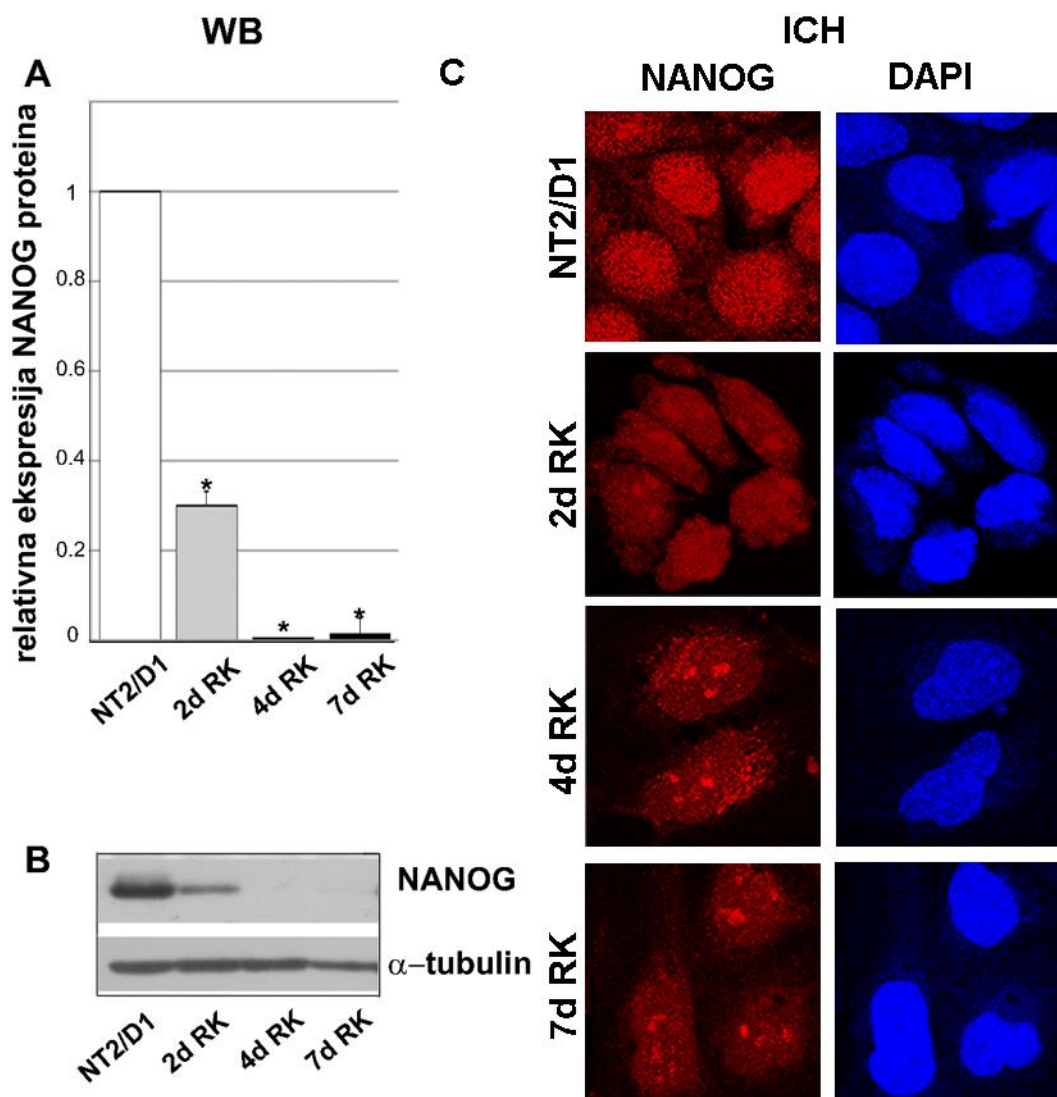
Kako je prikazano na **Slici 28**, u nediferenciranim NT2/D1 ćelijama detektovan je visok nivo proteina OCT4, u skladu sa pluripotentnim statusom ovih ćelija. U danu 2 tretmana retinoičnom kiselinom dolazi do značajnog pada ekspresije proteina OCT4 (**Slika 28 A, B**), što ukazuje na izlazak ćelija iz stanja pluripotentnosti i početak opredeljivanja ćelija. U narednim danima tretmana retinoičnom kiselinom (4dRK i 7dRK) nije detektovana ekspresija OCT4 (**Slika 28 A, B**). Imunocitohemijskom analizom u jedrima nediferenciranih NT2/D1 ćelija detektovana je ekspresija proteina OCT4 visokog intenziteta (**Slika 28 C**). Nakon 2 dana indukcije retinoičnom kiselinom intenzitet signala opada (**Slika 28 C**) da bi u narednim danima diferencijacije (4dRK i 7dRK) došlo do daljeg utišavanja ekspresije proteina OCT4 (**Slika 28 C**).



Slika 28. Analiza ekspresije proteina OCT4 tokom ranih faza neuralne diferencijacije NT2/D1 ćelija. (A) Relativna ekspresija proteina OCT4 tokom ranih faza neuralne diferencijacije NT2/D1 ćelija indukovane retinoičnom kiselinom tokom 2, 4 i 7 dana. Relativni nivo proteina OCT4 izražen je u odnosu na GAPDH i normalizovan u odnosu na nivo u netretiranim NT2/D1 ćelijama. Na grafiku su prikazane srednje vrednosti \pm S.D. iz najmanje tri neuralne diferencijacije; $*P < 0.05$. (B) Reprezentativni primer *Western blot* analize ekspresije proteina OCT4. GAPDH je korišćen kao kontrola količine proteina unetih u svaku reakciju. (C) Imunocitohemijska analiza ekspresije proteina OCT4 u nediferenciranim NT2/D1 ćelijama i NT2/D1 ćelijama tretiranim retinoičnom kiselinom tokom 2, 4 i 7 dana. Ćelijska jedra su vizualizovana DAPI bojenjem. Skala: 50 μ m.

Profil ekspresije proteina NANOG u *Western blot* analizi sličan je profilu ekspresije proteina OCT4, sa visokim nivoom u nediferenciranim NT2/D1 ćelijama, padom nakon 2 dana tretmana retinoičnom kiselinom, dok u 4. i 7. danu tretmana retinoičnom kiselinom ekspresija proteina NANOG nije detektovana (Slika 29 A, B). Imunocitohemijska analiza pokazuje visoku ekspresiju proteina NANOG u jedrima nediferenciranih NT2/D1 ćelija (Slika 29 C), što je u skladu sa rezultatima prethodnih

studija u pluripotentim matičnim ćelijama (Kalmar *et al.*, 2009, Torres-Padilla & Chambers, 2014). Sa početkom neuralne indukcije ekspresija NANOG proteina opada, ali se nakon 7 dana tretmana i dalje uočavaju ćelije koje ekspimiraju ovaj protein (Slika 29 C).

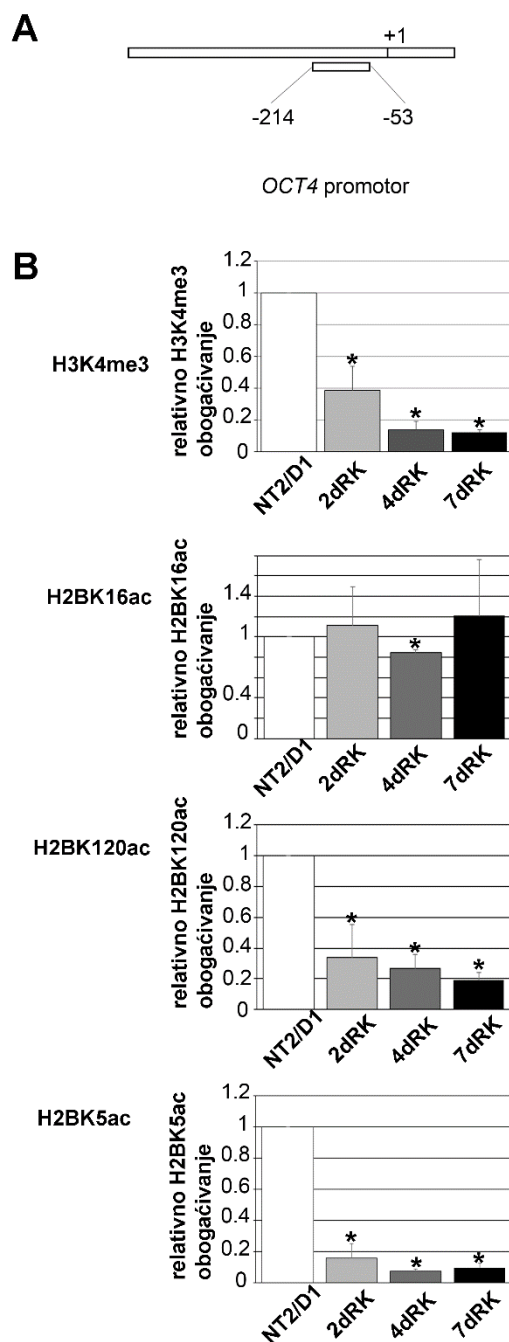


Slika 29. Analiza ekspresije proteina NANOG tokom ranih faza neuralne diferencijacije NT2/D1 ćelija. (A) Relativna ekspresija proteina NANOG tokom ranih faza neuralne diferencijacije NT2/D1 ćelija indukovane retinoičnom kiselinom tokom 2, 4 i 7 dana. Relativni nivo proteina NANOG izražen je u odnosu na α -tubulin i normalizovan u odnosu na nivo u netretiranim NT2/D1 ćelijama. Na grafiku su prikazane srednje vrednosti \pm S.D. iz najmanje tri neuralne diferencijacije; * $P < 0.05$. (B) Reprezentativni primer *Western blot* analize ekspresije proteina NANOG. α -tubulin je korišćen kao kontrola količine proteina unetih u svaku reakciju. (C) Imunocitohemijska analiza ekspresije proteina NANOG u nediferenciranim NT2/D1 ćelijama i NT2/D1 ćelijama tretiranim retinoičnom kiselinom tokom 2, 4 i 7 dana. Ćelijska jedra su vizualizovana DAPI bojenjem. Skala: 50 μ m.

Detektovani ekspresioni profili gena *OCT4* i *NANOG* ukazuju na postojanje mehanizama regulacije njihove ekspresije čije se delovanje ispoljava u prvim danima neuralne diferencijacije NT2/D1 ćelija indukovanih retinoičnom kiselinom. Literaturni podaci pokazuju da su u NT2/D1 ćelijama 5'-regulatorne sekvence gena *OCT4* i *NANOG* nemetilovane u nediferenciranim NT2/D1 ćelijama, da bi od dana 4 neuralne diferencijacije došlo do postepenog porasta stepena metilacije DNK (Deb-Rinker *et al.*, 2005). Stoga u ovoj studiji metilacija promotorskih regiona pomenutih gena nije analizirana, već su ispitani profili odabranih histonskih modifikacija na ovim regionima tokom ranih faza neuralne diferencijacije NT2/D1 ćelija.

4.12. Analiza profila modifikacija histona 3 (H3) i histona 2B (H2B) na humanom genu *OCT4* tokom ranih faza neuralne diferencijacije NT2/D1 ćelija

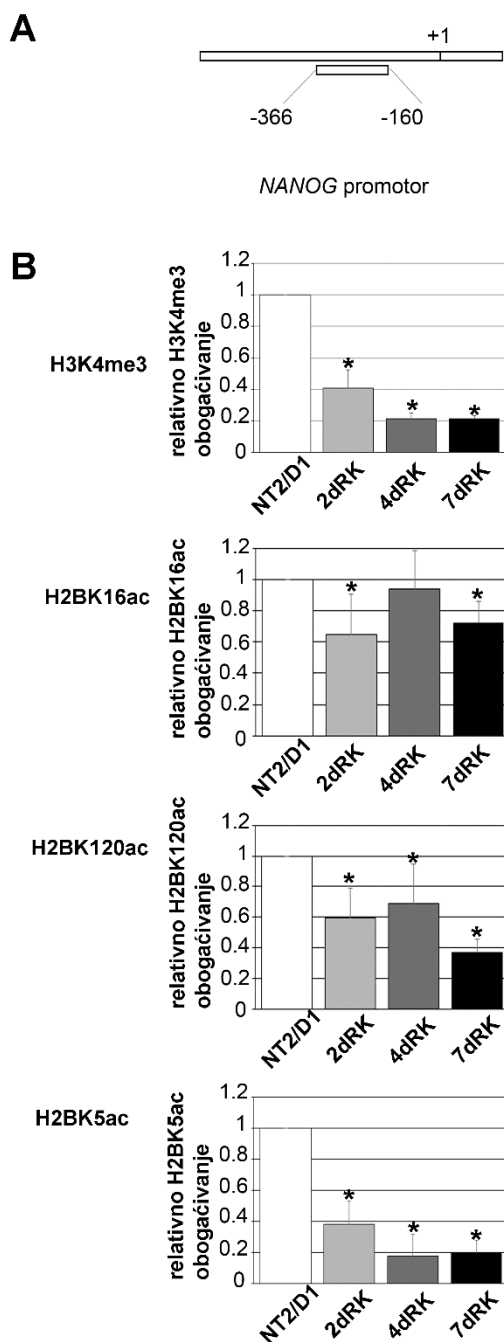
U daljem toku studije pristupilo se analizi odabranih H3 i H2B PTM na promotorskom regionu humanog gena *OCT4* metodom opisanom u prethodnim odeljcima. Region za analizu odabran je vizualizacijom humanog gena *OCT4* korišćenjem UCSC Genome Browser-a (<http://genome.ucsc.edu/index.html>) (Consortium, 2012), a imajući u vidu parametre za dizajn oligonukleotida definisane programom *Primer3*. U nediferenciranim NT2/D1 ćelijama detektovan je visok nivo H3K4me3 (**Slika 30 B**), markera asociranog sa aktivno transkribujućim genima (Mikkelsen *et al.*, 2007). Do statistički značajnog pada prisustva ovog markera došlo je u danu 2 indukcije retinoičnom kiselinom, da bi se ovaj trend nastavio i u narednim danima diferencijacije, paralelno sa padom ekspresije *OCT4* (**Slika 30 B**). Analiza profila H2BK5ac i H2BK120ac modifikacija pokazala je da se ovi markeri uklanjaju sa promotora gena *OCT4* po indukciji neuralne diferencijacije, sa najnižim nivoima u 4. i 7. danu tretmana (**Slika 30 B**), ukazujući na potencijalno značajnu ulogu acetilacije H2BK5 i H2BK120 rezidua u regulaciji ekspresije gena *OCT4*. Detektovane promene u kinetici H2BK16ac markera (**Slika 30 B**) nisu se pokazale relevantnim u odnosu na ekspresioni profil *OCT4*, čime je zaključeno da ova modifikacija nema značajnu ulogu u ranom odgovoru gena *OCT4* na indukciju neuralne diferencijacije.



Slika 30. Profili modifikacija histona 3 (H3) i histona 2B (H2B) na promotorskom regionu humanog gena *OCT4* tokom ranih faza neuralne diferencijacije NT2/D1 ćelija. (A) Shematski prikaz regiona od -214 do -53 humanog gena *OCT4* (pozicija naznačena u odnosu na TSS). (B) Rezultati ChIP-qPCR analiza za modifikacije H3K4me3, H2BK16ac, H2BK120ac i H2BK5ac. Relativno obogaćivanje je izračunato u odnosu na Flag i normalizovano na H3/H2B. Obogaćivanju u nediferenciranim NT2/D1 ćelijama dodeljena je vrednost 1 i ostali uzorci su normalizovani u odnosu na ovaj uzorak. Svaki ChIP eksperiment ponovljen je 3 puta (biološki replikati) dok su qPCR reakcije rađene kao duplikati. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SD, * $P < 0.05$.

4.13. Analiza profila modifikacija histona 3 (H3) i histona 2B (H2B) na humanom genu *NANOG* tokom ranih faza neuralne diferencijacije NT2/D1 ćelija

Analiza histonskih PTM na promotoru humanog gena *NANOG* u ranim fazama neuralne diferencijacije NT2/D1 ćelija urađena je na način prethodno opisan za ostale analizirane gene. Region za analizu odabran je vizualizacijom humanog gena *NANOG* korišćenjem UCSC Genome Browser-a (<http://genome.ucsc.edu/index.html>) (Consortium, 2012), a imajući u vidu parametre za dizajn oligonukleotida definisane programom *Primer3*. Detektovana kinetika H3K4me3 markera slična je prethodno utvrđenom profilu na promotoru gena *OCT4*, sa značajnim padom u depoziciji ove modifikacije na početku i tokom tretmana retinoičnom kiselinom (**Slika 31 B**). Ovaj pad dešava se paralelno sa padom u ekspresiji proteina *NANOG* i odslikava važnu ulogu metilacije H3K4 ostataka u transkripcionoj aktivnosti ovog gena. Slično, pokazano je da tokom inicijacije neuralne diferencijacije dolazi do snižavanja nivoa H2K5ac modifikacije na promotoru gena *NANOG*, dok za H2BK120ac detektovani pad nije toliko izražen kao u slučaju *OCT4* (**Slika 31 B**). Interesantno je i zapažanje da acetilacija H2BK16 ostataka na promotoru gena *NANOG* prati pad u ekspresiji ovog gena indukovanog neuralnom diferencijacijom, za razliku od profila ovog markera na promotoru *OCT4*. Zaključeno je da pored izrazitih sličnosti u histonskim „pejzažima“ ova dva gena, za pojedinačne histonske markere prisutne su razlike u izmenama tokom opredeljivanja ćelija ka neuralnim progenitorima.



Slika 31. Profili modifikacija histona 3 (H3) i histona 2B (H2B) na promotorskom regionu humanog gena *NANOG* tokom ranih faza neuralne diferencijacije NT2/D1 ćelija. (A) Shematski prikaz regiona od -366 do -160 humanog gena *NANOG* (pozicija naznačena u odnosu na TSS). (B) Rezultati ChIP-qPCR analiza za modifikacije H3K4me3, H2BK16ac, H2BK120ac i H2BK5ac. Relativno obogaćivanje je izračunato u odnosu na Flag reakciju i normalizovano na H3/H2B. Obogaćivanju u nediferenciranim NT2/D1 ćelijama dodeljena je vrednost 1 i ostali uzorci su normalizovani u odnosu na ovaj uzorak. Svaki ChIP eksperiment ponovljen je 3 puta (biološki replikati) dok su qPCR reakcije rađene kao duplikati. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SD, * $P < 0.05$.

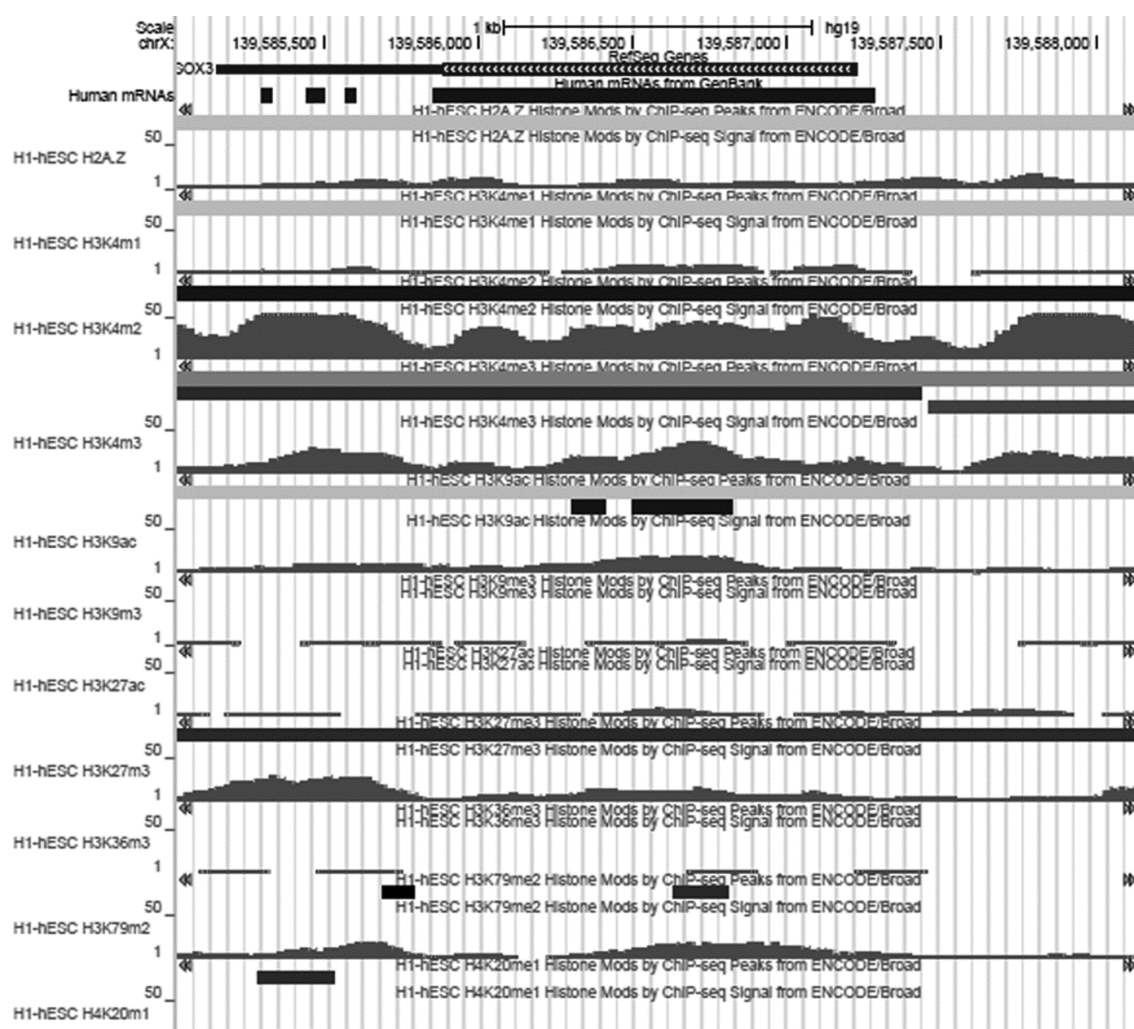
4.14. *In silico* analiza odabranih histonskih modifikacija na humanim genima *SOX1* i *SOX3* i genima faktorima pluripotencije (*SOX2*, *OCT4*, *NANOG*) u H1 liniji humanih embrionalnih matičnih ćelija

Imajući u vidu da je kompleksnost histonskog koda uslovljena tipom ćelija i sredinskim faktorima, od velikog je značaja ispitati histonske obrasce na genima *SOX1* i *SOX3* i genima faktorima pluripotencije (*SOX2*, *OCT4*, *NANOG*) i u drugom ćelijskom tipu. Stoga se pristupilo bioinformatičkoj analizi i pretrazi dostupnih podataka deponovanih u ENCODE (Encyclopedia of DNA Elements) bazi (www.encodeproject.org). ENCODE predstavlja međunarodni projekat nastao sa ciljem katalogizacije svih funkcionalnih elemenata genoma, čija je pretraga omogućena integrativnim pretraživačima. U cilju vizualizacije podataka relevantnih za ovu studiju, korišćen je UCSC Genome Browser (<http://genome.ucsc.edu/index.html>) na verziji humanog genoma GRCh37/hg19 (Consortium, 2012). Pretraženi su setovi rezultata dobijenih iz ChIP-Seq studija ENCODE/Broad Instituta (ENC Histone), pri čemu su kao kriterijumi pretrage unete odabrane histonske PTM na genima *SOX1*, *SOX2*, *SOX3*, *OCT4* i *NANOG* (Consortium, 2012). Imajući u vidu da NT2/D1 ćelije dele brojne morfološke i imunofenotipske karakteristike sa linijama humanih embrionalnih matičnih ćelija (Andrews, 1984), za *in silico* analizu je korišćena H1 linija humanih embrionalnih matičnih ćelija (Thomson *et al.*, 1998). Setovi podataka dobijeni pretragom UCSC Genome Browser-a za gene *SOX1*, *SOX2*, *OCT4* i *NANOG* prikazani su na **Slikama p1, p2, p3 i p4** u odeljku Prilozi. Primer ove analize za gen *SOX3* prikazan je na **Slici 32**. Rezultati analize sumirani su u **Tabeli 7**.

	<i>SOX1</i>	<i>SOX3</i>	<i>SOX2</i>	<i>OCT4</i>	<i>NANOG</i>
H2A.Z	+	-	-	+	+
H3K4me1	+	-	-	+	+
H3K4me2	++	++	++	++	++
H3K4me3	+	++	++	++	++
H3K9ac	-	+	++	++	+
H3K9me3	-	-	-	-	-
H3K27ac	-	-	++	++	-
H3K27me3	++	+	-	-	-
H3K36me3	-	+	-	+	+
H3K79me2	-	++	+	++	++
H4K20me1	-	-	-	+	-

Tabela 7. Histonske modifikacije u regionima koji okružuju gene *SOX1*, *SOX2*, *SOX3*, *OCT4* i *NANOG* u H1 liniji humanih embrionalnih matičnih ćelija. Setovi podataka dobijeni su pretragom UCSC Genome Browser-a. Od vrha ka dnu prikazani su: H2A.Z; markeri asocirani sa pojačivačima i promotorima – H3K4me1, H3K4me2 i H3K4me3; aktivirajući markeri H3K9ac, H3K9me3 i H3K27ac; reprimirajući marker H3K27me3; markeri kodirajućih regiona H3K36me3, H3K79me2 i H4K20me1. ++ modifikacija je visoko zastupljena; + modifikacija je prisutna; - modifikacija je odsutna na analiziranom regionu. Crvenom bojom označeno je prisustvo reprimirajuće histonske PTM, zelenom bojom prisustvo aktivirajuće histonske PTM, a sivom odsutnu modifikaciju.

Detektovani su ChIP-Seq signali za H3K4me2 i H3K4me3 na promotorima i kodirajućim regionima gena *SOX1* (Slika p1) i *SOX3* (Slika 32). Markeri tipični za aktivne promotore (H3K9ac i H3K27ac) i kodirajuće regione (H3K36me3 i H4K20me1) su odsutni sa promotorskih, odnosno kodirajućih delova gena *SOX1* (Slika p1, Odeljak 8. Prilozi) i *SOX3* (Slika 32), dok je H3K79me2 slabo zastupljen u kodirajućim regionima ovih gena (Slike p1, Odeljak 8. Prilozi i 32). Histonska varijanta H2A.Z, prisutna u nukleozomima pozicioniranim oko TSS, i u korelaciji sa transkripciono aktivnim genima (Bargaje *et al.*, 2012), takođe je slabo zastupljena na promotorima gena *SOX1* (Slika p1, Odeljak 8. Prilozi) i *SOX3* (Slika 32). Signali za reprimirajuću modifikaciju H3K27me3 prisutni su na promotorima gena *SOX1* (Slika p1, Odeljak 8. Prilozi) i *SOX3* (Slika 32). Detektovani histonski obrazac tipičan je za gene sa slabom transkripcionom aktivnošću i sa permisivnim promotorima, koji su spremni za brzu aktivaciju po dejstvu indukcionog signala, čemu u prilog ide i nizak nivo ekspresije *SOX1* i *SOX3* u humanim embrionalnim matičnim ćelijama (Wang *et al.*, 2012).



Slika 32. Histonske modifikacije u regionu koji okružuje gen *SOX3* u H1 liniji humanih embrionalnih matičnih ćelija (označene kao H1-hESC). Setovi podataka dobijeni su pretragom UCSC Genome Browser-a. Od vrha ka dnu

prikazani su: H2A.Z; markeri asocirani sa pojačivačima i promotorima – H3K4me1, H3K4me2 i H3K4me3; aktivirajući markeri H3K9ac, H3K9me3 i H3K27ac; reprimirajući marker H3K27me3; markeri kodirajućih regiona H3K36me3, H3K79me2 i H4K20me1. Strelice u prvoj traci označavaju smer transkripcije.

Kako je prikazano na **Slikama p2, p3 i p4** (Odeljak 8. Prilozi), u promotorskim i kodirajućim regionima gena faktora pluripotentnosti (*SOX2*, *OCT4* i *NANOG*) detektovani su signali za aktivirajuće histonske markere H3K4me3, H3K9ac, H3K27ac i H3K79me2, kao i odsustvo reprimirajućih modifikacija H3K9me3 i H3K27me3 (**Tabela 7**). Ovakav histonski „pejzaž“ tipičan je za veoma aktivne gene i u skladu je sa visokom ekspresijom gena *SOX2*, *OCT4* i *NANOG* u pluripotentnim tipovima ćelija.

5. DISKUSIJA

5.1. Dinamika ekspresije gena *SOX1* i *SOX3* i gena faktora pluripotentnosti (*SOX2*, *OCT4*, *NANOG*) u ranim fazama neuralne diferencijacije NT2/D1 ćelija indukovane retinoičnom kiselinom

Članovi *SOXB1* genske familije (*SOX1*, *SOX2* i *SOX3*) predstavljaju faktore sa ključnim ulogama u procesu neurogeneze kičmenjaka (Rex *et al.*, 1997, Bergsland *et al.*, 2011, Reiprich & Wegner, 2015). Ekspimirani su u neuralnim progenitorima gde suprimiraju aktivnost proneuralnih proteina i održavaju progenitore u nediferenciranom stanju (Bylund *et al.*, 2003, Graham *et al.*, 2003, Pevny & Placzek, 2005, Reiprich & Wegner, 2015). Održavanje proliferacije i stanja pluripotentnosti, kojima je definisan identitet matičnih ćelija, zavisi od kompleksne mreže regulatornih faktora, čije su ključne komponente geni *OCT4*, *SOX2* i *NANOG*, koji formiraju jezgro ove mreže (Boyer *et al.*, 2005, Loh *et al.*, 2006). Precizno kontrolisane interakcije između pomenutih faktora, njihovih ciljnih gena i proteinskih partnera omogućavaju pravilno opredeljivanje ćelija i progresiju razvojnih procesa, što se ostvaruje kroz izmene u globalnoj genskoj regulaciji (pregled u (Boyer *et al.*, 2005)). Imajući u vidu da geni *OCT4*, *NANOG* i *SOX2* formiraju funkcionalni “trijumvirat” transkripcionih faktora regulatora pluripotentnosti, kao i da se ovoj mreži pridružuju geni *SOX1* i *SOX3*, u ovoj tezi je ispitana dinamika ekspresije pomenutih gena u inicijalnim fazama neuralne diferencijacije NT2/D1 ćelija indukovanih retinoičnom kiselinom.

Literaturni podaci ukazuju da je aktivnost gena *SOXB1* neophodna na početnim stadijumima humane neurogeneze, a geni *SOX3* i *SOX1* su prepoznati kao najraniji neuralni markeri kičmenjaka (Pevny *et al.*, 1998, Brunelli *et al.*, 2003, Stevanovic, 2003, Baharvand *et al.*, 2007, Abranches *et al.*, 2009). Tokom embriogeneze miša i pacova ekspresija proteina SOX1 detektuje se u trenutku neuralne indukcije i ograničena je na ćelije ektoderma opredeljene ka neuralnim ćelijskim tipovima, a zatim biva utišana u neuralnim ćelijama koje su terminalno diferencirane (Pevny *et al.*, 1998). U *in vitro* eksperimentima indukcija ekspresije proteina SOX1 detektovana je 24h nakon inicijacije neuralne diferencijacije P19 embrionalnih karcinomskih ćelija miša (McBurney & Rogers, 1982) dok ovaj protein nije detektovan u diferenciranim neuronima (Pevny *et al.*, 1998). *In vivo* studije u embrionima pileta i miša ukazuju na dominantnu ekspresiju proteina SOX2 i SOX3 u nediferenciranim ćelijama neuralnog epitela CNS-a (Uwanogho *et al.*, 1995, Collignon *et al.*, 1996, Pevny & Lovell-Badge, 1997). Rane faze neuralne indukcije karakterišu se visokim nivoom proteina SOX2 i porastom ekspresije SOX3, dok su smanjenje proliferativnog kapaciteta i inicijacija diferencijacije ove populacije ćelija praćeni utišavanjem ekspresije ovih proteina (Uwanogho *et al.*, 1995, Collignon *et al.*, 1996, Pevny & Lovell-Badge, 1997). *Northern blot* analiza ekspresije gena *SOX2* u NT2/D1 ćelijama tokom ranih faza neuralne diferencijacije je pokazala visok nivo *SOX2* iRNK u nediferenciranim ćelijama (Stevanovic, 2003). Dva dana po dodavanju retinoične kiseline u medijum za gajenje ćelija dolazi do pada ekspresije *SOX2* i ovaj, nizak nivo, se zatim održava nakon 7 i 14 dana tretmana retinoičnom kiselinom (Stevanovic, 2003). Istovremeno, u danu 2 neuralne diferencijacije uočen je tranzijentni porast *SOX3* iRNK (Stevanovic, 2003).

Eksperimentalni podaci dobijeni u ovoj tezi u skladu su sa prethodno pomenutim studijama i jasno pokazuju da indukcija retinoičnom kiselinom uzrokuje dinamične promene u nivou proteina SOX1 (**Slika 23**) i SOX3 (**Slika 16**), kao i promene u ekspresiji faktora pluripotentnosti SOX2 (**Slika 26**), OCT4 (**Slika 28**) i NANOG (**Slika 29**) već 48h nakon indukcije NT2/D1 ćelija retinoičnom kiselinom. Ekspresija gena *SOX1* (**Slika 23**) i *SOX3* (**Slika 16**) je u nediferenciranim NT2/D1 ćelijama na niskom nivou, dok je na ovom stadijumu detektovan visok nivo ekspresije gena *SOX2* (**Slika 26**). Porast nivoa ekspresije gena *SOX3* (**Slika 16**) i *SOX1* (**Slika 23**), kao i pad ekspresije gena *SOX2* (**Slika 26**) do kojih dolazi nakon indukcije retinoičnom kiselinom jasno dokazuju da su najranije faze tretmana retinoičnom kiselinom od kritičnog značaja za transkripcionu aktivnost *SOXB1* gena. Takođe, u pluripotentnim, nediferenciranim NT2/D1 ćelijama detektovan je visok nivo proteina OCT4 i NANOG (**Slike 28 i 29**), što je očekivano, imajući u vidu sličnost NT2/D1 sa humanim embrionalnim matičnim ćelijama (Chambers *et al.*, 2003, Deb-Rinker *et al.*, 2005, Kalmar *et al.*, 2009, Torres-Padilla & Chambers, 2014). U skladu sa prethodnim studijama, jasno je pokazano da indukcija neuralne diferencijacije retinoičnom kiselinom predstavlja „okidač“ za smanjenje ekspresije OCT4 i NANOG proteina (**Slike 28 i 29**) (Houldsworth *et al.*, 2002, Deb-Rinker *et al.*, 2005, Shahhoseini *et al.*, 2010). Promene ekspresije gena *OCT4* i *NANOG* uočavaju se već u danu 2 tretmana retinoičnom kiselinom, odnosno u vremenskim okvirima u kojima su detektovane izražene promene i u ekspresiji *SOXB1* gena (**Slike 16, 23, 26, 28 i 29**). Ovako kompleksni molekularni događaji koji se odigravaju u prvim danima nakon delovanja indukujućeg signala potvrđuju da su inicijalne faze neuralne diferencijacije ključne za dalji tok neurogeneze, i da ih karakterišu globalne izmene genske ekspresije koje za posledicu imaju ireverzibilno opredeljivanje ćelija ka neuralnim ćelijskim tipovima (Pleasure & Lee, 1993, Przyborski *et al.*, 2000, Leypoldt *et al.*, 2001, Przyborski *et al.*, 2003, Deb-Rinker *et al.*, 2005, Megiorni *et al.*, 2005, Honecker *et al.*, 2014). Imajući u vidu navedene rezultate, zaključeno je da molekularni mehanizmi u inicijalnim fazama neuralne diferencijacije NT2/D1 ćelija indukovanih retinoičnom kiselinom oponašaju mehanizme uključene u razviće humanog CNS-a, što je potvrđeno i od strane drugih autora (Przyborski *et al.*, 2000, Stevanovic, 2003).

Interesantno je zapažanje da u trenutku dostizanja maksimalnog nivoa ekspresije *SOX3*, u danu 2 tretmana retinoičnom kiselinom, nivo *SOX2* pada na minimalni nivo u odnosu na sve posmatrane intervale (**Slike 16 i 26**). Pad ekspresije *SOX2*, markera pluripotentnosti, i porast ekspresije neuralnog markera *SOX3* koincidiraju sa trenutkom gubitka pluripotentnosti i aktivacijom neuralnog programa diferencijacije (Stevanovic, 2003). Inverzni profili ekspresije gena *SOX2* i *SOX3* detektovani su i u studiji Wang i saradnika, gde je primećeno da nakon utišavanja gena *SOX2* u humanim embrionalnim matičnim ćelijama dolazi do aktivacije ekspresije gena *SOX3*, kao kompenzatornog mehanizma kojim se ćelije održavaju u pluripotentnom stanju (Wang *et al.*, 2012). Navedeni efekat ostvaruje se zahvaljujući postojanju funkcionalne redundantnosti *SOXB1* faktora i delovanjem ovih proteina na zajedničke ciljane gene (Uchikawa *et al.*, 1999, Miyagi *et al.*, 2004, Corsinotti *et al.*, 2017). Međutim, pored zajedničkih ciljnih gena, istraživanja na neuralnim progenitorima miša sa deletiranim genom *Sox3* su pokazala da postoje geni koji su „ekskluzivni“ ciljni geni *SOX3* transkripcionog faktora. (McAninch & Thomas, 2014, Rogers *et al.*, 2014). Pokazano je da su ovi ciljni geni pro-neuralni geni, čija je ekspresija regulisana vezivanjem proteina *SOX3* za pojačivačke sekvence smeštene u intronima ili u intergenskim regionima (regionima

između gena) (McAninch & Thomas, 2014, Rogers *et al.*, 2014). Sa stanovišta genske regulacije, suprotni profili ekspresije gena *SOX2* i *SOX3* ukazuju na postojanje velikih razlika u mehanizmima kojima je aktivnost ovih gena kontrolisana, bilo preko transkripcionih faktora i signalnih puteva, bilo komponentama epigenetičke mašinerije.

5.2. Metilacija DNK kao mehanizam regulacije ekspresije *SOXB1* gena u ranim fazama neuralne diferencijacije NT2/D1 ćelija

Koordinisan proces neurogeneze zahteva integraciju unutarćelijskih faktora i ekstracelularnih signala, što omogućava preciznu kontrolu genske ekspresije i rezultuje diferencijacijom ćelija ka različitim neuralnim fenotipovima (Qiao *et al.*, 2016, Kameneva & Adameyko, 2019). Novije studije u ovoj oblasti ukazuju na pomeranje istraživačkog fokusa sa transkripcione regulacije genske ekspresije na regulaciju epigenetičkim mehanizmima, koji su, kako je pokazano, od vitalnog značaja za opredeljivanje pluripotentne matične ćelije ka zrelim neuralnim ćelijskim tipovima CNS-a (Qiao *et al.*, 2016, Tsuboi *et al.*, 2019, Desai & Pethe, 2020).

Literaturni podaci koji opisuju metilaciju gena *SOX1* i *SOX3* su ograničeni i pretežno fokusirani na analize u različitim tipovima maligniteta, dok je metilacioni status gena *SOX2*, osim u patofiziološkim stanjima, ispitivan i tokom procesa diferencijacije i generisanja indukovanih pluripotentnih matičnih ćelija (Miyagi *et al.*, 2004, Sikorska *et al.*, 2008, Barrand & Collas, 2010, Lee, Shin, *et al.*, 2014).

Izmenjeni obrasci metilacije DNK detektovani su u različitim tipovima maligniteta i ogledaju se u hipometilaciji celog genoma koja rezultuje hromozomskom nestabilnošću i aktivacijom genske ekspresije, kao i hipermetilacijom promotorskih regiona gena tumor supresora (Gazdzicka *et al.*, 2020). Pokazana je hipermetilacija regulatornih regiona gena *SOX3* u karcinomu penisa (Kuasne *et al.*, 2015), hroničnoj limfocitnoj (Rahmatpanah *et al.*, 2009) i akutnoj limfoblastnoj leukemiji (Kobayashi & Srour, 2011), dok je gen *SOX1* hipermetilovan u kolorektalnom kanceru (Chung *et al.*, 2019), kanceru bešike (Lopez *et al.*, 2017), cerviksa (Lai *et al.*, 2008, Chang *et al.*, 2014, Chen *et al.*, 2016, Wang *et al.*, 2016, Hsu *et al.*, 2017, Yuan *et al.*, 2019), jajnika (Su *et al.*, 2009, Kaur *et al.*, 2016), pluća (Nelson *et al.*, 2012, Zhao *et al.*, 2013, Li & Li, 2015), endometrijuma (Lai *et al.*, 2014, Wentzensen *et al.*, 2014), prostate (Mathews *et al.*, 2010), jednjaka (Kuo *et al.*, 2014, Tang *et al.*, 2019), nazofaringealnog (Guan *et al.*, 2014) i hepatocelularnom karcinomu (Tsao *et al.*, 2012, Liu *et al.*, 2017). Kako je pokazano, promena metilacionog statusa regulatornih regiona gena *SOX2* uključena je u nastanak i progresiju akutne mijeloidne leukemije (Zhang *et al.*, 2016), karcinoma jednjaka (Maehara *et al.*, 2017), karcinoma jetre (Liu *et al.*, 2016), želuca (Otsubo *et al.*, 2008, Wei *et al.*, 2016), prostate (Russo *et al.*, 2016), glioblastoma (Alonso *et al.*, 2011, Chiang *et al.*, 2014) i horiokarcinoma (Li *et al.*, 2008). Hipermetilacija promotorskih regiona gena tumor supresora predstavlja rani događaj u procesu kancerogeneze koji za posledicu ima smanjenu ekspresiju tih gena u tkivu tumora u odnosu na zdravo tkivo (Esteller, 2002). Studijama utvrđene korelacije između stepena metilacije promotorskih regiona gena tumor supresora i nivoa njihove ekspresije omogućile su razvoj novih dijagnostičkih i prognostičkih testova u onkologiji, pa analiza metilacionog statusa gena *SOX1* predstavlja deo dijagnostičkog panela u adenokarcinomu cerviksa (Yuan *et al.*, 2019) i kolorektalnom kanceru (Chung *et al.*, 2019).

Jedna od prvih studija u kojima je praćena epigenetićka regulacija ekspresije gena *SoxB1* grupe u kontekstu razvića sprovedena je od strane Lindemana i saradnika, koji su na model sistemu zebrica pokazali razlike u epigenetićkom statusu embrionalno ekspimiranih gena, koje rezultuju nastankom gen-specifićnih hromatinskih stanja (Lindeman *et al.*, 2010). Rezultati navedenog istraŹivanja detektovali su DNK metilaciju i slabo prisutne aktivirajuće histonske PTM na regulatornim regionima gena *Sox3* u diferenciranim somatskim ćelijama zebrice u poređenju sa ćelijama srednjeg stadijuma blastule (MBT, eng. *midblastula transition*), koje karakteriše visoka ekspresija *Sox3*, odsustvo metilacije DNK i prisustvo aktivirajućih histonskih markera (Lindeman *et al.*, 2010). Sa druge strane, sekvenca gena *Sox2* nemetilovana je kako u embrionalnim MBT ćelijama, u kojima je ovaj gen ekspimiran, tako i u somatskim ćelijama u kojima ekspresija *Sox2* nije detektovana (Lindeman *et al.*, 2010). Takođe, navedena studija pokazala je da su ispitivani *Sox2* regulatorni regioni bogati i aktivirajućim i reprimirajućim histonskim PTM u MBT ćelijama, dok je utišavanje *Sox2* u somatskim ćelijama praćeno uklanjanjem aktivirajućih histonskih markera (Lindeman *et al.*, 2010). Znaćaj interakcija epigenoma i gena *SoxB1* za ćelijsko opredeljivanje dodatno je potvrđen u studiji na embrionima pileta, gde je metilacija regulatornih regiona gena *Sox2* i *Sox3* oznaćena kao molekularni “prekidać” koji utišava transkripcione faktore ćelija nervne cevi i omogućava ekspresiju gena neuralne kreste (Hu *et al.*, 2012). Kako je pokazano, aktivacija ekspresije *Sox2* u ranim fazama razvića nervne ploće pileta omogućena je aktivnošću JMJD2A histonske demetilaze koja uklanja reprimirajući H3K9me3 znak sa promotora ovog gena (Bouzas *et al.*, 2016). Finalno, brojne studije pokazale su da reorganizacija hromatina u regionu koji okruŹuje gen *Sox2* prati kako proces diferencijacije embrionalnih matićnih ćelija (pregled u (van den Hurk *et al.*, 2016)), tako i proces generisanja indukovanih pluripotentnih matićnih ćelija (Koche *et al.*, 2011).

Imajući u vidu znaćajnu ulogu gena *SOXB1* grupe u procesu neurogeneze, kao i odgovor ovih gena na prisustvo retinoićne kiseline, u ovoj tezi ispitan je njihov metilacioni status u ranim fazama neuralne diferencijacije NT2/D1 ćelija. Uprkos niskim nivoima proteina SOX3 i SOX1 u nediferenciranim ćelijama, detektovana je hipometilacija oba promotora, koja se odrŹava tokom svih 7 dana tretmana retinoićnom kiselinom (**Slike 18, 19 i 24**). Metilacija promotorskog regiona gena *SOX2* nije analizirana u ovoj studiji, s obzirom na postojanje eksperimentalnih podataka koji potvrđuju odsustvo metilacije ovog gena tokom neuralne diferencijacije embrionalnih karcinomskih ćelija. Naime, u studiji Sikorske i saradnika dokazano je da su u nediferenciranim NT2/D1 ćelijama regulatorni regioni gena *SOX2* hipometilovani (Sikorska *et al.*, 2008). Kako je pokazano u pomenutoj studiji, u kasnijim fazama neuralne diferencijacije NT2/D1 ćelija kroz intenzivno epigenetićko remodelovanje prolaze pojaćivaćki elementi *SOX2*, *SRR1* i *SRR2*, locirani pribliŹno 4 kb uzvodno (*SRR1*) i pribliŹno 4 kb nizvodno (*SRR2*) od TSS-a (Miyagi *et al.*, 2004). Ovi regioni, nemetilovani u nediferenciranim NT2/D1 ćelijama sa visokom ekspresijom *SOX2*, bivaju razlićito metilovani tokom neuralne diferencijacije (Lindeman *et al.*, 2010). U astrocitima poreklom iz NT2/D1 ćelija (NT2-A) *SRR1* pojaćivać je hipermetilovan, a detektovano je odsustvo metilacije na *SRR2* elementu, Źto je u skladu sa niŹom ekspresijom *SOX2* proteina u ovim ćelijama (Lindeman *et al.*, 2010). Sa druge strane, u NT2-N ćelijama detektovana je metilacija oba regiona, praćena gubitkom ekspresije proteina *SOX2* (Lindeman *et al.*, 2010). Ovi rezultati jasno su ukazali da je metilacija regulatornih regiona gena *SOX2* vaŹan činilac u kontroli ekspresije ovog faktora, i da

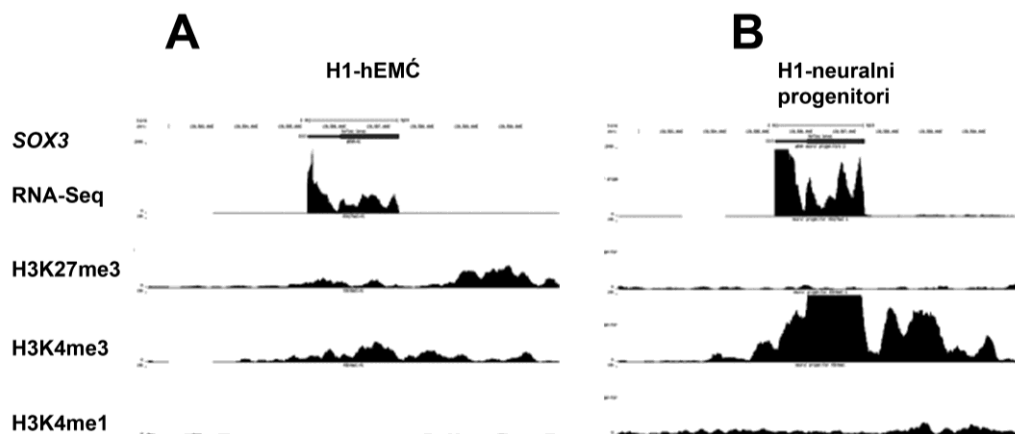
zahvaljujući razlikama u metilacionom statusu gena *SOX2* astrociti zadržavaju sposobnost da re-eksprimiraju *SOX2*, dok je ovaj gen u neuronima trajno utišan (Sikorska *et al.*, 2008). NT2-A tretirani bFGF (eng. *Basic Fibroblast Growth Factor*) u cilju simuliranja traumatske povrede mozga pokazuju povećani proliferativni kapacitet i reaktivaciju ekspresije *SOX2*, kojoj prethode demetilacija i histonska acetilacija *SRR1* regiona (Sikorska *et al.*, 2008). Slični rezultati dobijeni su i u studiji na NCCIT embrionalnim karcinomskim ćelijama, u kojoj je metilacija promotorskog i *SRR2* regiona gena *SOX2* na niskom nivou (Barrand & Collas, 2010). Imajući u vidu i rezultate dobijene u ovoj doktorskoj disertaciji, može se izvesti zaključak da su regulatorni elementi gena *SOXB1* hipometilovani u pluripotentnim ćelijama, što omogućava kreiranje permisivne platforme za delovanje drugih mehanizama regulacije genske ekspresije. Takođe, s obzirom na literaturne podatke prema kojima nizak stepen metilacije regulatornih regiona gena *SOX2* karakteriše kako multipotentne ćelijske tipove, u kojima je ovaj gen visoko eksprimiran (NCCIT ćelije), tako i diferencirane ćelije sa potpuno utišanom ekspresijom *SOX2* (Barrand & Collas, 2010), može se spekulirati da je ovakav metilacioni status gena *SOXB1* ključan za proces ćelijskog reprogramiranja u kom ova genska familija igra značajnu ulogu.

Analiza dinamike nivoa metilacije promotorskih regiona gena *SOXB1* familije tokom procesa neuralne diferencijacije posebno je dobila na značaju sa razvojem CRISPR-Cas tehnologije editovanja genoma. U novijoj studiji Baumann-a i saradnika ispitivana je uloga epigenoma kao komponente koja definiše ćelijski identitet i epigenetičkih barijera koje otežavaju ciljano reprogramiranje ćelija (Baumann *et al.*, 2019). Ciljana indukcija gena *Sox1* metodom “transkripcionog inženjerstva” (eng. *transcriptional engineering*, manipulacija genskom ekspresijom targetovanjem veštačkih transkripcionih faktora na promotore ciljnih gena (Gao *et al.*, 2014, Chavez *et al.*, 2015)), rezultovala je povećanjem potencijala za diferencijaciju određenog broja neuralnih progenitora (Baumann *et al.*, 2019). Analizom promotorskog regiona gena *Sox1* u neuralnim progenitorima koji reaguju na transaktivacioni stimulus utvrđen je nizak stepen metilacije DNK (Baumann *et al.*, 2019). Efikasnost procesa transaktivacije gena *Sox1* značajno je unapređena metodom editovanja epigenoma, odnosno uklanjanjem metilacije DNK enzimom Cas9-TET1 (Baumann *et al.*, 2019). Ovim eksperimentima je pokazano da struktura hromatina na regulatornim regionima gena faktora neuralne diferencijacije otežava forsiranu reaktivaciju ekspresije ovih faktora, čime zapravo definiše i štiti ćelijski identitet (Baumann *et al.*, 2019). Mehanizmi kojima metilacija DNK interferira sa sposobnošću ćelije da odgovori na transaktivaciju još uvek su nedovoljno ispitani. U okviru promotora gena *Sox1* postoje vezivna mesta za brojne pro-neuralne transkripcione faktore, od kojih se neka preklapaju sa CpG ostrvima (Messeguer *et al.*, 2002, Baumann *et al.*, 2019). Među pomenutim faktorima nalaze se E2F-1 (Campanero *et al.*, 2000), Sp1 (Zhu *et al.*, 2003) i YY1 (Kim, Kollhoff, *et al.*, 2003) čije je vezivanje za molekul DNK zavisno od metilacionog statusa ciljne sekvence, a imaju važnu ulogu tokom procesa neurulacije i neurogeneze. Rezultati navedene studije ukazuju na značaj ispitivanja metilacionog statusa gena faktora neuralne diferencijacije tokom procesa opredeljivanja ćelija. Poznavanje epigenetičkih mehanizama regulacije ekspresije gena *SOXB1* familije i njihove interakcije sa transkripcionim faktorima uključenim u regulaciju ekspresije pomenutih gena može značajno doprineti razvoju tehnika za manipulaciju populacijama pluripotentnih ćelija i povećanoj efikasnosti procesa *in vitro* neurogeneze. Hipometilovan status promotorskih regiona gena *SOXB1* grupe detektovan u ovoj doktorskoj disertaciji i prethodnim

studijama (Sikorska *et al.*, 2008) ukazuje da su ovi geni u permisivnom stanju, odnosno spremni da brzo odgovore na aktivacioni stimulus, i da stoga NT2/D1 ćelije imaju veliki potencijal za diferencijaciju u ranim fazama indukcije retinoičnom kiselinom. Imajući u vidu da proces *in vitro* neuralne diferencijacije NT2/D1 ćelija, uprkos brojnim pokušajima optimizacije protokola, rezultuje malim brojem neurona, bilo bi značajno ispitati da li u kasnijim fazama indukcije retinoičnom kiselinom dolazi do metilacije promotorskih regiona gena *SOXB1* grupe i da li je kod ćelija sa ovakvim epigenetičkim statusom zaustavljena ili onemogućena progresija procesa neuralne diferencijacije.

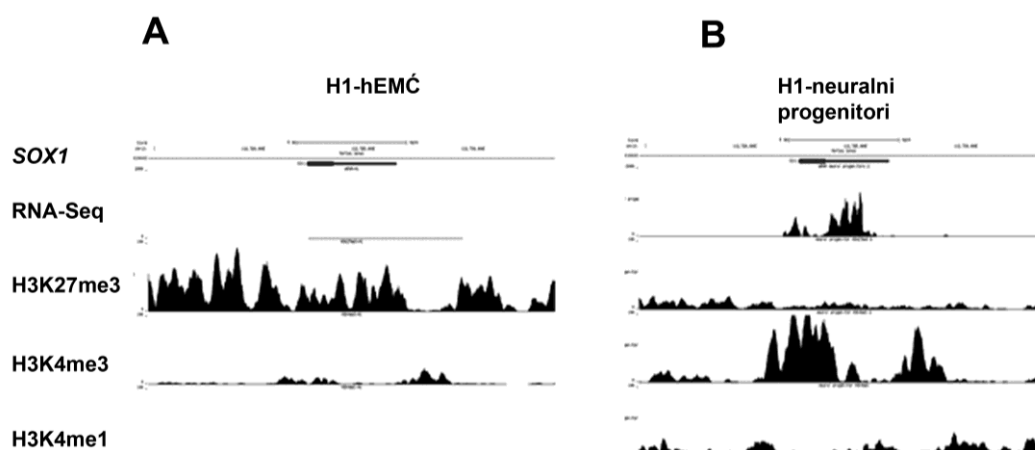
5.3. Posttranslacione modifikacije histona kao mehanizam regulacije ekspresije *SOXB1* gena u ranim fazama neuralne diferencijacije NT2/D1 ćelija

Nakon što je pokazano da metilacija DNK nije mehanizam kontrole ekspresije gena *SOXB1* u ranoj fazi neuralne diferencijacije NT2/D1 ćelija, analizirani su histonski markeri deponovani na pomenutim genima. Utvrđeno je postojanje dinamičnih genspecifičnih izmena histonskih PTM u odgovoru na retinoičnu kiselinu. Opsežna ChIP-qPCR analiza ispitivanih sekvenci u okviru gena *SOX3* pokazala je da je depozicija H3K4me3 modifikacija na minimalnom promotoru i u regionu uzvodno od TSS-a u korelaciji sa indukcijom transkripcije ovog gena (**Slika 21**). Ovaj zaključak podržan je studijom Lauberth i saradnika, u kojoj je dokazano da prisustvo H3K4me3 modifikacije olakšava regrutovanje TFIID (eng. *Transcription Factor II D*) i formiranje preinicijacionog kompleksa, na taj način promovišući transkripciju (Lauberth *et al.*, 2013). Bioinformatička analiza *online*-dostupnih podataka iz ENCODE baze ukazala je na bivalentnu prirodu (H3K4me3⁺/H2K27me3⁺) promotora *SOX3* (**Slika 32, Tabela 7**) i *SOX1* gena (**Slika p1, Tabela 7**) u H1 liniji humanih embrionalnih matičnih ćelija, u skladu sa slabom ekspresijom ovih gena u navedenoj ćelijskoj liniji. Pretraga *online*-dostupnih podataka iz NIH projekta Roadmap Epigenomics, dostupnog na adresi <http://www.roadmapepigenomics.org/> (Roadmap Epigenomics *et al.*, 2015) za odabrane histonske markere u H1 liniji humanih embrionalnih matičnih ćelija i neuralnim progenitorima poreklom iz H1 ćelija podržala je zaključke ove doktorske disertacije. Kako je prikazano na **Slici 33**, *SOX3* iRNK detektovana je u nediferenciranim H1 ćelijama (**Slika 33 A**), a u neuralnim progenitorima nastalim diferencijacijom H1 ćelija detektovano je povećanje ekspresije ovog gena (**Slika 33 B**). Neuralna diferencijacija praćena je uklanjanjem H3K27me3 sa gena *SOX3* i pojačanim prisustvom H3K4me3 i H3K4me1 markera (**Slika 33**). Ovakva situacija tipična je za gene “spremne” za brzu aktivaciju po delovanju indukujućeg signala.



Slika 33. Histonske modifikacije u regionu koji okružuje gen *SOX3* u H1 liniji humanih embrionalnih matičnih ćelija (H1-hEMĆ, panel A) i neuralnim progenitorima poreklom iz H1 ćelija (B). Setovi podataka dobijeni su pretragom Roadmap Epigenomics projekta dostupnog na adresi <http://www.roadmapepigenomics.org/> (Roadmap Epigenomics *et al.*, 2015), koji su obrađeni na Galaxy platformi (Afgan *et al.*, 2018) i vizuelizovani u UCSC pretraživaču. Od vrha ka dnu prikazani su: ekspresioni profili *SOX3* iRNK iz RNA-Seq eksperimenata; marker H3K27me3 asociran sa represijom transkripcije; markeri H3K4me3 i H3K4me1 asocirani sa aktivacijom transkripcije.

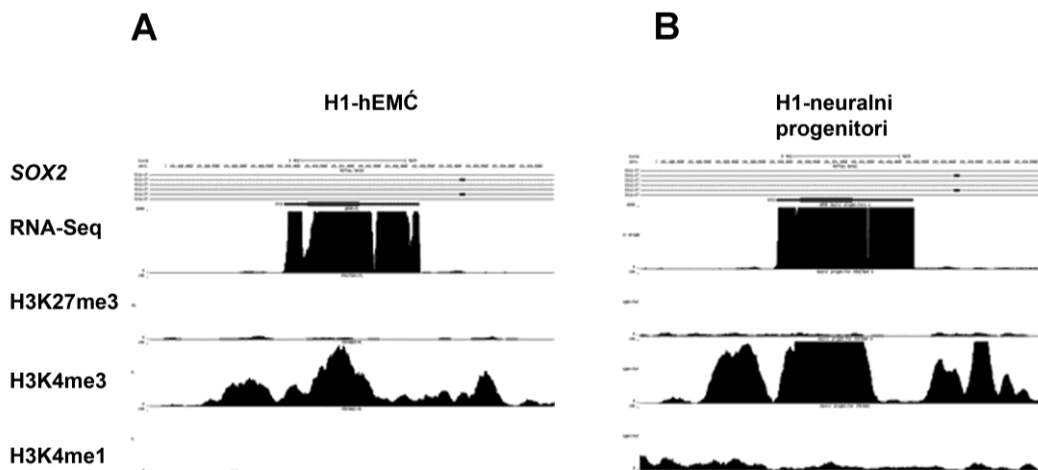
Prethodno detektovana transkripciona atkivacija gena *SOX1* u NT2/D1 ćelijama indukovanim retinoičnom kiselinom potvrđena je i u ovoj analizi, u kojoj ekspresija gena *SOX1* nije detektovana u pluripotentnim H1 ćelijama (Slika 34 A) i visoko eksprimiranom *SOX1* iRNK u neuralnim progenitorima (Slika 34 B). Prisustvo bivalentnih histonskih PTM na genu *SOX1* u H1 ćelijama (Slika 34 A) održava se i u neuralnim progenitorima (Slika 34 B), ali sa obrnutim doprinosima H3K4me3 i H3K27me3 modifikacija u odnosu na nediferencirane ćelije. Takođe, ovaj proces prati obogaćivanje H3K4me1 markerom (Slika 34).



Slika 34. Histonske modifikacije u regionu koji okružuje gen *SOX1* u H1 liniji humanih embrionalnih matičnih ćelija (H1-hEMĆ, panel A) i neuralnim progenitorima poreklom iz H1 ćelija (B). Setovi podataka dobijeni su pretragom Roadmap Epigenomics projekta dostupnog na adresi <http://www.roadmapepigenomics.org/> (Roadmap Epigenomics *et al.*, 2015), koji su obrađeni na Galaxy platformi (Afgan *et al.*, 2018) i vizuelizovani u UCSC pretraživaču. Od vrha ka dnu prikazani su: ekspresioni profili *SOX1* iRNK iz RNA-Seq eksperimenata; marker H3K27me3 asociran sa represijom transkripcije; markeri H3K4me3 i H3K4me1 asocirani sa aktivacijom transkripcije

Rezultati dobijeni na humanim embrionalnim matičnim ćelijama bioinformatički analizirani u ovoj tezi podržani su prethodnom studijom Mikkelsena i saradnika, u kojoj u embrionalnim matičnim ćelijama miša bivalentno obeleženi *Sox3* (H3K4me3+/H3K27me3+) postaje H3K4me3+ u opredeljenim neuralnim progenitorima, dok u embrionalnim fibroblastima miša (MEF) nije detektovano prisustvo ispitivanih histonskih markera na promotoru gena *Sox3* (Mikkelsen *et al.*, 2007). U istoj studiji, *Sox1* je bivalentno obeležen (H3K4me3+/H3K27me3+) kako u embrionalnim matičnim ćelijama, tako i u neuralnim progenitorima, dok ga u MEF ćelijama karakteriše H3K4me3-/H3K27me3+ profil (Mikkelsen *et al.*, 2007). *SOX1* je obeležen H3K4me3+/H3K27me3+ i tokom Bone Morphogenetic Protein 4 (BMP4)-indukovane diferencijacije humanih embrionalnih matičnih ćelija (Pan *et al.*, 2007). Rezultati ove doktorske disertacije pokazuju sličan trend u slučaju modifikacije H3K4me3 na promotorima gena *SOX1* i *SOX3* u ranim fazama neuralne diferencijacije NT2/D ćelija. Analiza profila H3K27me3 markera na promotorskim regionima pomenutih gena nije sprovedena u ovoj doktorskoj disertaciji, usled tehničkih ograničenja (nedostupno anti-H3K27me3 antitelo pogodno za upotrebu u ChIP eksperimentima). Ovu analizu je neophodno sprovesti u budućim istraživanjima u cilju dodatne potvrde bivalentne prirode gena *SOX1* i *SOX3*. Važno je istaći i postojanje značajnih razlika u histonskim profilima gena *SOX2* i *SOX3* tokom procesa neuralne diferencijacije. Naime, na promotoru gena *SOX2* detektovano je blago smanjenje prisustva H3K4me3 modifikacije na stadijumu ćelija 7 dana indukovanih retinoičnom kiselinom (Slika 27), u skladu sa rezultatima bioinformatičke analize na H1 liniji humanih embrionalnih matičnih ćelija i H1-diferenciranim neuralnim progenitorima kod kojih je promotor gena *SOX2* bogat pomenutim markerom u oba ćelijska tipa (Slika p2,

Tabela 7). Proces diferencijacije praćen je potpunim odsustvom reprimirajuće modifikacije H3K27me3 (**Slika 35**). Takođe, detektovan je blag porast signala za H3K4me1 u H1-neuralnim progenitorima (**Slika 35 B**). Može se zaključiti da je gen *SOX2* transkripciono aktivan u humanim embrionalnim matičnim ćelijama kao i u neuralnim progenitorima dobijenim indukovanom diferencijacijom ovih ćelija, i da ga karakteriše prisustvo aktivirajućih histonskih markera.



Slika 35. Histske modifikacije u regionu koji okružuje gen *SOX2* u H1 liniji humanih embrionalnih matičnih ćelija (H1-hEMĆ, panel A) i neuralnim progenitorima poreklom iz H1 ćelija (B). Setovi podataka dobijeni su pretragom Roadmap Epigenomics projekta dostupnog na adresi <http://www.roadmapepigenomics.org/> (Roadmap Epigenomics *et al.*, 2015), koji su obrađeni na Galaxy platformi (Afgan *et al.*, 2018) i vizuelizovani u UCSC pretraživaču. Od vrha ka dnu prikazani su: ekspresioni profili *SOX2* iRNK iz RNA-Seq eksperimenata; marker H3K27me3 asociran sa represijom transkripcije; markeri H3K4me3 i H3K4me1 asocirani sa aktivacijom transkripcije

Imajući u vidu da je ekspresija proteina *SOX2* detektovana u svim ispitivanim fazama neuralne diferencijacije NT2/D1 ćelija (**Slika 26**), kao i postojanje RNA-Seq pikova za *SOX2* transkript u H1 ćelijama i H1-diferenciranim neuralnim progenitorima (**Slika 35**), može se zaključiti da je ekspresija ovog faktora pluripotentnosti neophodna i nakon inicijacije neuralne diferencijacije i da je jedan od mehanizama kojim se ona održava upravo odsustvo metilacije DNK i reprimirajućih histonskih PTM, kao i prisustvo aktivirajućih markera. Interesantno bi bilo ispitati da li su u neuronima, u kojima je *SOX2* potpuno utišan, regulatorne sekvence ovog gena bogate H3K27me3 markerom, kao i da li depozicija ovog markera prethodi već potvrđenoj metilaciji ovih sekvenci (Sikorska *et al.*, 2008). Takođe, pokazano je da je promotor gena *SOX2* obeležen aktivirajućom H3K4me3 modifikacijom kako u pluripotentnim, nediferenciranim NCCIT embrionalnim karcinomskim ćelijama, tako i u diferenciranim ćelijskim tipovima kao što su keratinociti i fibroblasti, što je, pored niskog stepena metilacije DNK, jedan od razloga uspešnosti reprogramiranja ovih ćelijskih tipova u indukovane pluripotentne matične ćelije koje se postiže reaktivacijom ekspresije gena *SOX2* (Barrand & Collas, 2010).

Ekspresioni profili gena *SOXB1* grupe u model sistemu H1 ćelija i neuralnih progenitora nastalih diferencijacijom H1 ćelija, odgovaraju profilima dobijenim u inicijalnim fazama neuralne diferencijacije NT2/D1 ćelija, sa porastom nivoa ekspresije *SOX1* (**Slike 23 i 34**) i *SOX3* (**Slike 16 i 33**) i održavanjem visokog nivoa ekspresije gena *SOX2* (**Slike 26 i 35**) u neuralnim progenitorima. Iako potpuna vremenska korelacija ekspresionih profila gena *SOXB1* između ova dva model sistema nije moguća usled razlika u samim eksperimentalnim i metodološkim pristupima tokom propagacije i *in vitro* neuralne diferencijacije ćelija, jasno je da njihova dinamika prati isti trend i da je precizna regulacija nivoa proteina SOXB1 neophodna za rane faze *in vitro* i *in vivo* neurogeneze.

5.4. Razlike u regulaciji ekspresije *SOXB1* gena u ranim fazama neuralne diferencijacije NT2/D1 ćelija

Jedno od interesantnih otkrića proisteklih iz ChIP analiza histonskih PTM na promotorima gena *SOXB1* je postojanje značajnih razlika u profilima histonskih markera u inicijalnim fazama neuralne diferencijacije. Na osnovu dobijenih rezultata, rana faza neuralne diferencijacije NT2/D1 ćelija može se podeliti u dva stadijuma. Prvi stadijum čine prva 2 dana indukcije retinoičnom kiselinom i karakteriše se porastom ekspresije *SOX3* i padom ekspresije *SOX2* (**Slike 16 i 26**), uz nepromenjen, nizak nivo *SOX1* proteina (**Slika 23**). Drugi stadijum, od dana 4 do dana 7 indukcije praćen je padom nivoa *SOX2* i *SOX3* proteina (**Slike 16 i 26**), i porastom ekspresije *SOX1* (**Slika 23**). U prvom stadijumu, profil H3K4me3 markera na promotoru humanog gena *SOX2* nije u značajnoj korelaciji sa ekspresijom ovog gena, nasuprot genu *SOX3*, čija je transkripciona aktivacija u danu 2 tretmana retinoičnom kiselinom praćena pojačanom depozicijom H3K4me3 modifikacije (**Slike 21 i 27**). Ovakav H3K4me3 profil na promotoru gena *SOX2* u skladu je sa prethodno pomenutom studijom Barrand i saradnika, u kojoj je dokazano da je navedena modifikacija asocirana sa promotorom gena *SOX2* u različitim ćelijskim tipovima, nezavisno od njegove ekspresije (Barrand & Collas, 2010). Takođe, obogaćivanje H2BK5ac markerom u danu 2 indukcije značajno je manje na promotoru gena *SOX2* u poređenju sa promotorskim regionom gena *SOX3*, što dodatno ukazuje na različita stanja regulatornih regiona ovih gena u ćelijama koje započinju neuralnu diferencijaciju (**Slike 22 i 27**). U slučaju gena *SOX1*, zapažena je pojačana depozicija H3K4me3 markera u danu 2 tretmana retinoičnom kiselinom (**Slika 25**), koja prethodi aktivaciji ekspresije *SOX1* detektovanoj u danu 4 i 7 neuralne diferencijacije NT2/D1 ćelija (**Slika 23**).

U drugom stadijumu inicijalne faze neuralne diferencijacije, u danu 7 indukcije retinoičnom kiselinom, detektovan je značajan pad u svim analiziranim histonskim PTM na promotorima gena *SOX1*, *SOX2* i *SOX3* (**Slike 21, 22, 25 i 27**). Ovo implicira da je redukcija ekspresije *SOX2* i *SOX3* uočena u ovoj fazi rezultat delovanja sličnih epigenetičkih mehanizama. Sa druge strane, detektovano smanjenje H3K4me3 i H2B acetil markera na promotoru humanog gena *SOX1* (**Slika 25**) sugerije da ove aktivirajuće PTM nemaju značajnu ulogu u transkripcionoj aktivaciji ovog gena koja se odigrava u danima 4 i 7 neuralne diferencijacije. Stoga se nameće zaključak da su promene u ekspresionom profilu gena *SOX1* tokom ranih faza neuralne diferencijacije pod kontrolom drugih mehanizama, među kojima su potencijalna redukcija reprimirajućeg H3K27me3 markera, regulacija putem ncRNA, ili promene u aktivnosti

transkripcijskih faktora i signalnih puteva. Analiza epigenetičkih mehanizama uključenih u regulaciju ekspresije *SOXB1* gena u kasnijim fazama neuralne diferencijacije, kao i u ćelijama koje se nalaze na kasnijim stadijima procesa dediferencijacije, doprinela bi daljem rasvetljavanju uloge ovih gena u održavanju pluripotencije, i otvorila mogućnosti za unapređenje postojećih protokola za *in vitro* neuralnu diferencijaciju.

Važno je istaći da su do sada ispitani i drugi mehanizmi koji kontrolišu ekspresiju članova *SOXB1* familije gena i doprinose razlikama u njihovom odgovoru na signale koji indukuju neuralnu diferencijaciju (Stevanovic, 2003, Kovacevic Grujicic *et al.*, 2005, Mojsin *et al.*, 2006, Krstic *et al.*, 2007, Nikcevic *et al.*, 2008, Milivojevic *et al.*, 2010). Tako se ekspresija gena *SOX3* aktivira već u 2. danu tretmana NT2/D1 ćelija retinoičnom kiselinom (Stevanovic, 2003), dok u slučaju neuralne diferencijacije indukovane HMBA (eng. *Hexamethylene bisacetamide*) do istog efekta dolazi tek 14. dana tretmana (Stevanovic, 2003). Sa druge strane ekspresija gena *SOX2* pokazuje istu kinetiku u oba opisana slučaja (Stevanovic, 2003). Opsežna funkcionalna karakterizacija promotora humanog gena *SOX3* pokazala je postojanje regulatornih regiona uključenih u odgovor na retinoičnu kiselinu (Kovacevic Grujicic *et al.*, 2005, Mojsin *et al.*, 2006, Krstic *et al.*, 2007, Nikcevic *et al.*, 2008). Opisano je nekoliko elemenata, uključujući DR-3-like RXR RE, pozicioniran na -68 do -54 bp u odnosu na TSS (Nikcevic *et al.*, 2008) i atipični RA/RXR RE lociran na poziciji -259 do -154 bp (Mojsin *et al.*, 2006). Pokazano je da transkripcijski faktori NF-Y, PBX1 i MEIS1 imaju ulogu u regulaciji ekspresije ovog gena tokom prvih 2 dana neuralne indukcije retinoičnom kiselinom (Mojsin *et al.*, 2006, Krstic *et al.*, 2007). Analiza sličnosti i razlika u mehanizmima transkripcione regulacije ekspresije gena *SOX2* i *SOX3* u prva 2 dana tretmana NT2/D1 ćelija retinoičnom kiselinom pokazala je aktivaciju faktorima Sp1, MAZ, PBX1, MEIS1 i kompleksom ligand-RXR, dok je faktor TGIF' (eng. *5'-TG-3'interacting factor*) okarakterisan kao transkripcijski represor gena *SOX3*, bez značajnog efekta na ekspresiju *SOX2* (Milivojevic *et al.*, 2010). Takođe, nasuprot značajnoj ulozi proteina NF-Y u aktivaciji gena *SOX3* retinoičnom kiselinom, ovaj faktor je u istim eksperimentalnim uslovima ispoljio blag efekat na ekspresiju *SOX2* (Milivojevic *et al.*, 2010). Slični rezultati dobijeni su i u studiji Wiebe i saradnika, u kojoj je aktivnost promotora gena *Sox2* redukovana nakon indukcije F9 embrionalnih karcinomskih ćelija miša retinoičnom kiselinom (Wiebe *et al.*, 2000). Rezultati ove doktorske disertacije pružili su potporu hipotezi iznetoj u pomenutoj studiji prema kojoj je utišavanje gena *Sox2* nakon indukcije diferencijacije embrionalnih karcinomskih ćelija regulisano epigenetičkim mehanizmima (Wiebe *et al.*, 2000).

Pored proksimalnih regulatornih regiona, ekspresija gena *SOX2* i *SOX3* regulisana je i distalnim pojačivačima (Tomioka *et al.*, 2002, Brunelli *et al.*, 2003, Uchikawa *et al.*, 2003, Rogers *et al.*, 2009). U studiji na transgenim miševima utvrđeno je da profil ekspresije sa konstrukta dužine 8.3 kb koji obuhvata region ~3 kb uzvodno i ~3 kb nizvodno od *Sox3* ORF (eng. *open reading frame*) odgovara profilu endogeno ekspimiranog *Sox3*, ukazujući na postojanje regulatornih elemenata u okviru ovih regiona (Brunelli *et al.*, 2003). Takođe, u eksperimentima na embrionima pileta pokazano je postojanje brojnih pojačivačkih sekvenci kojima je regulisana aktivnost gena *Sox2* u toku nervnog razvića, a koji su specifični za različite delove mozga (Uchikawa *et al.*, 2003). Interesantno bi bilo ispitati epigenetičke mehanizme koji deluju na ovim regionima tokom neuralne diferencijacije. Pored regulatornih elemenata, ekspresija gena *SOX2* i *SOX3* regulisana je i aktivnošću signalnih puteva (Takahashi *et*

al., 2005, Armstrong *et al.*, 2006, Stavridis *et al.*, 2007, Smith *et al.*, 2008, Niwa *et al.*, 2009, Abello *et al.*, 2010, Mojsin *et al.*, 2015), dok je ekspresija gena *SOX2* modulirana i aktivnošću miRNK i ncRNK. miRNA-134 i miRNA-145 utišavaju ekspresiju gena *Sox2* interakcijom sa kodirajućim regionom ovog gena u embrionalnim matičnim ćelijama miša, odnosno 3'-UTR sekvencom u humanim embrionalnim matičnim ćelijama (Tay *et al.*, 2008, Xu *et al.*, 2009). Rezultati najnovijih istraživanja ukazuju da ncRNA *Sox2OT* (*SOX2 overlapping transcript*) učestvuje u regulaciji ekspresije gena *Sox2*. Pokazano je da *Sox2OT* inhibira samoobnavljanje neuralnih matičnih ćelija miša, što se ostvaruje interakcijom sa transkripcionim regulatorom YY1 i vezivanjem nastalog kompleksa za CpG ostrva u okviru *Sox2* lokusa koje je praćeno represijom ekspresije gena *Sox2* (Knauss *et al.*, 2018). Pokazano je da *SOX2OT* ima i funkciju onkogeno u brojnim malignitetima (Amaral *et al.*, 2009, Qu & Cao, 2018, Saghaeian Jazi *et al.*, 2018, Sun *et al.*, 2018, Wei *et al.*, 2018, Wu *et al.*, 2018, Zhang *et al.*, 2018). Takođe, u studiji Ahmad-a i saradnika, dokazano je postojanje *SOX1OT* (eng. *SOX1 overlapping transcript*) koja je visoko eksprimirana tokom diferencijacije neuralnih matičnih ćelija i čija je ekspresija u korelaciji sa ekspresijom gena *SOX1* (Ahmad *et al.*, 2017). Pored navedenih podataka, postoje literaturni podaci o kontroli ekspresije gena *SOX1* u toku neurogeneze mehanizmima signalne transdukcije (Stavridis *et al.*, 2007, Chambers *et al.*, 2009, Fei *et al.*, 2010), dok saznanja o ulozi transkripcionih faktora u ovom procesu nisu poznata. Imajući to u vidu, rezultati ove studije predstavljaju ne samo važan doprinos sagledavanju uloge epigenoma u kontroli ekspresije *SOXB1* gena, već i u polju regulacije ekspresije *SOX1* tokom procesa humane neurogeneze.

5.5. Epigenetička regulacija ekspresije gena *OCT4* i *NANOG* u ranim fazama neuralne diferencijacije NT2/D1 ćelija

Tokom diferencijacije matičnih ćelija brojne regulatorne mreže transkripcionih faktora koji diriguju procesom ćelijskog opredeljivanja postaju aktivne, dok ključni faktori pluripotentnosti postaju ireverzibilno utišani (Qiao *et al.*, 2016). Značajnu ulogu u kontroli događaja koji vode gubitku matičnog fenotipa imaju epigenetički mehanizmi regulacije genske ekspresije (Deb-Rinker *et al.*, 2005, Lee *et al.*, 2007, McCool *et al.*, 2007, Sikorska *et al.*, 2008, Shahhoseini *et al.*, 2010, Ziller *et al.*, 2015, Bhanu *et al.*, 2016). Epigenetička kontrola gena faktora pluripotentnosti *OCT4* i *NANOG*, koji zajedno sa *SOX2* formiraju centralnu mrežu regulatora matičnosti, bila je predmet brojnih studija, najčešće fokusiranih na mehanizme represije ovih gena tokom diferencijacije i embrionalnog razvića kičmenjaka (Gidekel & Bergman, 2002, Hoffmann *et al.*, 2006, Li *et al.*, 2007, Farthing *et al.*, 2008, Sikorska *et al.*, 2008, Barrand & Collas, 2010). Pokazano je da tokom procesa razvića promotor gena *Oct4/OCT4* biva metilovan u mišjim i humanim ćelijama, i da je njegova metilacija u somatskim ćelijama stabilna, čak i u globalno hipometilovanim ćelijskim linijama kancera (Gidekel & Bergman, 2002, Hoffmann *et al.*, 2006). Pored DNMT3a i DNMT3b-posredovane epigenetičke inaktivacije promotora gena *Oct4*, opredeljivanje embrionalnih matičnih ćelija praćeno je i metilacijom promotorskog regiona gena *Nanog*, koji je demetilovan u embrionalnim matičnim ćelijama, a utišan i metilovan u fibroblastima miša (Li *et al.*, 2007, Farthing *et al.*, 2008).

Slični rezultati dobijeni su i u studijama na embrionalnim karcinomskim ćelijama. Pokazano je da nediferencirane P19 ćelije miša održavaju visok nivo *OCT4*

ekspresije kroz promociju niskog stepena metilacije *Oct4* lokusa (Marikawa *et al.*, 2005, Huang *et al.*, 2015). Epigenetička regulacija gena *OCT4* i *NANOG* bila je predmet studije Deb-Rinker i saradnika, u kojoj je pokazano da su 5'-regulatorni regioni ovih gena nemetilovani u pluripotentnim NT2/D1 ćelijama, a postepeni porast u nivou metilacije uočava se od dana 4 indukcije retinoičnom kiselinom (Deb-Rinker *et al.*, 2005). Imajući u vidu pomenutu studiju, u ovoj tezi su analizirani profili odabranih histonskih PTM na promotorskim regionima gena *OCT4* i *NANOG* u ranim fazama neuralne diferencijacije NT2/D1 ćelija.

ChIP-qPCR analiza promotorskih regiona gena *OCT4* i *NANOG* pokazala je visoku zastupljenost aktivirajuće H3K4me3 modifikacije u pluripotentnim NT2/D1 ćelijama (**Slike 30 i 31**), što je i očekivano, imajući u vidu visoku ekspresiju pomenutih gena u ovoj ćelijskoj liniji (**Slike 28 i 29**). Detektovani pad prisustva ovog markera primećen je od dana 2 indukcije retinoičnom kiselinom (**Slike 30 i 31**) i u nastavku neuralne diferencijacije pratio je smanjenje transkripcione aktivnosti ovih gena (**Slike 28 i 29**), ukazujući na remodelovanje aktivnih promotora u sve zatvorenije strukture kao brzi odgovor na prisustvo indukujućeg signala. U prilog ovom zaključku idu i rezultati studije Favaedi i saradnika, koji su smanjenje u aktivirajućim H3K9ac i H3K4me3 modifikacijama na regulatornim regionima gena *OCT4* detektovali u danu 3 neuralne indukcije NT2/D1 ćelija (Favaedi *et al.*, 2012). Takođe, u neurosferama dobijenim produženim tretmanom NT2/D1 ćelija retinoičnom kiselinom uočena je hipometilacija H3K4 i hipoacetilacija H3K9 na uzvodnim regionima gena *OCT4* i *NANOG* (Shahhoseini *et al.*, 2010).

Pored profila H3K4me3 markera proučena je i acetilacija histona 2B, koja se generalno dovodi u vezu sa aktivnim promotorima (Kouzarides, 2007). Uočeno je da modifikacija H2BK5ac korelira sa ekspresionim profilima gena *OCT4* i *NANOG*, sa najvećom zastupljenošću u neindukovanim ćelijama, odnosno najnižom u danu 7 tretmana retinoičnom kiselinom (**Slike 30 i 31**), kada je ekspresija proteina OCT4 i NANOG utišana (**Slike 28 i 29**). Profili H2BK120ac markera pokazuju sličan trend, sa najvećim obogaćivanjem u neindukovanim NT2/D1 ćelijama (**Slike 30 i 31**). Uočene dinamične promene ovih acetil-modifikacija ukazuju na njihovu važnu ulogu u represiji gena faktora pluripotentnosti koja se odigrava u inicijalnim fazama neuralne diferencijacije. Interesantno je zapažanje da, uprkos literaturno pokazanim sličnostima u epigenetičkoj regulaciji gena *OCT4* i *NANOG*, kao i sličnim funkcijama koje vrše u ćeliji, njihov hromatinski "pejzaž" nije isti. Naime, analiza kinetike H2BK16ac markera pokazala je vezu između ovog markera i aktivnosti gena *NANOG* tokom indukcije retinoičnom kiselinom, dok relevantne promene na promotoru gena *OCT4* nisu uočene (**Slike 28, 29, 30 i 31**). Dalje rasvetljavanje potencijalnih razlika u epigenetičkoj kontroli ovih gena zahteva analizu drugih histonskih PTM, od kojih su brojne one koje se primenom hemijskih agenasa mogu ciljano modifikovati (Belvedere *et al.*, 2007, Copeland *et al.*, 2009, Dawson *et al.*, 2009, Dekker & Haisma, 2009, Miranda *et al.*, 2009, Chang *et al.*, 2010, Delmore *et al.*, 2011, Dawson *et al.*, 2012) i time omogućiti kontrolisanu ekspresiju faktora pluripotentnosti. Pored toga, jedan od važnih zaključaka proisteklih iz ove doktorske disertacije je da izmene u histonskim PTM deluju pre promena na nivou metilacije DNK (Deb-Rinker *et al.*, 2005) i stoga predstavljaju primarni odgovor gena faktora pluripotentnosti na signale koji indukuju diferencijaciju. Ovim je podržan model prema kome reverzibilna represija gena posredovana hromatinskom mašinerijom prethodi ireverzibilnoj represiji putem metilacije DNK regulatornih sekvenci, koja omogućava dugotrajno i stabilno utišavanje genske

ekspresije (Cedar & Bergman, 2009, Rose & Klose, 2014). Time je produbljeno razumevanje kompleksnih interakcija unutar epigenoma koje deluju na lokusima gena ključnih za razviće. Buduća istraživanja u ovoj oblasti omogućiće dublje poznavanje i dešifrovanje mehanizama koji integracijom signala iz spoljašnje sredine i nasleđenih genetičkih programa oblikuju identitet ćelija i pravilnu progresiju neurogeneze.

6. ZAKLJUČCI

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

1. Rane faze neuralne diferencijacije NT2/D1 ćelija karakterišu se dinamičnim izmenama u ekspresionim profilima gena *SOX1* i *SOX3* i gena faktora pluripotentnosti (*SOX2*, *OCT4* i *NANOG*)
2. Retinoična kiselina indukuje ekspresiju gena *SOX1* i *SOX3*, a reprimira ekspresiju gena *SOX2*, *OCT4* i *NANOG* u ranim fazama neuralne diferencijacije NT2/D1 ćelija
3. Rezultati ukazuju da regulacija ekspresije gena *SOX1* i *SOX3* tokom ranih faza neuralne diferencijacije NT2/D1 ćelija indukovanih retinoičnom kiselinom nije zavisna od metilacije DNK
4. Izmene u depoziciji H3K4me3 i H2B-acetil markera na regulatornim regionima gena *SOX3*, *SOX2*, *OCT4* i *NANOG* u korelaciji su sa profilima ekspresije ovih gena u ranim fazama neuralne diferencijacije NT2/D1 ćelija indukovanih retinoičnom kiselinom, dok takva korelacija za gen *SOX1* nije uočena
5. Histonski obrasci na regulatornim regionima gena *SOX1* i *SOX3* i gena faktora pluripotentnosti (*SOX2*, *OCT4* i *NANOG*) detektovani *in silico* analizom u H1 liniji humanih embrionalnih matičnih ćelija i neuralnim progenitorima poreklom iz H1 ćelija odgovaraju profilima histonskih markera u ranim fazama neuralne diferencijacije NT2/D1 ćelija indukovanih retinoičnom kiselinom

7. LITERATURA

- Abdelalim, E. M., Emara, M. M. & Kolatkar, P. R. (2014). The SOX transcription factors as key players in pluripotent stem cells. *Stem cells and development* **23**, 2687-2699.
- Abello, G., Khatri, S., Radosevic, M., Scotting, P. J., Giraldez, F. & Alsina, B. (2010). Independent regulation of Sox3 and Lmx1b by FGF and BMP signaling influences the neurogenic and non-neurogenic domains in the chick otic placode. *Developmental biology* **339**, 166-178.
- Abranches, E., Silva, M., Pradier, L., Schulz, H., Hummel, O., Henrique, D. & Bekman, E. (2009). Neural differentiation of embryonic stem cells in vitro: a road map to neurogenesis in the embryo. *PLoS one* **4**, e6286.
- Acloque, H., Ocana, O. H., Matheu, A., Rizzoti, K., Wise, C., Lovell-Badge, R. & Nieto, M. A. (2011). Reciprocal repression between Sox3 and snail transcription factors defines embryonic territories at gastrulation. *Developmental cell* **21**, 546-558.
- Adamo, A., Sese, B., Boue, S., Castano, J., Paramonov, I., Barrero, M. J. & Izpisua Belmonte, J. C. (2011). LSD1 regulates the balance between self-renewal and differentiation in human embryonic stem cells. *Nature cell biology* **13**, 652-659.
- Adikusuma, F., Pederick, D., McAninch, D., Hughes, J. & Thomas, P. (2017). Functional Equivalence of the SOX2 and SOX3 Transcription Factors in the Developing Mouse Brain and Testes. *Genetics* **206**, 1495-1503.
- Afgan, E., Baker, D., Batut, B., van den Beek, M., Bouvier, D., Cech, M., Chilton, J., Clements, D., Coraor, N., Gruning, B. A., Guerler, A., Hillman-Jackson, J., Hiltemann, S., Jalili, V., Rasche, H., Soranzo, N., Goecks, J., Taylor, J., Nekrutenko, A. & Blankenberg, D. (2018). The Galaxy platform for accessible, reproducible and collaborative biomedical analyses: 2018 update. *Nucleic acids research* **46**, W537-W544.
- Ahmad, A., Strohbuecker, S., Tufarelli, C. & Sottile, V. (2017). Expression of a SOX1 overlapping transcript in neural differentiation and cancer models. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* **74**, 4245-4258.
- Akamatsu, W., DeVeale, B., Okano, H., Cooney, A. J. & van der Kooy, D. (2009). Suppression of Oct4 by germ cell nuclear factor restricts pluripotency and promotes neural stem cell development in the early neural lineage. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **29**, 2113-2124.
- Alonso, M. M., Diez-Valle, R., Manterola, L., Rubio, A., Liu, D., Cortes-Santiago, N., Urquiza, L., Jauregi, P., Lopez de Munain, A., Sampron, N., Aramburu, A., Tejada-Solis, S., Vicente, C., Odero, M. D., Bandres, E., Garcia-Foncillas, J., Idoate, M. A., Lang, F. F., Fueyo, J. & Gomez-Manzano, C. (2011). Genetic and epigenetic modifications of Sox2 contribute to the invasive phenotype of malignant gliomas. *PLoS one* **6**, e26740.
- Alvarez-Saavedra, M., Antoun, G., Yanagiya, A., Oliva-Hernandez, R., Cornejo-Palma, D., Perez-Iratxeta, C., Sonenberg, N. & Cheng, H. Y. (2011). miRNA-132 orchestrates chromatin remodeling and translational control of the circadian clock. *Human molecular genetics* **20**, 731-751.

- Amaral, P. P., Neyt, C., Wilkins, S. J., Askarian-Amiri, M. E., Sunkin, S. M., Perkins, A. C. & Mattick, J. S. (2009). Complex architecture and regulated expression of the Sox2 locus during vertebrate development. *Rna* **15**, 2013-2027.
- Amir, R. E., Van den Veyver, I. B., Wan, M., Tran, C. Q., Francke, U. & Zoghbi, H. Y. (1999). Rett syndrome is caused by mutations in X-linked MECP2, encoding methyl-CpG-binding protein 2. *Nature genetics* **23**, 185-188.
- Andrews, P. W. (1984). Retinoic acid induces neuronal differentiation of a cloned human embryonal carcinoma cell line in vitro. *Developmental biology* **103**, 285-293.
- Andrews, P. W. (1988). Human teratocarcinomas. *Biochimica et biophysica acta* **948**, 17-36.
- Andrews, P. W., Damjanov, I., Simon, D., Banting, G. S., Carlin, C., Dracopoli, N. C. & Fogh, J. (1984). Pluripotent embryonal carcinoma clones derived from the human teratocarcinoma cell line Tera-2. Differentiation in vivo and in vitro. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* **50**, 147-162.
- Andrews, P. W., Nudelman, E., Hakomori, S. & Fenderson, B. A. (1990). Different patterns of glycolipid antigens are expressed following differentiation of TERA-2 human embryonal carcinoma cells induced by retinoic acid, hexamethylene bisacetamide (HMBA) or bromodeoxyuridine (BUdR). *Differentiation; research in biological diversity* **43**, 131-138.
- Antequera, F. & Bird, A. (1993). Number of CpG islands and genes in human and mouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**, 11995-11999.
- Antequera, F., Boyes, J. & Bird, A. (1990). High levels of de novo methylation and altered chromatin structure at CpG islands in cell lines. *Cell* **62**, 503-514.
- Armstrong, L., Hughes, O., Yung, S., Hyslop, L., Stewart, R., Wappler, I., Peters, H., Walter, T., Stojkovic, P., Evans, J., Stojkovic, M. & Lako, M. (2006). The role of PI3K/AKT, MAPK/ERK and NFkappabeta signalling in the maintenance of human embryonic stem cell pluripotency and viability highlighted by transcriptional profiling and functional analysis. *Human molecular genetics* **15**, 1894-1913.
- Arnold, K., Sarkar, A., Yram, M. A., Polo, J. M., Bronson, R., Sengupta, S., Seandel, M., Geijsen, N. & Hochedlinger, K. (2011). Sox2(+) adult stem and progenitor cells are important for tissue regeneration and survival of mice. *Cell stem cell* **9**, 317-329.
- Avilion, A. A., Nicolis, S. K., Pevny, L. H., Perez, L., Vivian, N. & Lovell-Badge, R. (2003). Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. *Genes & development* **17**, 126-140.
- Azuara, V., Perry, P., Sauer, S., Spivakov, M., Jorgensen, H. F., John, R. M., Gouti, M., Casanova, M., Warnes, G., Merckenschlager, M. & Fisher, A. G. (2006). Chromatin signatures of pluripotent cell lines. *Nature cell biology* **8**, 532-538.
- Badis, G., Berger, M. F., Philippakis, A. A., Talukder, S., Gehrke, A. R., Jaeger, S. A., Chan, E. T., Metzler, G., Vedenko, A., Chen, X., Kuznetsov, H., Wang, C. F., Coburn, D., Newburger, D. E., Morris, Q., Hughes, T. R. & Bulyk, M. L. (2009). Diversity and complexity in DNA recognition by transcription factors. *Science* **324**, 1720-1723.

- Baharvand, H., Mehrjardi, N. Z., Hatami, M., Kiani, S., Rao, M. & Haghghi, M. M. (2007). Neural differentiation from human embryonic stem cells in a defined adherent culture condition. *The International journal of developmental biology* **51**, 371-378.
- Baker, K. A., Hong, M., Sadi, D. & Mendez, I. (2000). Intrastratial and intranigral grafting of hNT neurons in the 6-OHDA rat model of Parkinson's disease. *Experimental neurology* **162**, 350-360.
- Ballas, N. & Mandel, G. (2005). The many faces of REST oversee epigenetic programming of neuronal genes. *Current opinion in neurobiology* **15**, 500-506.
- Banerjee, M., Sanderson, J. D., Spencer, J. & Dunn-Walters, D. K. (2000). Immunohistochemical analysis of ageing human B and T cell populations reveals an age-related decline of CD8 T cells in spleen but not gut-associated lymphoid tissue (GALT). *Mechanisms of ageing and development* **115**, 85-99.
- Bannister, A. J. & Kouzarides, T. (2011). Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell research* **21**, 381-395.
- Barber, B. A. & Rastegar, M. (2010). Epigenetic control of Hox genes during neurogenesis, development, and disease. *Annals of anatomy = Anatomischer Anzeiger : official organ of the Anatomische Gesellschaft* **192**, 261-274.
- Bargaje, R., Alam, M. P., Patowary, A., Sarkar, M., Ali, T., Gupta, S., Garg, M., Singh, M., Purkanti, R., Scaria, V., Sivasubbu, S., Brahmachari, V. & Pillai, B. (2012). Proximity of H2A.Z containing nucleosome to the transcription start site influences gene expression levels in the mammalian liver and brain. *Nucleic acids research* **40**, 8965-8978.
- Barrand, S. & Collas, P. (2010). Chromatin states of core pluripotency-associated genes in pluripotent, multipotent and differentiated cells. *Biochemical and biophysical research communications* **391**, 762-767.
- Barros, S. P. & Offenbacher, S. (2009). Epigenetics: connecting environment and genotype to phenotype and disease. *Journal of dental research* **88**, 400-408.
- Bartel, D. P. (2009). MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* **136**, 215-233.
- Bass, A. J., Watanabe, H., Mermel, C. H., Yu, S., Perner, S., Verhaak, R. G., Kim, S. Y., Wardwell, L., Tamayo, P., Gat-Viks, I., Ramos, A. H., Woo, M. S., Weir, B. A., Getz, G., Beroukhi, R., O'Kelly, M., Dutt, A., Rozenblatt-Rosen, O., Dziunycz, P., Komisarof, J., Chirieac, L. R., Lafargue, C. J., Scheble, V., Wilbertz, T., Ma, C., Rao, S., Nakagawa, H., Stairs, D. B., Lin, L., Giordano, T. J., Wagner, P., Minna, J. D., Gazdar, A. F., Zhu, C. Q., Brose, M. S., Ceconello, I., Ribeiro, U., Jr., Marie, S. K., Dahl, O., Shivdasani, R. A., Tsao, M. S., Rubin, M. A., Wong, K. K., Regev, A., Hahn, W. C., Beer, D. G., Rustgi, A. K. & Meyerson, M. (2009). SOX2 is an amplified lineage-survival oncogene in lung and esophageal squamous cell carcinomas. *Nature genetics* **41**, 1238-1242.
- Bassett, A., Cooper, S., Wu, C. & Travers, A. (2009). The folding and unfolding of eukaryotic chromatin. *Current opinion in genetics & development* **19**, 159-165.
- Baumann, V., Wiesbeck, M., Breunig, C. T., Braun, J. M., Kofler, A., Ninkovic, J., Gotz, M. & Stricker, S. H. (2019). Targeted removal of epigenetic barriers during transcriptional reprogramming. *Nature communications* **10**, 2119.

- Belvedere, S., Witter, D. J., Yan, J., Secrist, J. P., Richon, V. & Miller, T. A. (2007). Aminosteroyl hydroxamic acids (ASHAs): a potent new class of HDAC inhibitors. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* **17**, 3969-3971.
- Bergsland, M., Ramskold, D., Zaouter, C., Klum, S., Sandberg, R. & Muhr, J. (2011). Sequentially acting Sox transcription factors in neural lineage development. *Genes & development* **25**, 2453-2464.
- Bernstein, B. E., Meissner, A. & Lander, E. S. (2007). The mammalian epigenome. *Cell* **128**, 669-681.
- Bernstein, B. E., Mikkelsen, T. S., Xie, X., Kamal, M., Huebert, D. J., Cuff, J., Fry, B., Meissner, A., Wernig, M., Plath, K., Jaenisch, R., Wagschal, A., Feil, R., Schreiber, S. L. & Lander, E. S. (2006). A bivalent chromatin structure marks key developmental genes in embryonic stem cells. *Cell* **125**, 315-326.
- Bestor, T. H. (2000). The DNA methyltransferases of mammals. *Human molecular genetics* **9**, 2395-2402.
- Bhanu, N. V., Sidoli, S. & Garcia, B. A. (2016). Histone modification profiling reveals differential signatures associated with human embryonic stem cell self-renewal and differentiation. *Proteomics* **16**, 448-458.
- Bibel, M., Richter, J., Schrenk, K., Tucker, K. L., Staiger, V., Korte, M., Goetz, M. & Barde, Y. A. (2004). Differentiation of mouse embryonic stem cells into a defined neuronal lineage. *Nature neuroscience* **7**, 1003-1009.
- Bilodeau, S., Kagey, M. H., Frampton, G. M., Rahl, P. B. & Young, R. A. (2009). SetDB1 contributes to repression of genes encoding developmental regulators and maintenance of ES cell state. *Genes & development* **23**, 2484-2489.
- Bird, A. (2002). DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes & development* **16**, 6-21.
- Bird, A. P. (1986). CpG-rich islands and the function of DNA methylation. *Nature* **321**, 209-213.
- Bock, C., Kiskinis, E., Verstappen, G., Gu, H., Boulting, G., Smith, Z. D., Ziller, M., Croft, G. F., Amoroso, M. W., Oakley, D. H., Gnirke, A., Eggan, K. & Meissner, A. (2011). Reference Maps of human ES and iPS cell variation enable high-throughput characterization of pluripotent cell lines. *Cell* **144**, 439-452.
- Bond, A. M., Vangompel, M. J., Sametsky, E. A., Clark, M. F., Savage, J. C., Disterhoft, J. F. & Kohtz, J. D. (2009). Balanced gene regulation by an embryonic brain ncRNA is critical for adult hippocampal GABA circuitry. *Nature neuroscience* **12**, 1020-1027.
- Booth, H. A. & Holland, P. W. (2004). Eleven daughters of NANOG. *Genomics* **84**, 229-238.
- Borlongan, C. V., Tajima, Y., Trojanowski, J. Q., Lee, V. M. & Sanberg, P. R. (1998a). Transplantation of cryopreserved human embryonal carcinoma-derived neurons (NT2N cells) promotes functional recovery in ischemic rats. *Experimental neurology* **149**, 310-321.
- Borlongan, C. V., Tajima, Y., Trojanowski, J. Q., Lee, V. M. & Sanberg, P. R. (1998b). Cerebral ischemia and CNS transplantation: differential effects of grafted fetal rat striatal cells and human neurons derived from a clonal cell line. *Neuroreport* **9**, 3703-3709.
- Boulard, M., Bouvet, P., Kundu, T. K. & Dimitrov, S. (2007). Histone variant nucleosomes: structure, function and implication in disease. *Sub-cellular biochemistry* **41**, 71-89.

- Bouzas, S. O., Marini, M. S., Torres Zelada, E., Buzzi, A. L., Morales Vicente, D. A. & Strobl-Mazzulla, P. H. (2016). Epigenetic activation of Sox2 gene in the developing vertebrate neural plate. *Molecular biology of the cell* **27**, 1921-1927.
- Bowles, J., Schepers, G. & Koopman, P. (2000). Phylogeny of the SOX family of developmental transcription factors based on sequence and structural indicators. *Developmental biology* **227**, 239-255.
- Boyer, L. A., Lee, T. I., Cole, M. F., Johnstone, S. E., Levine, S. S., Zucker, J. P., Guenther, M. G., Kumar, R. M., Murray, H. L., Jenner, R. G., Gifford, D. K., Melton, D. A., Jaenisch, R. & Young, R. A. (2005). Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell* **122**, 947-956.
- Boyer, L. A., Plath, K., Zeitlinger, J., Brambrink, T., Medeiros, L. A., Lee, T. I., Levine, S. S., Wernig, M., Tajonar, A., Ray, M. K., Bell, G. W., Otte, A. P., Vidal, M., Gifford, D. K., Young, R. A. & Jaenisch, R. (2006). Polycomb complexes repress developmental regulators in murine embryonic stem cells. *Nature* **441**, 349-353.
- Boyes, J. & Bird, A. (1992). Repression of genes by DNA methylation depends on CpG density and promoter strength: evidence for involvement of a methyl-CpG binding protein. *The EMBO journal* **11**, 327-333.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* **72**, 248-254.
- Brunelli, S., Silva Casey, E., Bell, D., Harland, R. & Lovell-Badge, R. (2003). Expression of Sox3 throughout the developing central nervous system is dependent on the combined action of discrete, evolutionarily conserved regulatory elements. *Genesis* **36**, 12-24.
- Buganim, Y., Faddah, D. A., Cheng, A. W., Itskovich, E., Markoulaki, S., Ganz, K., Klemm, S. L., van Oudenaarden, A. & Jaenisch, R. (2012). Single-cell expression analyses during cellular reprogramming reveal an early stochastic and a late hierarchic phase. *Cell* **150**, 1209-1222.
- Buitrago-Delgado, E., Schock, E. N., Nordin, K. & LaBonne, C. (2018). A transition from SoxB1 to SoxE transcription factors is essential for progression from pluripotent blastula cells to neural crest cells. *Developmental biology* **444**, 50-61.
- Buschbeck, M. & Hake, S. B. (2017). Variants of core histones and their roles in cell fate decisions, development and cancer. *Nature reviews. Molecular cell biology* **18**, 299-314.
- Bylund, M., Andersson, E., Novitch, B. G. & Muhr, J. (2003). Vertebrate neurogenesis is counteracted by Sox1-3 activity. *Nature neuroscience* **6**, 1162-1168.
- Cacci, E., Negri, R., Biagioni, S. & Lupo, G. (2017). Histone Methylation and microRNA-dependent Regulation of Epigenetic Activities in Neural Progenitor Self-Renewal and Differentiation. *Current topics in medicinal chemistry* **17**, 794-807.
- Calvanese, V. & Fraga, M. F. (2012). Epigenetics of embryonic stem cells. *Advances in experimental medicine and biology* **741**, 231-253.
- Campanero, M. R., Armstrong, M. I. & Flemington, E. K. (2000). CpG methylation as a mechanism for the regulation of E2F activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**, 6481-6486.

- Camper, S. A. (2004). Sox3 and sexual dysfunction: it's in the head. *Nature genetics* **36**, 217-219.
- Castillo, S. D. & Sanchez-Cespedes, M. (2012). The SOX family of genes in cancer development: biological relevance and opportunities for therapy. *Expert opinion on therapeutic targets* **16**, 903-919.
- Cedar, H. & Bergman, Y. (2009). Linking DNA methylation and histone modification: patterns and paradigms. *Nature reviews. Genetics* **10**, 295-304.
- Chadee, D. N., Hendzel, M. J., Tylicski, C. P., Allis, C. D., Bazett-Jones, D. P., Wright, J. A. & Davie, J. R. (1999). Increased Ser-10 phosphorylation of histone H3 in mitogen-stimulated and oncogene-transformed mouse fibroblasts. *The Journal of biological chemistry* **274**, 24914-24920.
- Chahrouh, M., Jung, S. Y., Shaw, C., Zhou, X., Wong, S. T., Qin, J. & Zoghbi, H. Y. (2008). MeCP2, a key contributor to neurological disease, activates and represses transcription. *Science* **320**, 1224-1229.
- Chalei, V., Sansom, S. N., Kong, L., Lee, S., Montiel, J. F., Vance, K. W. & Ponting, C. P. (2014). The long non-coding RNA Dali is an epigenetic regulator of neural differentiation. *eLife* **3**, e04530.
- Chambers, I., Colby, D., Robertson, M., Nichols, J., Lee, S., Tweedie, S. & Smith, A. (2003). Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell* **113**, 643-655.
- Chambers, I., Silva, J., Colby, D., Nichols, J., Nijmeijer, B., Robertson, M., Vrana, J., Jones, K., Grotewold, L. & Smith, A. (2007). Nanog safeguards pluripotency and mediates germline development. *Nature* **450**, 1230-1234.
- Chambers, S. M., Fasano, C. A., Papapetrou, E. P., Tomishima, M., Sadelain, M. & Studer, L. (2009). Highly efficient neural conversion of human ES and iPS cells by dual inhibition of SMAD signaling. *Nature biotechnology* **27**, 275-280.
- Chang, C. C., Huang, R. L., Wang, H. C., Liao, Y. P., Yu, M. H. & Lai, H. C. (2014). High methylation rate of LMX1A, NKX6-1, PAX1, PTPRR, SOX1, and ZNF582 genes in cervical adenocarcinoma. *International journal of gynecological cancer : official journal of the International Gynecological Cancer Society* **24**, 201-209.
- Chang, D. F., Tsai, S. C., Wang, X. C., Xia, P., Senadheera, D. & Lutzko, C. (2009). Molecular characterization of the human NANOG protein. *Stem cells* **27**, 812-821.
- Chang, Y., Ganesh, T., Horton, J. R., Spannhoff, A., Liu, J., Sun, A., Zhang, X., Bedford, M. T., Shinkai, Y., Snyder, J. P. & Cheng, X. (2010). Adding a lysine mimic in the design of potent inhibitors of histone lysine methyltransferases. *Journal of molecular biology* **400**, 1-7.
- Chatagnon, A., Veber, P., Morin, V., Bedo, J., Triqueneaux, G., Semon, M., Laudet, V., d'Alche-Buc, F. & Benoit, G. (2015). RAR/RXR binding dynamics distinguish pluripotency from differentiation associated cis-regulatory elements. *Nucleic acids research* **43**, 4833-4854.
- Chavez, A., Scheiman, J., Vora, S., Pruitt, B. W., Tuttle, M., E, P. R. I., Lin, S., Kiani, S., Guzman, C. D., Wiegand, D. J., Ter-Ovanesyan, D., Braff, J. L., Davidsohn, N., Housden, B. E., Perrimon, N., Weiss, R., Aach, J., Collins, J. J. & Church, G. M. (2015). Highly efficient Cas9-mediated transcriptional programming. *Nature methods* **12**, 326-328.

- Cheah, P. S. & Thomas, P. Q. (2015). SOX3 expression in the glial system of the developing and adult mouse cerebellum. *SpringerPlus* **4**, 400.
- Chen, X., Xu, H., Yuan, P., Fang, F., Huss, M., Vega, V. B., Wong, E., Orlov, Y. L., Zhang, W., Jiang, J., Loh, Y. H., Yeo, H. C., Yeo, Z. X., Narang, V., Govindarajan, K. R., Leong, B., Shahab, A., Ruan, Y., Bourque, G., Sung, W. K., Clarke, N. D., Wei, C. L. & Ng, H. H. (2008). Integration of external signaling pathways with the core transcriptional network in embryonic stem cells. *Cell* **133**, 1106-1117.
- Chen, Y., Cui, Z., Xiao, Z., Hu, M., Jiang, C., Lin, Y. & Chen, Y. (2016). PAX1 and SOX1 methylation as an initial screening method for cervical cancer: a meta-analysis of individual studies in Asians. *Annals of translational medicine* **4**, 365.
- Chew, J. L., Loh, Y. H., Zhang, W., Chen, X., Tam, W. L., Yeap, L. S., Li, P., Ang, Y. S., Lim, B., Robson, P. & Ng, H. H. (2005). Reciprocal transcriptional regulation of Pou5f1 and Sox2 via the Oct4/Sox2 complex in embryonic stem cells. *Molecular and cellular biology* **25**, 6031-6046.
- Chiang, J. H., Cheng, W. S., Hood, L. & Tian, Q. (2014). An epigenetic biomarker panel for glioblastoma multiforme personalized medicine through DNA methylation analysis of human embryonic stem cell-like signature. *OmicS : a journal of integrative biology* **18**, 310-323.
- Choo, K. B. (2011). Epigenetics in disease and cancer. *The Malaysian journal of pathology* **33**, 61-70.
- Chovanec, M., Albany, C., Mego, M., Montironi, R., Cimadamore, A. & Cheng, L. (2018). Emerging Prognostic Biomarkers in Testicular Germ Cell Tumors: Looking Beyond Established Practice. *Frontiers in oncology* **8**, 571.
- Christie, V. B., Marder, T. B., Whiting, A. & Przyborski, S. A. (2008). The role of retinoids in the adult nervous system and their therapeutic potential. *Mini reviews in medicinal chemistry* **8**, 601-608.
- Chung, H. H., Kuo, C. C., Hsiao, C. W., Chen, C. Y., Hu, J. M., Hsu, C. H., Chou, Y. C., Lin, Y. W. & Shih, Y. L. (2019). A Novel Prognostic DNA Methylation Panel for Colorectal Cancer. *International journal of molecular sciences* **20**.
- Cihak, A. (1974). Biological effects of 5-azacytidine in eukaryotes. *Oncology* **30**, 405-422.
- Clark, S. J., Harrison, J., Paul, C. L. & Frommer, M. (1994). High sensitivity mapping of methylated cytosines. *Nucleic acids research* **22**, 2990-2997.
- Colas, J., Chessel, N., Ouared, A., Gruz-Gibelli, E., Marin, P., Herrmann, F. R. & Savioz, A. (2020). Neuroprotection against Amyloid-beta-Induced DNA Double-Strand Breaks Is Mediated by Multiple Retinoic Acid-Dependent Pathways. *Neural plasticity* **2020**, 9369815.
- Collignon, J., Sockanathan, S., Hacker, A., Cohen-Tannoudji, M., Norris, D., Rastan, S., Stevanovic, M., Goodfellow, P. N. & Lovell-Badge, R. (1996). A comparison of the properties of Sox-3 with Sry and two related genes, Sox-1 and Sox-2. *Development* **122**, 509-520.
- Conaway, R. C., Sato, S., Tomomori-Sato, C., Yao, T. & Conaway, J. W. (2005). The mammalian Mediator complex and its role in transcriptional regulation. *Trends in biochemical sciences* **30**, 250-255.
- Consortium, E. P. (2012). An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. *Nature* **489**, 57-74.

- Copeland, R. A., Solomon, M. E. & Richon, V. M. (2009). Protein methyltransferases as a target class for drug discovery. *Nature reviews. Drug discovery* **8**, 724-732.
- Corsinotti, A., Wong, F. C., Tatar, T., Szczerbinska, I., Halbritter, F., Colby, D., Gogolok, S., Pantier, R., Liggat, K., Mirfazeli, E. S., Hall-Ponsele, E., Mullin, N. P., Wilson, V. & Chambers, I. (2017). Distinct SoxB1 networks are required for naive and primed pluripotency. *eLife* **6**.
- Coskun, V., Tsoa, R. & Sun, Y. E. (2012). Epigenetic regulation of stem cells differentiating along the neural lineage. *Current opinion in neurobiology* **22**, 762-767.
- Coyle, D. E., Li, J. & Baccei, M. (2011). Regional differentiation of retinoic acid-induced human pluripotent embryonic carcinoma stem cell neurons. *PloS one* **6**, e16174.
- Cremazy, F., Berta, P. & Girard, F. (2000). Sox neuro, a new Drosophila Sox gene expressed in the developing central nervous system. *Mechanisms of development* **93**, 215-219.
- Crews, L., Adame, A., Patrick, C., Delaney, A., Pham, E., Rockenstein, E., Hansen, L. & Masliah, E. (2010). Increased BMP6 levels in the brains of Alzheimer's disease patients and APP transgenic mice are accompanied by impaired neurogenesis. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **30**, 12252-12262.
- Cruickshank, M. N., Besant, P. & Ulgiati, D. (2010). The impact of histone post-translational modifications on developmental gene regulation. *Amino acids* **39**, 1087-1105.
- Cunningham, M. L., Mac Auley, A. & Mirkes, P. E. (1994). From gastrulation to neurulation: transition in retinoic acid sensitivity identifies distinct stages of neural patterning in the rat. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* **200**, 227-241.
- Dahariya, S., Paddibhatla, I., Kumar, S., Raghuwanshi, S., Palapati, A. & Gutti, R. K. (2019). Long non-coding RNA: Classification, biogenesis and functions in blood cells. *Molecular immunology* **112**, 82-92.
- Das, B. C., Dasgupta, S. & Ray, S. K. (2019). Potential therapeutic roles of retinoids for prevention of neuroinflammation and neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Neural regeneration research* **14**, 1880-1892.
- Das, B. C., Thapa, P., Karki, R., Das, S., Mahapatra, S., Liu, T. C., Torregroza, I., Wallace, D. P., Kambhampati, S., Van Veldhuizen, P., Verma, A., Ray, S. K. & Evans, T. (2014). Retinoic acid signaling pathways in development and diseases. *Bioorganic & medicinal chemistry* **22**, 673-683.
- Dawlaty, M. M., Ganz, K., Powell, B. E., Hu, Y. C., Markoulaki, S., Cheng, A. W., Gao, Q., Kim, J., Choi, S. W., Page, D. C. & Jaenisch, R. (2011). Tet1 is dispensable for maintaining pluripotency and its loss is compatible with embryonic and postnatal development. *Cell stem cell* **9**, 166-175.
- Dawson, M. A., Bannister, A. J., Gottgens, B., Foster, S. D., Bartke, T., Green, A. R. & Kouzarides, T. (2009). JAK2 phosphorylates histone H3Y41 and excludes HP1alpha from chromatin. *Nature* **461**, 819-822.
- Dawson, M. A., Kouzarides, T. & Huntly, B. J. (2012). Targeting epigenetic readers in cancer. *The New England journal of medicine* **367**, 647-657.
- De Clerck, L., Taelman, J., Popovic, M., Willems, S., Van der Jeught, M., Heindryckx, B., De Sutter, P., Marks, H., Deforce, D. & Dhaenens, M. (2019). Untargeted

- histone profiling during naive conversion uncovers conserved modification markers between mouse and human. *Scientific reports* **9**, 17240.
- de Ruijter, A. J., van Gennip, A. H., Caron, H. N., Kemp, S. & van Kuilenburg, A. B. (2003). Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family. *The Biochemical journal* **370**, 737-749.
- De Santa Barbara, P., Bonneaud, N., Boizet, B., Desclozeaux, M., Moniot, B., Sudbeck, P., Scherer, G., Poulat, F. & Berta, P. (1998). Direct interaction of SRY-related protein SOX9 and steroidogenic factor 1 regulates transcription of the human anti-Mullerian hormone gene. *Molecular and cellular biology* **18**, 6653-6665.
- Deato, M. D. & Tjian, R. (2007). Switching of the core transcription machinery during myogenesis. *Genes & development* **21**, 2137-2149.
- Deb-Rinker, P., Ly, D., Jezierski, A., Sikorska, M. & Walker, P. R. (2005). Sequential DNA methylation of the Nanog and Oct-4 upstream regions in human NT2 cells during neuronal differentiation. *The Journal of biological chemistry* **280**, 6257-6260.
- Dekker, F. J. & Haisma, H. J. (2009). Histone acetyl transferases as emerging drug targets. *Drug discovery today* **14**, 942-948.
- Delcuve, G. P., Rastegar, M. & Davie, J. R. (2009). Epigenetic control. *Journal of cellular physiology* **219**, 243-250.
- Delmore, J. E., Issa, G. C., Lemieux, M. E., Rahl, P. B., Shi, J., Jacobs, H. M., Kastritis, E., Gilpatrick, T., Paranal, R. M., Qi, J., Chesi, M., Schinzel, A. C., McKeown, M. R., Heffernan, T. P., Vakoc, C. R., Bergsagel, P. L., Ghobrial, I. M., Richardson, P. G., Young, R. A., Hahn, W. C., Anderson, K. C., Kung, A. L., Bradner, J. E. & Mitsiades, C. S. (2011). BET bromodomain inhibition as a therapeutic strategy to target c-Myc. *Cell* **146**, 904-917.
- Delva, L., Bastie, J. N., Rochette-Egly, C., Kraiba, R., Balitrand, N., Despouy, G., Chambon, P. & Chomienne, C. (1999). Physical and functional interactions between cellular retinoic acid binding protein II and the retinoic acid-dependent nuclear complex. *Molecular and cellular biology* **19**, 7158-7167.
- Deng, J., Shoemaker, R., Xie, B., Gore, A., LeProust, E. M., Antosiewicz-Bourget, J., Egli, D., Maherali, N., Park, I. H., Yu, J., Daley, G. Q., Eggan, K., Hochedlinger, K., Thomson, J., Wang, W., Gao, Y. & Zhang, K. (2009). Targeted bisulfite sequencing reveals changes in DNA methylation associated with nuclear reprogramming. *Nature biotechnology* **27**, 353-360.
- Desai, D. & Pethe, P. (2020). Polycomb repressive complex 1: Regulators of neurogenesis from embryonic to adult stage. *Journal of cellular physiology* **235**, 4031-4045.
- Dettlaff, T. A. (1964). Cell Divisions, Duration of Interkinetic States and Differentiation in Early Stages of Embryonic Development. *Advances in morphogenesis* **4**, 323-362.
- Dev, S., Adler, A. J. & Edwards, R. B. (1993). Adult rabbit brain synthesizes retinoic acid. *Brain research* **632**, 325-328.
- Ding, L., Paszkowski-Rogacz, M., Nitzsche, A., Slabicki, M. M., Heninger, A. K., de Vries, I., Kittler, R., Junqueira, M., Shevchenko, A., Schulz, H., Hubner, N., Doss, M. X., Sachinidis, A., Hescheler, J., Iacone, R., Anastassiadis, K., Stewart, A. F., Pisabarro, M. T., Caldarelli, A., Poser, I., Theis, M. & Buchholz, F. (2009). A genome-scale RNAi screen for Oct4 modulators defines a role of the Paf1 complex for embryonic stem cell identity. *Cell stem cell* **4**, 403-415.

- Dmitrovsky, E., Moy, D., Miller, W. H., Jr., Li, A. & Masui, H. (1990). Retinoic acid causes a decline in TGF- α expression, cloning efficiency, and tumorigenicity in a human embryonal cancer cell line. *Oncogene research* **5**, 233-239.
- Dolle, P. (2009). Developmental expression of retinoic acid receptors (RARs). *Nuclear receptor signaling* **7**, e006.
- Dong, C., Wilhelm, D. & Koopman, P. (2004). Sox genes and cancer. *Cytogenetic and genome research* **105**, 442-447.
- Dong, D. & Zile, M. H. (1995). Endogenous retinoids in the early avian embryo. *Biochemical and biophysical research communications* **217**, 1026-1031.
- Donovan, P. J. & de Miguel, M. P. (2003). Turning germ cells into stem cells. *Current opinion in genetics & development* **13**, 463-471.
- Drakulic, D., Vicentic, J. M., Schwirtlich, M., Tomic, J., Krstic, A., Klajn, A. & Stevanovic, M. (2015). The overexpression of SOX2 affects the migration of human teratocarcinoma cell line NT2/D1. *Anais da Academia Brasileira de Ciencias* **87**, 389-404.
- Dunnett, S. B., Kendall, A. L., Watts, C. & Torres, E. M. (1997). Neuronal cell transplantation for Parkinson's and Huntington's diseases. *British medical bulletin* **53**, 757-776.
- Dy, P., Penzo-Mendez, A., Wang, H., Pedraza, C. E., Macklin, W. B. & Lefebvre, V. (2008). The three SoxC proteins--Sox4, Sox11 and Sox12--exhibit overlapping expression patterns and molecular properties. *Nucleic acids research* **36**, 3101-3117.
- Eberle, I., Pless, B., Braun, M., Dingermann, T. & Marschalek, R. (2010). Transcriptional properties of human NANOG1 and NANOG2 in acute leukemic cells. *Nucleic acids research* **38**, 5384-5395.
- Ehrlich, M., Gama-Sosa, M. A., Huang, L. H., Midgett, R. M., Kuo, K. C., McCune, R. A. & Gehrke, C. (1982). Amount and distribution of 5-methylcytosine in human DNA from different types of tissues of cells. *Nucleic acids research* **10**, 2709-2721.
- Einhorn, L. H. (2002). Chemotherapeutic and surgical strategies for germ cell tumors. *Chest surgery clinics of North America* **12**, 695-706.
- Ekonomou, A., Kazanis, I., Malas, S., Wood, H., Alifragis, P., Denaxa, M., Karagogeos, D., Constanti, A., Lovell-Badge, R. & Episkopou, V. (2005). Neuronal migration and ventral subtype identity in the telencephalon depend on SOX1. *PLoS biology* **3**, e186.
- Elsaesser, S. J., Goldberg, A. D. & Allis, C. D. (2010). New functions for an old variant: no substitute for histone H3.3. *Current opinion in genetics & development* **20**, 110-117.
- Esteller, M. (2002). CpG island hypermethylation and tumor suppressor genes: a booming present, a brighter future. *Oncogene* **21**, 5427-5440.
- Etchamendy, N., Enderlin, V., Marighetto, A., Vouimba, R. M., Pallet, V., Jaffard, R. & Higeret, P. (2001). Alleviation of a selective age-related relational memory deficit in mice by pharmacologically induced normalization of brain retinoid signaling. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **21**, 6423-6429.
- Fabbri, M., Garzon, R., Cimmino, A., Liu, Z., Zanesi, N., Callegari, E., Liu, S., Alder, H., Costinean, S., Fernandez-Cymering, C., Volinia, S., Guler, G., Morrison, C.

- D., Chan, K. K., Marcucci, G., Calin, G. A., Huebner, K. & Croce, C. M. (2007). MicroRNA-29 family reverts aberrant methylation in lung cancer by targeting DNA methyltransferases 3A and 3B. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 15805-15810.
- Fabian, M. R. & Sonenberg, N. (2012). The mechanics of miRNA-mediated gene silencing: a look under the hood of miRISC. *Nature structural & molecular biology* **19**, 586-593.
- Fairbanks, D. J., Fairbanks, A. D., Ogden, T. H., Parker, G. J. & Maughan, P. J. (2012). NANOGP8: evolution of a human-specific retro-oncogene. *G3* **2**, 1447-1457.
- Farthing, C. R., Ficz, G., Ng, R. K., Chan, C. F., Andrews, S., Dean, W., Hemberger, M. & Reik, W. (2008). Global mapping of DNA methylation in mouse promoters reveals epigenetic reprogramming of pluripotency genes. *PLoS genetics* **4**, e1000116.
- Favaedi, R., Shahhoseini, M. & Akhoond, M. R. (2012). Comparative epigenetic analysis of Oct4 regulatory region in RA-induced differentiated NT2 cells under adherent and non-adherent culture conditions. *Molecular and cellular biochemistry* **363**, 129-134.
- Favaloro, J., Treisman, R. & Kamen, R. (1980). Transcription maps of polyoma virus-specific RNA: analysis by two-dimensional nuclease S1 gel mapping. *Methods in enzymology* **65**, 718-749.
- Fei, T., Xia, K., Li, Z., Zhou, B., Zhu, S., Chen, H., Zhang, J., Chen, Z., Xiao, H., Han, J. D. & Chen, Y. G. (2010). Genome-wide mapping of SMAD target genes reveals the role of BMP signaling in embryonic stem cell fate determination. *Genome research* **20**, 36-44.
- Feldman, N., Gerson, A., Fang, J., Li, E., Zhang, Y., Shinkai, Y., Cedar, H. & Bergman, Y. (2006). G9a-mediated irreversible epigenetic inactivation of Oct-3/4 during early embryogenesis. *Nature cell biology* **8**, 188-194.
- Ferrari, S., Harley, V. R., Pontiggia, A., Goodfellow, P. N., Lovell-Badge, R. & Bianchi, M. E. (1992). SRY, like HMG1, recognizes sharp angles in DNA. *The EMBO journal* **11**, 4497-4506.
- Festuccia, N., Gonzalez, I. & Navarro, P. (2017). The Epigenetic Paradox of Pluripotent ES Cells. *Journal of molecular biology* **429**, 1476-1503.
- Festuccia, N., Osorno, R., Wilson, V. & Chambers, I. (2013). The role of pluripotency gene regulatory network components in mediating transitions between pluripotent cell states. *Current opinion in genetics & development* **23**, 504-511.
- Foster, J. W. & Graves, J. A. (1994). An SRY-related sequence on the marsupial X chromosome: implications for the evolution of the mammalian testis-determining gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**, 1927-1931.
- Francois, M., Koopman, P. & Beltrame, M. (2010). SoxF genes: Key players in the development of the cardio-vascular system. *The international journal of biochemistry & cell biology* **42**, 445-448.
- Frigerio, G., Burri, M., Bopp, D., Baumgartner, S. & Noll, M. (1986). Structure of the segmentation gene paired and the Drosophila PRD gene set as part of a gene network. *Cell* **47**, 735-746.
- Fujita, J., Crane, A. M., Souza, M. K., Dejosez, M., Kyba, M., Flavell, R. A., Thomson, J. A. & Zwaka, T. P. (2008). Caspase activity mediates the differentiation of embryonic stem cells. *Cell stem cell* **2**, 595-601.

- Fussner, E., Ahmed, K., Dehghani, H., Strauss, M. & Bazett-Jones, D. P. (2010). Changes in chromatin fiber density as a marker for pluripotency. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* **75**, 245-249.
- Gaillard, E., Bruck, N., Brelivet, Y., Bour, G., Lalevee, S., Bauer, A., Poch, O., Moras, D. & Rochette-Egly, C. (2006). Phosphorylation by PKA potentiates retinoic acid receptor alpha activity by means of increasing interaction with and phosphorylation by cyclin H/cdk7. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 9548-9553.
- Gao, X., Tsang, J. C., Gaba, F., Wu, D., Lu, L. & Liu, P. (2014). Comparison of TALE designer transcription factors and the CRISPR/dCas9 in regulation of gene expression by targeting enhancers. *Nucleic acids research* **42**, e155.
- Garcia, I., Aldaregia, J., Marjanovic Vicentic, J., Aldaz, P., Moreno-Cugnon, L., Torres-Bayona, S., Carrasco-Garcia, E., Garros-Regulez, L., Egana, L., Rubio, A., Pollard, S., Stevanovic, M., Sampron, N. & Matheu, A. (2017). Oncogenic activity of SOX1 in glioblastoma. *Scientific reports* **7**, 46575.
- Gardiner-Garden, M. & Frommer, M. (1987). CpG islands in vertebrate genomes. *Journal of molecular biology* **196**, 261-282.
- Garzon, R., Liu, S., Fabbri, M., Liu, Z., Heaphy, C. E., Callegari, E., Schwind, S., Pang, J., Yu, J., Muthusamy, N., Havelange, V., Volinia, S., Blum, W., Rush, L. J., Perrotti, D., Andreeff, M., Bloomfield, C. D., Byrd, J. C., Chan, K., Wu, L. C., Croce, C. M. & Marcucci, G. (2009). MicroRNA-29b induces global DNA hypomethylation and tumor suppressor gene reexpression in acute myeloid leukemia by targeting directly DNMT3A and 3B and indirectly DNMT1. *Blood* **113**, 6411-6418.
- Gawlik-Rzemieniewska, N. & Bednarek, I. (2016). The role of NANOG transcriptional factor in the development of malignant phenotype of cancer cells. *Cancer biology & therapy* **17**, 1-10.
- Gazdzicka, J., Golabek, K., Strzelczyk, J. K. & Ostrowska, Z. (2020). Epigenetic Modifications in Head and Neck Cancer. *Biochemical genetics* **58**, 213-244.
- Germain, P., Chambon, P., Eichele, G., Evans, R. M., Lazar, M. A., Leid, M., De Lera, A. R., Lotan, R., Mangelsdorf, D. J. & Gronemeyer, H. (2006). International Union of Pharmacology. LXIII. Retinoid X receptors. *Pharmacological reviews* **58**, 760-772.
- Gidekel, S. & Bergman, Y. (2002). A unique developmental pattern of Oct-3/4 DNA methylation is controlled by a cis-demodification element. *The Journal of biological chemistry* **277**, 34521-34530.
- Gillespie, R. F. & Gudas, L. J. (2007a). Retinoic acid receptor isotype specificity in F9 teratocarcinoma stem cells results from the differential recruitment of coregulators to retinoic response elements. *The Journal of biological chemistry* **282**, 33421-33434.
- Gillespie, R. F. & Gudas, L. J. (2007b). Retinoid regulated association of transcriptional co-regulators and the polycomb group protein SUZ12 with the retinoic acid response elements of Hoxa1, RARbeta(2), and Cyp26A1 in F9 embryonal carcinoma cells. *Journal of molecular biology* **372**, 298-316.
- Gilmour, D. S. & Lis, J. T. (1984). Detecting protein-DNA interactions in vivo: distribution of RNA polymerase on specific bacterial genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **81**, 4275-4279.

- Glass, C. K. (1994). Differential recognition of target genes by nuclear receptor monomers, dimers, and heterodimers. *Endocrine reviews* **15**, 391-407.
- Glover, J. C., Renaud, J. S. & Rijli, F. M. (2006). Retinoic acid and hindbrain patterning. *Journal of neurobiology* **66**, 705-725.
- Gokbuget, D. & Blelloch, R. (2019). Epigenetic control of transcriptional regulation in pluripotency and early differentiation. *Development* **146**.
- Goldberg, A. D., Banaszynski, L. A., Noh, K. M., Lewis, P. W., Elsaesser, S. J., Stadler, S., Dewell, S., Law, M., Guo, X., Li, X., Wen, D., Chapgier, A., DeKolver, R. C., Miller, J. C., Lee, Y. L., Boydston, E. A., Holmes, M. C., Gregory, P. D., Grealley, J. M., Rafii, S., Yang, C., Scambler, P. J., Garrick, D., Gibbons, R. J., Higgs, D. R., Cristea, I. M., Urnov, F. D., Zheng, D. & Allis, C. D. (2010). Distinct factors control histone variant H3.3 localization at specific genomic regions. *Cell* **140**, 678-691.
- Goodfellow, C. E., Graham, S. E., Dragunow, M. & Glass, M. (2011). Characterization of NTera2/D1 cells as a model system for the investigation of cannabinoid function in human neurons and astrocytes. *Journal of neuroscience research* **89**, 1685-1697.
- Goto, T., Adjaye, J., Rodeck, C. H. & Monk, M. (1999). Identification of genes expressed in human primordial germ cells at the time of entry of the female germ line into meiosis. *Molecular human reproduction* **5**, 851-860.
- Graham, V., Khudyakov, J., Ellis, P. & Pevny, L. (2003). SOX2 functions to maintain neural progenitor identity. *Neuron* **39**, 749-765.
- Graves, J. A. (1998). Interactions between SRY and SOX genes in mammalian sex determination. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* **20**, 264-269.
- Graves, J. A. (2006). Sex chromosome specialization and degeneration in mammals. *Cell* **124**, 901-914.
- Grunstein, M. (1997). Histone acetylation in chromatin structure and transcription. *Nature* **389**, 349-352.
- Gu, P., LeMenuet, D., Chung, A. C., Mancini, M., Wheeler, D. A. & Cooney, A. J. (2005). Orphan nuclear receptor GCNF is required for the repression of pluripotency genes during retinoic acid-induced embryonic stem cell differentiation. *Molecular and cellular biology* **25**, 8507-8519.
- Guan, Z., Zhang, J., Wang, J., Wang, H., Zheng, F., Peng, J., Xu, Y., Yan, M., Liu, B., Cui, B., Huang, Y. & Liu, Q. (2014). SOX1 down-regulates beta-catenin and reverses malignant phenotype in nasopharyngeal carcinoma. *Molecular cancer* **13**, 257.
- Gubbay, J., Collignon, J., Koopman, P., Capel, B., Economou, A., Munsterberg, A., Vivian, N., Goodfellow, P. & Lovell-Badge, R. (1990). A gene mapping to the sex-determining region of the mouse Y chromosome is a member of a novel family of embryonically expressed genes. *Nature* **346**, 245-250.
- Gudas, L. J. (1994). Retinoids and vertebrate development. *The Journal of biological chemistry* **269**, 15399-15402.
- Gudas, L. J. & Wagner, J. A. (2011). Retinoids regulate stem cell differentiation. *Journal of cellular physiology* **226**, 322-330.
- Guillemain, I., Alonso, G., Patey, G., Privat, A. & Chaudieu, I. (2000). Human NT2 neurons express a large variety of neurotransmission phenotypes in vitro. *The Journal of comparative neurology* **422**, 380-395.

- Guo, G., Huss, M., Tong, G. Q., Wang, C., Li Sun, L., Clarke, N. D. & Robson, P. (2010). Resolution of cell fate decisions revealed by single-cell gene expression analysis from zygote to blastocyst. *Developmental cell* **18**, 675-685.
- Guo, J. U., Su, Y., Zhong, C., Ming, G. L. & Song, H. (2011). Hydroxylation of 5-methylcytosine by TET1 promotes active DNA demethylation in the adult brain. *Cell* **145**, 423-434.
- Hackett, J. A. & Surani, M. A. (2014). Regulatory principles of pluripotency: from the ground state up. *Cell stem cell* **15**, 416-430.
- Hale, F. (1935). The relation of vitamin A to anophthalmos in pigs. *American Journal of Ophthalmology* **18**, 1087-1092.
- Hall, I. M., Shankaranarayana, G. D., Noma, K., Ayoub, N., Cohen, A. & Grewal, S. I. (2002). Establishment and maintenance of a heterochromatin domain. *Science* **297**, 2232-2237.
- Hamel, B. C., Smits, A. P., Otten, B. J., van den Helm, B., Ropers, H. H. & Mariman, E. C. (1996). Familial X-linked mental retardation and isolated growth hormone deficiency: clinical and molecular findings. *American journal of medical genetics* **64**, 35-41.
- Han, F., Jiang, X., Li, Z. M., Zhuang, X., Zhang, X., Ouyang, W. M., Liu, W. B., Mao, C. Y., Chen, Q., Huang, C. S., Gao, F., Cui, Z. H., Ao, L., Li, Y. F., Cao, J. & Liu, J. Y. (2020). Epigenetic Inactivation of SOX30 Is Associated with Male Infertility and Offers a Therapy Target for Non-obstructive Azoospermia. *Molecular therapy. Nucleic acids* **19**, 72-83.
- Han, F., Liu, W., Jiang, X., Shi, X., Yin, L., Ao, L., Cui, Z., Li, Y., Huang, C., Cao, J. & Liu, J. (2015). SOX30, a novel epigenetic silenced tumor suppressor, promotes tumor cell apoptosis by transcriptional activating p53 in lung cancer. *Oncogene* **34**, 4391-4402.
- Han, F., Liu, W., Xiao, H., Dong, Y., Sun, L., Mao, C., Yin, L., Jiang, X., Ao, L., Cui, Z., Cao, J. & Liu, J. (2015). High expression of SOX30 is associated with favorable survival in human lung adenocarcinoma. *Scientific reports* **5**, 13630.
- Hansen, T. B., Jensen, T. I., Clausen, B. H., Bramsen, J. B., Finsen, B., Damgaard, C. K. & Kjems, J. (2013). Natural RNA circles function as efficient microRNA sponges. *Nature* **495**, 384-388.
- Hansis, C., Grifo, J. A. & Krey, L. C. (2000). Oct-4 expression in inner cell mass and trophectoderm of human blastocysts. *Molecular human reproduction* **6**, 999-1004.
- Hardcastle, Z. & Papalopulu, N. (2000). Distinct effects of XBF-1 in regulating the cell cycle inhibitor p27(XIC1) and imparting a neural fate. *Development* **127**, 1303-1314.
- Hart, A. H., Hartley, L., Ibrahim, M. & Robb, L. (2004). Identification, cloning and expression analysis of the pluripotency promoting Nanog genes in mouse and human. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* **230**, 187-198.
- Hartley, R. S., Margulis, M., Fishman, P. S., Lee, V. M. & Tang, C. M. (1999). Functional synapses are formed between human NTera2 (NT2N, hNT) neurons grown on astrocytes. *The Journal of comparative neurology* **407**, 1-10.
- Hassani, S. N., Moradi, S., Taleahmad, S., Braun, T. & Baharvand, H. (2018). Transition of inner cell mass to embryonic stem cells: mechanisms, facts, and hypotheses. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*.

- Hendrich, B. & Bird, A. (1998). Identification and characterization of a family of mammalian methyl-CpG binding proteins. *Molecular and cellular biology* **18**, 6538-6547.
- Hepburn, A. C., Steele, R. E., Veeratterapillay, R., Wilson, L., Kounatidou, E. E., Barnard, A., Berry, P., Cassidy, J. R., Moad, M., El-Sherif, A., Gaughan, L., Mills, I. G., Robson, C. N. & Heer, R. (2019). The induction of core pluripotency master regulators in cancers defines poor clinical outcomes and treatment resistance. *Oncogene* **38**, 4412-4424.
- Herman, J. G., Graff, J. R., Myohanen, S., Nelkin, B. D. & Baylin, S. B. (1996). Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**, 9821-9826.
- Higashijima, Y. & Kanki, Y. (2019). Molecular mechanistic insights: The emerging role of SOXF transcription factors in tumorigenesis and development. *Seminars in cancer biology*.
- Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G. & Watson, R. (1993). Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Bio/technology* **11**, 1026-1030.
- Hirabayashi, Y. & Gotoh, Y. (2010). Epigenetic control of neural precursor cell fate during development. *Nature reviews. Neuroscience* **11**, 377-388.
- Ho, L. & Crabtree, G. R. (2010). Chromatin remodelling during development. *Nature* **463**, 474-484.
- Hoei-Hansen, C. E., Almstrup, K., Nielsen, J. E., Brask Sonne, S., Graem, N., Skakkebaek, N. E., Leffers, H. & Rajpert-De Meyts, E. (2005). Stem cell pluripotency factor NANOG is expressed in human fetal gonocytes, testicular carcinoma in situ and germ cell tumours. *Histopathology* **47**, 48-56.
- Hoffmann, M. J., Muller, M., Engers, R. & Schulz, W. A. (2006). Epigenetic control of CTCFL/BORIS and OCT4 expression in urogenital malignancies. *Biochemical pharmacology* **72**, 1577-1588.
- Hol, F. A., Schepens, M. T., van Beersum, S. E., Redolfi, E., Affer, M., Vezzoni, P., Hamel, B. C., Karnes, P. S., Mariman, E. C. & Zucchi, I. (2000). Identification and characterization of an Xq26-q27 duplication in a family with spina bifida and panhypopituitarism suggests the involvement of two distinct genes. *Genomics* **69**, 174-181.
- Holland, L. Z., Schubert, M., Holland, N. D. & Neuman, T. (2000). Evolutionary conservation of the presumptive neural plate markers *AmphiSox1/2/3* and *AmphiNeurogenin* in the invertebrate chordate amphioxus. *Developmental biology* **226**, 18-33.
- Hombach, S. & Kretz, M. (2016). Non-coding RNAs: Classification, Biology and Functioning. *Advances in experimental medicine and biology* **937**, 3-17.
- Honecker, F., Rohlfing, T., Harder, S., Braig, M., Gillis, A. J., Glaesener, S., Barrett, C., Bokemeyer, C., Buck, F., Brummendorf, T. H., Looijenga, L. H. & Balabanov, S. (2014). Proteome analysis of the effects of all-trans retinoic acid on human germ cell tumor cell lines. *Journal of proteomics* **96**, 300-313.
- Honecker, F., Stoop, H., Mayer, F., Bokemeyer, C., Castrillon, D. H., Lau, Y. F., Looijenga, L. H. & Oosterhuis, J. W. (2006). Germ cell lineage differentiation in non-seminomatous germ cell tumours. *The Journal of pathology* **208**, 395-400.

- Horvath, J. E., Bailey, J. A., Locke, D. P. & Eichler, E. E. (2001). Lessons from the human genome: transitions between euchromatin and heterochromatin. *Human molecular genetics* **10**, 2215-2223.
- Hou, L., Srivastava, Y. & Jauch, R. (2017). Molecular basis for the genome engagement by Sox proteins. *Seminars in cell & developmental biology* **63**, 2-12.
- Houldsworth, J., Heath, S. C., Bosl, G. J., Studer, L. & Chaganti, R. S. (2002). Expression profiling of lineage differentiation in pluripotential human embryonal carcinoma cells. *Cell growth & differentiation : the molecular biology journal of the American Association for Cancer Research* **13**, 257-264.
- Hsu, Y. W., Huang, R. L., Su, P. H., Chen, Y. C., Wang, H. C., Liao, C. C. & Lai, H. C. (2017). Genotype-specific methylation of HPV in cervical intraepithelial neoplasia. *Journal of gynecologic oncology* **28**, e56.
- Hu, G., Kim, J., Xu, Q., Leng, Y., Orkin, S. H. & Elledge, S. J. (2009). A genome-wide RNAi screen identifies a new transcriptional module required for self-renewal. *Genes & development* **23**, 837-848.
- Hu, N., Strobl-Mazzulla, P., Sauka-Spengler, T. & Bronner, M. E. (2012). DNA methyltransferase3A as a molecular switch mediating the neural tube-to-neural crest fate transition. *Genes & development* **26**, 2380-2385.
- Huang, C., Xiang, Y., Wang, Y., Li, X., Xu, L., Zhu, Z., Zhang, T., Zhu, Q., Zhang, K., Jing, N. & Chen, C. D. (2010). Dual-specificity histone demethylase KIAA1718 (KDM7A) regulates neural differentiation through FGF4. *Cell research* **20**, 154-165.
- Huang, H. S., Redmond, T. M., Kubish, G. M., Gupta, S., Thompson, R. C., Turner, D. L. & Uhler, M. D. (2015). Transcriptional regulatory events initiated by Ascl1 and Neurog2 during neuronal differentiation of P19 embryonic carcinoma cells. *Journal of molecular neuroscience : MN* **55**, 684-705.
- Humphries, B., Wang, Z. & Yang, C. (2019). MicroRNA Regulation of Epigenetic Modifiers in Breast Cancer. *Cancers* **11**.
- Hurlbert, M. S., Gianani, R. I., Hutt, C., Freed, C. R. & Kaddis, F. G. (1999). Neural transplantation of hNT neurons for Huntington's disease. *Cell transplantation* **8**, 143-151.
- Ijpenberg, A., Tan, N. S., Gelman, L., Kersten, S., Seydoux, J., Xu, J., Metzger, D., Canaple, L., Chambon, P., Wahli, W. & Desvergne, B. (2004). In vivo activation of PPAR target genes by RXR homodimers. *The EMBO journal* **23**, 2083-2091.
- Ikushima, H., Todo, T., Ino, Y., Takahashi, M., Miyazawa, K. & Miyazono, K. (2009). Autocrine TGF-beta signaling maintains tumorigenicity of glioma-initiating cells through Sry-related HMG-box factors. *Cell stem cell* **5**, 504-514.
- Jacobs, S., Lie, D. C., DeCicco, K. L., Shi, Y., DeLuca, L. M., Gage, F. H. & Evans, R. M. (2006). Retinoic acid is required early during adult neurogenesis in the dentate gyrus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 3902-3907.
- Jaenisch, R., Harbers, K., Jahner, D., Stewart, C. & Stuhlmann, H. (1982). DNA methylation, retroviruses, and embryogenesis. *Journal of cellular biochemistry* **20**, 331-336.
- Jenuwein, T. & Allis, C. D. (2001). Translating the histone code. *Science* **293**, 1074-1080.

- Jerabek, S., Merino, F., Scholer, H. R. & Cojocaru, V. (2014). OCT4: dynamic DNA binding pioneers stem cell pluripotency. *Biochimica et biophysica acta* **1839**, 138-154.
- Ji, E. H. & Kim, J. (2016). SoxD Transcription Factors: Multifaceted Players of Neural Development. *International journal of stem cells* **9**, 3-8.
- John, R. M. & Rougeulle, C. (2018). Developmental Epigenetics: Phenotype and the Flexible Epigenome. *Frontiers in cell and developmental biology* **6**, 130.
- Jones, P. L., Veenstra, G. J., Wade, P. A., Vermaak, D., Kass, S. U., Landsberger, N., Strouboulis, J. & Wolffe, A. P. (1998). Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. *Nature genetics* **19**, 187-191.
- Jonkers, I., Kwak, H. & Lis, J. T. (2014). Genome-wide dynamics of Pol II elongation and its interplay with promoter proximal pausing, chromatin, and exons. *eLife* **3**, e02407.
- Juan, A. H., Kumar, R. M., Marx, J. G., Young, R. A. & Sartorelli, V. (2009). Mir-214-dependent regulation of the polycomb protein Ezh2 in skeletal muscle and embryonic stem cells. *Molecular cell* **36**, 61-74.
- Kalmar, T., Lim, C., Hayward, P., Munoz-Descalzo, S., Nichols, J., Garcia-Ojalvo, J. & Martinez Arias, A. (2009). Regulated fluctuations in nanog expression mediate cell fate decisions in embryonic stem cells. *PLoS biology* **7**, e1000149.
- Kamachi, Y. & Kondoh, H. (2013). Sox proteins: regulators of cell fate specification and differentiation. *Development* **140**, 4129-4144.
- Kamachi, Y., Uchikawa, M., Collignon, J., Lovell-Badge, R. & Kondoh, H. (1998). Involvement of Sox1, 2 and 3 in the early and subsequent molecular events of lens induction. *Development* **125**, 2521-2532.
- Kamachi, Y., Uchikawa, M., Tanouchi, A., Sekido, R. & Kondoh, H. (2001). Pax6 and SOX2 form a co-DNA-binding partner complex that regulates initiation of lens development. *Genes & development* **15**, 1272-1286.
- Kameneva, P. & Adameyko, I. (2019). Recent advances in our understanding of central and peripheral nervous system progenitors. *Current opinion in cell biology* **61**, 24-30.
- Kanhere, A., Viiri, K., Araujo, C. C., Rasaiyaah, J., Bouwman, R. D., Whyte, W. A., Pereira, C. F., Brookes, E., Walker, K., Bell, G. W., Pombo, A., Fisher, A. G., Young, R. A. & Jenner, R. G. (2010). Short RNAs are transcribed from repressed polycomb target genes and interact with polycomb repressive complex-2. *Molecular cell* **38**, 675-688.
- Kapusta, A., Kronenberg, Z., Lynch, V. J., Zhuo, X., Ramsay, L., Bourque, G., Yandell, M. & Feschotte, C. (2013). Transposable elements are major contributors to the origin, diversification, and regulation of vertebrate long noncoding RNAs. *PLoS genetics* **9**, e1003470.
- Katoh, K. & Miyata, T. (1999). A heuristic approach of maximum likelihood method for inferring phylogenetic tree and an application to the mammalian SOX-3 origin of the testis-determining gene SRY. *FEBS letters* **463**, 129-132.
- Kaur, M., Singh, A., Singh, K., Gupta, S. & Sachan, M. (2016). Development of a multiplex MethyLight assay for the detection of DAPK1 and SOX1 methylation in epithelial ovarian cancer in a north Indian population. *Genes & genetic systems* **91**, 175-181.

- Kehler, J., Tolkunova, E., Koschorz, B., Pesce, M., Gentile, L., Boiani, M., Lomeli, H., Nagy, A., McLaughlin, K. J., Scholer, H. R. & Tomilin, A. (2004). Oct4 is required for primordial germ cell survival. *EMBO reports* **5**, 1078-1083.
- Kelberman, D., Rizzoti, K., Avilion, A., Bitner-Glindzicz, M., Cianfarani, S., Collins, J., Chong, W. K., Kirk, J. M., Achermann, J. C., Ross, R., Carmignac, D., Lovell-Badge, R., Robinson, I. C. & Dattani, M. T. (2006). Mutations within Sox2/SOX2 are associated with abnormalities in the hypothalamo-pituitary-gonadal axis in mice and humans. *The Journal of clinical investigation* **116**, 2442-2455.
- Kiefer, J. C. (2007). Back to basics: Sox genes. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* **236**, 2356-2366.
- Kim, J., Kollhoff, A., Bergmann, A. & Stubbs, L. (2003). Methylation-sensitive binding of transcription factor YY1 to an insulator sequence within the paternally expressed imprinted gene, Peg3. *Human molecular genetics* **12**, 233-245.
- Kim, K., Doi, A., Wen, B., Ng, K., Zhao, R., Cahan, P., Kim, J., Aryee, M. J., Ji, H., Ehrlich, L. I., Yabuuchi, A., Takeuchi, A., Cunniff, K. C., Hongguang, H., McKinney-Freeman, S., Naveiras, O., Yoon, T. J., Irizarry, R. A., Jung, N., Seita, J., Hanna, J., Murakami, P., Jaenisch, R., Weissleder, R., Orkin, S. H., Weissman, I. L., Feinberg, A. P. & Daley, G. Q. (2010). Epigenetic memory in induced pluripotent stem cells. *Nature* **467**, 285-290.
- Kim, R., Trubetsky, A., Suzuki, T., Jenkins, N. A., Copeland, N. G. & Lenz, J. (2003). Genome-based identification of cancer genes by proviral tagging in mouse retrovirus-induced T-cell lymphomas. *Journal of virology* **77**, 2056-2062.
- Kim, T. H. & Dekker, J. (2018). ChIP-Quantitative Polymerase Chain Reaction (ChIP-qPCR). *Cold Spring Harbor protocols* **2018**.
- Klajn, A., Drakulic, D., Tosic, M., Pavkovic, Z., Schwirtlich, M. & Stevanovic, M. (2014). SOX2 overexpression affects neural differentiation of human pluripotent NT2/D1 cells. *Biochemistry. Biokhimiia* **79**, 1172-1182.
- Knauss, J. L., Miao, N., Kim, S. N., Nie, Y., Shi, Y., Wu, T., Pinto, H. B., Donohoe, M. E. & Sun, T. (2018). Long noncoding RNA Sox2ot and transcription factor YY1 co-regulate the differentiation of cortical neural progenitors by repressing Sox2. *Cell death & disease* **9**, 799.
- Kobayashi, H. & Kikyo, N. (2015). Epigenetic regulation of open chromatin in pluripotent stem cells. *Translational research : the journal of laboratory and clinical medicine* **165**, 18-27.
- Kobayashi, M. & Srour, E. F. (2011). Regulation of murine hematopoietic stem cell quiescence by Dmtf1. *Blood* **118**, 6562-6571.
- Koche, R. P., Smith, Z. D., Adli, M., Gu, H., Ku, M., Gnirke, A., Bernstein, B. E. & Meissner, A. (2011). Reprogramming factor expression initiates widespread targeted chromatin remodeling. *Cell stem cell* **8**, 96-105.
- Koh, K. P., Yabuuchi, A., Rao, S., Huang, Y., Cunniff, K., Nardone, J., Laiho, A., Tahiliani, M., Sommer, C. A., Mostoslavsky, G., Lahesmaa, R., Orkin, S. H., Rodig, S. J., Daley, G. Q. & Rao, A. (2011). Tet1 and Tet2 regulate 5-hydroxymethylcytosine production and cell lineage specification in mouse embryonic stem cells. *Cell stem cell* **8**, 200-213.
- Kondoh, H. & Kamachi, Y. (2010). SOX-partner code for cell specification: Regulatory target selection and underlying molecular mechanisms. *The international journal of biochemistry & cell biology* **42**, 391-399.

- Kondoh, H., Uchikawa, M. & Kamachi, Y. (2004). Interplay of Pax6 and SOX2 in lens development as a paradigm of genetic switch mechanisms for cell differentiation. *The International journal of developmental biology* **48**, 819-827.
- Kondziolka, D., Steinberg, G. K., Wechsler, L., Meltzer, C. C., Elder, E., Gebel, J., Decesare, S., Jovin, T., Zafonte, R., Lebowitz, J., Flickinger, J. C., Tong, D., Marks, M. P., Jamieson, C., Luu, D., Bell-Stephens, T. & Teraoka, J. (2005). Neurotransplantation for patients with subcortical motor stroke: a phase 2 randomized trial. *Journal of neurosurgery* **103**, 38-45.
- Kondziolka, D., Wechsler, L., Gebel, J., DeCesare, S., Elder, E. & Meltzer, C. C. (2003). Neuronal transplantation for motor stroke: from the laboratory to the clinic. *Physical medicine and rehabilitation clinics of North America* **14**, S153-160, xi.
- Kondziolka, D., Wechsler, L., Goldstein, S., Meltzer, C., Thulborn, K. R., Gebel, J., Jannetta, P., DeCesare, S., Elder, E. M., McGrogan, M., Reitman, M. A. & Bynum, L. (2000). Transplantation of cultured human neuronal cells for patients with stroke. *Neurology* **55**, 565-569.
- Kornberg, R. D. (1974). Chromatin structure: a repeating unit of histones and DNA. *Science* **184**, 868-871.
- Kouzarides, T. (2007). Chromatin modifications and their function. *Cell* **128**, 693-705.
- Kovacevic Grujicic, N., Mojsin, M., Krstic, A. & Stevanovic, M. (2005). Functional characterization of the human SOX3 promoter: identification of transcription factors implicated in basal promoter activity. *Gene* **344**, 287-297.
- Krstic, A., Mojsin, M. & Stevanovic, M. (2007). Regulation of SOX3 gene expression is driven by multiple NF-Y binding elements. *Archives of biochemistry and biophysics* **467**, 163-173.
- Kuasne, H., Colus, I. M., Busso, A. F., Hernandez-Vargas, H., Barros-Filho, M. C., Marchi, F. A., Scapulatempo-Neto, C., Faria, E. F., Lopes, A., Guimaraes, G. C., Herceg, Z. & Rogatto, S. R. (2015). Genome-wide methylation and transcriptome analysis in penile carcinoma: uncovering new molecular markers. *Clinical epigenetics* **7**, 46.
- Kumar, P. & Mistri, T. K. (2019). Transcription factors in SOX family: Potent regulators for cancer initiation and development in the human body. *Seminars in cancer biology*.
- Kuo, I. Y., Chang, J. M., Jiang, S. S., Chen, C. H., Chang, I. S., Sheu, B. S., Lu, P. J., Chang, W. L., Lai, W. W. & Wang, Y. C. (2014). Prognostic CpG methylation biomarkers identified by methylation array in esophageal squamous cell carcinoma patients. *International journal of medical sciences* **11**, 779-787.
- Kurie, J. M., Buck, J., Eppinger, T. M., Moy, D. & Dmitrovsky, E. (1993). 9-cis and all-trans retinoic acid induce a similar phenotype in human teratocarcinoma cells. *Differentiation; research in biological diversity* **54**, 123-129.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Laga, A. C., Lai, C. Y., Zhan, Q., Huang, S. J., Velazquez, E. F., Yang, Q., Hsu, M. Y. & Murphy, G. F. (2010). Expression of the embryonic stem cell transcription factor SOX2 in human skin: relevance to melanocyte and merkel cell biology. *The American journal of pathology* **176**, 903-913.
- Lagerstrom-Fermer, M., Sundvall, M., Johnsen, E., Warne, G. L., Forrest, S. M., Zajac, J. D., Rickards, A., Ravine, D., Landegren, U. & Pettersson, U. (1997). X-linked

- recessive panhypopituitarism associated with a regional duplication in Xq25-q26. *American journal of human genetics* **60**, 910-916.
- Lagos, D., Pollara, G., Henderson, S., Gratrix, F., Fabani, M., Milne, R. S., Gotch, F. & Boshoff, C. (2010). miR-132 regulates antiviral innate immunity through suppression of the p300 transcriptional co-activator. *Nature cell biology* **12**, 513-519.
- Lai, H. C., Lin, Y. W., Huang, T. H., Yan, P., Huang, R. L., Wang, H. C., Liu, J., Chan, M. W., Chu, T. Y., Sun, C. A., Chang, C. C. & Yu, M. H. (2008). Identification of novel DNA methylation markers in cervical cancer. *International journal of cancer* **123**, 161-167.
- Lai, H. C., Wang, Y. C., Yu, M. H., Huang, R. L., Yuan, C. C., Chen, K. J., Wu, C. C., Chiang, K. J. & Chao, T. K. (2014). DNA methylation as a biomarker for the detection of hidden carcinoma in endometrial atypical hyperplasia. *Gynecologic oncology* **135**, 552-559.
- Lander, E. S., Linton, L. M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M. C., Baldwin, J., Devon, K., Dewar, K., Doyle, M., FitzHugh, W., Funke, R., Gage, D., Harris, K., Heaford, A., Howland, J., Kann, L., Lehoczky, J., LeVine, R., McEwan, P., McKernan, K., Meldrim, J., Mesirov, J. P., Miranda, C., Morris, W., Naylor, J., Raymond, C., Rosetti, M., Santos, R., Sheridan, A., Sougnez, C., Stange-Thomann, Y., Stojanovic, N., Subramanian, A., Wyman, D., Rogers, J., Sulston, J., Ainscough, R., Beck, S., Bentley, D., Burton, J., Clee, C., Carter, N., Coulson, A., Deadman, R., Deloukas, P., Dunham, A., Dunham, I., Durbin, R., French, L., Grafham, D., Gregory, S., Hubbard, T., Humphray, S., Hunt, A., Jones, M., Lloyd, C., McMurray, A., Matthews, L., Mercer, S., Milne, S., Mullikin, J. C., Mungall, A., Plumb, R., Ross, M., Shownkeen, R., Sims, S., Waterston, R. H., Wilson, R. K., Hillier, L. W., McPherson, J. D., Marra, M. A., Mardis, E. R., Fulton, L. A., Chinwalla, A. T., Pepin, K. H., Gish, W. R., Chissole, S. L., Wendl, M. C., Delehaunty, K. D., Miner, T. L., Delehaunty, A., Kramer, J. B., Cook, L. L., Fulton, R. S., Johnson, D. L., Minx, P. J., Clifton, S. W., Hawkins, T., Branscomb, E., Predki, P., Richardson, P., Wenning, S., Slezak, T., Doggett, N., Cheng, J. F., Olsen, A., Lucas, S., Elkin, C., Uberbacher, E., Frazier, M., Gibbs, R. A., Muzny, D. M., Scherer, S. E., Bouck, J. B., Sodergren, E. J., Worley, K. C., Rives, C. M., Gorrell, J. H., Metzker, M. L., Naylor, S. L., Kucherlapati, R. S., Nelson, D. L., Weinstock, G. M., Sakaki, Y., Fujiyama, A., Hattori, M., Yada, T., Toyoda, A., Itoh, T., Kawagoe, C., Watanabe, H., Totoki, Y., Taylor, T., Weissenbach, J., Heilig, R., Saurin, W., Artiguenave, F., Brottier, P., Bruls, T., Pelletier, E., Robert, C., Wincker, P., Smith, D. R., Doucette-Stamm, L., Rubenfield, M., Weinstock, K., Lee, H. M., Dubois, J., Rosenthal, A., Platzer, M., Nyakatura, G., Taudien, S., Rump, A., Yang, H., Yu, J., Wang, J., Huang, G., Gu, J., Hood, L., Rowen, L., Madan, A., Qin, S., Davis, R. W., Federspiel, N. A., Abola, A. P., Proctor, M. J., Myers, R. M., Schmutz, J., Dickson, M., Grimwood, J., Cox, D. R., Olson, M. V., Kaul, R., Raymond, C., Shimizu, N., Kawasaki, K., Minoshima, S., Evans, G. A., Athanasiou, M., Schultz, R., Roe, B. A., Chen, F., Pan, H., Ramser, J., Lehrach, H., Reinhardt, R., McCombie, W. R., de la Bastide, M., Dedhia, N., Blocker, H., Hornischer, K., Nordsiek, G., Agarwala, R., Aravind, L., Bailey, J. A., Bateman, A., Batzoglou, S., Birney, E., Bork, P., Brown, D. G., Burge, C. B., Cerutti, L., Chen, H. C., Church, D., Clamp, M., Copley, R. R., Doerks, T., Eddy, S. R.,

- Eichler, E. E., Furey, T. S., Galagan, J., Gilbert, J. G., Harmon, C., Hayashizaki, Y., Haussler, D., Hermjakob, H., Hokamp, K., Jang, W., Johnson, L. S., Jones, T. A., Kasif, S., Kasprzyk, A., Kennedy, S., Kent, W. J., Kitts, P., Koonin, E. V., Korf, I., Kulp, D., Lancet, D., Lowe, T. M., McLysaght, A., Mikkelsen, T., Moran, J. V., Mulder, N., Pollara, V. J., Ponting, C. P., Schuler, G., Schultz, J., Slater, G., Smit, A. F., Stupka, E., Szustakowki, J., Thierry-Mieg, D., Thierry-Mieg, J., Wagner, L., Wallis, J., Wheeler, R., Williams, A., Wolf, Y. I., Wolfe, K. H., Yang, S. P., Yeh, R. F., Collins, F., Guyer, M. S., Peterson, J., Felsenfeld, A., Wetterstrand, K. A., Patrinos, A., Morgan, M. J., de Jong, P., Catanese, J. J., Osoegawa, K., Shizuya, H., Choi, S., Chen, Y. J., Szustakowki, J. & International Human Genome Sequencing, C. (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* **409**, 860-921.
- Langston, A. W. & Gudas, L. J. (1992). Identification of a retinoic acid responsive enhancer 3' of the murine homeobox gene Hox-1.6. *Mechanisms of development* **38**, 217-227.
- LaRosa, G. J. & Gudas, L. J. (1988). An early effect of retinoic acid: cloning of an mRNA (Era-1) exhibiting rapid and protein synthesis-independent induction during teratocarcinoma stem cell differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **85**, 329-333.
- Lauberth, S. M., Nakayama, T., Wu, X., Ferris, A. L., Tang, Z., Hughes, S. H. & Roeder, R. G. (2013). H3K4me3 interactions with TAF3 regulate preinitiation complex assembly and selective gene activation. *Cell* **152**, 1021-1036.
- Laudet V, G. H. (2002). *The Nuclear Receptor Factsbook*. San Diego: Academic Press.
- Laumonier, F., Ronce, N., Hamel, B. C., Thomas, P., Lespinasse, J., Raynaud, M., Paringaux, C., Van Bokhoven, H., Kalscheuer, V., Fryns, J. P., Chelly, J., Moraine, C. & Briault, S. (2002). Transcription factor SOX3 is involved in X-linked mental retardation with growth hormone deficiency. *American journal of human genetics* **71**, 1450-1455.
- Lawson, K. A., Meneses, J. J. & Pedersen, R. A. (1991). Clonal analysis of epiblast fate during germ layer formation in the mouse embryo. *Development* **113**, 891-911.
- Leao, R., Ahmad, A. E. & Hamilton, R. J. (2019). Testicular Cancer Biomarkers: A Role for Precision Medicine in Testicular Cancer. *Clinical genitourinary cancer* **17**, e176-e183.
- Lee, D. S., Shin, J. Y., Tonge, P. D., Puri, M. C., Lee, S., Park, H., Lee, W. C., Hussein, S. M., Bleazard, T., Yun, J. Y., Kim, J., Li, M., Cloonan, N., Wood, D., Clancy, J. L., Mosbergen, R., Yi, J. H., Yang, K. S., Kim, H., Rhee, H., Wells, C. A., Preiss, T., Grimmond, S. M., Rogers, I. M., Nagy, A. & Seo, J. S. (2014). An epigenomic roadmap to induced pluripotency reveals DNA methylation as a reprogramming modulator. *Nature communications* **5**, 5619.
- Lee, E. R., Murdoch, F. E. & Fritsch, M. K. (2007). High histone acetylation and decreased polycomb repressive complex 2 member levels regulate gene specific transcriptional changes during early embryonic stem cell differentiation induced by retinoic acid. *Stem cells* **25**, 2191-2199.
- Lee, K. B., Folger, J. K., Rajput, S. K. & Smith, G. W. (2014). Temporal regulation of mRNAs for select bone morphogenetic proteins (BMP), BMP receptors and their associated SMAD proteins during bovine early embryonic development: effects of exogenous BMP2 on embryo developmental progression. *Reproductive biology and endocrinology : RB&E* **12**, 67.

- Lee, T. I., Jenner, R. G., Boyer, L. A., Guenther, M. G., Levine, S. S., Kumar, R. M., Chevalier, B., Johnstone, S. E., Cole, M. F., Isono, K., Koseki, H., Fuchikami, T., Abe, K., Murray, H. L., Zucker, J. P., Yuan, B., Bell, G. W., Herbolsheimer, E., Hannett, N. M., Sun, K., Odom, D. T., Otte, A. P., Volkert, T. L., Bartel, D. P., Melton, D. A., Gifford, D. K., Jaenisch, R. & Young, R. A. (2006). Control of developmental regulators by Polycomb in human embryonic stem cells. *Cell* **125**, 301-313.
- Lee, V. M., Hartley, R. S. & Trojanowski, J. Q. (2000). Neurobiology of human neurons (NT2N) grafted into mouse spinal cord: implications for improving therapy of spinal cord injury. *Progress in brain research* **128**, 299-307.
- Lefebvre, P., Benomar, Y. & Staels, B. (2010). Retinoid X receptors: common heterodimerization partners with distinct functions. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* **21**, 676-683.
- Lefebvre, V. (2010). The SoxD transcription factors--Sox5, Sox6, and Sox13--are key cell fate modulators. *The international journal of biochemistry & cell biology* **42**, 429-432.
- Lefebvre, V. & Bhattaram, P. (2016). SOXC Genes and the Control of Skeletogenesis. *Current osteoporosis reports* **14**, 32-38.
- Lefebvre, V. & de Crombrughe, B. (1998). Toward understanding SOX9 function in chondrocyte differentiation. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology* **16**, 529-540.
- Lefebvre, V., Dumitriu, B., Penzo-Mendez, A., Han, Y. & Pallavi, B. (2007). Control of cell fate and differentiation by Sry-related high-mobility-group box (Sox) transcription factors. *The international journal of biochemistry & cell biology* **39**, 2195-2214.
- Legube, G. & Trouche, D. (2003). Regulating histone acetyltransferases and deacetylases. *EMBO reports* **4**, 944-947.
- Lenardo, M. J., Staudt, L., Robbins, P., Kuang, A., Mulligan, R. C. & Baltimore, D. (1989). Repression of the IgH enhancer in teratocarcinoma cells associated with a novel octamer factor. *Science* **243**, 544-546.
- Lengner, C. J., Camargo, F. D., Hochedlinger, K., Welstead, G. G., Zaidi, S., Gokhale, S., Scholer, H. R., Tomilin, A. & Jaenisch, R. (2007). Oct4 expression is not required for mouse somatic stem cell self-renewal. *Cell stem cell* **1**, 403-415.
- Leyboldt, F., Lewerenz, J. & Methner, A. (2001). Identification of genes up-regulated by retinoic-acid-induced differentiation of the human neuronal precursor cell line NTERA-2 cl.D1. *Journal of neurochemistry* **76**, 806-814.
- Li, A. S., Siu, M. K., Zhang, H., Wong, E. S., Chan, K. Y., Ngan, H. Y. & Cheung, A. N. (2008). Hypermethylation of SOX2 gene in hydatidiform mole and choriocarcinoma. *Reproductive sciences* **15**, 735-744.
- Li, E., Beard, C. & Jaenisch, R. (1993). Role for DNA methylation in genomic imprinting. *Nature* **366**, 362-365.
- Li, G., Margueron, R., Hu, G., Stokes, D., Wang, Y. H. & Reinberg, D. (2010). Highly compacted chromatin formed in vitro reflects the dynamics of transcription activation in vivo. *Molecular cell* **38**, 41-53.
- Li, J. Y., Pu, M. T., Hirasawa, R., Li, B. Z., Huang, Y. N., Zeng, R., Jing, N. H., Chen, T., Li, E., Sasaki, H. & Xu, G. L. (2007). Synergistic function of DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b in the methylation of Oct4 and Nanog. *Molecular and cellular biology* **27**, 8748-8759.

- Li, K., Wang, R. W., Jiang, Y. G., Zou, Y. B. & Guo, W. (2013). Overexpression of Sox3 is associated with diminished prognosis in esophageal squamous cell carcinoma. *Annals of surgical oncology* **20 Suppl 3**, S459-466.
- Li, L. C. & Dahiya, R. (2002). MethPrimer: designing primers for methylation PCRs. *Bioinformatics* **18**, 1427-1431.
- Li, M. & Izpisua Belmonte, J. C. (2018). Deconstructing the pluripotency gene regulatory network. *Nature cell biology* **20**, 382-392.
- Li, N. & Li, S. (2015). Epigenetic inactivation of SOX1 promotes cell migration in lung cancer. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* **36**, 4603-4610.
- Li, Z., Shen, J., Wu, W. K., Wang, X., Liang, J., Qiu, G. & Liu, J. (2012). Vitamin A deficiency induces congenital spinal deformities in rats. *PLoS one* **7**, e46565.
- Liang, Z., Xu, J. & Gu, C. (2019). Novel role of the SRY-related high-mobility-group box D gene in cancer. *Seminars in cancer biology*.
- Lilly, A. J., Lacaud, G. & Kouskoff, V. (2017). SOXF transcription factors in cardiovascular development. *Seminars in cell & developmental biology* **63**, 50-57.
- Lin, N., Chang, K. Y., Li, Z., Gates, K., Rana, Z. A., Dang, J., Zhang, D., Han, T., Yang, C. S., Cunningham, T. J., Head, S. R., Dueter, G., Dong, P. D. & Rana, T. M. (2014). An evolutionarily conserved long noncoding RNA TUNA controls pluripotency and neural lineage commitment. *Molecular cell* **53**, 1005-1019.
- Lin, Y. W., Tsao, C. M., Yu, P. N., Shih, Y. L., Lin, C. H. & Yan, M. D. (2013). SOX1 suppresses cell growth and invasion in cervical cancer. *Gynecologic oncology* **131**, 174-181.
- Lincoln, J., Kist, R., Scherer, G. & Yutzey, K. E. (2007). Sox9 is required for precursor cell expansion and extracellular matrix organization during mouse heart valve development. *Developmental biology* **305**, 120-132.
- Lindeman, L. C., Winata, C. L., Aanes, H., Mathavan, S., Alestrom, P. & Collas, P. (2010). Chromatin states of developmentally-regulated genes revealed by DNA and histone methylation patterns in zebrafish embryos. *The International journal of developmental biology* **54**, 803-813.
- Linker, C. & Stern, C. D. (2004). Neural induction requires BMP inhibition only as a late step, and involves signals other than FGF and Wnt antagonists. *Development* **131**, 5671-5681.
- Lister, R., Pelizzola, M., Kida, Y. S., Hawkins, R. D., Nery, J. R., Hon, G., Antosiewicz-Bourget, J., O'Malley, R., Castanon, R., Klugman, S., Downes, M., Yu, R., Stewart, R., Ren, B., Thomson, J. A., Evans, R. M. & Ecker, J. R. (2011). Hotspots of aberrant epigenomic reprogramming in human induced pluripotent stem cells. *Nature* **471**, 68-73.
- Liu, G., David, B. T., Trawczynski, M. & Fessler, R. G. (2020). Advances in Pluripotent Stem Cells: History, Mechanisms, Technologies, and Applications. *Stem cell reviews and reports* **16**, 3-32.
- Liu, L., Liu, C., Zhang, Q., Shen, J., Zhang, H., Shan, J., Duan, G., Guo, D., Chen, X., Cheng, J., Xu, Y., Yang, Z., Yao, C., Lai, M. & Qian, C. (2016). SIRT1-mediated transcriptional regulation of SOX2 is important for self-renewal of liver cancer stem cells. *Hepatology* **64**, 814-827.

- Liu, X. Y., Fan, Y. C., Gao, S., Zhao, J., Chen, L. Y., Li, F. & Wang, K. (2017). Methylation of SOX1 and VIM promoters in serum as potential biomarkers for hepatocellular carcinoma. *Neoplasma* **64**, 745-753.
- Liu, Z. Q., Mahmood, T. & Yang, P. C. (2014). Western blot: technique, theory and trouble shooting. *North American journal of medical sciences* **6**, 160.
- Loh, K. M. & Lim, B. (2011). A precarious balance: pluripotency factors as lineage specifiers. *Cell stem cell* **8**, 363-369.
- Loh, Y. H., Wu, Q., Chew, J. L., Vega, V. B., Zhang, W., Chen, X., Bourque, G., George, J., Leong, B., Liu, J., Wong, K. Y., Sung, K. W., Lee, C. W., Zhao, X. D., Chiu, K. P., Lipovich, L., Kuznetsov, V. A., Robson, P., Stanton, L. W., Wei, C. L., Ruan, Y., Lim, B. & Ng, H. H. (2006). The Oct4 and Nanog transcription network regulates pluripotency in mouse embryonic stem cells. *Nature genetics* **38**, 431-440.
- Lopez, J. I., Angulo, J. C., Martin, A., Sanchez-Chapado, M., Gonzalez-Corpas, A., Colas, B. & Ropero, S. (2017). A DNA hypermethylation profile reveals new potential biomarkers for the evaluation of prognosis in urothelial bladder cancer. *APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica* **125**, 787-796.
- Louro, R., El-Jundi, T., Nakaya, H. I., Reis, E. M. & Verjovski-Almeida, S. (2008). Conserved tissue expression signatures of intronic noncoding RNAs transcribed from human and mouse loci. *Genomics* **92**, 18-25.
- Macarthur, B. D., Ma'ayan, A. & Lemischka, I. R. (2009). Systems biology of stem cell fate and cellular reprogramming. *Nature reviews. Molecular cell biology* **10**, 672-681.
- Maden, M. (2002). Retinoid signalling in the development of the central nervous system. *Nature reviews. Neuroscience* **3**, 843-853.
- Maehara, R., Fujikura, K., Takeuchi, K., Akita, M., Abe-Suzuki, S., Karbanova, J., Corbeil, D., Itoh, T., Kakeji, Y. & Zen, Y. (2017). SOX2-silenced squamous cell carcinoma: a highly malignant form of esophageal cancer with SOX2 promoter hypermethylation. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc.*
- Makrides, N., Panayiotou, E., Fanis, P., Karaiskos, C., Lapathitis, G. & Malas, S. (2018). Sequential Role of SOXB2 Factors in GABAergic Neuron Specification of the Dorsal Midbrain. *Frontiers in molecular neuroscience* **11**, 152.
- Malas, S., Duthie, S. M., Mohri, F., Lovell-Badge, R. & Episkopou, V. (1997). Cloning and mapping of the human SOX1: a highly conserved gene expressed in the developing brain. *Mammalian genome : official journal of the International Mammalian Genome Society* **8**, 866-868.
- Malas, S., Postlethwaite, M., Ekonomou, A., Whalley, B., Nishiguchi, S., Wood, H., Meldrum, B., Constanti, A. & Episkopou, V. (2003). Sox1-deficient mice suffer from epilepsy associated with abnormal ventral forebrain development and olfactory cortex hyperexcitability. *Neuroscience* **119**, 421-432.
- Malik, S. & Roeder, R. G. (2005). Dynamic regulation of pol II transcription by the mammalian Mediator complex. *Trends in biochemical sciences* **30**, 256-263.
- Mansouri, S., Nejad, R., Karabork, M., Ekinci, C., Solaroglu, I., Aldape, K. D. & Zadeh, G. (2016). Sox2: regulation of expression and contribution to brain tumors. *CNS oncology* **5**, 159-173.

- Marikawa, Y., Fujita, T. C. & Alarcon, V. B. (2005). Heterogeneous DNA methylation status of the regulatory element of the mouse Oct4 gene in adult somatic cell population. *Cloning and stem cells* **7**, 8-16.
- Marjanovic Vicentic, J., Drakulic, D., Garcia, I., Vukovic, V., Aldaz, P., Puskas, N., Nikolic, I., Tasic, G., Raicevic, S., Garros-Regulez, L., Sampron, N., Atkinson, M. J., Anastasov, N., Matheu, A. & Stevanovic, M. (2019). SOX3 can promote the malignant behavior of glioblastoma cells. *Cellular oncology* **42**, 41-54.
- Mark, M., Ghyselinck, N. B. & Chambon, P. (2009). Function of retinoic acid receptors during embryonic development. *Nuclear receptor signaling* **7**, e002.
- Marson, A., Levine, S. S., Cole, M. F., Frampton, G. M., Brambrink, T., Johnstone, S., Guenther, M. G., Johnston, W. K., Wernig, M., Newman, J., Calabrese, J. M., Dennis, L. M., Volkert, T. L., Gupta, S., Love, J., Hannett, N., Sharp, P. A., Bartel, D. P., Jaenisch, R. & Young, R. A. (2008). Connecting microRNA genes to the core transcriptional regulatory circuitry of embryonic stem cells. *Cell* **134**, 521-533.
- Mathews, L. A., Hurt, E. M., Zhang, X. & Farrar, W. L. (2010). Epigenetic regulation of CpG promoter methylation in invasive prostate cancer cells. *Molecular cancer* **9**, 267.
- Mato Prado, M., Frampton, A. E., Stebbing, J. & Krell, J. (2015). Gene of the month: NANOG. *Journal of clinical pathology* **68**, 763-765.
- Matoba, R., Niwa, H., Masui, S., Ohtsuka, S., Carter, M. G., Sharov, A. A. & Ko, M. S. (2006). Dissecting Oct3/4-regulated gene networks in embryonic stem cells by expression profiling. *PloS one* **1**, e26.
- McAninch, D. & Thomas, P. (2014). Identification of highly conserved putative developmental enhancers bound by SOX3 in neural progenitors using ChIP-Seq. *PloS one* **9**, e113361.
- McBurney, M. W. & Rogers, B. J. (1982). Isolation of male embryonal carcinoma cells and their chromosome replication patterns. *Developmental biology* **89**, 503-508.
- McCool, K. W., Xu, X., Singer, D. B., Murdoch, F. E. & Fritsch, M. K. (2007). The role of histone acetylation in regulating early gene expression patterns during early embryonic stem cell differentiation. *The Journal of biological chemistry* **282**, 6696-6706.
- Meehan, R. R., Lewis, J. D. & Bird, A. P. (1992). Characterization of MeCP2, a vertebrate DNA binding protein with affinity for methylated DNA. *Nucleic acids research* **20**, 5085-5092.
- Megiorni, F., Mora, B., Indovina, P. & Mazzilli, M. C. (2005). Expression of neuronal markers during NTera2/cloneD1 differentiation by cell aggregation method. *Neuroscience letters* **373**, 105-109.
- Mehta, G. A., Khanna, P. & Gatz, M. L. (2019). Emerging Role of SOX Proteins in Breast Cancer Development and Maintenance. *Journal of mammary gland biology and neoplasia* **24**, 213-230.
- Memczak, S., Jens, M., Elefsinioti, A., Torti, F., Krueger, J., Rybak, A., Maier, L., Mackowiak, S. D., Gregersen, L. H., Munschauer, M., Loewer, A., Ziebold, U., Landthaler, M., Kocks, C., le Noble, F. & Rajewsky, N. (2013). Circular RNAs are a large class of animal RNAs with regulatory potency. *Nature* **495**, 333-338.
- Mercer, T. R. & Mattick, J. S. (2013). Structure and function of long noncoding RNAs in epigenetic regulation. *Nature structural & molecular biology* **20**, 300-307.

- Messeguer, X., Escudero, R., Farre, D., Nunez, O., Martinez, J. & Alba, M. M. (2002). PROMO: detection of known transcription regulatory elements using species-tailored searches. *Bioinformatics* **18**, 333-334.
- Mezquita, B. & Mezquita, C. (2019). Two Opposing Faces of Retinoic Acid: Induction of Stemness or Induction of Differentiation Depending on Cell-Type. *Biomolecules* **9**.
- Mikkelsen, T. S., Hanna, J., Zhang, X., Ku, M., Wernig, M., Schorderet, P., Bernstein, B. E., Jaenisch, R., Lander, E. S. & Meissner, A. (2008). Dissecting direct reprogramming through integrative genomic analysis. *Nature* **454**, 49-55.
- Mikkelsen, T. S., Ku, M., Jaffe, D. B., Issac, B., Lieberman, E., Giannoukos, G., Alvarez, P., Brockman, W., Kim, T. K., Koche, R. P., Lee, W., Mendenhall, E., O'Donovan, A., Presser, A., Russ, C., Xie, X., Meissner, A., Wernig, M., Jaenisch, R., Nusbaum, C., Lander, E. S. & Bernstein, B. E. (2007). Genome-wide maps of chromatin state in pluripotent and lineage-committed cells. *Nature* **448**, 553-560.
- Milivojevic, M., Nikcevic, G., Kovacevic-Grujicic, N., Krstic, A., Mojsin, M., Drakulic, D. & Stevanovic, M. (2010). Involvement of ubiquitous and TALE transcription factors, as well as liganded RXR α , in the regulation of human SOX2 gene expression in the NT2/D1 embryonal carcinoma cell line. *Archives of Biological Sciences, Belgrade* **62**, 199-210.
- Miranda, T. B., Cortez, C. C., Yoo, C. B., Liang, G., Abe, M., Kelly, T. K., Marquez, V. E. & Jones, P. A. (2009). DZNep is a global histone methylation inhibitor that reactivates developmental genes not silenced by DNA methylation. *Molecular cancer therapeutics* **8**, 1579-1588.
- Misiuta, I. E., Saporta, S., Sanberg, P. R., Zigova, T. & Willing, A. E. (2006). Influence of retinoic acid and lithium on proliferation and dopaminergic potential of human NT2 cells. *Journal of neuroscience research* **83**, 668-679.
- Mitsui, K., Tokuzawa, Y., Itoh, H., Segawa, K., Murakami, M., Takahashi, K., Maruyama, M., Maeda, M. & Yamanaka, S. (2003). The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell* **113**, 631-642.
- Miyagi, S., Kato, H. & Okuda, A. (2009). Role of SoxB1 transcription factors in development. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* **66**, 3675-3684.
- Miyagi, S., Saito, T., Mizutani, K., Masuyama, N., Gotoh, Y., Iwama, A., Nakauchi, H., Masui, S., Niwa, H., Nishimoto, M., Muramatsu, M. & Okuda, A. (2004). The Sox-2 regulatory regions display their activities in two distinct types of multipotent stem cells. *Molecular and cellular biology* **24**, 4207-4220.
- Miyazono, M., Lee, V. M. & Trojanowski, J. Q. (1995). Proliferation, cell death, and neuronal differentiation in transplanted human embryonal carcinoma (NTera2) cells depend on the graft site in nude and severe combined immunodeficient mice. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* **73**, 273-283.
- Mizuguchi, G., Shen, X., Landry, J., Wu, W. H., Sen, S. & Wu, C. (2004). ATP-driven exchange of histone H2AZ variant catalyzed by SWR1 chromatin remodeling complex. *Science* **303**, 343-348.
- Mizuno, K., Kojima, Y., Kamisawa, H., Moritoki, Y., Nishio, H., Nakane, A., Kurokawa, S., Kohri, K. & Hayashi, Y. (2014). Elucidation of distinctive

- genomic DNA structures in patients with 46,XX testicular disorders of sex development using genome wide analyses. *The Journal of urology* **192**, 535-541.
- Mizuseki, K., Kishi, M., Matsui, M., Nakanishi, S. & Sasai, Y. (1998). Xenopus Zic-related-1 and Sox-2, two factors induced by chordin, have distinct activities in the initiation of neural induction. *Development* **125**, 579-587.
- Moalem, S., Babul-Hirji, R., Stavropolous, D. J., Wherrett, D., Bagli, D. J., Thomas, P. & Chitayat, D. (2012). XX male sex reversal with genital abnormalities associated with a de novo SOX3 gene duplication. *American journal of medical genetics. Part A* **158A**, 1759-1764.
- Mohandas, T., Sparkes, R. S. & Shapiro, L. J. (1981). Reactivation of an inactive human X chromosome: evidence for X inactivation by DNA methylation. *Science* **211**, 393-396.
- Mojsin, M., Grujicic, N. K., Nikcevic, G., Krstic, A., Savic, T. & Stevanovic, M. (2006). Mapping of the RXRalpha binding elements involved in retinoic acid induced transcriptional activation of the human SOX3 gene. *Neuroscience research* **56**, 409-418.
- Mojsin, M. & Stevanovic, M. (2009). PBX1 and MEIS1 up-regulate SOX3 gene expression by direct interaction with a consensus binding site within the basal promoter region. *The Biochemical journal* **425**, 107-116.
- Mojsin, M., Topalovic, V., Vicentic, J. M., Schwirtlich, M., Stanisavljevic, D., Drakulic, D. & Stevanovic, M. (2015). Crosstalk between SOXB1 proteins and WNT/beta-catenin signaling in NT2/D1 cells. *Histochemistry and cell biology* **144**, 429-441.
- Mollaaghababa, R. & Pavan, W. J. (2003). The importance of having your SOX on: role of SOX10 in the development of neural crest-derived melanocytes and glia. *Oncogene* **22**, 3024-3034.
- Mongan, N. P. & Gudas, L. J. (2007). Diverse actions of retinoid receptors in cancer prevention and treatment. *Differentiation; research in biological diversity* **75**, 853-870.
- Mullin, N. P., Yates, A., Rowe, A. J., Nijmeijer, B., Colby, D., Barlow, P. N., Walkinshaw, M. D. & Chambers, I. (2008). The pluripotency rheostat Nanog functions as a dimer. *The Biochemical journal* **411**, 227-231.
- Musch, T., Oz, Y., Lyko, F. & Breiling, A. (2010). Nucleoside drugs induce cellular differentiation by caspase-dependent degradation of stem cell factors. *PloS one* **5**, e10726.
- Nakagawa, M., Koyanagi, M., Tanabe, K., Takahashi, K., Ichisaka, T., Aoi, T., Okita, K., Mochiduki, Y., Takizawa, N. & Yamanaka, S. (2008). Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nature biotechnology* **26**, 101-106.
- Nambu, P. A. & Nambu, J. R. (1996). The Drosophila fish-hook gene encodes a HMG domain protein essential for segmentation and CNS development. *Development* **122**, 3467-3475.
- Nan, X., Ng, H. H., Johnson, C. A., Laherty, C. D., Turner, B. M., Eisenman, R. N. & Bird, A. (1998). Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature* **393**, 386-389.
- Nappi, L., Thi, M., Lum, A., Huntsman, D., Eigl, B. J., Martin, C., O'Neil, B., Maughan, B. L., Chi, K., So, A., Black, P. C., Gleave, M., Wyatt, A. W., Lavoie, J. M., Khalaf, D., Bell, R., Daneshmand, S., Hamilton, R. J., Leao, R. R. N.,

- Nichols, C. & Kollmannsberger, C. (2019). Developing a Highly Specific Biomarker for Germ Cell Malignancies: Plasma miR371 Expression Across the Germ Cell Malignancy Spectrum. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **37**, 3090-3098.
- Nardini, M., Gnesutta, N., Donati, G., Gatta, R., Forni, C., Fossati, A., Vornrhein, C., Moras, D., Romier, C., Bolognesi, M. & Mantovani, R. (2013). Sequence-specific transcription factor NF-Y displays histone-like DNA binding and H2B-like ubiquitination. *Cell* **152**, 132-143.
- Nelson, H. H., Marsit, C. J., Christensen, B. C., Houseman, E. A., Kontic, M., Wiemels, J. L., Karagas, M. R., Wrensch, M. R., Zheng, S., Wiencke, J. K. & Kelsey, K. T. (2012). Key epigenetic changes associated with lung cancer development: results from dense methylation array profiling. *Epigenetics* **7**, 559-566.
- Ng, H. H. & Surani, M. A. (2011). The transcriptional and signalling networks of pluripotency. *Nature cell biology* **13**, 490-496.
- Ng, S. Y., Bogu, G. K., Soh, B. S. & Stanton, L. W. (2013). The long noncoding RNA RMST interacts with SOX2 to regulate neurogenesis. *Molecular cell* **51**, 349-359.
- Ng, S. Y., Johnson, R. & Stanton, L. W. (2012). Human long non-coding RNAs promote pluripotency and neuronal differentiation by association with chromatin modifiers and transcription factors. *The EMBO journal* **31**, 522-533.
- Ni, X., Hu, G. & Cai, X. (2019). The success and the challenge of all-trans retinoic acid in the treatment of cancer. *Critical reviews in food science and nutrition* **59**, S71-S80.
- Nichols, J., Zevnik, B., Anastassiadis, K., Niwa, H., Klewe-Nebenius, D., Chambers, I., Scholer, H. & Smith, A. (1998). Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. *Cell* **95**, 379-391.
- Nikcevic, G., Savic, T., Kovacevic-Grujicic, N. & Stevanovic, M. (2008). Up-regulation of the SOX3 gene expression by retinoic acid: characterization of the novel promoter-response element and the retinoid receptors involved. *Journal of neurochemistry* **107**, 1206-1215.
- Nishiguchi, S., Wood, H., Kondoh, H., Lovell-Badge, R. & Episkopou, V. (1998). Sox1 directly regulates the gamma-crystallin genes and is essential for lens development in mice. *Genes & development* **12**, 776-781.
- Niwa, H., Miyazaki, J. & Smith, A. G. (2000). Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nature genetics* **24**, 372-376.
- Niwa, H., Nakamura, A., Urata, M., Shirae-Kurabayashi, M., Kuraku, S., Russell, S. & Ohtsuka, S. (2016). The evolutionally-conserved function of group B1 Sox family members confers the unique role of Sox2 in mouse ES cells. *BMC evolutionary biology* **16**, 173.
- Niwa, H., Ogawa, K., Shimosato, D. & Adachi, K. (2009). A parallel circuit of LIF signalling pathways maintains pluripotency of mouse ES cells. *Nature* **460**, 118-122.
- Oh, J. H., Do, H. J., Yang, H. M., Moon, S. Y., Cha, K. Y., Chung, H. M. & Kim, J. H. (2005). Identification of a putative transactivation domain in human Nanog. *Experimental & molecular medicine* **37**, 250-254.

- Ohi, Y., Qin, H., Hong, C., Blouin, L., Polo, J. M., Guo, T., Qi, Z., Downey, S. L., Manos, P. D., Rossi, D. J., Yu, J., Hebrok, M., Hochedlinger, K., Costello, J. F., Song, J. S. & Ramalho-Santos, M. (2011). Incomplete DNA methylation underlies a transcriptional memory of somatic cells in human iPS cells. *Nature cell biology* **13**, 541-549.
- Okamoto, K., Okazawa, H., Okuda, A., Sakai, M., Muramatsu, M. & Hamada, H. (1990). A novel octamer binding transcription factor is differentially expressed in mouse embryonic cells. *Cell* **60**, 461-472.
- Okamura, K., Chung, W. J., Ruby, J. G., Guo, H., Bartel, D. P. & Lai, E. C. (2008). The Drosophila hairpin RNA pathway generates endogenous short interfering RNAs. *Nature* **453**, 803-806.
- Okano, M., Bell, D. W., Haber, D. A. & Li, E. (1999). DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell* **99**, 247-257.
- Okitsu, C. Y., Hsieh, J. C. & Hsieh, C. L. (2010). Transcriptional activity affects the H3K4me3 level and distribution in the coding region. *Molecular and cellular biology* **30**, 2933-2946.
- Olins, A. L. & Olins, D. E. (1974). Spheroid chromatin units (v bodies). *Science* **183**, 330-332.
- Olson, C. R. & Mello, C. V. (2010). Significance of vitamin A to brain function, behavior and learning. *Molecular nutrition & food research* **54**, 489-495.
- Olynik, B. M. & Rastegar, M. (2012). The genetic and epigenetic journey of embryonic stem cells into mature neural cells. *Frontiers in genetics* **3**, 81.
- Oosterhuis, J. W. & Looijenga, L. H. (2005). Testicular germ-cell tumours in a broader perspective. *Nature reviews. Cancer* **5**, 210-222.
- Oosterhuis, J. W., Looijenga, L. H., van Echten, J. & de Jong, B. (1997). Chromosomal constitution and developmental potential of human germ cell tumors and teratomas. *Cancer genetics and cytogenetics* **95**, 96-102.
- Orkin, S. H., Wang, J., Kim, J., Chu, J., Rao, S., Theunissen, T. W., Shen, X. & Levasseur, D. N. (2008). The transcriptional network controlling pluripotency in ES cells. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* **73**, 195-202.
- Otsubo, T., Akiyama, Y., Yanagihara, K. & Yuasa, Y. (2008). SOX2 is frequently downregulated in gastric cancers and inhibits cell growth through cell-cycle arrest and apoptosis. *British journal of cancer* **98**, 824-831.
- Palmieri, S. L., Peter, W., Hess, H. & Scholer, H. R. (1994). Oct-4 transcription factor is differentially expressed in the mouse embryo during establishment of the first two extraembryonic cell lineages involved in implantation. *Developmental biology* **166**, 259-267.
- Pan, G., Tian, S., Nie, J., Yang, C., Ruotti, V., Wei, H., Jonsdottir, G. A., Stewart, R. & Thomson, J. A. (2007). Whole-genome analysis of histone H3 lysine 4 and lysine 27 methylation in human embryonic stem cells. *Cell stem cell* **1**, 299-312.
- Pan, H. & Schultz, R. M. (2011). Sox2 modulates reprogramming of gene expression in two-cell mouse embryos. *Biology of reproduction* **85**, 409-416.
- Pasini, D., Bracken, A. P., Agger, K., Christensen, J., Hansen, K., Cloos, P. A. & Helin, K. (2008). Regulation of stem cell differentiation by histone methyltransferases and demethylases. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* **73**, 253-263.

- Patterson, K., Molloy, L., Qu, W. & Clark, S. (2011). DNA methylation: bisulphite modification and analysis. *Journal of visualized experiments : JoVE*.
- Pearson, B. J. & Doe, C. Q. (2004). Specification of temporal identity in the developing nervous system. *Annual review of cell and developmental biology* **20**, 619-647.
- Penzel, R., Oswald, R., Chen, Y., Tacke, L. & Grunz, H. (1997). Characterization and early embryonic expression of a neural specific transcription factor xSOX3 in *Xenopus laevis*. *The International journal of developmental biology* **41**, 667-677.
- Perera, A., Eisen, D., Wagner, M., Laube, S. K., Kunzel, A. F., Koch, S., Steinbacher, J., Schulze, E., Splith, V., Mittermeier, N., Muller, M., Biel, M., Carell, T. & Michalakis, S. (2015). TET3 is recruited by REST for context-specific hydroxymethylation and induction of gene expression. *Cell reports* **11**, 283-294.
- Perissi, V., Jepsen, K., Glass, C. K. & Rosenfeld, M. G. (2010). Deconstructing repression: evolving models of co-repressor action. *Nature reviews. Genetics* **11**, 109-123.
- Perl, A. K., Kist, R., Shan, Z., Scherer, G. & Whitsett, J. A. (2005). Normal lung development and function after Sox9 inactivation in the respiratory epithelium. *Genesis* **41**, 23-32.
- Peschansky, V. J. & Wahlestedt, C. (2014). Non-coding RNAs as direct and indirect modulators of epigenetic regulation. *Epigenetics* **9**, 3-12.
- Pevny, L. & Placzek, M. (2005). SOX genes and neural progenitor identity. *Current opinion in neurobiology* **15**, 7-13.
- Pevny, L. H. & Lovell-Badge, R. (1997). Sox genes find their feet. *Current opinion in genetics & development* **7**, 338-344.
- Pevny, L. H., Sockanathan, S., Placzek, M. & Lovell-Badge, R. (1998). A role for SOX1 in neural determination. *Development* **125**, 1967-1978.
- Pierson Smela, M., Sybirna, A., Wong, F. C. K. & Surani, M. A. (2019). Testing the role of SOX15 in human primordial germ cell fate. *Wellcome open research* **4**, 122.
- Pillai-Kastoori, L., Wen, W. & Morris, A. C. (2015). Keeping an eye on SOXC proteins. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* **244**, 367-376.
- Plachta, N., Bibel, M., Tucker, K. L. & Barde, Y. A. (2004). Developmental potential of defined neural progenitors derived from mouse embryonic stem cells. *Development* **131**, 5449-5456.
- Pleasure, S. J. & Lee, V. M. (1993). NTera 2 cells: a human cell line which displays characteristics expected of a human committed neuronal progenitor cell. *Journal of neuroscience research* **35**, 585-602.
- Pleasure, S. J., Page, C. & Lee, V. M. (1992). Pure, postmitotic, polarized human neurons derived from NTera 2 cells provide a system for expressing exogenous proteins in terminally differentiated neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **12**, 1802-1815.
- Poche, R. A., Furuta, Y., Chaboissier, M. C., Schedl, A. & Behringer, R. R. (2008). Sox9 is expressed in mouse multipotent retinal progenitor cells and functions in Muller glial cell development. *The Journal of comparative neurology* **510**, 237-250.
- Podobinska, M., Szablowska-Gadomska, I., Augustyniak, J., Sandvig, I., Sandvig, A. & Buzanska, L. (2017). Epigenetic Modulation of Stem Cells in

- Neurodevelopment: The Role of Methylation and Acetylation. *Frontiers in cellular neuroscience* **11**, 23.
- Podrygajlo, G., Song, Y., Schlesinger, F., Krampfl, K. & Bicker, G. (2010). Synaptic currents and transmitter responses in human NT2 neurons differentiated in aggregate culture. *Neuroscience letters* **468**, 207-210.
- Polo, J. M., Liu, S., Figueroa, M. E., Kulalert, W., Eminli, S., Tan, K. Y., Apostolou, E., Stadtfeld, M., Li, Y., Shioda, T., Natesan, S., Wagers, A. J., Melnick, A., Evans, T. & Hochedlinger, K. (2010). Cell type of origin influences the molecular and functional properties of mouse induced pluripotent stem cells. *Nature biotechnology* **28**, 848-855.
- Popovic, J., Stanisavljevic, D., Schwirtlich, M., Klajn, A., Marjanovic, J. & Stevanovic, M. (2014). Expression analysis of SOX14 during retinoic acid induced neural differentiation of embryonal carcinoma cells and assessment of the effect of its ectopic expression on SOXB members in HeLa cells. *PloS one* **9**, e91852.
- Posfai, E., Tam, O. H. & Rossant, J. (2014). Mechanisms of pluripotency in vivo and in vitro. *Current topics in developmental biology* **107**, 1-37.
- Przyborski, S. A., Morton, I. E., Wood, A. & Andrews, P. W. (2000). Developmental regulation of neurogenesis in the pluripotent human embryonal carcinoma cell line NTERA-2. *The European journal of neuroscience* **12**, 3521-3528.
- Przyborski, S. A., Smith, S. & Wood, A. (2003). Transcriptional profiling of neuronal differentiation by human embryonal carcinoma stem cells in vitro. *Stem cells* **21**, 459-471.
- Qian, Q., Qian, H., Zhang, X., Zhu, W., Yan, Y., Ye, S., Peng, X., Li, W., Xu, Z., Sun, L. & Xu, W. (2012). 5-Azacytidine induces cardiac differentiation of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells by activating extracellular regulated kinase. *Stem cells and development* **21**, 67-75.
- Qiao, Y., Wang, R., Yang, X., Tang, K. & Jing, N. (2015). Dual roles of histone H3 lysine 9 acetylation in human embryonic stem cell pluripotency and neural differentiation. *The Journal of biological chemistry* **290**, 2508-2520.
- Qiao, Y., Wang, X., Wang, R., Li, Y., Yu, F., Yang, X., Song, L., Xu, G., Chin, Y. E. & Jing, N. (2015). AF9 promotes hESC neural differentiation through recruiting TET2 to neurodevelopmental gene loci for methylcytosine hydroxylation. *Cell discovery* **1**, 15017.
- Qiao, Y., Yang, X. & Jing, N. (2016). Epigenetic regulation of early neural fate commitment. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* **73**, 1399-1411.
- Qiu, M., Chen, D., Shen, C., Shen, J., Zhao, H. & He, Y. (2017). Sex-determining region Y-box protein 3 induces epithelial-mesenchymal transition in osteosarcoma cells via transcriptional activation of Snail1. *Journal of experimental & clinical cancer research : CR* **36**, 46.
- Qu, F. & Cao, P. (2018). Long noncoding RNA SOX2OT contributes to gastric cancer progression by sponging miR-194-5p from AKT2. *Experimental cell research* **369**, 187-196.
- Quinlan, G. A., Williams, E. A., Tan, S. S. & Tam, P. P. (1995). Neuroectodermal fate of epiblast cells in the distal region of the mouse egg cylinder: implication for body plan organization during early embryogenesis. *Development* **121**, 87-98.
- Qureshi, I. A., Mattick, J. S. & Mehler, M. F. (2010). Long non-coding RNAs in nervous system function and disease. *Brain research* **1338**, 20-35.

- Radziskeuskaya, A., Chia Gle, B., dos Santos, R. L., Theunissen, T. W., Castro, L. F., Nichols, J. & Silva, J. C. (2013). A defined Oct4 level governs cell state transitions of pluripotency entry and differentiation into all embryonic lineages. *Nature cell biology* **15**, 579-590.
- Radziskeuskaya, A. & Silva, J. C. (2014). Do all roads lead to Oct4? the emerging concepts of induced pluripotency. *Trends in cell biology* **24**, 275-284.
- Rahmatpanah, F. B., Carstens, S., Hooshmand, S. I., Welsh, E. C., Sjahputera, O., Taylor, K. H., Bennett, L. B., Shi, H., Davis, J. W., Arthur, G. L., Shanafelt, T. D., Kay, N. E., Wooldridge, J. E. & Caldwell, C. W. (2009). Large-scale analysis of DNA methylation in chronic lymphocytic leukemia. *Epigenomics* **1**, 39-61.
- Rank, G., Cerruti, L., Simpson, R. J., Moritz, R. L., Jane, S. M. & Zhao, Q. (2010). Identification of a PRMT5-dependent repressor complex linked to silencing of human fetal globin gene expression. *Blood* **116**, 1585-1592.
- Rastegar, M., Hotta, A., Pasceri, P., Makarem, M., Cheung, A. Y., Elliott, S., Park, K. J., Adachi, M., Jones, F. S., Clarke, I. D., Dirks, P. & Ellis, J. (2009). MECP2 isoform-specific vectors with regulated expression for Rett syndrome gene therapy. *PloS one* **4**, e6810.
- Reginensi, A., Clarkson, M., Neirijnck, Y., Lu, B., Ohyama, T., Groves, A. K., Sock, E., Wegner, M., Costantini, F., Chaboissier, M. C. & Schedl, A. (2011). SOX9 controls epithelial branching by activating RET effector genes during kidney development. *Human molecular genetics* **20**, 1143-1153.
- Reiprich, S. & Wegner, M. (2015). From CNS stem cells to neurons and glia: Sox for everyone. *Cell and tissue research* **359**, 111-124.
- Remenyi, A., Lins, K., Nissen, L. J., Reinbold, R., Scholer, H. R. & Wilmanns, M. (2003). Crystal structure of a POU/HMG/DNA ternary complex suggests differential assembly of Oct4 and Sox2 on two enhancers. *Genes & development* **17**, 2048-2059.
- Rex, M., Orme, A., Uwanogho, D., Tointon, K., Wigmore, P. M., Sharpe, P. T. & Scotting, P. J. (1997). Dynamic expression of chicken Sox2 and Sox3 genes in ectoderm induced to form neural tissue. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* **209**, 323-332.
- Rhinn, M. & Dolle, P. (2012). Retinoic acid signalling during development. *Development* **139**, 843-858.
- Rizzino, A. (2013). Concise review: The Sox2-Oct4 connection: critical players in a much larger interdependent network integrated at multiple levels. *Stem cells* **31**, 1033-1039.
- Rizzoti, K., Brunelli, S., Carmignac, D., Thomas, P. Q., Robinson, I. C. & Lovell-Badge, R. (2004). SOX3 is required during the formation of the hypothalamo-pituitary axis. *Nature genetics* **36**, 247-255.
- Roadmap Epigenomics, C., Kundaje, A., Meuleman, W., Ernst, J., Bilenky, M., Yen, A., Heravi-Moussavi, A., Kheradpour, P., Zhang, Z., Wang, J., Ziller, M. J., Amin, V., Whitaker, J. W., Schultz, M. D., Ward, L. D., Sarkar, A., Quon, G., Sandstrom, R. S., Eaton, M. L., Wu, Y. C., Pfening, A. R., Wang, X., Claussnitzer, M., Liu, Y., Coarfa, C., Harris, R. A., Shores, N., Epstein, C. B., Gjonjeska, E., Leung, D., Xie, W., Hawkins, R. D., Lister, R., Hong, C., Gascard, P., Mungall, A. J., Moore, R., Chuah, E., Tam, A., Canfield, T. K., Hansen, R. S., Kaul, R., Sabo, P. J., Bansal, M. S., Carles, A., Dixon, J. R., Farh, K. H.,

- Feizi, S., Karlic, R., Kim, A. R., Kulkarni, A., Li, D., Lowdon, R., Elliott, G., Mercer, T. R., Neph, S. J., Onuchic, V., Polak, P., Rajagopal, N., Ray, P., Sallari, R. C., Siebenthal, K. T., Sinnott-Armstrong, N. A., Stevens, M., Thurman, R. E., Wu, J., Zhang, B., Zhou, X., Beaudet, A. E., Boyer, L. A., De Jager, P. L., Farnham, P. J., Fisher, S. J., Haussler, D., Jones, S. J., Li, W., Marra, M. A., McManus, M. T., Sunyaev, S., Thomson, J. A., Tlsty, T. D., Tsai, L. H., Wang, W., Waterland, R. A., Zhang, M. Q., Chadwick, L. H., Bernstein, B. E., Costello, J. F., Ecker, J. R., Hirst, M., Meissner, A., Milosavljevic, A., Ren, B., Stamatoyannopoulos, J. A., Wang, T. & Kellis, M. (2015). Integrative analysis of 111 reference human epigenomes. *Nature* **518**, 317-330.
- Rochette-Egly, C. (2020). Retinoic Acid-Regulated Target Genes During Development: Integrative Genomics Analysis. *Sub-cellular biochemistry* **95**, 57-85.
- Rodda, D. J., Chew, J. L., Lim, L. H., Loh, Y. H., Wang, B., Ng, H. H. & Robson, P. (2005). Transcriptional regulation of nanog by OCT4 and SOX2. *The Journal of biological chemistry* **280**, 24731-24737.
- Rogers, C. D., Harafuji, N., Archer, T., Cunningham, D. D. & Casey, E. S. (2009). Xenopus Sox3 activates sox2 and geminin and indirectly represses Xvent2 expression to induce neural progenitor formation at the expense of non-neural ectodermal derivatives. *Mechanisms of development* **126**, 42-55.
- Rogers, N., Cheah, P. S., Szarek, E., Banerjee, K., Schwartz, J. & Thomas, P. (2013). Expression of the murine transcription factor SOX3 during embryonic and adult neurogenesis. *Gene expression patterns : GEP* **13**, 240-248.
- Rogers, N., McAninch, D. & Thomas, P. (2014). Dbx1 is a direct target of SOX3 in the spinal cord. *PLoS one* **9**, e95356.
- Rose, N. R. & Klose, R. J. (2014). Understanding the relationship between DNA methylation and histone lysine methylation. *Biochimica et biophysica acta* **1839**, 1362-1372.
- Rosner, M. H., Vigano, M. A., Ozato, K., Timmons, P. M., Poirier, F., Rigby, P. W. & Staudt, L. M. (1990). A POU-domain transcription factor in early stem cells and germ cells of the mammalian embryo. *Nature* **345**, 686-692.
- Rossetto, D., Avvakumov, N. & Cote, J. (2012). Histone phosphorylation: a chromatin modification involved in diverse nuclear events. *Epigenetics* **7**, 1098-1108.
- Roth, S. Y., Denu, J. M. & Allis, C. D. (2001). Histone acetyltransferases. *Annual review of biochemistry* **70**, 81-120.
- Russell, S. R., Sanchez-Soriano, N., Wright, C. R. & Ashburner, M. (1996). The Dichaete gene of *Drosophila melanogaster* encodes a SOX-domain protein required for embryonic segmentation. *Development* **122**, 3669-3676.
- Russo, M. V., Esposito, S., Tupone, M. G., Manzoli, L., Airolidi, I., Pompa, P., Cindolo, L., Schips, L., Sorrentino, C. & Di Carlo, E. (2016). SOX2 boosts major tumor progression genes in prostate cancer and is a functional biomarker of lymph node metastasis. *Oncotarget* **7**, 12372-12385.
- Saghaeian Jazi, M., Samaei, N. M., Mowla, S. J., Arefnezhad, B. & Kouhsar, M. (2018). SOX2OT knockdown derived changes in mitotic regulatory gene network of cancer cells. *Cancer cell international* **18**, 129.
- Sander, S., Bullinger, L., Klapproth, K., Fiedler, K., Kestler, H. A., Barth, T. F., Moller, P., Stilgenbauer, S., Pollack, J. R. & Wirth, T. (2008). MYC stimulates EZH2 expression by repression of its negative regulator miR-26a. *Blood* **112**, 4202-4212.

- Santi, D. V., Norment, A. & Garrett, C. E. (1984). Covalent bond formation between a DNA-cytosine methyltransferase and DNA containing 5-azacytosine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **81**, 6993-6997.
- Santos, N. C. & Kim, K. H. (2010). Activity of retinoic acid receptor-alpha is directly regulated at its protein kinase A sites in response to follicle-stimulating hormone signaling. *Endocrinology* **151**, 2361-2372.
- Saporta, S., Borlongan, C. V. & Sanberg, P. R. (1999). Neural transplantation of human neuroteratocarcinoma (hNT) neurons into ischemic rats. A quantitative dose-response analysis of cell survival and behavioral recovery. *Neuroscience* **91**, 519-525.
- Saporta, S., Makoui, A. S., Willing, A. E., Daadi, M., Cahill, D. W. & Sanberg, P. R. (2002). Functional recovery after complete contusion injury to the spinal cord and transplantation of human neuroteratocarcinoma neurons in rats. *Journal of neurosurgery* **97**, 63-68.
- Sarkar, A. & Hochedlinger, K. (2013). The sox family of transcription factors: versatile regulators of stem and progenitor cell fate. *Cell stem cell* **12**, 15-30.
- Satoh, J. & Kuroda, Y. (2000). Differential gene expression between human neurons and neuronal progenitor cells in culture: an analysis of arrayed cDNA clones in NTERA2 human embryonal carcinoma cell line as a model system. *Journal of neuroscience methods* **94**, 155-164.
- Schepers, G. E., Teasdale, R. D. & Koopman, P. (2002). Twenty pairs of sox: extent, homology, and nomenclature of the mouse and human sox transcription factor gene families. *Developmental cell* **3**, 167-170.
- Schneider, C. A., Rasband, W. S. & Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature methods* **9**, 671-675.
- Scholer, H. R., Hatzopoulos, A. K., Balling, R., Suzuki, N. & Gruss, P. (1989). A family of octamer-specific proteins present during mouse embryogenesis: evidence for germline-specific expression of an Oct factor. *The EMBO journal* **8**, 2543-2550.
- Schug, T. T., Berry, D. C., Shaw, N. S., Travis, S. N. & Noy, N. (2007). Opposing effects of retinoic acid on cell growth result from alternate activation of two different nuclear receptors. *Cell* **129**, 723-733.
- Sessa, L., Breiling, A., Lavorgna, G., Silvestri, L., Casari, G. & Orlando, V. (2007). Noncoding RNA synthesis and loss of Polycomb group repression accompanies the colinear activation of the human HOXA cluster. *Rna* **13**, 223-239.
- Seymour, P. A., Freude, K. K., Tran, M. N., Mayes, E. E., Jensen, J., Kist, R., Scherer, G. & Sander, M. (2007). SOX9 is required for maintenance of the pancreatic progenitor cell pool. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 1865-1870.
- Shahhoseini, M., Taei, A., Mehrjardi, N. Z., Salekdeh, G. H. & Baharvand, H. (2010). Epigenetic analysis of human embryonic carcinoma cells during retinoic acid-induced neural differentiation. *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire* **88**, 527-538.
- Sharpe, C. & Goldstone, K. (2000). The control of Xenopus embryonic primary neurogenesis is mediated by retinoid signalling in the neurectoderm. *Mechanisms of development* **91**, 69-80.

- Sheridan, K. M. & Maltese, W. A. (1998). Expression of Rab3A GTPase and other synaptic proteins is induced in differentiated NT2N neurons. *Journal of molecular neuroscience : MN* **10**, 121-128.
- Sikorska, M., Sandhu, J. K., Deb-Rinker, P., Jezierski, A., Leblanc, J., Charlebois, C., Ribocco-Lutkiewicz, M., Bani-Yaghoub, M. & Walker, P. R. (2008). Epigenetic modifications of SOX2 enhancers, SRR1 and SRR2, correlate with in vitro neural differentiation. *Journal of neuroscience research* **86**, 1680-1693.
- Silva, J. & Smith, A. (2008). Capturing pluripotency. *Cell* **132**, 532-536.
- Simon, J. A. & Kingston, R. E. (2009). Mechanisms of polycomb gene silencing: knowns and unknowns. *Nature reviews. Molecular cell biology* **10**, 697-708.
- Sinclair, A. H., Berta, P., Palmer, M. S., Hawkins, J. R., Griffiths, B. L., Smith, M. J., Foster, J. W., Frischauf, A. M., Lovell-Badge, R. & Goodfellow, P. N. (1990). A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature* **346**, 240-244.
- Singh, R., Fazal, Z., Freemantle, S. J. & Spinella, M. J. (2019). Mechanisms of cisplatin sensitivity and resistance in testicular germ cell tumors. *Cancer drug resistance* **2**, 580-594.
- Siomi, M. C., Sato, K., Pezic, D. & Aravin, A. A. (2011). PIWI-interacting small RNAs: the vanguard of genome defence. *Nature reviews. Molecular cell biology* **12**, 246-258.
- Smith, J. R., Vallier, L., Lupo, G., Alexander, M., Harris, W. A. & Pedersen, R. A. (2008). Inhibition of Activin/Nodal signaling promotes specification of human embryonic stem cells into neuroectoderm. *Developmental biology* **313**, 107-117.
- Sockanathan, S. & Jessell, T. M. (1998). Motor neuron-derived retinoid signaling specifies the subtype identity of spinal motor neurons. *Cell* **94**, 503-514.
- Solomon, M. J., Larsen, P. L. & Varshavsky, A. (1988). Mapping protein-DNA interactions in vivo with formaldehyde: evidence that histone H4 is retained on a highly transcribed gene. *Cell* **53**, 937-947.
- Sorm, F., Piskala, A., Cihak, A. & Vesely, J. (1964). 5-Azacytidine, a new, highly effective cancerostatic. *Experientia* **20**, 202-203.
- Spinella, M. J., Freemantle, S. J., Sekula, D., Chang, J. H., Christie, A. J. & Dmitrovsky, E. (1999). Retinoic acid promotes ubiquitination and proteolysis of cyclin D1 during induced tumor cell differentiation. *The Journal of biological chemistry* **274**, 22013-22018.
- Squillaro, T., Alessio, N., Cipollaro, M., Melone, M. A., Hayek, G., Renieri, A., Giordano, A. & Galderisi, U. (2012). Reduced expression of MECP2 affects cell commitment and maintenance in neurons by triggering senescence: new perspective for Rett syndrome. *Molecular biology of the cell* **23**, 1435-1445.
- Stanisavljevic, D., Petrovic, I., Vukovic, V., Schwirtlich, M., Gredic, M., Stevanovic, M. & Popovic, J. (2017). SOX14 activates the p53 signaling pathway and induces apoptosis in a cervical carcinoma cell line. *PloS one* **12**, e0184686.
- Stavridis, M. P., Lunn, J. S., Collins, B. J. & Storey, K. G. (2007). A discrete period of FGF-induced Erk1/2 signalling is required for vertebrate neural specification. *Development* **134**, 2889-2894.
- Stevanovic, M. (2003). Modulation of SOX2 and SOX3 gene expression during differentiation of human neuronal precursor cell line NTERA2. *Molecular biology reports* **30**, 127-132.

- Stevanovic, M., Lovell-Badge, R., Collignon, J. & Goodfellow, P. N. (1993). SOX3 is an X-linked gene related to SRY. *Human molecular genetics* **2**, 2013-2018.
- Stevanovic, M., Zuffardi, O., Collignon, J., Lovell-Badge, R. & Goodfellow, P. (1994). The cDNA sequence and chromosomal location of the human SOX2 gene. *Mammalian genome : official journal of the International Mammalian Genome Society* **5**, 640-642.
- Stevens, L. C. (1967). Origin of testicular teratomas from primordial germ cells in mice. *Journal of the National Cancer Institute* **38**, 549-552.
- Stevens, L. C. (1984). Germ cell origin of testicular and ovarian teratomas. *Transplantation proceedings* **16**, 502-504.
- Stilley, C. S., Ryan, C. M., Kondziolka, D., Bender, A., DeCesare, S. & Wechsler, L. (2004). Changes in cognitive function after neuronal cell transplantation for basal ganglia stroke. *Neurology* **63**, 1320-1322.
- Stolt, C. C. & Wegner, M. (2010). SoxE function in vertebrate nervous system development. *The international journal of biochemistry & cell biology* **42**, 437-440.
- Strahl, B. D. & Allis, C. D. (2000). The language of covalent histone modifications. *Nature* **403**, 41-45.
- Streit, A., Sockanathan, S., Perez, L., Rex, M., Scotting, P. J., Sharpe, P. T., Lovell-Badge, R. & Stern, C. D. (1997). Preventing the loss of competence for neural induction: HGF/SF, L5 and Sox-2. *Development* **124**, 1191-1202.
- Su, H. Y., Lai, H. C., Lin, Y. W., Chou, Y. C., Liu, C. Y. & Yu, M. H. (2009). An epigenetic marker panel for screening and prognostic prediction of ovarian cancer. *International journal of cancer* **124**, 387-393.
- Sun, C., Nakatake, Y., Akagi, T., Ura, H., Matsuda, T., Nishiyama, A., Koide, H., Ko, M. S., Niwa, H. & Yokota, T. (2009). Dax1 binds to Oct3/4 and inhibits its transcriptional activity in embryonic stem cells. *Molecular and cellular biology* **29**, 4574-4583.
- Sun, J., Wei, X. & Xu, L. (2018). Upregulation of lncRNA Sox2ot indicates a poor prognosis for patients with hepatocellular carcinoma and promotes cell invasion. *Oncology letters* **16**, 1189-1195.
- Sutton, E., Hughes, J., White, S., Sekido, R., Tan, J., Arboleda, V., Rogers, N., Knowler, K., Rowley, L., Eyre, H., Rizzoti, K., McAninch, D., Goncalves, J., Slee, J., Turbitt, E., Bruno, D., Bengtsson, H., Harley, V., Vilain, E., Sinclair, A., Lovell-Badge, R. & Thomas, P. (2011). Identification of SOX3 as an XX male sex reversal gene in mice and humans. *The Journal of clinical investigation* **121**, 328-341.
- Suzuki, M. M. & Bird, A. (2008). DNA methylation landscapes: provocative insights from epigenomics. *Nature reviews. Genetics* **9**, 465-476.
- Szenker, E., Ray-Gallet, D. & Almouzni, G. (2011). The double face of the histone variant H3.3. *Cell research* **21**, 421-434.
- Taatjes, D. J. (2010). The human Mediator complex: a versatile, genome-wide regulator of transcription. *Trends in biochemical sciences* **35**, 315-322.
- Tachibana, M., Sugimoto, K., Nozaki, M., Ueda, J., Ohta, T., Ohki, M., Fukuda, M., Takeda, N., Niida, H., Kato, H. & Shinkai, Y. (2002). G9a histone methyltransferase plays a dominant role in euchromatic histone H3 lysine 9 methylation and is essential for early embryogenesis. *Genes & development* **16**, 1779-1791.

- Takahashi, K., Murakami, M. & Yamanaka, S. (2005). Role of the phosphoinositide 3-kinase pathway in mouse embryonic stem (ES) cells. *Biochemical Society transactions* **33**, 1522-1525.
- Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K. & Yamanaka, S. (2007). Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* **131**, 861-872.
- Takahashi, K. & Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* **126**, 663-676.
- Talbert, P. B. & Henikoff, S. (2010). Histone variants--ancient wrap artists of the epigenome. *Nature reviews. Molecular cell biology* **11**, 264-275.
- Tam, P. P. (1989). Regionalisation of the mouse embryonic ectoderm: allocation of prospective ectodermal tissues during gastrulation. *Development* **107**, 55-67.
- Tam, P. P. & Zhou, S. X. (1996). The allocation of epiblast cells to ectodermal and germ-line lineages is influenced by the position of the cells in the gastrulating mouse embryo. *Developmental biology* **178**, 124-132.
- Tang, L., Liou, Y. L., Wan, Z. R., Tang, J., Zhou, Y., Zhuang, W. & Wang, G. (2019). Aberrant DNA methylation of PAX1, SOX1 and ZNF582 genes as potential biomarkers for esophageal squamous cell carcinoma. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie* **120**, 109488.
- Tantin, D. (2013). Oct transcription factors in development and stem cells: insights and mechanisms. *Development* **140**, 2857-2866.
- Tate, P. H. & Bird, A. P. (1993). Effects of DNA methylation on DNA-binding proteins and gene expression. *Current opinion in genetics & development* **3**, 226-231.
- Tay, Y., Zhang, J., Thomson, A. M., Lim, B. & Rigoutsos, I. (2008). MicroRNAs to Nanog, Oct4 and Sox2 coding regions modulate embryonic stem cell differentiation. *Nature* **455**, 1124-1128.
- Taylor, S. M. & Jones, P. A. (1982). Mechanism of action of eukaryotic DNA methyltransferase. Use of 5-azacytosine-containing DNA. *Journal of molecular biology* **162**, 679-692.
- Tegenge, M. A., Stern, M. & Bicker, G. (2009). Nitric oxide and cyclic nucleotide signal transduction modulates synaptic vesicle turnover in human model neurons. *Journal of neurochemistry* **111**, 1434-1446.
- Testa, A., Donati, G., Yan, P., Romani, F., Huang, T. H., Vigano, M. A. & Mantovani, R. (2005). Chromatin immunoprecipitation (ChIP) on chip experiments uncover a widespread distribution of NF-Y binding CCAAT sites outside of core promoters. *The Journal of biological chemistry* **280**, 13606-13615.
- Thompson, B., Katsanis, N., Apostolopoulos, N., Thompson, D. C., Nebert, D. W. & Vasilou, V. (2019). Genetics and functions of the retinoic acid pathway, with special emphasis on the eye. *Human genomics* **13**, 61.
- Thomson, J. A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S. S., Waknitz, M. A., Swiergiel, J. J., Marshall, V. S. & Jones, J. M. (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* **282**, 1145-1147.
- Thu, K. L., Becker-Santos, D. D., Radulovich, N., Pikor, L. A., Lam, W. L. & Tsao, M. S. (2014). SOX15 and other SOX family members are important mediators of tumorigenesis in multiple cancer types. *Oncoscience* **1**, 326-335.
- Tighe, A. P. & Gudas, L. J. (2004). Retinoic acid inhibits leukemia inhibitory factor signaling pathways in mouse embryonic stem cells. *Journal of cellular physiology* **198**, 223-229.

- Tjeertes, J. V., Miller, K. M. & Jackson, S. P. (2009). Screen for DNA-damage-responsive histone modifications identifies H3K9Ac and H3K56Ac in human cells. *The EMBO journal* **28**, 1878-1889.
- Tomioka, M., Nishimoto, M., Miyagi, S., Katayanagi, T., Fukui, N., Niwa, H., Muramatsu, M. & Okuda, A. (2002). Identification of Sox-2 regulatory region which is under the control of Oct-3/4-Sox-2 complex. *Nucleic acids research* **30**, 3202-3213.
- Torres-Padilla, M. E. & Chambers, I. (2014). Transcription factor heterogeneity in pluripotent stem cells: a stochastic advantage. *Development* **141**, 2173-2181.
- Tost, J. & Gut, I. G. (2007a). Analysis of gene-specific DNA methylation patterns by pyrosequencing technology. *Methods in molecular biology* **373**, 89-102.
- Tost, J. & Gut, I. G. (2007b). DNA methylation analysis by pyrosequencing. *Nature protocols* **2**, 2265-2275.
- Trojanowski, J. Q., Mantione, J. R., Lee, J. H., Seid, D. P., You, T., Inge, L. J. & Lee, V. M. (1993). Neurons derived from a human teratocarcinoma cell line establish molecular and structural polarity following transplantation into the rodent brain. *Experimental neurology* **122**, 283-294.
- Tsao, C. M., Yan, M. D., Shih, Y. L., Yu, P. N., Kuo, C. C., Lin, W. C., Li, H. J. & Lin, Y. W. (2012). SOX1 functions as a tumor suppressor by antagonizing the WNT/beta-catenin signaling pathway in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* **56**, 2277-2287.
- Tse, C., Sera, T., Wolffe, A. P. & Hansen, J. C. (1998). Disruption of higher-order folding by core histone acetylation dramatically enhances transcription of nucleosomal arrays by RNA polymerase III. *Molecular and cellular biology* **18**, 4629-4638.
- Tsuboi, M., Hirabayashi, Y. & Gotoh, Y. (2019). Diverse gene regulatory mechanisms mediated by Polycomb group proteins during neural development. *Current opinion in neurobiology* **59**, 164-173.
- Uchikawa, M., Ishida, Y., Takemoto, T., Kamachi, Y. & Kondoh, H. (2003). Functional analysis of chicken Sox2 enhancers highlights an array of diverse regulatory elements that are conserved in mammals. *Developmental cell* **4**, 509-519.
- Uchikawa, M., Kamachi, Y. & Kondoh, H. (1999). Two distinct subgroups of Group B Sox genes for transcriptional activators and repressors: their expression during embryonic organogenesis of the chicken. *Mechanisms of development* **84**, 103-120.
- Ulitsky, I., Shkumatava, A., Jan, C. H., Sive, H. & Bartel, D. P. (2011). Conserved function of lincRNAs in vertebrate embryonic development despite rapid sequence evolution. *Cell* **147**, 1537-1550.
- Uwanogho, D., Rex, M., Cartwright, E. J., Pearl, G., Healy, C., Scotting, P. J. & Sharpe, P. T. (1995). Embryonic expression of the chicken Sox2, Sox3 and Sox11 genes suggests an interactive role in neuronal development. *Mechanisms of development* **49**, 23-36.
- van den Hurk, M., Kenis, G., Bardy, C., van den Hove, D. L., Gage, F. H., Steinbusch, H. W. & Rutten, B. P. (2016). Transcriptional and epigenetic mechanisms of cellular reprogramming to induced pluripotency. *Epigenomics* **8**, 1131-1149.
- Varambally, S., Cao, Q., Mani, R. S., Shankar, S., Wang, X., Ateeq, B., Laxman, B., Cao, X., Jing, X., Ramnarayanan, K., Brenner, J. C., Yu, J., Kim, J. H., Han, B., Tan, P., Kumar-Sinha, C., Lonigro, R. J., Palanisamy, N., Maher, C. A. &

- Chinnaiyan, A. M. (2008). Genomic loss of microRNA-101 leads to overexpression of histone methyltransferase EZH2 in cancer. *Science* **322**, 1695-1699.
- Venter, J. C., Adams, M. D., Myers, E. W., Li, P. W., Mural, R. J., Sutton, G. G., Smith, H. O., Yandell, M., Evans, C. A., Holt, R. A., Gocayne, J. D., Amanatides, P., Ballew, R. M., Huson, D. H., Wortman, J. R., Zhang, Q., Kodira, C. D., Zheng, X. H., Chen, L., Skupski, M., Subramanian, G., Thomas, P. D., Zhang, J., Gabor Miklos, G. L., Nelson, C., Broder, S., Clark, A. G., Nadeau, J., McKusick, V. A., Zinder, N., Levine, A. J., Roberts, R. J., Simon, M., Slayman, C., Hunkapiller, M., Bolanos, R., Delcher, A., Dew, I., Fasulo, D., Flanigan, M., Florea, L., Halpern, A., Hannenhalli, S., Kravitz, S., Levy, S., Mobarry, C., Reinert, K., Remington, K., Abu-Threideh, J., Beasley, E., Biddick, K., Bonazzi, V., Brandon, R., Cargill, M., Chandramouliswaran, I., Charlab, R., Chaturvedi, K., Deng, Z., Di Francesco, V., Dunn, P., Eilbeck, K., Evangelista, C., Gabrielian, A. E., Gan, W., Ge, W., Gong, F., Gu, Z., Guan, P., Heiman, T. J., Higgins, M. E., Ji, R. R., Ke, Z., Ketchum, K. A., Lai, Z., Lei, Y., Li, Z., Li, J., Liang, Y., Lin, X., Lu, F., Merkulov, G. V., Milshina, N., Moore, H. M., Naik, A. K., Narayan, V. A., Neelam, B., Nusskern, D., Rusch, D. B., Salzberg, S., Shao, W., Shue, B., Sun, J., Wang, Z., Wang, A., Wang, X., Wang, J., Wei, M., Wides, R., Xiao, C., Yan, C., Yao, A., Ye, J., Zhan, M., Zhang, W., Zhang, H., Zhao, Q., Zheng, L., Zhong, F., Zhong, W., Zhu, S., Zhao, S., Gilbert, D., Baumhueter, S., Spier, G., Carter, C., Cravchik, A., Woodage, T., Ali, F., An, H., Awe, A., Baldwin, D., Baden, H., Barnstead, M., Barrow, I., Beeson, K., Busam, D., Carver, A., Center, A., Cheng, M. L., Curry, L., Danaher, S., Davenport, L., Desilets, R., Dietz, S., Dodson, K., Doup, L., Ferreira, S., Garg, N., Gluecksmann, A., Hart, B., Haynes, J., Haynes, C., Heiner, C., Hladun, S., Hostin, D., Houck, J., Howland, T., Ibegwam, C., Johnson, J., Kalush, F., Kline, L., Koduru, S., Love, A., Mann, F., May, D., McCawley, S., McIntosh, T., McMullen, I., Moy, M., Moy, L., Murphy, B., Nelson, K., Pfannkoch, C., Pratts, E., Puri, V., Qureshi, H., Reardon, M., Rodriguez, R., Rogers, Y. H., Romblad, D., Ruhfel, B., Scott, R., Sitter, C., Smallwood, M., Stewart, E., Strong, R., Suh, E., Thomas, R., Tint, N. N., Tse, S., Vech, C., Wang, G., Wetter, J., Williams, S., Williams, M., Windsor, S., Winn-Deen, E., Wolfe, K., Zaveri, J., Zaveri, K., Abril, J. F., Guigo, R., Campbell, M. J., Sjolander, K. V., Karlak, B., Kejariwal, A., Mi, H., Lazareva, B., Hatton, T., Narechania, A., Diemer, K., Muruganujan, A., Guo, N., Sato, S., Bafna, V., Istrail, S., Lippert, R., Schwartz, R., Walenz, B., Yooseph, S., Allen, D., Basu, A., Baxendale, J., Blick, L., Caminha, M., Carnes-Stine, J., Caulk, P., Chiang, Y. H., Coyne, M., Dahlke, C., Mays, A., Dombroski, M., Donnelly, M., Ely, D., Esparham, S., Fosler, C., Gire, H., Glanowski, S., Glasser, K., Glodek, A., Gorokhov, M., Graham, K., Gropman, B., Harris, M., Heil, J., Henderson, S., Hoover, J., Jennings, D., Jordan, C., Jordan, J., Kasha, J., Kagan, L., Kraft, C., Levitsky, A., Lewis, M., Liu, X., Lopez, J., Ma, D., Majoros, W., McDaniel, J., Murphy, S., Newman, M., Nguyen, T., Nguyen, N., Nodell, M., Pan, S., Peck, J., Peterson, M., Rowe, W., Sanders, R., Scott, J., Simpson, M., Smith, T., Sprague, A., Stockwell, T., Turner, R., Venter, E., Wang, M., Wen, M., Wu, D., Wu, M., Xia, A., Zandieh, A. & Zhu, X. (2001). The sequence of the human genome. *Science* **291**, 1304-1351.

- Vidal, V. P., Chaboissier, M. C., Lutzkendorf, S., Cotsarelis, G., Mill, P., Hui, C. C., Ortonne, N., Ortonne, J. P. & Schedl, A. (2005). Sox9 is essential for outer root sheath differentiation and the formation of the hair stem cell compartment. *Current biology : CB* **15**, 1340-1351.
- Viswanathan, S. R., Daley, G. Q. & Gregory, R. I. (2008). Selective blockade of microRNA processing by Lin28. *Science* **320**, 97-100.
- Vriz, S., Joly, C., Boulekbache, H. & Condamine, H. (1996). Zygotic expression of the zebrafish Sox-19, an HMG box-containing gene, suggests an involvement in central nervous system development. *Brain research. Molecular brain research* **40**, 221-228.
- Waddington, C. H. (1959). Canalization of development and genetic assimilation of acquired characters. *Nature* **183**, 1654-1655.
- Wade, P. A. (2001). Methyl CpG-binding proteins and transcriptional repression. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* **23**, 1131-1137.
- Wang, J., Levasseur, D. N. & Orkin, S. H. (2008). Requirement of Nanog dimerization for stem cell self-renewal and pluripotency. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 6326-6331.
- Wang, R., van Leeuwen, R. W., Boers, A., Klip, H. G., de Meyer, T., Steenbergen, R. D., van Criekinge, W., van der Zee, A. G., Schuurin, E. & Wisman, G. B. (2016). Genome-wide methylome analysis using MethylCap-seq uncovers 4 hypermethylated markers with high sensitivity for both adeno- and squamous-cell cervical carcinoma. *Oncotarget* **7**, 80735-80750.
- Wang, T. W., Stromberg, G. P., Whitney, J. T., Brower, N. W., Klymkowsky, M. W. & Parent, J. M. (2006). Sox3 expression identifies neural progenitors in persistent neonatal and adult mouse forebrain germinative zones. *The Journal of comparative neurology* **497**, 88-100.
- Wang, X., He, C., Moore, S. C. & Ausio, J. (2001). Effects of histone acetylation on the solubility and folding of the chromatin fiber. *The Journal of biological chemistry* **276**, 12764-12768.
- Wang, Z., Oron, E., Nelson, B., Razis, S. & Ivanova, N. (2012). Distinct lineage specification roles for NANOG, OCT4, and SOX2 in human embryonic stem cells. *Cell stem cell* **10**, 440-454.
- Ware, C. B., Wang, L., Mecham, B. H., Shen, L., Nelson, A. M., Bar, M., Lamba, D. A., Dauphin, D. S., Buckingham, B., Askari, B., Lim, R., Tewari, M., Gartler, S. M., Issa, J. P., Pavlidis, P., Duan, Z. & Blau, C. A. (2009). Histone deacetylase inhibition elicits an evolutionarily conserved self-renewal program in embryonic stem cells. *Cell stem cell* **4**, 359-369.
- Watanabe, T., Totoki, Y., Toyoda, A., Kaneda, M., Kuramochi-Miyagawa, S., Obata, Y., Chiba, H., Kohara, Y., Kono, T., Nakano, T., Surani, M. A., Sakaki, Y. & Sasaki, H. (2008). Endogenous siRNAs from naturally formed dsRNAs regulate transcripts in mouse oocytes. *Nature* **453**, 539-543.
- Watt, F. & Molloy, P. L. (1988). Cytosine methylation prevents binding to DNA of a HeLa cell transcription factor required for optimal expression of the adenovirus major late promoter. *Genes & development* **2**, 1136-1143.
- Wegner, M. (1999). From head to toes: the multiple facets of Sox proteins. *Nucleic acids research* **27**, 1409-1420.

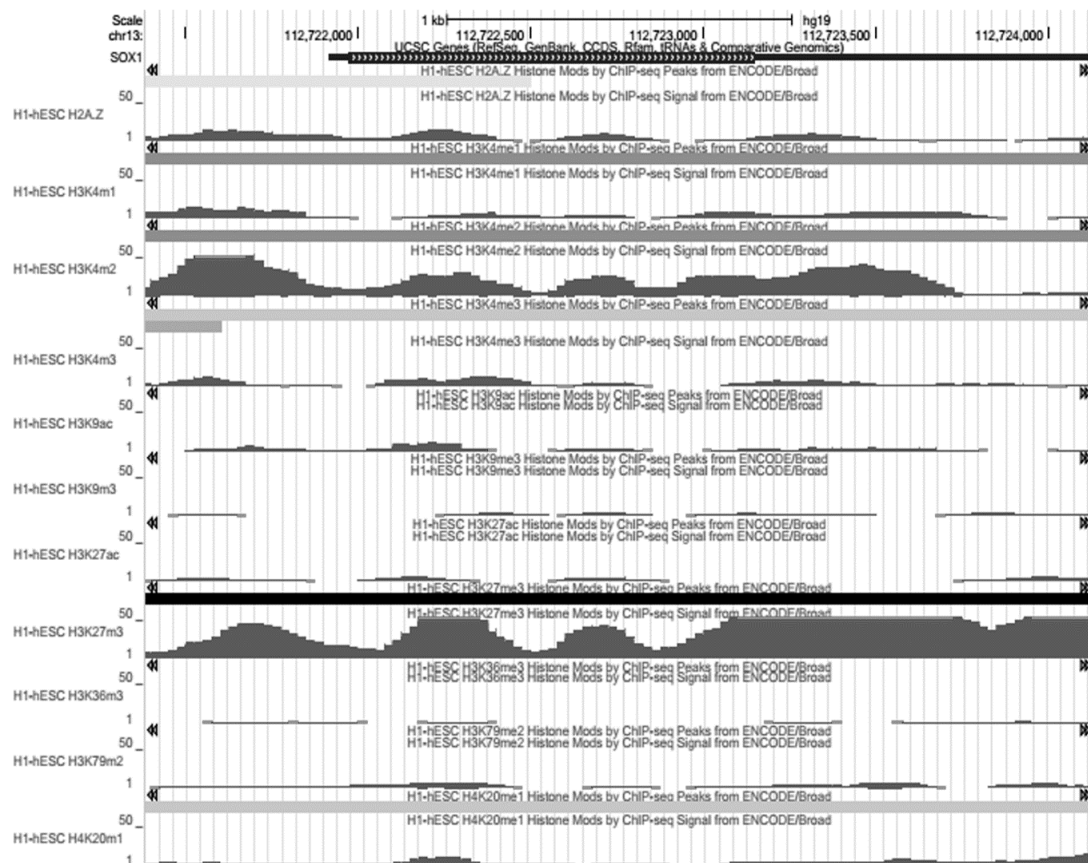
- Wegner, M. (2010). All purpose Sox: The many roles of Sox proteins in gene expression. *The international journal of biochemistry & cell biology* **42**, 381-390.
- Wei, B., Liu, G., Cai, H. L., Li, G. P., Huang, H. Q., Luo, Q. & Huang, Z. J. (2016). [Methylation and demethylation of SOX2 gene promoter in BGC-823 gastric cancer cells]. *Zhonghua yi xue za zhi* **96**, 2548-2553.
- Wei, R., Ding, C., Rodriguez, R. A. & Del Mar Requena Mullor, M. (2018). The SOX2OT/miR-194-5p axis regulates cell proliferation and mobility of gastric cancer through suppressing epithelial-mesenchymal transition. *Oncology letters* **16**, 6361-6368.
- Weider, M. & Wegner, M. (2017). SoxE factors: Transcriptional regulators of neural differentiation and nervous system development. *Seminars in cell & developmental biology* **63**, 35-42.
- Weina, K. & Utikal, J. (2014). SOX2 and cancer: current research and its implications in the clinic. *Clinical and translational medicine* **3**, 19.
- Weiss, J., Meeks, J. J., Hurley, L., Raverot, G., Frassetto, A. & Jameson, J. L. (2003). Sox3 is required for gonadal function, but not sex determination, in males and females. *Molecular and cellular biology* **23**, 8084-8091.
- Wentzensen, N., Bakkum-Gamez, J. N., Killian, J. K., Sampson, J., Guido, R., Glass, A., Adams, L., Luhn, P., Brinton, L. A., Rush, B., d'Ambrosio, L., Gunja, M., Yang, H. P., Garcia-Closas, M., Lacey, J. V., Jr., Lissowska, J., Podratz, K., Meltzer, P., Shridhar, V. & Sherman, M. E. (2014). Discovery and validation of methylation markers for endometrial cancer. *International journal of cancer* **135**, 1860-1868.
- Wiebe, M. S., Wilder, P. J., Kelly, D. & Rizzino, A. (2000). Isolation, characterization, and differential expression of the murine Sox-2 promoter. *Gene* **246**, 383-393.
- Williamson, K. A., Hever, A. M., Rainger, J., Rogers, R. C., Magee, A., Fiedler, Z., Keng, W. T., Sharkey, F. H., McGill, N., Hill, C. J., Schneider, A., Messina, M., Turnpenny, P. D., Fantes, J. A., van Heyningen, V. & FitzPatrick, D. R. (2006). Mutations in SOX2 cause anophthalmia-esophageal-genital (AEG) syndrome. *Human molecular genetics* **15**, 1413-1422.
- Willing, A. E., Saporta, S., Lixian, J., Milliken, M., Poulos, S., Bowersox, S. S. & Sanberg, P. R. (2002). Preliminary study of the behavioral effects of LBS-neuron implantation on seizure susceptibility following middle cerebral artery occlusion in the rats. *Neurotoxicity research* **4**, 111-118.
- Willing, A. E., Sudberry, J. J., Othberg, A. I., Saporta, S., Poulos, S. G., Cameron, D. F., Freeman, T. B. & Sanberg, P. R. (1999). Sertoli cells decrease microglial response and increase engraftment of human hNT neurons in the hemiparkinsonian rat striatum. *Brain research bulletin* **48**, 441-444.
- Willing, A. E., Zigova, T., Milliken, M., Poulos, S., Saporta, S., McGrogan, M., Snable, G. & Sanberg, P. R. (2002). Lithium exposure enhances survival of NT2N cells (hNT neurons) in the hemiparkinsonian rat. *The European journal of neuroscience* **16**, 2271-2278.
- Winzi, M., Casas Vila, N., Paszkowski-Rogacz, M., Ding, L., Noack, S., Theis, M., Butter, F. & Buchholz, F. (2018). The long noncoding RNA lncR492 inhibits neural differentiation of murine embryonic stem cells. *PloS one* **13**, e0191682.

- Wong, O. G. & Cheung, A. N. (2016). Stem cell transcription factor NANOG in cancers--is eternal youth a curse? *Expert opinion on therapeutic targets* **20**, 407-417.
- Wood, H. B. & Episkopou, V. (1999). Comparative expression of the mouse Sox1, Sox2 and Sox3 genes from pre-gastrulation to early somite stages. *Mechanisms of development* **86**, 197-201.
- Woods, K. S., Cundall, M., Turton, J., Rizotti, K., Mehta, A., Palmer, R., Wong, J., Chong, W. K., Al-Zyoud, M., El-Ali, M., Otonkoski, T., Martinez-Barbera, J. P., Thomas, P. Q., Robinson, I. C., Lovell-Badge, R., Woodward, K. J. & Dattani, M. T. (2005). Over- and underdosage of SOX3 is associated with infundibular hypoplasia and hypopituitarism. *American journal of human genetics* **76**, 833-849.
- Wu, Y., Chen, X., Liang, Y., Li, J., Zhang, K., Dai, L., Guan, X., Wang, K. & Bai, Y. (2018). Overexpression of long non-coding RNA SOX2OT promotes esophageal squamous cell carcinoma growth. *Cancer cell international* **18**, 76.
- Xia, Y., Papalopulu, N., Vogt, P. K. & Li, J. (2000). The oncogenic potential of the high mobility group box protein Sox3. *Cancer research* **60**, 6303-6306.
- Xu, L., Glass, C. K. & Rosenfeld, M. G. (1999). Coactivator and corepressor complexes in nuclear receptor function. *Current opinion in genetics & development* **9**, 140-147.
- Xu, N., Papagiannakopoulos, T., Pan, G., Thomson, J. A. & Kosik, K. S. (2009). MicroRNA-145 regulates OCT4, SOX2, and KLF4 and represses pluripotency in human embryonic stem cells. *Cell* **137**, 647-658.
- Xu, Y., Wu, F., Tan, L., Kong, L., Xiong, L., Deng, J., Barbera, A. J., Zheng, L., Zhang, H., Huang, S., Min, J., Nicholson, T., Chen, T., Xu, G., Shi, Y., Zhang, K. & Shi, Y. G. (2011). Genome-wide regulation of 5hmC, 5mC, and gene expression by Tet1 hydroxylase in mouse embryonic stem cells. *Molecular cell* **42**, 451-464.
- Xu, Y., Xu, C., Kato, A., Tempel, W., Abreu, J. G., Bian, C., Hu, Y., Hu, D., Zhao, B., Cerovina, T., Diao, J., Wu, F., He, H. H., Cui, Q., Clark, E., Ma, C., Barbara, A., Veenstra, G. J., Xu, G., Kaiser, U. B., Liu, X. S., Sugrue, S. P., He, X., Min, J., Kato, Y. & Shi, Y. G. (2012). Tet3 CXXC domain and dioxygenase activity cooperatively regulate key genes for Xenopus eye and neural development. *Cell* **151**, 1200-1213.
- Yabuta, Y., Kurimoto, K., Ohinata, Y., Seki, Y. & Saitou, M. (2006). Gene expression dynamics during germline specification in mice identified by quantitative single-cell gene expression profiling. *Biology of reproduction* **75**, 705-716.
- Yan, Q., Wang, F., Miao, Y., Wu, X., Bai, M., Xi, X. & Feng, Y. (2016). Sex-determining region Y-box3 (SOX3) functions as an oncogene in promoting epithelial ovarian cancer by targeting Src kinase. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* **37**, 12263-12271.
- Young, R. A. (2011). Control of the embryonic stem cell state. *Cell* **144**, 940-954.
- Yu, C., Zhang, Y. L., Pan, W. W., Li, X. M., Wang, Z. W., Ge, Z. J., Zhou, J. J., Cang, Y., Tong, C., Sun, Q. Y. & Fan, H. Y. (2013). CRL4 complex regulates mammalian oocyte survival and reprogramming by activation of TET proteins. *Science* **342**, 1518-1521.

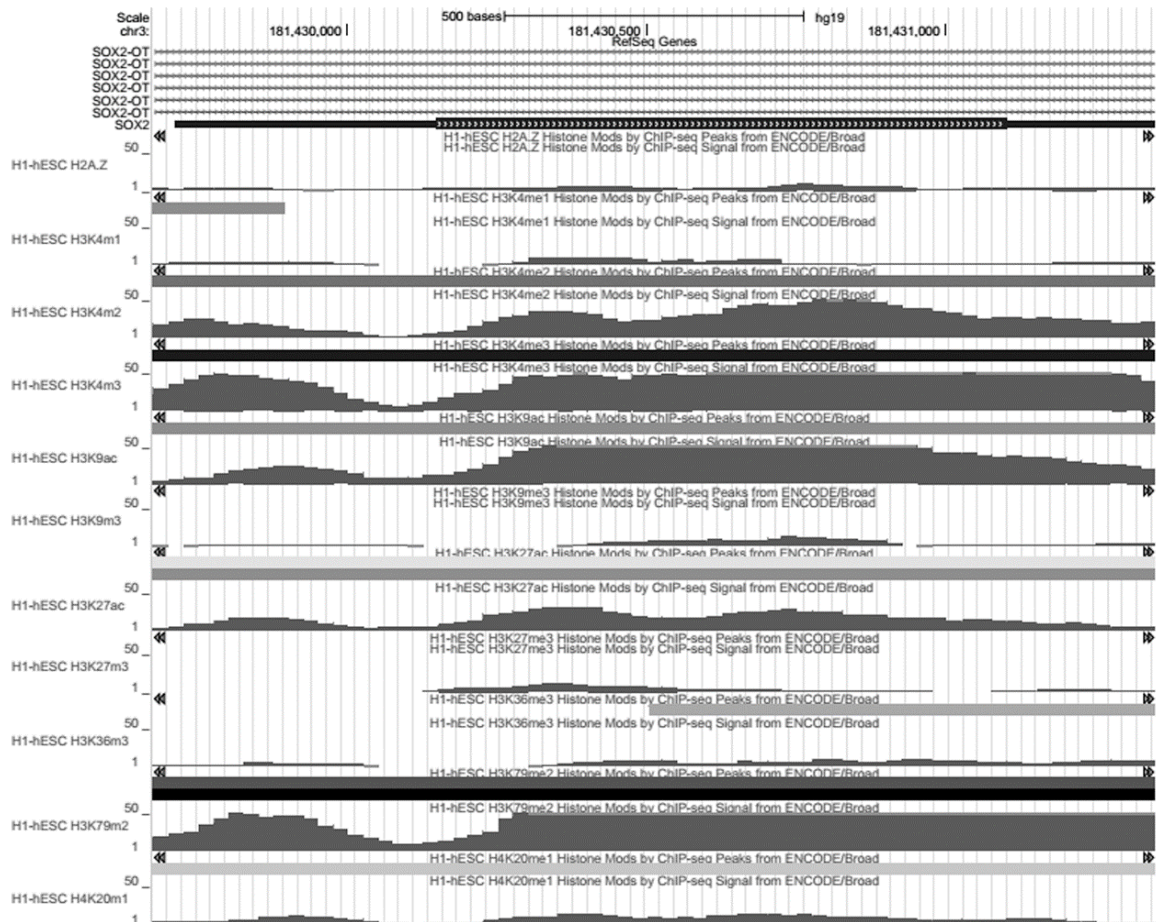
- Yuan, M., Yao, L. & Abulizi, G. (2019). Tumor-suppressor gene SOX1 is a methylation-specific expression gene in cervical adenocarcinoma. *Medicine* **98**, e17225.
- Zachariah, R. M. & Rastegar, M. (2012). Linking epigenetics to human disease and Rett syndrome: the emerging novel and challenging concepts in MeCP2 research. *Neural plasticity* **2012**, 415825.
- Zaletel, I., Schwirtlich, M., Perovic, M., Jovanovic, M., Stevanovic, M., Kanazir, S. & Puskas, N. (2018). Early Impairments of Hippocampal Neurogenesis in 5xFAD Mouse Model of Alzheimer's Disease Are Associated with Altered Expression of SOXB Transcription Factors. *Journal of Alzheimer's disease : JAD* **65**, 963-976.
- Zaret, K. S., Watts, J., Xu, J., Wandzioch, E., Smale, S. T. & Sekiya, T. (2008). Pioneer factors, genetic competence, and inductive signaling: programming liver and pancreas progenitors from the endoderm. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* **73**, 119-126.
- Zentner, G. E. & Henikoff, S. (2013). Regulation of nucleosome dynamics by histone modifications. *Nature structural & molecular biology* **20**, 259-266.
- Zhang, J., Wang, X., Li, M., Han, J., Chen, B., Wang, B. & Dai, J. (2006). NANOGP8 is a retrogene expressed in cancers. *The FEBS journal* **273**, 1723-1730.
- Zhang, K., Li, Y., Qu, L., Ma, X., Zhao, H. & Tang, Y. (2018). Long noncoding RNA Sox2 overlapping transcript (SOX2OT) promotes non-small-cell lung cancer migration and invasion via sponging microRNA 132 (miR-132). *OncoTargets and therapy* **11**, 5269-5278.
- Zhang, K., Williams, K. E., Huang, L., Yau, P., Siino, J. S., Bradbury, E. M., Jones, P. R., Minch, M. J. & Burlingame, A. L. (2002). Histone acetylation and deacetylation: identification of acetylation and methylation sites of HeLa histone H4 by mass spectrometry. *Molecular & cellular proteomics : MCP* **1**, 500-508.
- Zhang, L. Y., Yuan, Y. Q., Zhou, D. M., Wang, Z. Y., Ju, S. G., Sun, Y., Li, J. & Fu, J. X. (2016). Impact of Global and Gene-Specific DNA Methylation in de Novo or Relapsed Acute Myeloid Leukemia Patients Treated with Decitabine. *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP* **17**, 431-437.
- Zhang, S. & Cui, W. (2014). Sox2, a key factor in the regulation of pluripotency and neural differentiation. *World journal of stem cells* **6**, 305-311.
- Zhao, F. Q. (2013). Octamer-binding transcription factors: genomics and functions. *Frontiers in bioscience* **18**, 1051-1071.
- Zhao, S., Nichols, J., Smith, A. G. & Li, M. (2004). SoxB transcription factors specify neuroectodermal lineage choice in ES cells. *Molecular and cellular neurosciences* **27**, 332-342.
- Zhao, Y., Zhou, H., Ma, K., Sun, J., Feng, X., Geng, J., Gu, J., Wang, W., Zhang, H., He, Y., Guo, S., Zhou, X., Yu, J. & Lin, Q. (2013). Abnormal methylation of seven genes and their associations with clinical characteristics in early stage non-small cell lung cancer. *Oncology letters* **5**, 1211-1218.
- Zhong, X. & Jin, Y. (2009). Critical roles of coactivator p300 in mouse embryonic stem cell differentiation and Nanog expression. *The Journal of biological chemistry* **284**, 9168-9175.
- Zhou, X., Duan, X., Qian, J. & Li, F. (2009). Abundant conserved microRNA target sites in the 5'-untranslated region and coding sequence. *Genetica* **137**, 159-164.

- Zhu, W. G., Srinivasan, K., Dai, Z., Duan, W., Druhan, L. J., Ding, H., Yee, L., Villalona-Calero, M. A., Plass, C. & Otterson, G. A. (2003). Methylation of adjacent CpG sites affects Sp1/Sp3 binding and activity in the p21(Cip1) promoter. *Molecular and cellular biology* **23**, 4056-4065.
- Zile, M. H. (2004). Vitamin a requirement for early cardiovascular morphogenesis specification in the vertebrate embryo: insights from the avian embryo. *Experimental biology and medicine* **229**, 598-606.
- Ziller, M. J., Edri, R., Yaffe, Y., Donaghey, J., Pop, R., Mallard, W., Issner, R., Gifford, C. A., Goren, A., Xing, J., Gu, H., Cachiarelli, D., Tsankov, A., Epstein, C., Rinn, J. R., Mikkelsen, T. S., Kohlbacher, O., Gnirke, A., Bernstein, B. E., Elkabetz, Y. & Meissner, A. (2015). Dissecting neural differentiation regulatory networks through epigenetic footprinting. *Nature* **518**, 355-359.

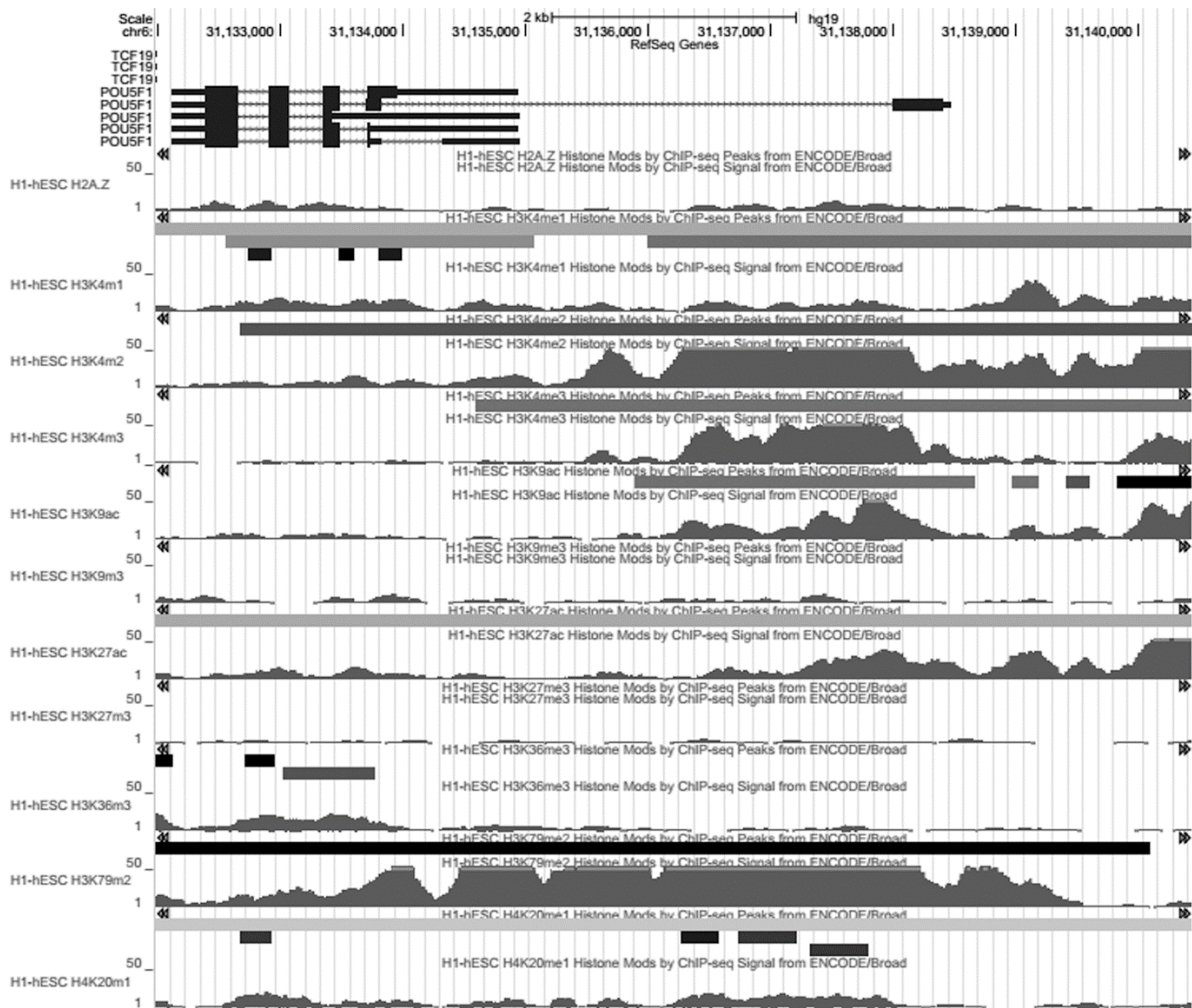
8. PRILOZI



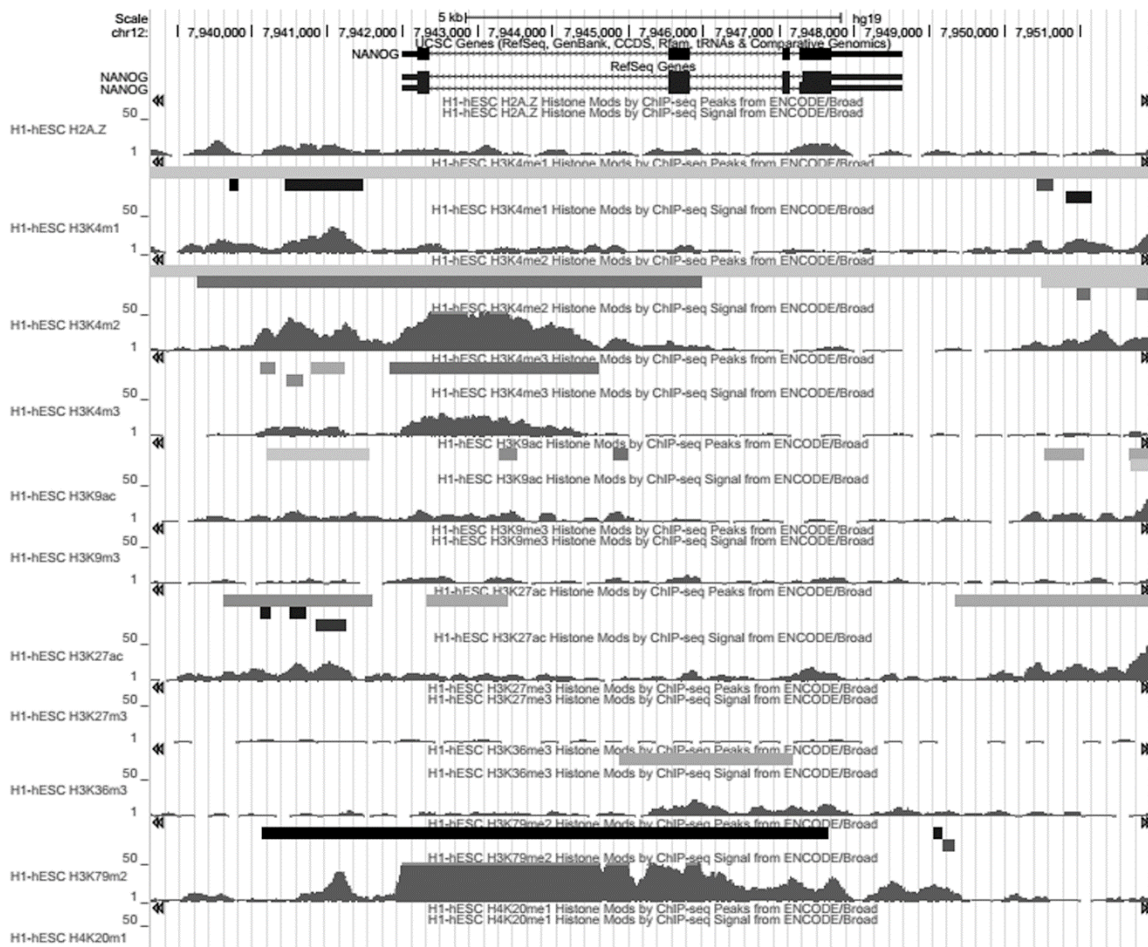
Slika p1. Histonske modifikacije u regionu koji okružuje gen *SOX1* u H1 liniji humanih embrionalnih matičnih ćelija (označene kao H1-hESC). Setovi podataka dobijeni su pretragom UCSC Genome Browser-a. Od vrha ka dnu prikazani su: H2A.Z; markeri asocirani sa pojačivačima i promotorima – H3K4me1, H3K4me2 i H3K4me3; aktivirajući markeri H3K9ac, H3K9me3 i H3K27ac; reprimirajući marker H3K27me3; markeri kodirajućih regiona H3K36me3, H3K79me2 i H4K20me1. Strelice u prvoj traci označavaju smer transkripcije.



Slika p2. Histonske modifikacije u regionu koji okružuje gen *SOX2* u H1 liniji humanih embrionalnih matičnih ćelija (označene kao H1-hESC). Setovi podataka dobijeni su pretragom UCSC Genome Browser-a. Od vrha ka dnu prikazani su: H2A.Z; markeri asocirani sa pojačivačima i promotorima – H3K4me1, H3K4me2 i H3K4me3; aktivirajući markeri H3K9ac, H3K9me3 i H3K27ac; reprimirajući marker H3K27me3; markeri kodirajućih regiona H3K36me3, H3K79me2 i H4K20me1. Strelice u prvoj traci označavaju smer transkripcije.



Slika p3. Histonske modifikacije u regionu koji okružuje gen *OCT4* (*POU5F1*) u H1 liniji humanih embrionalnih matičnih ćelija (označene kao H1-hESC). Setovi podataka dobijeni su pretragom UCSC Genome Browser-a. Od vrha ka dnu prikazani su: H2A.Z; markeri asociрани sa pojačivačima i promotorima – H3K4me1, H3K4me2 i H3K4me3; aktivirajući markeri H3K9ac, H3K9me3 i H3K27ac; reprimirajući marker H3K27me3; markeri kodirajućih regiona H3K36me3, H3K79me2 i H4K20me1. Strelice u prvj traci označavaju smer transkripcije.



Slika p4. Histonske modifikacije u regionu koji okružuje gen *NANOG* u H1 liniji humanih embrionalnih matičnih ćelija (označene kao H1-hESC). Setovi podataka dobijeni su pretragom UCSC Genome Browser-a. Od vrha ka dnu prikazani su: H2A.Z; markeri asocirani sa pojačivačima i promotorima – H3K4me1, H3K4me2 i H3K4me3; aktivirajući markeri H3K9ac, H3K9me3 i H3K27ac; reprimirajući marker H3K27me3; markeri kodirajućih regiona H3K36me3, H3K79me2 i H4K20me1. Strelice u prvoj traci označavaju smer transkripcije.

Biografija autora

Vladanka M. Vuković rođena je 22.08.1987. god u Užicu. Diplomске studije na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu završila je u roku sa prosečnom ocenom 9,73. Doktorske studije na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, studijski program Molekularna biologija, modul Molekularna biologija eukariota, upisala je 2011. godine. Od januara 2012. godine zaposlena je u Laboratoriji za humanu molekularnu genetiku Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Univerziteta u Beogradu. Dobitnik je Erasmus Mundus stipendije zahvaljujući kojoj je tokom 2013. i 2014. godine boravila na Univerzitetu u Milanu, u Laboratoriji profesora Roberta Mantovanija, gde je realizovala deo eksperimenata za svoju doktorsku disertaciju. Autor je ili koautor 12 naučnih radova. Autor je ili koautor 24 saopštenja na međunarodnim naučnim skupovima štampanih u izvodu (M34) i 12 saopštenja na nacionalnim naučnim skupovima štampanih u izvodu (M64). Pored navedenog, bila je uključena u realizaciju projekata za popularizaciju nauke.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а _____ Vladanka M. Vuković _____

број индекса _____ M3014/2011 _____

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Epigenetički mehanizmi regulacije ekspresije humanog gena SOX3 i gena faktora pluripotentnosti (SOX2, OCT4 i NANOG) tokom ranih faza neuralne diferencijacije NTera2/D1 ćelija

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

Потпис докторанда

У Београду, 23.11.2020. _____

Прилог 2.

**Изјава о истоветности штампане и електронске
верзије докторског рада**

Име и презиме аутора _____ Vladanka M. Vuković _____

Број индекса _____ M3014/2011 _____

Студијски програм _____ Molekularna biologija eukariota _____

Наслов рада _____ Epigenetički mehanizmi regulacije ekspresije humanog gena SOX3 i gena faktora pluripotentnosti (SOX2, OCT4 i NANOG) tokom ranih faza neuralne diferencijacije Ntera2/D1 ćelija _____

Ментор _____ dr Marija Mojsin _____

Потписани/а _____ Vladanka M. Vuković _____

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

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

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

Потпис докторанда

У Београду, _____ 23.11.2020. _____

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

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

Epigenetički mehanizmi regulacije ekspresije humanog gena *SOX3* i gena faktora pluripotencnosti (*SOX2*, *OCT4* i *NANOG*) tokom ranih faza neuralne diferencijacije NTera2/D1 ćelija

која је моје ауторско дело.

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

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

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

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

Потпис докторанда

У Београду, _____ 23.11.2020. _____

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

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

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

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

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

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

