

UNIVERZITET U BEOGRADU
BIOLOSKI FAKULTET

Jelena Popović

**Transkripciona regulacija
ekspresije humanog
SOX 14 gena**

Doktorska disertacija

Beograd, 2010.



PA 20 745

Uf 36 PP 4567

**Univerzitet u Beogradu
Biološki fakultet**

Jelena Popović

**Transkripciona regulacija ekspresije humanog
SOX14 gena**

Doktorska disertacija



Beograd, 2010.

ČLANOVI KOMISIJE:

**Dr Milena Stevanović, naučni savetnik, dopisni član SANU
Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjirstvo,
Univerzitet u Beogradu**

**Dr Dušanka Savić Pavićević, docent
Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu**

**Dr Svetlana Radović,
Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu**

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

Ovom prilikom zahvaljujem se Dr Mileni Stevanović na ukazanom poverenju, razumevanju, pomoći pri izradi ove teze, svim savetima i sugestijama, bez čega ovaj rad ne bi bio ostvaren.

Dr Dušanki Savić Pavićević zahvaljujem se za prihvatanje mentorstva i kritičkoj oceni ovog rada.

Dr Svetlani Radović zahvaljujem se na svim savetima i kritičkoj oceni rada.

Veliko hvala mojim dragim kolegama Goci, Mariji, Gruji, Andrijani, Isidori, Aci, Danijeli, Mileni i Jovani jer bi bez njih ovaj posao bio nezamisliv.

Posebnu zahvalnost dugujem našoj Tijani, koja je duboko verovala u sve moje eksperimentalne ideje.

Zahvaljujem se svim srcem ostalim kolegama u Institutu, koji su mi pomogli da realizujem ovaj rad, kao i ostalima koji su na bilo koji drugi način doprineli istom, a posebno pilates ekipi.

Posebno želim da se zahvalim mojoj dragoj porodici na podršci, pažnji i ljubavi...

Beograd, 25.4.2010.

APSTRAKT

Ekspresija *Sox14* gena detektovana je tokom različitih faza razvića nervnog sistema. U literaturi je poznato da je ekspresija *Sox14* gena miša i pileta dozno zavisna od signalnog molekula Sonic hedgehog (SHH), kao i to da je opšti transkripcioni faktor NF-Y važan za transkripcionu regulaciju humanog *SOX14* gena. U ovoj tezi su po prvi put analizirani molekularni mehanizmi uključeni u regulaciju ekspresije humanog *SOX14* gena, kao i uticaj FOXA2 i SHH signalnog molekula na njegovu ekspresiju.

Metodom elongacije reverznog oligonukleotida određen je start transkripcije ovog gena, koji se nalazi 251 nukleotid uzvodno od ATG kodona. Korišćenjem promotor-reporterskih konstrukata definisan je minimalni promotorski region *SOX14* gena (-470/+201) koji sadrži regulatorne elemente neophodne za bazalnu transkripcionu aktivnost u HepG2 ćelijama. Takođe, delecionom analizom optimalnog promotora identifikovan je pozitivni regulatorni region, na poziciji -783/-470. U okviru ovog regulatornog regiona *in silico* analizom je otkriveno potencijalno vezivno mesto za FOXA2 transkripcioni faktor koje je evolutivno očuvano kod sisara, kako po poziciji tako i po nukleotidnom sastavu. Rezultati prezentovani u ovom radu pokazali su da je tkivno specifični FOXA2 transkripcioni faktor važan za regulaciju ekspresije *SOX14* gena u U87MG ćelijama, kao i to da je upravo ovaj transkripcioni faktor odgovoran za posredovanje uticaja SHH signalnog puta na ekspresiju *SOX14* gena u HepG2 ćelijama.

Identifikacijom *Sox14* gena kod koze (*Capra hircus*), pacova (*Rattus norvegicus*) i govečeta (*Bos taurus*) dopunjena je baza podataka deponovanih sekvenci za *Sox14* gen kičmenjaka. Uporedna analiza *SOX14* ortologa pokazala je izuzetno visok stepen evolutivne očuvanosti ovog proteina. Uporednim mapiranjem *SOXB* gena kod različitih kičmenjaka izvršena je dopuna predloženog modela evolucije ove grupe gena.

Ova teza predstavlja prvu funkcionalnu karakterizaciju regulatornog regiona *SOX14* gena čoveka, kao i definisanje uloge transkripcionog faktora FOXA2 koji je uključen u signalni put kojim SHH ostvaruje uticaj na ekspresiju *SOX14* gena.

Ključne reči: pozitivni regulatorni region, *SOX14*, FOXA2, GLI, SHH

ABSTRACT

Sox14 gene expression is detected during different stages of neural development. It was previously shown that expression of *Sox14* gene in spinal cord explants of chick and mouse is regulated by Sonic hedgehog (SHH) in a dose-dependent manner, and that NF-Y transcription factor has important role in the transcriptional regulation of human *SOX14* gene. For the first time, we have performed analysis of the molecular mechanisms underlying the transcriptional regulation of *SOX14* gene expression, and demonstrated the role of FOXA2 and SHH in up-regulation of *SOX14* gene expression.

Using primer extension, we have identified the transcription start point of *SOX14* gene, placed 251 nt upstream of the ATG codon. Using promoter reporter constructs, we have determined the minimal *SOX14* gene promoter region (-470/+201) that confers the basal promoter activity in HepG2 cells. Deletion analysis of the optimal promoter region (-1123/+201) revealed *cis* regulatory region (-783/-470) that is necessary for *SOX14* promoter activity. Within this regulatory region, *in silico* analysis revealed the presence of consensus binding site for FOXA2 transcription factor which is conserved in both position and sequence among all analyzed mammalian orthologues. The presented results demonstrated that tissue specific transcription factor FOXA2 has important role in regulation of *SOX14* gene expression in U87MG cells and also that this transcription factor participates in SHH signaling pathway leading to *SOX14* gene activation in HepG2 cells.

In this thesis, for the first time, we have identified *Sox14* gene in goat (*Capra hircus*), cow (*Bos taurus*) and rat (*Rattus norvegicus*). Comparative analysis of SOX14 protein in vertebrates revealed remarkable evolutionary conservation. Mapping data presented in this thesis, has not only supported the proposed model of group B Sox genes evolution, but has also revealed additional events that occurred during evolution of those genes in vertebrates.

This work represents the first insight into functional characterization of the human *SOX14* gene regulatory region as well as signaling pathway implicated in SHH regulation of *SOX14* gene expression.

Key words: positive regulatory region, *SOX14*, FOXA2, GLI, SHH

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Transkripciona regulacija ekspresije gena	2
1.1.2. Pojačivači i utišivači transkripcije gena (enhenseri i sajenseri)	4
1.1.3. Epigenetska regulacija ekspresije gena	6
1.1.4. Regulacija ekspresije gena pomoću kratkih interferirajućih RNK	8
1.2. <i>SOX</i> geni/ <i>SOX</i> protein	10
1.3. <i>SOX</i> proteini kao transkripcioni faktori	15
1.3.1. Domenska struktura <i>SOX</i> proteina	15
1.3.2. Vezivanje <i>SOX</i> proteina za DNK	15
1.3.3. Konformacione promene DNK izazvane vezivanjem <i>SOX</i> proteina	17
1.3.4. Interakcije sa drugim proteinima	17
1.3.5. Lokalizacija <i>SOX</i> proteina u ćeliji	19
1.4. <i>SoxB</i> grupa gena	20
1.5. Evolucija <i>SoxB</i> grupe gena	23
1.6. <i>Fox</i> familija transkripcionih faktora	25
1.6.1. <i>FoxA2</i>	27
1.6.2. <i>Fox</i> i <i>Sox</i> geni	29
1.7. „Hedgehog“ signalni put	29
1.7.1. SHH signalni put kod čoveka	34
1.8. <i>SOX14</i> gen	36
1.8.1. Analiza promotora <i>SOX14</i> gena	40
2. CILJ RADA	42
3. MATERIJAL I METODE	43
3.1 Eksperimentalni material	43
3.1.1. Bakterijski sojevi korišćeni u radu	43
3.1.2. Vektori korišćeni u ovom radu	43
3.1.3. Plazmidni konstrukti korišćeni u ovom radu	44
3.1.4. Ćelijske linije korišćene u ovom radu	46
3.1.5. Antitela korišćena u ovom radu	46

3.1.6. Oligonukleotidi korišćeni u ovom radu	46
3.1.7. Radioaktivni izotopi	48
3.1.8. Komercijalni kitovi	48
3.2. Eksperimentalne metode	49
3.2.1. Određivanje starta transkripcije metodom elongacije oligonukleotida "Primer extension"	49
3.2.2. Sekvenciranje DNK T7 Sequencing Kit-om	50
3.2.3. Metode subkloniranja fragmenata DNK u komercijalni vektor	50
3.2.3.1. Enzimska reakcija isecanja DNK restriktionim enzimima	50
3.2.3.2. Defosforilacija DNK	51
3.2.3.3. Ligiranje fragmenata DNK	51
3.2.4. Izolacija plazmidne DNK "Qiagen EndoFree® Plasmid" kitom	51
3.2.5. Tranzijentna transfekcija HepG2 i U87MG ćelija kalcijum-fosfatnom precipitacijom	52
3.2.6. Priprema ćelijskih ekstrakata	53
3.2.7. β -galaktozidazni esej	53
3.2.8. CAT esej	54
3.2.9. Izolacija jedarnih proteina	55
3.2.10. Esej smanjene elektroforetske pokretljivosti (EMSA-electrophoretic mobility shift assay)	55
3.2.11. Generisanje mutiranog promotorskog konstruktta <i>SOX14</i> gena	57
3.2.12. Izolacija ukupnih ćeliskih proteina i „Western blot“ analiza	59
3.2.13. Izolacija RNK	59
3.2.14. Oslobođanje RNK izolata od prisustva DNK	60
3.2.15. Reverzna transkripcija	60
3.2.16. RT-PCR	61
3.2.17. PCR u realnom vremenu (Real time PCR)	62
3.2.18. Utišavanje FOXA2 transkripcionog faktora primenom siRNK	62
3.2.19. Analiza sekvenci SOX14 ortologa	63
3.2.20. Izolacija genomske DNK iz krvi	65
3.2.21. Izolacija genomske DNK iz krvi CTAB metodom	65

3.2.22. Izolacija genomske DNK iz jetre pacova	66
3.2.23. Reakcija lančanog umnožavanja DNK (PCR)	66
3.2.24. Određivanje hromozomskih pozicija SOXB grupe gena	67
4. REZULTATI	68
4.1. Određivanje starta transkripcije <i>SOX14</i> gena	68
4.2. Definisanje bazalnog promotora <i>SOX14</i> gena	70
4.3. Definisanje pozitivnog regulatornog regiona u okviru <i>SOX14</i> optimalnog promotora	73
4.4. U87MG ćelijska linija kao model sistem za proučavanje regulacije ekspresije <i>SOX14</i> gena	75
4.5. Analiza pozitivnog regulatornog regiona u U87MG ćelijama	76
4.6. <i>In silico</i> analiza regiona <i>SmaI-XbaI</i> (320CAT5)	77
4.7. Interakcije jedarnih proteina iz HepG2 i U87MG ćelija sa FOXA2 vezivnim mestom	81
4.8. Uticaj mutacije u FOXA2 vezivnom mestu na aktivnost konstrukta 320CAT5	86
4.9. Uticaj povećane ekspresije FOXA2 transkripcionog faktora na aktivnost konstrukta 320CAT5	88
4.10. Razlika u ekspresiji FOXA2 transkripcionog faktora u HepG2 i U87MG ćelijama	89
4.11. Efekat povećane ekspresije FOXA2 na vezivanje ukupnih proteina za probu 36	91
4.12. Efekat povećane ekspresije FOXA2 proteina na endogeni nivo ekspresije <i>SOX14</i> gena u U87MG ćelijama	93
4.13. Efekat utišavanja ekspresije FOXA2 gena na ekspresiju <i>SOX14</i> gena	95
4.14. Uticaj signalnog molekula „Sonic Hedgehog“ na ekspresiju <i>SOX14</i> gena	96
4.15. Uticaj povećane ekspresije <i>Gli1-3</i> transkripcionih faktora na ekspresiju <i>SOX14</i> gena	98
4.16. Uticaj SHH-N proteina na aktivnost konstrukta 320CAT5	100
4.17. Uticaj <i>FOXA2</i> siRNK na indukciju ekspresije <i>SOX14</i> gena SHH-N rekombinantnim proteinom	101

4.18. Analiza SOX14 proteina	102
4.19. Analiza genomske organizacije i evolucije SOXB grupe gena	108
5. DISKUSIJA	110
5.1. Određivanje starta transkripcije i definisanje bazalnog promotora <i>SOX14</i> gena	110
5.2. Definisanje pozitivnog kontrolnog regiona <i>SOX14</i> promotora	111
5.3. U87MG ćelijska linija kao novi model sistem u proučavanju ekspresije <i>SOX14</i> gena	112
5.4. Kompjuterska analiza pozitivnog kontrolnog regiona <i>SmaI-XbaI</i>	113
5.5. Potencijalna uloga FOXA2 transkripcionog faktora u posredovanju SHH signalnog puta tokom regulacije ekspresije <i>SOX14</i> gena	114
5.6. Uloga FOXA2 transkripcioni faktora u regulaciji ekspresije <i>SOX14</i> gena	116
5.7. Uloga GLI1 transkripcionog faktora i SHH signalnog peptida u regulaciji ekspresije <i>SOX14</i> gena	117
5.8. Efekat utišavanja FOXA2 transkripcionog faktora na indukciju <i>SOX14</i> gena SHH signalnim peptidom	118
5.9. Potencijalni model regulacije ekspresije <i>SOX14</i> gena	120
5.10. Analiza SOX14 proteinske sekvence	122
5.11. Osvrt na evoluciju SOXB grupe gena	123
6. ZAKLJUČCI	124
7. DODATAK	126
8. LITERATURA	131

1. UVOD

Veliki broj različitih tipova ćelija u višćelijskim organizmima postoji zahvaljujući diferencijalnoj i strogo kontrolisanoj ekspresiji velikog broja gena. Danas se zna da evolucija kompleksnih bioloških sistema nije išla samo u pravcu stvaranja većeg broja novih gena, već je došlo i do razvoja složenijih i raznovrsnijih mehanizama regulacije ekspresije postojećih gena. Tako, regulacija genske ekspresije kod eukariota zahteva precizne prostorne i vremenski koordinisane interakcije između opštih i specifičnih transkripcionih faktora i *cis* regulatornih elemenata kao što su promotori, pojačivači (enhenser), prigušivači (silencer) i insulatori (Orphanides i Reinberg, 2002; Smale i Kadonaga, 2003; West i Fraser, 2005). Na putu od DNK do proteina postoji niz koraka koji su regulisani na različite načine. Ćelija može kontrolisati sintezu proteina na sledećim nivoima (Darnell, 1982):

1. kontrolisanjem kada i koliko često će se dati gen prepisivati (**transkripciona kontrola**)
2. kontrolisanjem kako će primarni transkript biti obrađen (**kontrola procesovanja RNK**)
3. kontrolisanjem transporta iRNK iz nukleusa u citoplazmu (**kontrola transporta RNK**)
4. kontrolisanjem prepisivanja iRNK na ribozomima (**translaciona kontrola**)
5. kontrolom destabilizacije određenih iRNK u citoplazmi (**degradaciona kontrola**)
6. selektivnom aktivacijom ili inaktivacijom proteina koji su već sintetisani (**kontrola aktivacije proteina**)
7. remodelovanjem hromatina koje dovodi do promene ekspresije gena (**epigenetska kontrola ekspresije**)

U uvodnom delu biće dat kratak pregled transkripcione regulacije ekspresije gena kod eukariota koja predstavlja jedan od najvažnijih vidova kontrole ekspresije (Alberts, 1994). Takođe, biće predstavljeni podaci vezani za strukturu, funkciju i evoluciju B subfamilije *SOX/Sox* gena kao i dosadašnja saznanja o ulozi ovih gena u različitim procesima tokom embrionalnog razvića. Posebna pažnja biće posvećena profilu ekspresije i funkciji *SOX14/Sox14* gena tokom embrionalnog razvića kičmenjaka. U cilju boljeg sagledavanja dobijenih rezultata biće kratko opisani „Sonic hedgehog“ (SHH) signalni put i Fox familija transkripcionih faktora.

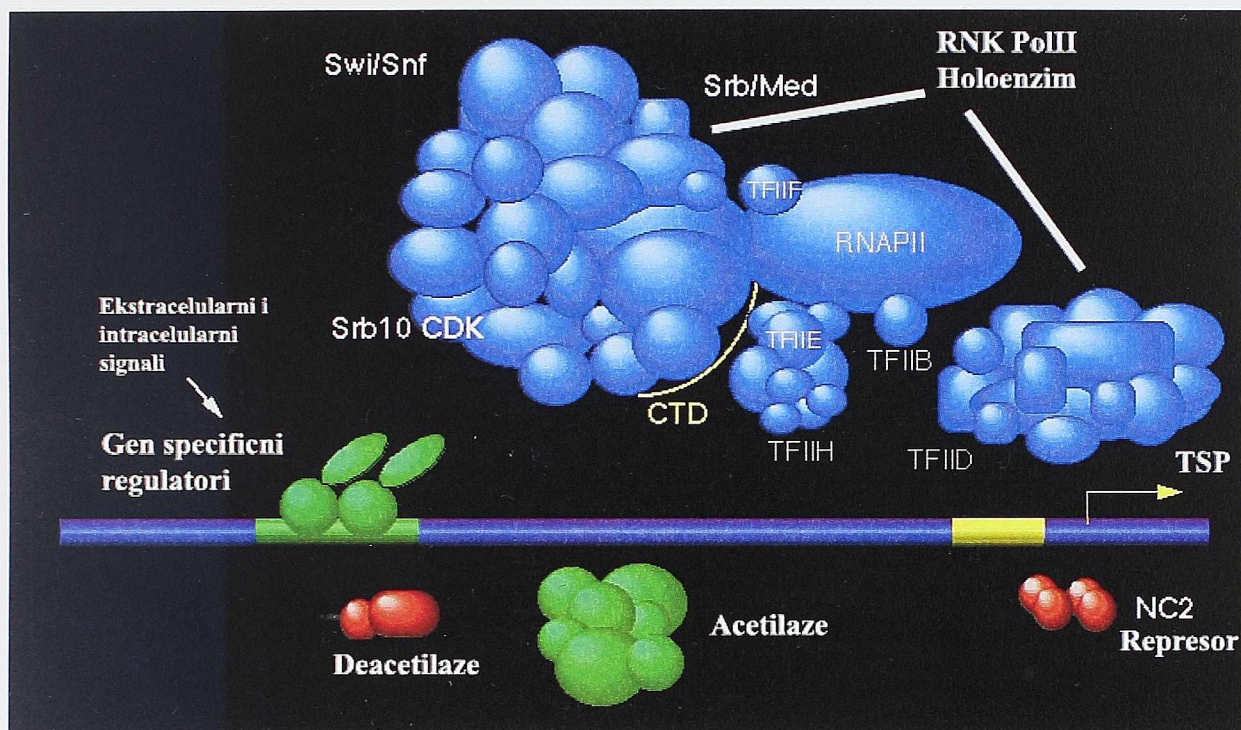
1.1. Transkripciona regulacija ekspresije gena

Transkripciji eukariotskih gena prethodi veliki broj događaja u ćeliji, kao što su dekondezacija i remodelovanje hromatina na ciljnom lokusu, modifikacije histona, vezivanje transkripcionih aktivatora i koaktivatora za enhenserske i promotorske elemente i vezivanje bazalne transkripcione mašinerije na jezgro promotora (Smale i Kadonaga, 2003). Za otpočinjanje transkripcije neophodno je otvaranje upakovanog, kondenzovanog hromatina u regionima koji obuhvataju promotor gena, pa i sam gen. Prvo se dekondezuju veliki hromatinski domeni (25 - 100 kb), a zatim dolazi do remodelovanja hromatina u okviru promotorskog regiona što je praćeno i kovalentnim modifikacijama histona u okviru nukleozoma (Wallrath, et al., 1994). Acetilacijom ili metilacijom slobodnih amino grupa na N- terminalnom delu histonskih molekula, dolazi do oslobađanja DNK iz forme u kojoj se nalazi (Turner, et al., 1992). Ovakva modifikacija uslovlja gubitak pozitivnog naelektrisanja molekula histona, čime se smanjuje njihov afinitet za fosfatne grupe DNK (Wolffe i Pruss, 1996).

Promotorska sekvenca je pozicionirana uzvodno od gena koji se prepisuje i predstavlja glavni regulatorni region preko koga se vrši kontrola ekspresije. Jezgro promotora okružuje mesto inicijacije transkripcije i oko 35 bp uzvodno i nizvodno od njega (Butler i Kadonaga, 2002). Ovaj region sadrži sve regulatorne sekvence potrebne za prepoznavanje od strane bazalne transkripcione mašinerije i inicijaciju transkripcije. Start transkripcije predstavlja prvi nukleotid od kojeg započinje transkripcija. Promotor uključuje region koji se proteže oko 250 bp uzvodno i nizvodno od starta transkripcije (transcription start point- tsp), ali ta granica nije strogo određena (Butler i Kadonaga, 2002). Proksimalni promotori sadrže vezivna mesta za opšte i tkivno-specifične transkripcione faktore koji mogu imati aktivatorsku ili represorsku ulogu u procesu transkripcije datog gena. Inicijaciji transkripcije prethodi vezivanje sekvencno-specifičnih transkripcionih faktora za njihove regulatorne motive u okviru promotora i enhensera i angažovanje koaktivatora koji dovode do remodelovanja hromatina i modifikacije histona, što za posledicu ima promenu strukture i pozicije nukleozoma (Ghosh i Van Duyne, 1996).

Na ovaj način regulisana reorganizacija hromatinske strukture u okviru promotora omogućava i stabilizuje vezivanje bazalne transkripcione mašinerije, koju sačinjavaju RNK polimeraza II, i brojni opšti transkripcioni faktori neophodni za pravilno pozicioniranje polimeraze i interakcije sa drugim specifičnim regulatornim proteinima (slika 1).

Do sada je poznato da je ekspresija većine gena regulisana na transkripcionom nivou, posredstvom transkripcionih faktora. Osnovne strukturne osobine transkripcionih faktora čine prisustvo DNK vezujućeg domena, transaktivirajućeg domena i domena za protein-protein interakcije (Locker, 2001). Opšti transkripcioni faktori i RNK PolIII ulaze u sastav holoenzima koji je važan za otpočinjanje procesa transkripcije (slika 1) Vezivanje drugih transkripcionih faktora, koji ne ulaze u ovaj holoenzim i koji prepoznaju specifične konsenzusne sekvence na DNK promotorskog regiona (gen specifični regulatori), potpomažu stabilnosti inicijacionog kompleksa ili menjaju konformaciju DNK, čime se obezbeđuje preciznost i brzina procesa transkripcije (Marian i Roberts, 1993). Proteini definisani kao koaktivatori, histon-acetilaze, deacetilaze, kinaze i metilaze, takođe imaju važnu ulogu u regulaciji genske epkspresije ali zbog odsustva DNK vezujućeg domena nisu svrstani u klasu transkripcionih faktora (Brivanlou i Darnell, 2002).

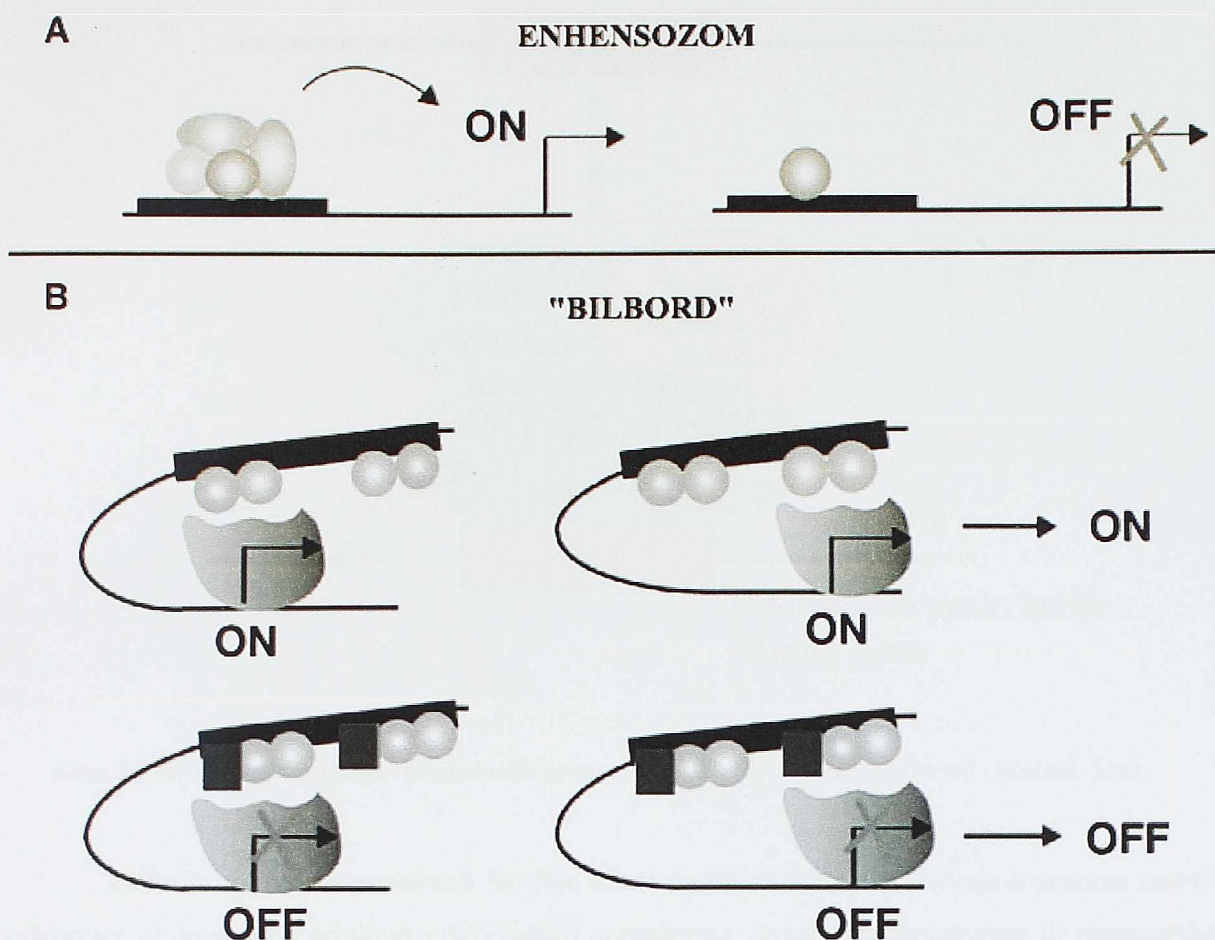


Slika 1. Proteini neophodni za otpočinjanje procesa transkripcije: Opšti transkripcioni faktori ulaze u sastav RNK PolIII holoenzima. U prisustvu gen specifičnih transkripcionih faktora, represora, acetilaza, deacetilaza i ekstracelularnih i intracelularnih signala dolazi do vezivanja holoenzima za jezgro promotora (označeno žutom bojom) i otpočinjanja transkripcije ciljnog gena. Preuzeto sa web strane <http://web.wi.mit.edu/young/young.html>.

Transkripcijski faktori su od esencijalnog značaja u procesu genske ekspresije i prisutni su u svakom živom organizmu. Broj transkripcijskih faktora u jednom organizmu zavisi od veličine i složenosti njegovog genoma, tako da veći genomi imaju i veći broj transkripcijskih faktora (Nimwegen, 2003). U humanom genomu postoji preko 2000 proteina koji imaju DNK vezujući domen i za većinu se smatra da funkcionišu kao transkripcijski faktori (Babu, et al., 2004). Humani geni su okruženi brojnim vezivnim mestima za različite transkripcijske faktore, a efikasna ekspresija svakog gena zahteva kooperativno delovanje većeg broja različitih transkripcijskih faktora. Procenjuje se da postoji približno 2000 humanih transkripcijskih faktora kojima se postiže precizna regulacija ekspresije približno oko 25 000 gena (Brivanlou i Darnell, 2002; Stein, 2004).

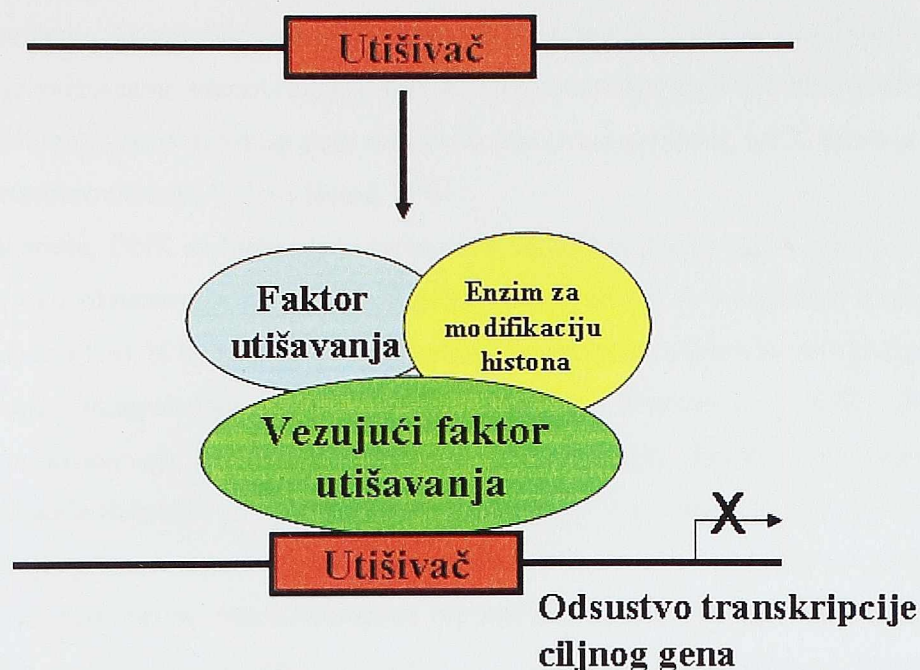
1.1.2. Pojačivači i utišivači transkripcije gena (enhenseri i sajenseri)

Pojačivači ili enhenseri predstavljaju *cis* regulatorne elemente koji stimulišu proces transkripcije, nezavisno od svoje pozicije i orijentacije u odnosu na mesto otpočinjanja transkripcije (Arnosti i Kulkarni, 2005). Jedna od osobina enhensera višćelijskih organizama je da su njihove pozicije najčešće lokalizovane u okviru 100 kilobaza u odnosu na gen koji regulišu. Smatra se da je uobičajeno da enhenseri budu u *cis* poziciji u odnosu na svoje ciljne gene i ako postoje podaci o *trans* regulaciji preko uparivanja sestrinskih hromatida (Kennison i Southworth, 2002). Grupisanje vezivnih mesta za transkripcijske faktore u okviru enhensera bitno je zbog ostvarivanja protein-protein interakcija među njima, kako bi bila obezbeđena preciznost procesa transkripcije (Droge i Muller-Hill, 2001). Postoje dva osnovna modela po kojima enhenseri ostvaruju svoju funkciju. Prvi model, model enhensozoma, podrazumeva da vezivna mesta u okviru enhensera omogućavaju kooperaciju transkripcijskih faktora u procesu aktivacije transkripcije (slika 2A). Narušavanje jednog vezivnog mesta ili odsustvo jednog regulatornog proteina dovodi do inaktivacije transkripcije. Po drugom modelu koji se naziva „bilbord“, enhenseri sadrže više funkcionalnih jedinica koje su sposobne da nezavisno regulišu ekspresiju gena. Aktivatori su grupisani u manje grupe u okviru enhensera a bazalna transkripcijska mašinerija „bira“ sa kojom od njih će stupiti u interakcije i time ostvariti transkripciju gena. Po ovom modelu pojedini delovi enhensera mogu specifično biti blokirani vezivanjem represora u njihovoj neposrednoj blizini (slika 2B) (Arnosti i Kulkarni, 2005).



Slika 2. Modeli regulacije transkripcije enhenserskim elementima: A) Model enhensozoma, koji podrazumeva da je za pravilnu aktivaciju transkripcije neophodno simultano vezivanje većeg broja transkripcionih faktora B) Model Bilborda, po kome transkripciona mašinerija odabira grupe transkripcionih faktora koji su vezani za enhenser i tako modeluje aktivaciju transkripcije ciljnih gena u različitim tkivima. Vezivanje represora u neposrednoj blizini grupe aktivatora dovodi do zaustavljanja procesa transkripcije. Preuzeto iz Arnosti i Kulkarni, 2005.

Utišivači ili sajlenersi predstavljaju *cis* regulatorne regione koje prepoznaju transkripcioni represori. Vezivanje ovih transkripcionih faktora, zajedno sa enzimima za modifikaciju histona dovodi do stvaranja lokalne heterohromatinske strukture koja onemogućava transkripciju ciljnog gena (slika 3) (Grewal i Moazed, 2003)



Slika 3. Mehanizam regulacije transkripcije gena preko utišivača. Preuzeto iz Grewal i Moazed, 2003.

Veliki broj do sada proučenih familija transkripcionih faktora učestvuje u procesu razvića i održavanju homeostaze adultnih višćelijskih organizama. Svojom aktivacionom ili represorskom ulogom vrše modulaciju ekspresije ciljnih gena, i na taj način omogućavaju preciznu kontrolu diferencijacije i organogeneze, proliferacije i ćelijske smrti.

1.1.3. Epigenetska regulacija ekspresije gena

U novije vreme sve češći predmet izučavanja je tzv. epigenetska kontrola ekspresije gena koja, u najširem smislu, podrazumeva remodelovanje hromatina, koje se postiže modifikacijom histona i/ili metilacijom DNK.

Hromozomi su sačinjeni od dve tipa hromatina: euhromatina i heterohromatina. Heterohromatinski domeni su nedostupni transkripcionim faktorima i stoga transkripciono neaktivni, dok euhromatinski domeni sačinjavaju transkripciono aktivne delove genoma. Dugački blokovi heterohromatina okružuju hromozomske strukture kao što su centromere i telomere, dok su kraći domeni razasuti po hromozomu (Grewal i Elgin, 2002). Osim što ima ulogu u održavanju genomske stabilnosti, heterohromatin ima ulogu i u regulaciji ekspresije gena tokom razvića i

ćelijske diferencijacije. Formiranje heterohromatinskih struktura je važno za inaktivaciju onih gena čija je ekspresija važna samo tokom razvića, kao što su recimo Hox geni (Cavalli, 2002). Takođe, u somatskim ćelijama osoba ženskog pola dolazi do inaktivacije jednog od X hromozoma preko modifikacije heterohromatina (Avner i Heard, 2001).

Kod eukariota, DNK sa histonskim proteinima formira nukleozome u kojima je DNK dva puta obmotana oko oktamernog kompleksa koji se sastoji od po dva molekula svakog histona (H2A, H2B, H3, and H4). N terminalni domeni histona su mesta na kojima se vrše posttranslacione modifikacije koje omogućavaju remodelovanje hromatina (Jenuwein i Allis, 2001). Ove modifikacije podrazumevaju acetilaciju, metilaciju, ubikvitinaciju, fosforilaciju i sumoilaciju a najčešće modifikacije dešavaju se na lizinima konzerviranih N terminalnih domena histona H3 i H4. Acetilacija je proces vezan za povećanu transkripcionu aktivnost dok je smanjen nivo acetilacije histona povezan sa transkripcionom represijom, tako da su heterohromatinski delovi genoma kod svih organizama povezani sa smanjenim nivoom acetilacije histona (Moazed, 2001). Metilacija lizina na poziciji 9 u histonu H3 povezana je sa formiranjem heterohromatina, a u tom procesu važan je i proces metilacije DNK (Nakayama, et al., 2001; Rea, et al., 2000). Metilacija DNK podrazumeva dodavanje metil grupe na citozin pri čemu nastaje 5-metilcitozin. Neki delovi genoma, kao što su recimo repetitivne sekvence, su metilovani u većoj meri i za njih je karakteristično da su transkripciono neaktivni (Johnson, et al., 2002; Soppe, et al., 2002; Tamaru i Selker, 2001). Ove modifikacije menjaju oblik samih histona a time i karakteristike hromatina, čime se postiže transkripciona aktivnost ili represija ciljnih gena.

Nekodirajući RNK molekuli različitih dužina takođe imaju važnu ulogu u modelovanju hromatina tako što određuju specifičnu lokaciju za njegovu modifikaciju (Park i Kuroda, 2001). RNK interferenca (RNKi), pored svoje dobro poznate postratranskripcione uloge u utišavanju gena (Hannon, 2002). takođe učestvuje u formiranju heterohromatina. Komponente RNKi mašinerije (član PAZ/Piwi familije Argonaute (ago1), RNaseIII-like enzim Dicer (dcr1) i RNK-zavisna RNK polimeraza (rdp1)) neophodne su za formiranje heterohromatina i metilaciju lizina na poziciji 9 u okviru histona H3 (Hall, et al., 2002; Volpe, et al., 2002).

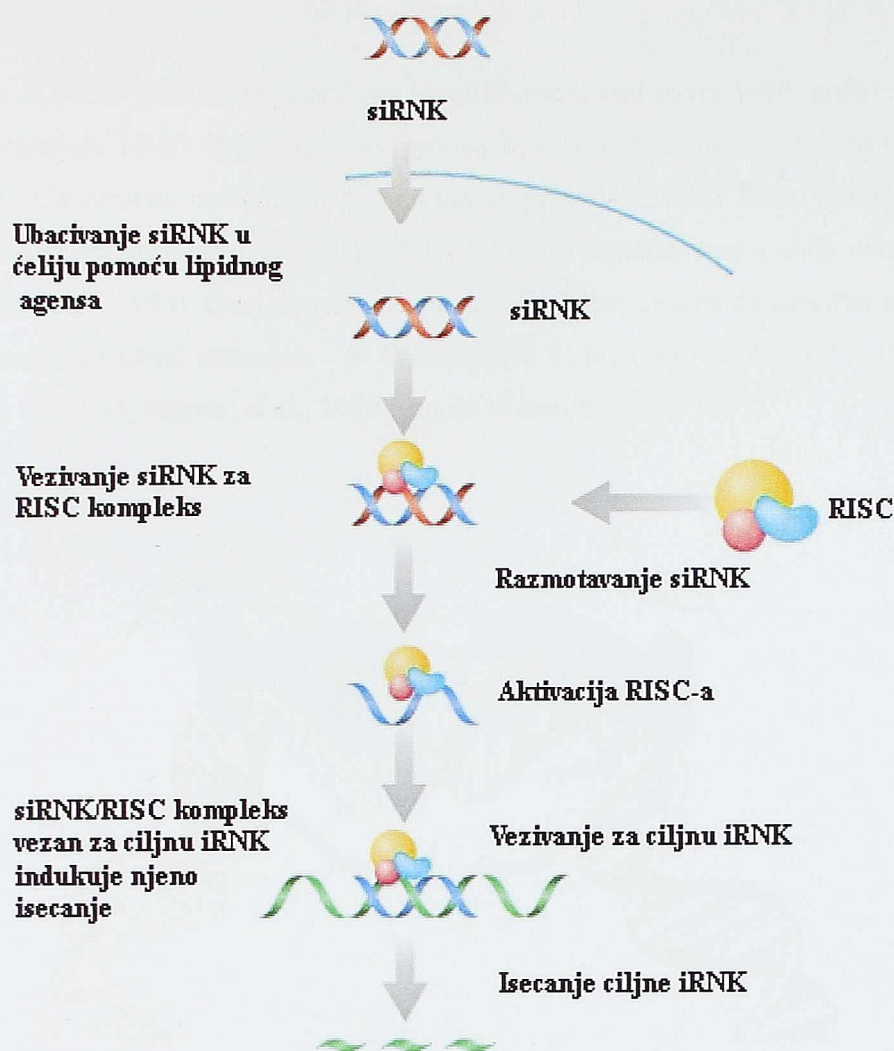


1.1.4. Regulacija ekspresije gena pomoću kratkih interferirajućih RNK (siRNK)

Utišavanje gena posredstvom dvolančanih RNK (dsRNK) je prirodni proces koji je otkriven proučavanjem RNK interference kod nematode *C. elegans*. (Smardon, *et al.*, 2000; Tabara, *et al.*, 1999). Posttranskripciono utišavanje gena predstavlja evolutivno očuvan mehanizam odbrane nižih organizama, važan za zaštitu genoma od virusnih infekcija i genomske nestabilnosti prouzrokovane mobilnim genetičkim elementima, kao što su transpozoni, koji produkuju dsRNK intermedijere u ćeliji (Hamilton i Baulcombe, 1999; Jensen, *et al.*, 1999; Sharp i Zamore, 2000).

U sisarskim ćelijama otkriveno je da dsRNK može pokrenuti dva tipa ćelijskog odgovora: nespecifičnu inhibiciju ekspresije gena i sekvencno-specifičnu inhibiciju koja uzrokuje degradaciju ciljne iRNK. Nespecifična inhibicija uključuje aktivaciju dsRNK zavisne Protein Kinaze R (PKR) i 2'-5'-oligoadenilat sintetaze koja je normalno indukovana interferonom. Nakon inaktivacije, PKR fosforiliše eukariotski translacioni inicijacioni factor 2 (eIF2) i tako nespecifično inhibira sintezu proteina u ćeliji. Paralelno, aktivirana 2'-5'-oligoadenilat sintetaza dovodi do nespecifične hidrolize iRNK i rRNK aktiviranjem RNazeL (Grant, *et al.*, 1995; Kaufman, 1999; Stark, *et al.*, 1998). Aktivacija ovog puta smatra se nespecifičnom odbranom ćelija u slučaju virusne infekcije, koja vodi opštem prestanku sinteze proteina u ćeliji.

Nasuprot tome, kratke interferirajuće RNK (siRNK) pripadaju gen specifičnim dvolančanim RNK molekulima, dugim 20-25 nukleotida, koji imaju svojstvo da se komplementarno vezuju za iRNK, sprečavajući tako njenu translaciju (Marjori Matzke, 2001). Prvi korak u ovom procesu je obrada dugih dvolančanih RNK nastalih u ćeliji od strane DICER-a, dsRNK specifične endonukleaze, pri čemu nastaju kratki siRNK duplesi. Sa druge strane, kao moćno sredstvo u istraživanjima mogu da se koriste gen specifični siRNK molekuli koji su hemijski nasintetisani, a zatim ubačeni u ćelije efikasnim transfekcionim agansom. Ovako nastali siRNK molekuli imaju na 3' kraju 2 nesparena nukleotida koji indukuju vezivanje RISC-a (RNA-Induced Silencing Complex) prevodeći ga u aktiviranu formu (slika 4) (Nykanen, *et al.*, 2001). RNKazna aktivnost RISC kompleksa dovodi do razmotavanja RNK dupleksa i odvajanje lanaca pri čemu „antisense“ lanac služi kao vodič za prepoznavanje ciljne sekvence. Ciljna iRNK se zatim iseca endonukleaznom aktivnošću RISC kompleksa blizu mesta za koje se vezala „antisense“ siRNK. Dalje, u nezavisnoj reakciji, isečena ciljna RNK biva dalje degradovana ćelijskim egzonukleazama. Na ovaj način onemogućena je translacija gena od interesa (Holen, *et al.*, 2002).

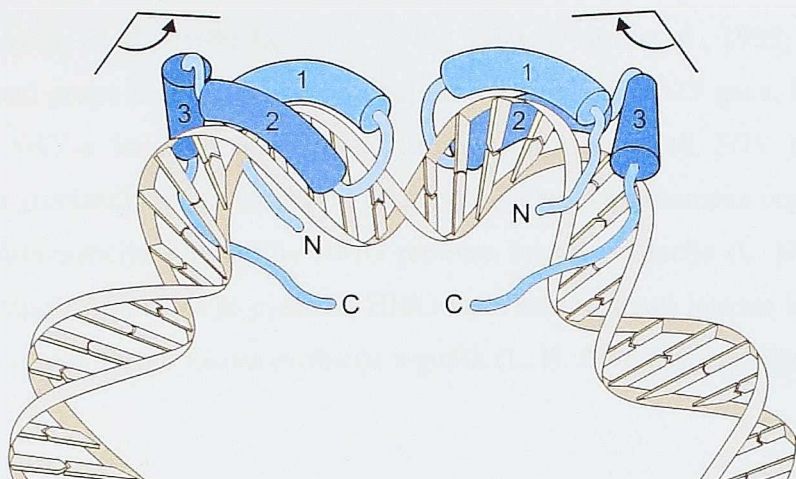


Slika 4. Degradacija ciljne mRNA pomoću siRNA. Nakon ubacivanja siRNA u ćeliju dolazi do njenog vezivanja za RISC kompleks. RISC čine grupisani proteini koji prepoznaju specifično jednolančanu siRNA ili mikroRNA. RISC koristi siRNA ili miRNA kao matricu za prepoznavanje komplementarne mRNA i tada se aktivira RNazna aktivnost RISC-a što dovodi do isecanja ciljne mRNA. (Preuzeto sa web strane Santa Cruz Biotechnology, Inc.)

siRNA molekuli su veoma značajni u istraživanjima regulacije ekspresije gena, jer se utišavanjem pojedinih gena od interesa može pokazati njihov uticaj na ekspresiju ispitivanih gena (Reinhart i Bartel, 2002). Ovo otkriće doprinosi identifikaciji funkcije pojedinih gena, ali i napore da se ovaj vid regulacije ekspresije iskoristi u prevenciji i tretmanu različitih bolesti kod čoveka kao što su različiti oblici tumora, HIV infekcije i neke hronične bolesti (Yin i Wan, 2002).

1.2. SOX geni/SOX proteini

Familija *SOX/Sox* gena, koja je prvi put identifikovana kod sisara 1990. godine, kodira SOX proteine koji pripadaju HMG (**h**igh **m**obility **g**roup) boks superfamiliji DNK vezujućih proteina (Wegner, 1999). Zajednička osobina ovih proteina je prisustvo HMG boks vezujućeg domena, dužine 79 aminokiselina, koji se sastoji od 3 α heliksa koji su organizovani u oblik uvrnutog slova L (slika 5) (Laudet, et al., 1993). Ovaj domen omogućava SOX proteinima da specifično prepoznaju i vežu se za heksamernu DNK sekvencu - 5' WWCAAW 3' pri čemu je W- A/T (Denny, et al., 1992; Harley, et al., 1994; Mertin, et al., 1999; van de Wetering, et al., 1993).



Slika 5. Shematski prikaz strukture HMG domena SOX proteina. Domen se savija u strukturu oblika slova L koja se sastoji od 3 α -heliksa i ostvaruje kontakt sa malim žljebom DNK zavojnice, savijajući se pod uglom od 30 do 110 stepeni. Slika prikazuje dva HMG domena vezana za DNK u suprotnoj orijentaciji. α -heliksi su predstavljeni cilindrima a sekvence između heliksa kao i N i C terminalni domeni su predstavljeni trakama. Preuzeto iz Lefebvre, et al., 2007.

Sry (Sex-determining region Y) gen je prvi otkriveni *Sox* gen (Gubbay, et al., 1990; Sinclair, et al., 1990). koji je odgovoran za determinaciju muškog pola i koji je lociran na Y hromozomu. Ostali članovi ove genske familije otkriveni su na osnovu homologije sa Sry genom u okviru HMG boks domena i na osnovu ove karakteristike nastao je akronim *Sox* (**S**RY-related **H**MG **b**ox) (Denny, et al., 1992; Gubbay, et al., 1990; E. M. Wright, et al., 1993). Brojevi su *Sox*

genima dodeljivani na osnovu redosleda njihovog otkrića. Schepers i saradnici su 2002. godine pretraživanjem sekvenci kompletnih genoma čoveka i miša izvršili ponovnu numeraciju i klasifikaciju, što je finalno rezultiralo identifikacijom dvadesetak različitih *Sox* gena prisutnih kod obe vrste (Schepers, et al., 2002). Na osnovu poređenja proteinskih sekvenci unutar i van HMG boks domena, *Sox* geni su svrstani u 10 grupa (A-J), pri čemu je grupa B podeljena na podgrupe B1 i B2, dok grupe I i J imaju po jednog člana koji nemaju ortologe među *Sox* genima kičmenjaka (I- *Xenopus laevis Sox31*; J- *Caenorhabditis elegans SoxJ*) (Bowles, et al., 2000). U tabeli 1, prikazano je 8 grupa *Sox* gena (A-H) koje su prisutne kod miša i čoveka. SOX proteini u okviru iste grupe pokazuju visok nivo homologije (70-90%) kako u okviru HMG boks domena tako i van njega, dok proteini iz različitih grupa pokazuju homologiju samo u okviru HMG boks domena ($\geq 46\%$). Većina *Sox* gena ima 1-3 egzona i jednu varijantu primarnog RNK transkripta, dok *Sox* geni grupa D i H sadrže više egzona koji mogu dati primarne transkripte različitih dužina i izmenjenih karakteristika (Hiraoka, et al., 1998; Lefebvre, et al., 1998; Osaki, et al., 1999; Wunderle, et al., 1996). *SOX/Sox* geni grupe A, B, C i G ne poseduju introne. Osim *SOX3* gena, koji je smešten na X hromozomu i *SRY*-a koji se nalazi na Y hromozomu, svi ostali *SOX* geni mapiraju na autozomima i nisu grupisani, već su razbacani po genomu. Ovakva genomska organizacija ukazuje na moguću ranu divergenciju subfamilije HMG proteina tokom evolucije (L. H. Pevny i Lovell-Badge, 1997). Predpostavlja se da je predački HMG boks mogao imati introne koje i danas imaju neki *Sox* geni, ali su se ti introni tokom evolucije izgubili (L. H. Pevny i Lovell-Badge, 1997).






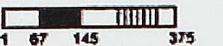






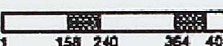
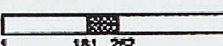


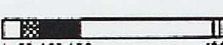

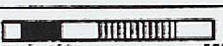


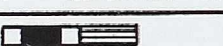

GRUPA	GEN	LOKUS		SCHEMATSKI PRIKAZ GENA	REFERENCE
		MIŠ	ČOVEK		
A	<i>Sry</i>	YC3	Yp11.3		Gubbay et al., 1992 Dubin et al., 1995
B1	<i>Sox1</i>	8 A1-A2	13q34		Collignon et al., 1996 Kamachi et al., 1999
	<i>Sox2</i>	3 A2-B	3q26.3-q27		
	<i>Sox3</i>	X A7.3-B	Xq26.3		
B2	<i>Sox14</i>	9 E3.3	3q22-q23		Hargrave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

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

Sox geni regulišu veliki broj različitih procesa tokom razvića kao što su: razviće nervnog sistema, razviće sočiva, folikula dlake, creva, B ćelija, mišića, hrskavice, krvnih sudova itd (Bowles, et al., 2000). Ekspimiraju se u velikom broju tkiva tokom razvića i zbog toga se mutacije u ovim genima dovode u vezu sa etiologijom mnogih bolesti i određenih tipova kancera (Tabela 2, (Dong, et al., 2004)). Na osnovu dosadašnjih saznanja vezanih za funkciju *SOX/Sox* gena mogu se izvući sledeći generalni zaključci:

1. *Sox* geni regulišu specifikaciju i diferencijaciju mnogih ćelijskih tipova,
2. *Sox* geni koji pripadaju istoj podgrupi imaju slične funkcije,
3. *Sox* geni u okviru jedne podgrupe mogu uticati na funkciju gena iz druge podgrupe
4. Jedan isti *Sox* gen može biti uključen u različite procese tokom razvića jednog ili više ćelijskih tipova (Kiefer, 2007).

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

Grupa	Gen	Uloga
	<i>Sox12</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Nepoznata
D	<i>Sox5</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Razviće skeleta (Smits et al., 2001) • Razviće nervne kreste (Perez-Alcala et al., 2004) • Gliogeneza (Stolt et al., 2006)
	<i>Sox6</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Provodljivost srčanog mišića (Hagiwara et al., 2000) • Razviće skeleta (Smits et al., 2001) • Gliogeneza (Stolt et al., 2006) • Eritropoeza (Dumitriu et al., 2006; Yi et al., 2006)
	<i>Sox13</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Limfopoeza (Melichar et al., 2007)
E	<i>Sox8</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Gliogeneza (Stolt et al., 2004 and 2005) • Razviće testisa (Chaboissier et al., 2004) • Osteogeneza (Schmidt et al., 2005) • Formiranje nervne kreste (Maka et al., 2005; O'Donnell et al., 2006)
	<i>Sox9</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Determinacija pola (Barrionuevo et al., 2006a; Kobayashi et al., 2005) • Hondrogeneza (Bi et al., 1999; Akiyama et al., 2002) • Razviće nervne kreste (Cheung et al., 2005) • Gliogeneza (Stolt et al., 2003; Wegner and Stolt, 2005) • Održavanje ćelija notohorda (Barrionuevo et al., 2006) • Kardiogeneza (Akiyama et al., 2004) • Formiranje unutrašnjeg uha (Taylor and LaBonne, 2005) • Formiranje folikula dlake (Vidal et al., 2005) • Razviće pankreasa (Seymour et al., 2007)
	<i>Sox10</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Razviće nervne kreste (Wegner and Stolt, 2005; Kelsh et al., 2006) • Formiranje unutrašnjeg uha (Taylor and LaBonne, 2005)
F	<i>Sox7</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Kardiogeneza (Zhang et al., 2005)
	<i>Sox17</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Formiranje endoderma (Kanai-Azuma et al., 2002) • Angiogeneza (Matsui et al., 2006)
	<i>Sox18</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Kardiogeneza (Pennisi et al., 2000; Zhang et al., 2005) • Angiogeneza (Downes i Koopman, 2001; Matsui et al., 2006) • Razviće folikula dlake (Pennisi et al., 2000)
G	<i>Sox15</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Regeneracija skeletne mišićne mase (Lee et al., 2004; Meeson et al., 2007)
H	<i>Sox30</i>	<ul style="list-style-type: none"> • nepoznata

Tabela 2: Pregled ekspresije *Sox* gena miša i njihova biološka funkcija. Preuzeto iz Dong, et al., 2004.

1.3. SOX proteini kao transkripcioni faktori

1.3.1. Domenska struktura SOX proteina

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

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

1.3.2. Vezivanje SOX proteina za DNK

SOX i TEF/LEF-1 proteini pokazuju veću specifičnost za određene sekvence prilikom vezivanja za DNK od svojih evolutivnih predaka, HMG domenskih proteina (Lefebvre, et al.,

2007). Ova karakteristika omogućava SOX proteinima da, iako su prisutni u maloj količini u ćeliji, ostvare svoje funkcije preko specifičnih sekvenci u regulatornim regionima ciljnih gena. *In vitro* eksperimenti u kojima je ispitivan afinitet SOX proteina za vezivanje za specifične sekvence DNK, ukazali su da se SOX proteini preferencijalno vezuju za heksamernu sekvencu 5' (A/T)(A/T)CAA(A/T) 3' (Denny, *et al.*, 1992; Harley, *et al.*, 1994; Mertin, *et al.*, 1999; van de Wetering, *et al.*, 1993). Ova sekvenca veoma je slična konsenzusnoj sekvenci za vezivanje TEF/LEF-1 proteina, 5' T(A/T)(A/T)CAAG 3' (Love, *et al.*, 1995; M. H. Werner i Burley, 1997). Na afinitet vezivanja SOX proteina utiče i struktura sekvence koja okružuje heksamernu sekvencu, ali zahtevi za prisustvom tačno određene sekvence variraju među različitim SOX proteinima (Mertin, *et al.*, 1999). Afinitet za određenu sekvencu direktno zavisi od strukture HMG boks domena što SOX proteinima iz iste grupe obezbeđuje da regulišu ekspresiju istih ciljnih gena, dok proteini iz drugih grupa mogu da kompetiraju za ista mesta ili da preko izmenjenih sekvenci regulišu druge ciljne gene (Lefebvre, *et al.*, 1998). Eksperimentalni podaci ukazuju da oba mehanizma funkcionišu *in vivo*. Na primer, SOX5 i SOX6, koji pripadaju SoxD grupi, aktiviraju Col2a1 gen preko enhensera koji sadrži nekoliko mesta za vezivanje SOX proteina, kooperativno se vezujući sa SOX9 proteinom koji pripada grupi E (Lefebvre, *et al.*, 1998). Međutim, u promotorima Mpz i Mpb gena ovi proteini kompetiraju za vezivanje sa SOX9 i SOX10 ostvarujući pri tom represorsku funkciju (Stolt, *et al.*, 2006).

Važno je naglasiti da je otkriveno više slučajeva u kojima se SOX proteini vezuju za sekvence DNK koje samo delimično odgovaraju konsenzusnoj sekvenci otkrivenoj *in vitro* eksperimentima (Mertin, *et al.*, 1999). Sekvence slične konsenzusnoj veoma su zastupljene u genomu pa je jasno da specifičnost DNK sekvence nije jedini kriterijum za vezivanje SOX proteina u regulatornim regionima ciljnih gena *in vivo*. Gore pomenuti enhenser Col2a1 gena, za koji se vezuju SOX5, SOX6 i SOX9, poseduje 4 vezivna mesta za SOX proteine od kojih ni jedno ne deli homologiju sa konsenzusnim heksamerom u svih 6 nukleotida (Lefebvre, *et al.*, 1997; Lefebvre, *et al.*, 1998). Ova 4 mesta nalaze se u delu enhensera koji čine 2 invertovana ponovka od po 11 nukleotida koji mogu da formiraju nelinearne strukture DNK (Lefebvre, *et al.*, 1997; Lefebvre, *et al.*, 1998). Konformacija DNK u regionima gde se nalaze nekonsenzusne sekvence takođe može da bude jedan od kriterijuma po kojima SOX proteini vrše selekciju mesta za vezivanje. Činjenica da se SOX proteini *in vivo* vezuju za DNK sekvence koje ne odgovaraju u potpunosti konsenzusnom mestu otkrivenom *in vitro* otežavaju pronalaženje potencijalnih ciljnih gena ovih proteina. Potencijalna vezivna mesta za SOX proteine u okviru promotorskih regiona ciljnih gena ne mogu se otkriti samo na osnovu analize sekvence DNK, po čemu se razlikuju od većine drugih

transkripcionih faktora. Sve dok se ne otkriju svi kriterijumi po kojima SOX proteini vrše selekciju vezivnih mesta na DNK biće teško identifikovati sve ciljne gene u čiju regulaciju ekspresije su ovi proteini uključeni.

1.3.3. Konformacione promene DNK izazvane vezivanjem SOX proteina

Pokazano je da LEF-1 protein ima ključnu arhitektonsku ulogu u formiranju aktivnog transkripcionog kompleksa na enhenseru gena za T ćelijski receptor alfa (TCR α) (Giese, et al., 1995). Prilikom formiranja ovog enhensozoma, LEF-1 se vezuje za DNK i izaziva veoma oštro savijanje zavojnice koje dovodi do bliskog kontakta proteina vezanih za veoma udaljene sekvence na linearnoj DNK (Lefebvre, et al., 2007). Iako SOX proteini takođe izazivaju savijanje DNK i verovatno imaju značajnu ulogu u formiranju enhensozoma, ovakav primer uloge SOX proteina kao arhitektonskih faktora još nije potvrđen *in vivo*. U prilog hipotezi da je promena konformacije DNK jedna od osnovnih funkcija SOX proteina idu podaci o specifičnim mutacijama SOX proteina. Kod čoveka su opisane mutacije u *SRY* i *SOX2* genu, povezane sa patološkim fenotipom, koje ne utiču na vezivanje ovih proteina za DNK već selektivno pogađaju sposobnost ovih proteina da izazovu konformacione promene DNK (Scaffidi i Bianchi, 2001).

Ugao savijanja DNK zavojnice prilikom vezivanja SOX proteina varira od 30° do čak 110° (Weiss, 2001). Ovakav raspon savijanja obezbeđen je fleksibilnom strukturom HMG boks domena koja postaje rigidna prilikom vezivanja za DNK izazivajući savijanje zavojnice. Istovremeno, interakcija sa DNK obezbeđuje kompletno savijanje proteina i zauzimanje tercijarne strukture. Fleksibilna struktura HMG boks domena predstavlja veoma ekonomičan način da u mnogobrojnim ćelijskim tipovima dvadesetak SOX proteina organizuje veoma različite tipove enhensozoma.

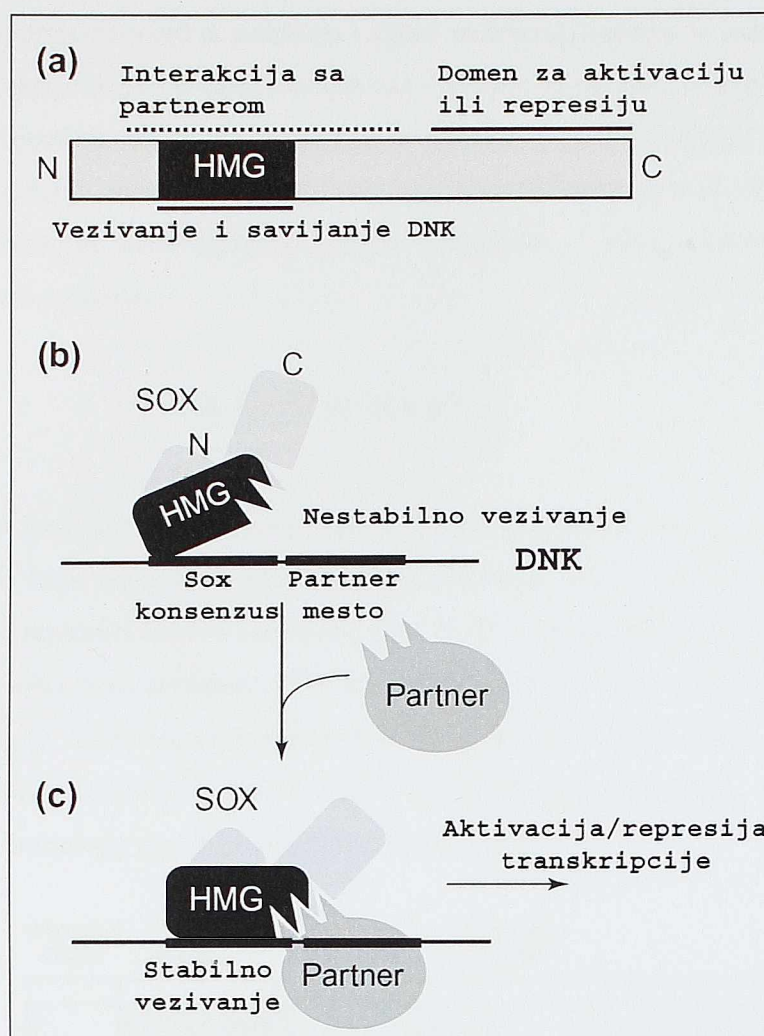
1.3.4. Interakcije sa drugim proteinima

Još jedna važna karakteristika SOX proteina je njihova sposobnost da interaguju sa različitim transkripcionim faktorima (Kamachi, et al., 2000; Wilson i Koopman, 2002). Ova osobina SOX proteina prvi put je otkrivena, i do sada najbolje okarakterisana, na enhenseru *Fgf4* gena koji je specifično aktiviran u embrionalnim matičnim ćelijama i embrionalnim karcinoma ćelijama (H. Yuan, et al., 1995). Ovaj enhenser sadrži blisko postavljena vezivna mesta za SOX

proteine i POU domenske proteine. SOX2 i OCT3/4 (koji pripada porodici POU domenskih proteina) su koeksprimirani u ovim ćelijama i sinergistički aktiviraju enhanser *Fgf4* gena formirajući heterodimere preko svojih domena za vezivanje za DNK (Remenyi, et al., 2003). Sinergističko delovanje ova dva proteina potvrđeno je i drugim slučajevima aktivacije gena specifično eksprimiranih u matičnim ćelijama, uključujući i sam *Sox2* gen (Tomioka, et al., 2002). Transkripcioni faktori sa kojima SOX2 ostvaruje interakcije u drugim ćelijskim tipovima su Pax6 u ćelijama sočiva (Kamachi, et al., 2001) i Brn2 u neuralnom primordijumu (Tanaka, et al., 2004).

Interakcije SOX proteina sa drugim transkripcionim faktorima uglavnom se odvijaju preko domena za vezivanje za DNK. Efikasno vezivanje drugog transkripcionog faktora za DNK vezujući domen SOX proteina verovatno je povezano sa činjenicom da se SOX proteini vezuju za mali, a većina ostalih transkripcionih faktora za veliki žleb DNK zavojnice (Lefebvre, et al., 2007). Takođe, interakcije sa partnerskim transkripcionim faktorima odvijaju se preko C terminalnog domena, kao što je opisano za interakcije SOX17 i β -katenina tokom razvića endoderma kod *Xenopusa* (Zorn, et al., 1999) i interakciju SOX9 sa HSP70 (Marshall i Harley, 2001).

In vitro je pokazano da SOX proteini ostvaruju interakcije sa različitim transkripcionim faktorima: homeodomenskim proteinima, proteinima koji poseduju Zn-prstiće, HLH proteinima i proteinima sa strukturom leucinskog rajsferšlusa (Remenyi, et al., 2003; Wissmuller, et al., 2006). U većini slučajeva heterodimerizacija se ostvaruje preko C terminalnog kraja HMG boks domena SOX proteina i domena za vezivanje za DNK drugog proteina (slika 6) (Remenyi, et al., 2003). Na ovaj način HMG boks učestvuje u formiranju enhensozoma, ne samo promenom konformacije DNK, već i direktnom interakcijom sa različitim tipovima transkripcionih faktora.



Slika 6. Vezivanje SOX proteina za partnerski protein i DNK. a) Tipičan SOX protein ima tri funkcionalna domena: aktivacioni ili represorski domen na C-terminusu, HMG boks odgovoran za vezivanje za DNK i domen koji je odgovoran za protein-protein interakcije. b) Kada se SOX protein vezuje samo preko HMG boks domena, vezivanje je nestabilno. c) Kada je partnerski transkripcioni faktor vezan za SOX protein i susednu sekvencu istovremeno, onda je vezivanje SOX proteina za ciljnu DNK sekvencu stabilizovano i može doći do aktivacije ili represije transkripcije ciljnog gena. Preuzeto iz Kamachi, et al., 2000.

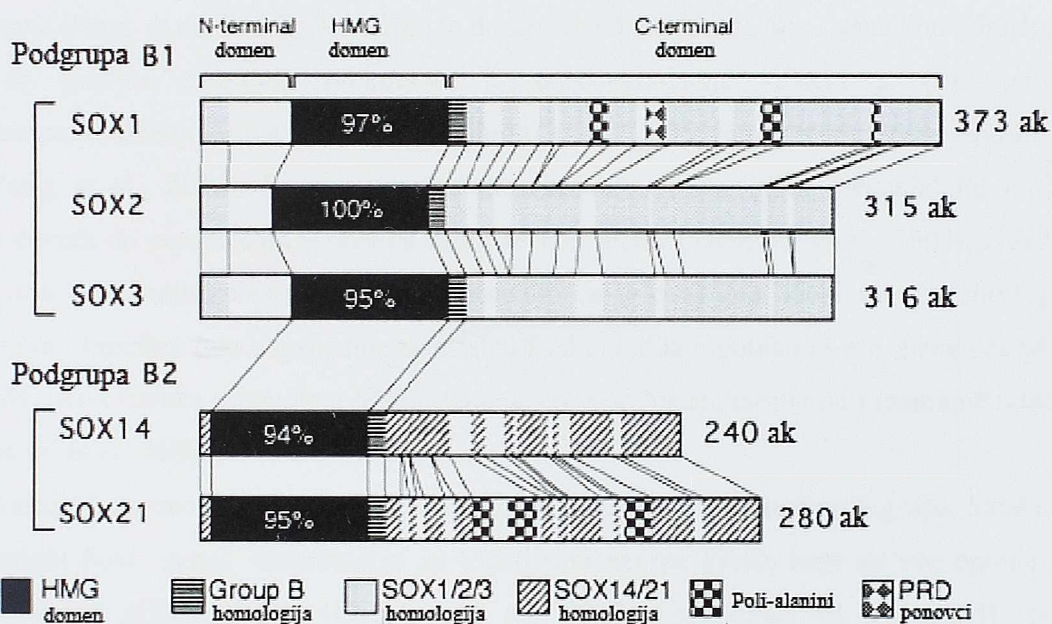
1.3.5. Lokalizacija SOX proteina u ćeliji

HMG boks SOX proteina sadrži dva domena koji obezbeđuju lokalizaciju ovih proteina u jedru. Ovi domeni (NLS-Nuclear Localisation Signal) su međusobno nezavisni i evolutivno visoko očuvani kod svih SOX proteina (Sudbeck i Scherer, 1997). HMG domeni proteina iz SoxE grupe,

pored signala za ulazak proteina u jedro, poseduju i signal za izlazak proteina iz jedra u citoplazmu (Gasca, et al., 2002). Tako je SOX9 protein lokalizovan u citoplazmi u nediferenciranim gonadama embriona i ranim stadijumima diferencijacije ženskih gonada, a postoji podatak da je i SOX2 detektovan u citoplazmi ćelija unutrašnje ćelijske mase blastocista (Avilion, et al., 2003). Još uvek je nejasno da li je transport SOX proteina između citoplazme i jedra generalni mehanizam regulacije aktivnosti ovih proteina.

1.4. SoxB grupa gena

Ovu grupu *SOX* gena sačinjavaju dve podgrupe okarakterisane na osnovu sličnosti u okviru HMG domena: SOXB1 koju sačinjavaju transkripcioni aktivatori *SOX1*, *SOX2*, *SOX3*, i SOXB2 koju čine transkripcioni represori *SOX14* i *SOX21* (slika 7). Ova grupa *SOX* gena pokazuje najveći stepen homologije sa HMG boks domenom *SRY* gena (Malas, et al., 1999). Članovi grupe SOXB proteina međusobno imaju visok stepen homologije u okviru HMG domena (slika 7). Takođe, iza HMG domena sledi kratki segment dužine 8 amino kiselina koji je zajednički za sve članove SOXB grupe (B group homology region) (Uchikawa, et al., 1999).



Slika 7. Članovi B subfamilije *SOX/Sox* gena: shematski prikaz njihove strukture i međusobne homologije (Uchikawa et al 1999.)

Zajedničko svojstvo članova SoxB grupe gena je da su uključeni u regulaciju ranih faza procesa neurogeneze. Osim ove najznačajnije uloge u kojoj učestvuju svi članovi SoxB grupe, ovi geni su važni i za razviće sočiva (*Sox1* i *Sox2*) (Nishiguchi, et al., 1998), kao i za pravilno razviće urogenitalne brazde i proces gametogeneze (*Sox3*) (J. Weiss, et al., 2003). Zajedno sa članovima SOXC, D i E grupe, SOXB geni su uključeni u razviće nervnih ćelija (Episkopou, 2005; Wegner i Stolt, 2005). U progenitorskim ćelijama tokom ovog procesa dolazi do represije progenitorskih markera, zaustavljanja ćelijskog ciklusa, migracije i ekspresije specifičnih neuralnih markera. Ekspresioni profil *SOX/Sox* gena uključenih u neurogenezu se preklapa i pokriva sve faze razvića, od neuralnih matičnih ćelija do neurona i makroglije (L. Pevny i Placzek, 2005). Članovi SoxB1 grupe, *Sox1*, *Sox2* i *Sox3*, su transkripcioni aktivatori koji definišu neuralni potencijal u okviru ektoderma i imaju ulogu u neuralnoj determinaciji (L. Pevny i Placzek, 2005). Ekspresijom ovih gena održava se neuralno progenitorko svojstvo ćelija, tj svojstvo nalik matičnim ćelijama (Bylund, et al., 2003). Iako im se uloge u ranim fazama razvića nervnog sistema preklapaju, članovi SoxB1 grupe gena dobijaju različite funkcije tokom diferencijacije. *Sox1* gen je neophodan za terminalnu diferencijaciju vlakana sočiva i diferencijaciju neurona ventralnog dela striatuma (Ekonomou, et al., 2005; Nishiguchi, et al., 1998). Odsustvo ekspresije *Sox2* gena dovodi do degradacije neurona u talamusu, striatumu i septumu, što ukazuje na njegovu značajnu funkciju u procesu održavanja ovih neurona (Ferri, et al., 2004). Pokazano je da smanjena ekspresija *Sox2* gena kod odraslog miša dovodi do gubitka neuralnih prekursora i neurodegradacije kakava je primećena kod Huntingtonove i Alchajmerove bolesti (Ekonomou, et al., 2005; Ferri, et al., 2004; Sottile, et al., 2006; Wang, et al., 2006). *Sox3* je visoko eksprimiran u ventralnom diencefalonu i njegovo odsustvo dovodi do poremećaja u razviću hipofize kod miševa (Rizzoti, et al., 2004). Istraživanja na miševima koji imaju deleciju *Sox3* gena ukazuju da je ovaj gen neophodan za morfogenezu hipotalamusa i hipofize i da obezbeđuje normalne funkcije duž hipotalamo-hipofizne ose (Rizzoti, et al., 2004). Kod čoveka mutacije u *SOX3* genu dovode do hipopituarizma i mentalne retardacije (Laumonier, et al., 2002).

Kasnije faze razvića nervnog sistema regulišu i *SOX/Sox* geni iz drugih grupa. *Sox4* i *Sox11* koji pripadaju SoxC grupi, eksprimiraju se u ćelijama nervne kreste koje su već opredeljene u pravcu neuralne diferencijacije (Cheung, et al., 2000; Uwanogho, et al., 1995). Njihova overekspresija aktivira ekspresiju neuralnih markera Tuj1 i MAP2 (Bergsland, et al., 2006). Razviće oligodendrocita, astrocita i Švanovih ćelija u centralnom i perifernom nervnom sistemu zavisna je od članova SoxE i SoxD grupe gena (Stolt, et al., 2006; Wegner i Stolt, 2005). Članovi SoxE grupe *Sox8*, *Sox9* i *Sox10* su koeksprimirani tokom gliogeneze i završnih procesa

mijelinizacije (Stolt i Wegner, 2010). Članovi SoxD grupe: *Sox5* i *Sox6*, negativno regulišu ekspresiju članova SoxE grupe gena i tako vremenski određuju razviće oligodendrocita (Stolt, et al., 2006).

SOX14 i SOX21 proteini su veoma slični na amino-kiselinskom nivou, i kao što je već rečeno, poseduju osobine transkripcionih represora (Uchikawa, et al., 1999). Eksperimenti vezani za karakterizaciju SOX14 i SOX21 proteina i njihova transkripciona svojstva rađeni su na DC5 minimalnom enheseru $\delta 1$ kristalinskog gena pileta i poređeni sa aktivnišću SOX1 proteina. Za razliku od drugih SOX proteina, kao što su SOX1-3 (Kamachi, et al., 1995; Kamachi, et al., 1998), SOX4 (van de Wetering, et al., 1993), SOX9 (Sudbeck i Scherer, 1997), SOX10 (Pusch, et al., 1998), SOX18 (Hosking, et al., 2001) i SOX24 (Kanda, et al., 1998) koji su u istom eksperimentu pokazali transaktivaciona svojstva, C terminalni domeni SOX14 i SOX21 proteina pokazali su represorna svojstva. Represorni efekat SOX21 proteina bio je jači od represornog efekta SOX14 proteina (Uchikawa, et al., 1999).

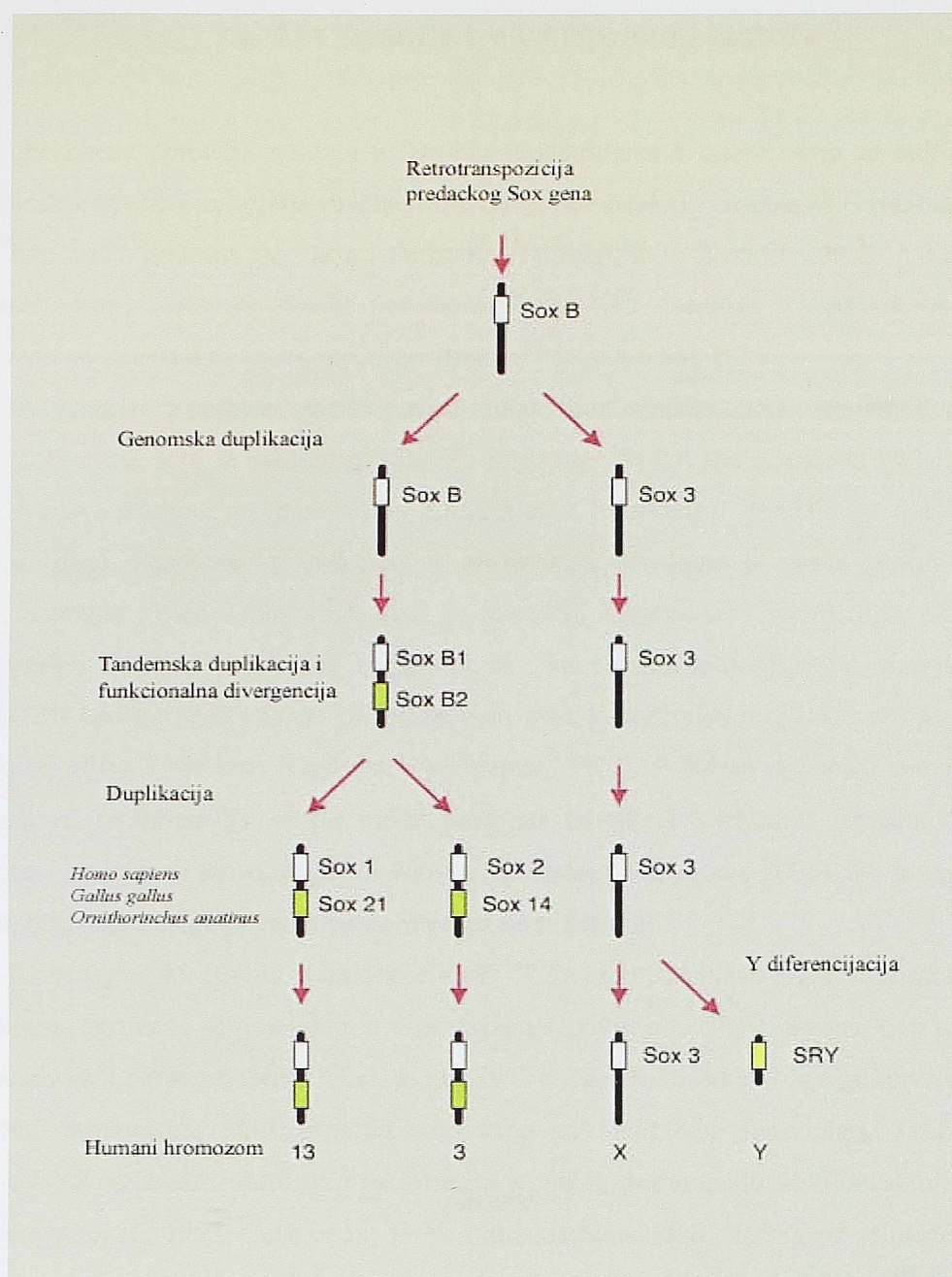
Sox21 gen je široko eksprimiran u mozgu. Njegova ekspresija se preklapa sa ekspresijom *Sox2* gena u telencefalonu, preoptičkoj zoni, ventralnom talamusu, mezencefalonu i ventralnom delu kičmene moždine (Uchikawa, et al., 1999). Smatra se da se pravilno razviće ovih tkiva postiže balansom između aktivacije i represije ciljnih gena regulisanih transkripcionim faktorima SOX2 i SOX21 (Uchikawa, et al., 1999).

Tokom embriogeneze, neurogeneza je inicirana u trenutku kada proneuralni proteini indukuju ekspresiju SoxB2 gena: *Sox14* i *Sox21* (Malas, et al., 1999). Ova dva proteina funkcionišu kao transkripcioni represori koji regulišu ekspresiju transkripcionih aktivatora podgrupe SoxB1, čime se obezbeđuje izlazak ćelije iz proneuralnog stanja u pravcu neuralne diferencijacije (Sandberg, et al., 2005). Prema istraživanjima Sandberga na embrionima pileta, fini balans ekspresije između *Sox1-3* i *Sox21* gena određuje da li će ćelija ostati u progenitorskom stanju ili će se usmeriti u pravcu diferencijacije (Sandberg, et al., 2005). Proneuralni proteini indukuju neurogenezu tako što dovode do povećane ekspresije *Sox21* gena, koja uvodi ćeliju u proces diferencijacije. Smatra se da proneuralni faktori povećavaju ekspresiju *Sox21* gena, a nakon dostizanja određenog nivoa ekspresije, *Sox21* inhibira aktivnost *Sox3* gena čime se stvaraju uslovi za neuralnu diferencijaciju. Ovaj prelazak iz proneuralnog stanja u fazu diferencijacije može biti kontrolisan direktnom represijom *Sox1-3* od strane *Sox21* a kako *Sox1-3* i *Sox21* potencijalno regulišu isti set ciljnih gena, moguće je da njihov međusobni nivo ekspresije određuje početak neurogeneze ili zadržavanje u nediferenciranom stanju (Sandberg, et al., 2005).

1.5. Evolucija SoxB grupe gena

Pre izvesnog vremena predložen je model evolucije SoxB grupe gena prema kome je tokom evolucije došlo do duplikacije, rearanžmana i divergencije predačkog SoxB gena (slika 8) (Kirby, et al., 2002). Predpostavlja se da je predački SoxB gen koji nije posedovao intron bio dupliciran, ili usled nejednakog krosing-overa ili kao posledica duplikacije čitavog genoma, pri čemu su nastale dve kopije ovog gena na različitim hromozomima. Jedan kopija, locirana na autozomu od koga vode poreklo polni hromozomi (X i Y) evoluirala je u *Sox3* gen, dok je *Sox3* alel na predačkom Y hromozomu pretrpeo velike promene i evoluirao u *Sry* gen (Graves, 1998). Druga kopija SoxB gena pretrpela je tandemsku duplikaciju pri čemu su nastala dva SoxB gena veoma blisko pozicionirana. Zatim su ova dva SoxB gena pretrpela još jednu rundu duplikacije a zatim divergirala, kako u sekvenci tako i u funkciji, pri čemu je nastao par SoxB1 i SoxB2 gena od kojih je jedan aktivator a drugi represor (slika 8).

U skladu sa ovim modelom *Sox3* gen je lociran na X hromozomu dok su ostali članovi SoxB grupe locirani na autozomima i organizovani u dva para gena: par *Sox1* i *Sox21*, par *Sox2* i *Sox14*, po jedan aktivator i jedan represor na istom hromozomu. Predloženi model dat je na osnovu uporedne analize SoxB gena kod međusobno evolutivno udaljenih vrsta, uključujući pile, kljunara i čoveka. Par koji obuhvata gene *Sox2* i *Sox14* lociran je na hromozomu 3q kod čoveka, 1q kod kljunara i hromozomu 9 kod pileta (Arsic, et al., 1998; Kirby, et al., 2002; Kuroiwa, et al., 2002; Stevanovic, et al., 1994). Drugi par koji uključuje *Sox1* i *Sox21* lokalizovan je na hromozomu 13q kod čoveka (Malas, et al., 1999) i hromozomu 1 kod pileta (Kuroiwa, et al., 2002). Konzervirana hromozomalna organizacija članova B grupe u dva para (*Sox1-Sox21* i *Sox2-Sox14*) kod pileta i čoveka ukazuje na to da su se obe duplikacije SOXB gena desile kod zajedničkog pretka ptica i sisara (Kamachi, et al., 1998; Uchikawa, et al., 1999).



Slika 8. Predloženi model evolucije B1 (belo) i B2 (zeleno) grupe *SOX/Sox* gena prema Kirby, et al., 2002. Obajšnjenje dato u tekstu.

1.6. Fox familija transkripcionih faktora

„Forkhead“ proteini spadaju u familiju transkripcionih faktora koji su uključeni u veliki broj bioloških procesa u kojima pokazuju veliku funkcionalnu raznolikost (Friedman i Kaestner, 2006). Ime ovih proteina potiče od embriona *Drosophila-e*, nastalih usled mutacije u genu „forkhead“, koji, osim što imaju poremećaj u razviću prednjeg i zadnjeg creva, imaju i karakteristične izraštaje na glavi, nalik na viljušku (Weigel, et al., 1989).

Svi članovi „Forkhead“ familije gena imaju karakterističan DNK vezujući domen, dugačak 110 aminokiselina, koji je evolutivno očuvan od kvasca do čoveka (Carlsson i Mahlapuu, 2002). Na osnovu ove osobine a prema novoj nomenklaturi „Forkhead“ proteini su dobili naziv FOX (Forkhead box). Fox geni su podeljeni u subfamilije, pri čemu je svaka subfamilija označena slovom, a unutar svake subfamilije, geni su označeni brojevima. I pored toga, često se i dalje upotrebljavaju sinonimi koji nisu usklađeni sa Fox nomenklaturom (npr. sinonim FoxA2 je HNF3 β). Do danas nije pokazano prisustvo ovih gena kod Protista i biljaka, već samo kod nekih askomiceta, gljiva i Metazoa (Carlsson i Mahlapuu, 2002). Pošto su uključeni u različite procese morfogeneze, pretpostavlja se da može postojati određena korelacija između kompleksnosti organizma i broja ovih transkripcionih faktora (Carlsson i Mahlapuu, 2002), što je i potvrđeno kod nekoliko organizama čija je genomska sekvenca kompletirana.

Kristalografska studija pokazala je da FOX proteine sačinjava „helix-turn-helix“ jezgro od tri α -heliksa, okruženo sa dve petlje u vidu krilaca (Lai, et al., 1993). S toga, ovu grupu proteina često nazivaju i „Winged helix“ (Lai, et al., 1993). Za razliku od svih drugih proteina sa „helix-turn-helix“ strukturom, FOX proteini se vezuju za DNK kao monomeri. Trodimenzionalna struktura DNK vezujućeg domena Fox proteina je slična trodimenzionalnoj strukturi histona H1 i H5 (Brennan, et al., 1993; Cerf, et al., 1994; Ramakrishnan, et al., 1993), pa se može pretpostaviti da je ova strukturna sličnost i funkcionalno značajna. Istraživanja u okviru FOXA subfamilije pokazala su da je njihovo vezivanje za nukleozom nezavisno od acetilacije histona kao i da njihovo vezivanje prevodi hromatin u konformaciju pogodnu za vezivanje drugih transkripcionih faktora (Cirillo i Zaret, 1999). FOX proteini imaju uglavnom svojstvo transkripcionih aktivatora, međutim postoje podaci da FOXA, FOXC2, FOXD2, FOXD3 i FOXG1 proteini imaju svojstvo represora (Bourguignon, et al., 1998; Freyaldenhoven, et al., 1997; Vavricka, et al., 2004).

Evolutivna analiza je pokazala da su se prvi Fox geni pojavili u jednoćelijskim ili jednostavnim višćelijskim organizmima, i da su imali ulogu u ćelijskom metabolizmu (Carlsson i

Mahlapuu, 2002). Sa pojavom kompleksnijih organizama, uloga *Fox* gena se promenila, tako da su stekli tkivno specifičnu raspodelu, i postali uključeni u proces ćelijske diferencijacije. U najvećem broju slučajeva, Fox geni su odgovorni za procese diferencijacije tokom razvića, a funkcionišu i u adultnim stupnjevima, u kontroli metabolizma (Carlsson i Mahlapuu, 2002). Proučavanjem miševa kod kojih su izvršene „knockout“ mutacije u različitim Fox genima, došlo se do zaključka da su oni imaju ključnu ulogu u održavanju pravilnog embrionalnog razvića (Tabela 3). Takođe, otkriven je niz mutacija u različitim FOX genima kod čoveka koje se uglavnom dominantno nasleđuju i koje dovode do niza poremećaja sa drastičnim malformacijama. Tako na primer, mutacije u FOXC1 genu dovode do urođenog glaukoma, mutacije u FOXC2 do fenotipa sa limfedemom, ptosis-om i rascepom nepca, FOXE1 do zastoja u razviću štitne žlezde, praćeni rascepom nepca i hoanalnom atrezijom, zatim mutacije u FOXL2 dovode do BPES sindroma („Blepharophimosis Epicanthus Inversus Syndrome“), a mutacije u FOXP2 dovode do drastičnog poremećaj u govoru (Carlsson i Mahlapuu, 2002) itd.

Gen (ranije korišćen naziv)	Mutirani fenotip	Reference
Foxa1 (HNF3α)	Umiru postnatalno usled zastoja u rastu i hipoglikemije	(Kaestner, et al., 1999; Shih, et al., 1999)
Foxa2 (HNF3β)	Osustvo notohorde i prednjeg creva. Embrioni dostižu stadijum E8.5 embrionalnog razvića. Inaktivacija ovog gena u pankreasu dovodi do hiperinsulinemične hipoglikemije	(Ang i Rossant, 1994; Sund, et al., 2000)
Foxa3 (HNF3γ)	Smanjena ekspresija glukoznog transportera GLUT2 koja dovodi do hipoglikemije	(Kaestner, et al., 1998; Shen, et al., 2001)
Foxb1 (Mf3)	Zastoj u rastu i poremećaj u CNS-u	(Alvarez-Bolado, et al., 2000; Labosky, et al., 1997; Wehr, et al., 1997)
Foxc1 (Mf1)	Umiru nakon rođenja usled zastoja u rastu, kardiovaskularnih problema, poremećaja u razviću skeleta, bubrega i očiju. Zajedno sa Foxc2 neophodan za razviće somita	(Kidson, et al., 1999; Kume, et al., 2000; Wolffe, 1994)
Foxc2 (Mhf1)	Umiru pre rođenja usled skeletnih i kardiovaskularnih problema, zajedno sa Foxc2 neophodan za razviće somita	(Iida, et al., 1997; Kume, et al., 2000; Winnier, et al., 1999)
Foxd1 (Bf2)	Umiru u prvih 24h života usled otkazivanja rada	(Hatini, et al., 1996)

	bubrega	
Foxd2 (Mf2)	40% ima problema u radu bubrega	(Kume, et al., 2000)
Foxe1 (TTF-2)	Umiru u prvih 48h života usled poremećaja rada tireoidne žlezde	(De Felice, et al., 1998)
Foxe3	Degeneracija sočiva	(Blixt, et al., 2000; Brownell, et al., 2000)
Foxf1 (HFH8)	Umiru tokom razvića na stadijumu E9 usled poremećaja u nastanku mezoderma i vaskularizacije	(Kalinichenko, et al., 2001; Mahlapuu, et al., 2001)
Foxg1(Bf1)	Umiru odmah nakon rođenja sa drastičnim poremećajima u moždanim hemisferama	(Xuan, et al., 1995)
Foxh1 (Fast)	Umiru tokom rezvića usled poremećaja u nastanku notohorde, perhoralnog mezoderma i endoderma	(Hoodless, et al., 2001)
Foxi1 (Fkh-10)	Poremećaj u unutrašnjem uhu i održavanju ravnoteže	(Hulander, et al., 1998)
Foxj1 (HFH-4)	Poremećaj u levo-dednoj osi simetriji	(Chen, et al., 1998)
Foxk1 (MNF)	Zaostajanje u rastu, poremećaj u miogenim matičnim ćelijama	(Garry, et al., 2000)
Foxl1 (Fkh-6)	Epitelijalno-intestinalna hiperplazija, snažna aktivacija WNT- β catenin signalnog puta	(Kaestner, et al., 1997)
Foxm1 (HFH11)	Kardiovaskularni defekti i poliploidija u kardiomiocitama i hepatocitama	(Korver, et al., 1997)
Foxn1 (Whn)	Fenotip sa odsustvom dlake	(Nehls, et al., 1994)
Foxp3	Snažna proliferacija CD4 i CD8 T limfocita	(Brunkow, et al., 2001)
Foxq1	Poremećaj u nastanku dlake	(Hong, et al., 2001)

Tabela 3. Mutacije u Fox genima i njihova povezanost sa opisanim malformacijama. Tabela preuzeta iz Carlsson i Mahlapuu, 2000.

1.6.1. FoxA2

FOXA subfamilija transkripcionih faktora, ranije poznata kao HNF3 (hepatocyte nuclear factor 3) sisara obuhvata 3 gena, FOXA1 (HNF3 α), FOXA2 (HNF3 β) i FOXA3 (HNF3 γ), koji predstavljaju tkivno specifične regulatore razvića sa zajedničkim DNK vezujućim motivom (Kaestner, et al., 1994). FOXA proteini su prvi put identifikovani kao proteini iz jedarnih ekstrakata ćelija jetre koji se vezuju za enhenserski region gena za transtiretin (Wolfrum, Besser, et al., 2003). *Foxa* geni eksprimirani su i u crevima, pankreasu, plućima, notohordi i nervnoj ploči

(Kaestner, *et al.*, 1999). Utvrđeno je da je konsenzus DNK sekvenca za koju se vezuje FOXA2 A/G C/T A/C AA C/T A (Cha JY, 2000). Istraživanja vezana za način na koji FOXA transkripcioni faktori ostvaruju svoju funkciju pri transkripciji pokazala su da ovi transkripcioni faktori vrše otvaranje hromatina svojim C terminalnim domenom koji se vezuje za histone H3 i H4 (Cirillo, *et al.*, 2002). Vezivanje FOXA za svoju ciljnu sekvencu dovodi do poremećaja internukleozomalnih interakcija koje ostvaruju H3/H4 tetrameri, što ima za posledicu razmotavanje hromatina i stvaranja uslova za vezivanje drugih proteina važnih za regulaciju transkripcije ciljnih gena (Cirillo, *et al.*, 2002).

Foxa2 gen se eksprimira veoma rano u razviću, i to u notohordi i nervnoj ploči (Sasaki i Hogan, 1993). Da bi potvrdili ulogu Foxa2 u neurogenezi, Sasaki i autori su konstruisali transgene embrione miša koji su ektopično ekspimirali Foxa2. Kod transgenih životinja morfologija mozga je bila narušena u predelu ekspresije ovog gena, pri čemu je došlo do prostorne promene u ekspresiji gena specifičnih za regulaciju razvića nervne ploče i nervne cevi. Ovi rezultati su ukazali na ulogu Foxa2 transkripcionog faktora u regulaciji razvića ovih delova nervnog sistema. Takođe, pokazano je da Foxa2 može indukovati ektopičnu pojavu funkcionalne formacije slične nervnoj ploči *in vivo* (Sasaki i Hogan, 1994). Na osnovu ovih rezultata, predložena je i hijerarhija događaja u razviću nervne ploče (Sasaki i Hogan, 1994). Kao signalni molekul koji učestvuje u prenosu signala sa notohorde na nervnu cev i nervnu ploču u razviću, predložen je "Sonic hedgehog" (SHH) signalni put (Echelard, *et al.*, 1993). Naime, pokazano je da SHH indukuje ekspresiju Foxa2 do trenutka kada njegova koncentracija ne dostigne određeni nivo, a zatim sam Foxa2 pozitivnom povratnom spregom održava ekspresiju SHH molekula (Sasaki i Hogan, 1994).

Pored uloge u neurogenezi, Foxa2 je neophodan pri stvaranju epitela creva, pošto zajedno sa Foxa1 reguliše ekspresiju gena koji učestvuju u ovom procesu (Carlsson i Mahlapuu, 2002). Takođe, potvrđena je uloga svih FoxA proteina u metabolizmu jetre, pankreasa i creva. Kod više od 100 gena ekspimiranih u jetri, pankreasu i crevu, otkrivena su vezivna mesta za FoxA proteine.

Foxa2 je ekspimiran u prekursorima adipocita, gde inhibira diferencijaciju adipocita aktivirajući gen pod nazivom Pref-1 (Wolfrum, Shih, *et al.*, 2003). Utvrđeno je da se ekspresija Foxa i Pref-1 povećava kao odgovor na hormon rasta. U diferenciranim adipocitima Foxa2 kontroliše ekspresiju gena uključenih u metabolizam glukoze i masnih kiselina, kao što su geni za glukozni transporter-4, heksokinazu-2, hormon-senzitivnu lipazu, piruvat kinazu (Wolfrum, Shih, *et al.*, 2003). Zato se može zaključiti da je anti-adipogena aktivnost hormona rasta posredovana FoxA2 proteinom (Wolfrum, Shih, *et al.*, 2003). Ovi podaci ukazuju da FoxA2 ima važnu ulogu u regulaciji diferencijacije i metabolizma adipocita.

1.6.2. *Fox* i *Sox* geni

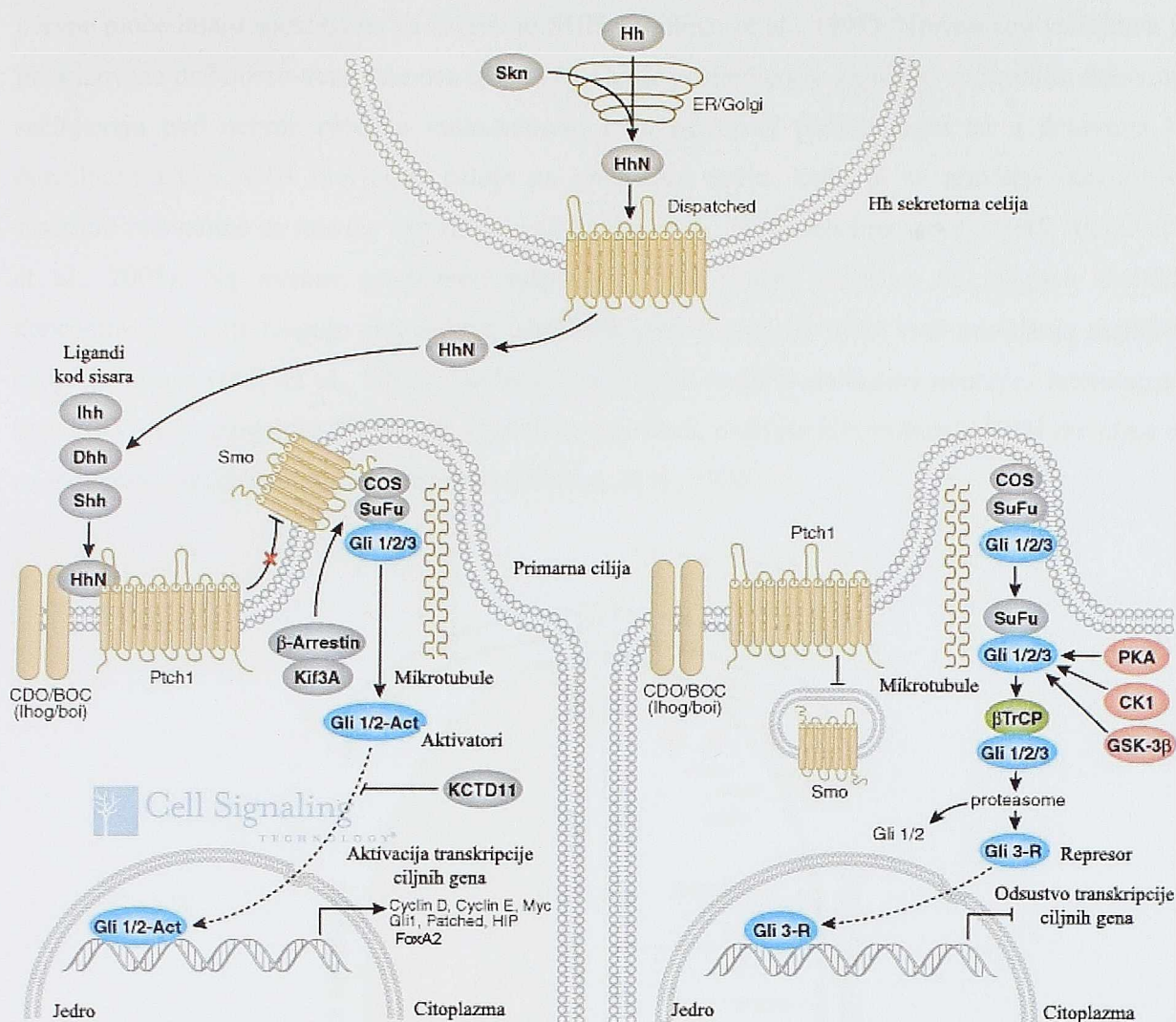
Sox i *Fox* familije gena poseduju slične karakteristike. Obe čine familije gena koji kodiraju transkripcione faktore važne za veliki broj različitih procesa tokom razvića, kao što su: gastrulacija, određivanje ćelijske sudbine i morfogeneza (Carlsson i Mahlapuu, 2002; L. H. Pevny i Lovell-Badge, 1997; Wegner, 1999). Obe familije su podeljene na podfamilije na osnovu aminokiselinske sekvence njihovih DNK-vezivnih domena. SOX proteini su uključeni u različite procese razvića kao na primer razviće nervnog sistema, razviće oka, nervne kreste, gastrulacije i modelovanje mezoderma (Heeg-Truesdell i LaBonne, 2004). Fox geni su takođe uključeni u veliki broj procesa tokom razvića kao što su razviće oka, organizacija epitela pluća, održavanje prekursorskih ćelija nervne kretse, gastrulacija i modelovanje telesne ose (Carlsson i Mahlapuu, 2002). Fox transkripcioni faktori su ciljni geni brojnih signalnih puteva, uključujući Nodal-TGF β /Smad signalni put (Transforming growth factor beta) koji je uključen u specifikaciju endoderma vertebrata (Hoodless, et al., 2001). *Sox17* gen je takođe uključen u razviće endoderma kao ciljni gen Nodal signalnog puta (Alexander i Stainier, 1999). Kod *Xenopusa* je pokazano da su *Foxa1* i *Foxa2* direktni transkripcioni targeti SOX17 proteina (Sinner, et al., 2004). Takođe, funkcije SOX i FOX proteina su povezane tokom razvića nervne kreste, tako što je ekspresija *FoxD3* kod *Xenopusa* regulisana SOX10 proteinom (Honore, et al., 2003). Na osnovu ovih informacija može se reći da su ove dve familije gena blisko funkcionalno povezane.

1.7. „Hedgehog“ signalni put

„Hedgehog“ gen (*Hh*) je jedan od gena koji određuje polarnost segmenata *Drosophila-e* i na osnovu koga je identifikovana grupa homolognih gena kod Vertebrata: Sonic hedgehog (SHH), Indian hedgehog (*Ihh*) i Desert hedgehog (*Dhh*) (Echelard, et al., 1993). Ovi geni kodiraju sekretorne intercelularne proteine koji na različite načine uključeni u proces embriogeneze. Mehanizam po kome se odvija ovaj signalni put prikazan je na slici 9. Hedgehog signalni put je evolutivno konzerviran i ima ključnu ulogu u procesu razvića vezanu za modelovanje i održavanje proliferativnih zona (Cohen, 2003). Pravilna sekrecija i gradijentna difuzija hedgehog liganada Sonic, Desert i Indian kod Vertebrata zahteva autoprocisivno isecanje i njihove lipidne modifikacije (McMahon, 2000). U odsustvu hedgehog liganada u ćelijama koje primaju ovaj signal, receptor Hedgehog liganada „Patched“ (*Ptch*) normalno je vezan i suprimira aktivnost drugog trans-

membranskog proteina koji se naziva "Smoothened" (Smo). Tada SUFU („supressor of fused“) i COS2 („kinesin-like protein, Costal2“) odvajaju od mikrotubula rezerve glavnog medijatora SHH signalnog puta, GLI proteine („Glioma-associated oncogene homolog“), koji mogu biti fosforilisani od strane PKA, CKI i GSK3 što rezultuje β -TrCP-posredovanoj degradaciji GLI aktivatora (GLI1 i GLI2 kod sisara) (Kogerman, et al., 1999; Lee, et al., 1997; Sisson, et al., 1997; Stone, et al., 1996; Stone, et al., 1999). Nakon toga, u ćeliji ostaje samo GLI3 koji ima svojstva represora, što dovodi do represije Hh ciljnih gena (Meyer i Roelink, 2003). U aktiviranom stanju Hh vezivanje za PTCH („patched“) dovodi do aktivacije SMO („Smoothened“) čija G-protein aktivnost blokira inhibiciju Gli proteina kinaziranjem, koji su sada slobodni da se transportuju u nukleus i aktiviraju ciljne gene (ciklin D, Ciklin E, MYC, Foxa2, Sox9 itd) (Rahnama, et al., 2006; Taipale, et al., 2002).

Najviše proučavan od svih hedgehog liganada je Sonic hedgehog (SHH). Kao i svi drugi "hedgehog" proteini aktivnost SHH zavisi od pravilnog procesovanja u endoplazmatičnom retikulumu (Marti, et al., 1995). To podrazumeva isecanje SHH prekursora na signalni, N-terminalni domen veličine 19kDa (SHH-N) i C-terminalni domen veličine 25kDa koji ima funkciju u daljoj modifikaciji signalnog molekula (SHH-C) (Marti, et al., 1995). SHH-C ima intramolekularnu holesterol transferaznu aktivnost i odgovoran je za kovalentno vezivanje holesterola za C terminalni deo SHH-N (Porter, et al., 1996). Dodavanje holesterola ima važnu ulogu u ograničavanju prostorne aktivnosti SHH-N vezujući ga za membranu i tako sprečavajući njegovu difuziju od mesta gde je izvršena sekrecija (Porter, et al., 1996). Aktivnost SHH-N se postiže njegovim vezivanjem za transmembranski receptor PTCH. Kada se SHH-N veže za PTCH, oslobađa se Smo od blokade i signalni put teče dalje aktivacijom Gli gena (Lum i Beachy, 2004).

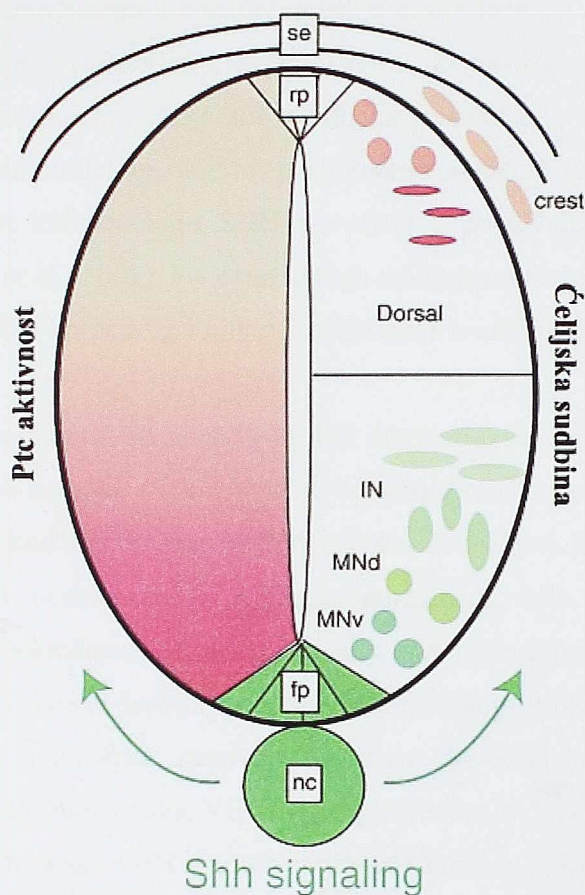


Slika 9. Hedgehog signalni put. Objašnjenje dato u tekstu. Preuzeto sa web strane Cell Signaling Technology:

<http://www.cellsignal.com/reference/pathway/Hedgehog.html>

SHH igra važnu ulogu u mnogim procesima. Ovaj signalni put ima najvažniju ulogu tokom razvića delujući kao morfogen i tako vršeći modelovanje mnogih sistema, uključujući udove (Currie i Ingham, 1996), centralne strukture u mozgu (Herzog, et al., 2003), kičmenoj moždini (Lewis i Eisen, 2001), talamusu i zoni "limitas intrathalamica" (Scholpp, et al., 2006). U centralnom nervnom sistemu gde je uloga Hh najviše izučavana, SHH signalni put je ključan za rano ventralno modelovanje nervne cevi i kasnije za razviće dorzalnih struktura mozga. Proučavanjem procesa razvića kod miša pokazano je da je notohorda izvor koji luči SHH protein (Yamada, et al., 1999). Takođe, ćelije koje se nalaze neposredno uz notohordu u ventralnom delu

nervne ploče imaju sposobnost da sekretuju SHH (Roelink, et al., 1995). Nervna cev vertebrata je polarizovana duž dorzo-ventralne ose (slika 10). Čelije postavljene u najnižim ventralnim delovima sačinjavaju pod nervne ploče a moto-neuroni i inter-neuroni pozicionirani su u delovima ka dorzalnom kraju. SHH morfogen deluje na gradientni način, kako bi se pravilno razvile sve strukture relevantne za razviće nervne cevi (Ericson, et al., 1997; Roelink, et al., 1995; Stamataki, et al., 2005). Na ovakav gradientnu raspodelu SHH i kroz odgovor na njegove različite koncentracije, ćelije reaguju aktivacijom određenih setova gena što dalje vodi nastajanju različitih ćelijskih tipova (Poh, et al., 2002). Na taj način nastaju različiti podtipovi neurona: interneuroni tipa V0-V3 i motoneuroni (Slika 10). U *in vitro* uslovima, različite koncentracije SHH dovoljne su za indukciju različitih podtipova neurona (Ericson, et al., 1996).



Slika 10. Shematski prikaz gradijentnog dejstva SHH morfogena. Nc- notohorda, fp- podna ploča nervne cevi, IN- interneuroni, MN- motoneuroni, rp- krovna ploča nervne cevi, se- površinski ektoderm, crest- nervna kresta. Zelenom bojom označeni su ćelijski tipovi koji nastaju usled gradijentne koncentracije SHH, poreklom iz notohorde.

Crvenom bojom označeni su ćelijski tipovi koji nastaju pod dejstvom signala poreklom iz rp i čine senzorne neurone (Goodrich i Scott, 1998).

Uticaj SHH na formiranje uzdužne ose simetrije organizma pokazan je u eksperimentima na embrionima pileta. Uočeno je da je SHH eksprimiran asimetrično u Hensenovom čvoru tokom gastrulacije i to na levoj strani (S. Wang, et al., 2004). Ovaj ekspresioni profil je u korelaciji sa pravilnim pozicioniranjem srca tokom razvića (Levin, et al., 1995). Miševi koji su imali mutaciju u SHH pokazali su odsustvo ekspresije markera specifičnih za desno-levu simetriju kao i lateralne defekte u morfologiji srca i drugih organa (Tsukui, et al., 1999).

SHH signalni put ima važnu ulogu i u procesu hematopoeze (Bhardwaj, et al., 2001). Hematopoeza je inicirana u populaciji matičnih ćelija koje potiču iz mezoderma, kombinacijom citokina koji regulišu diferencijaciju u specifične ćelije krvne loze, ili pak obnavljanjem ćelija sa pluripotetnim potencijalom (Dieterlen-Lievre, 1998). Dodavanje SHH proteina rezultuje povećanjem broja hematopoetičnih ćelija sposobnih za repopulaciju matičnih ćelija. Delimična neutralizacija SHH signala antitelom inhibira proliferaciju matičnih ćelija krvne loze, dok se sa druge strane povećanjem koncentracije SHH povećava i populacija ćelija sa pluripotentnim potencijalom (Bhardwaj, et al., 2001). Na osnovu toga zaključeno da je SHH faktor neophodan za proliferaciju matičnih ćelija krvne loze i njihovo održavanje u nediferenciranom stanju (Bhardwaj, et al., 2001).

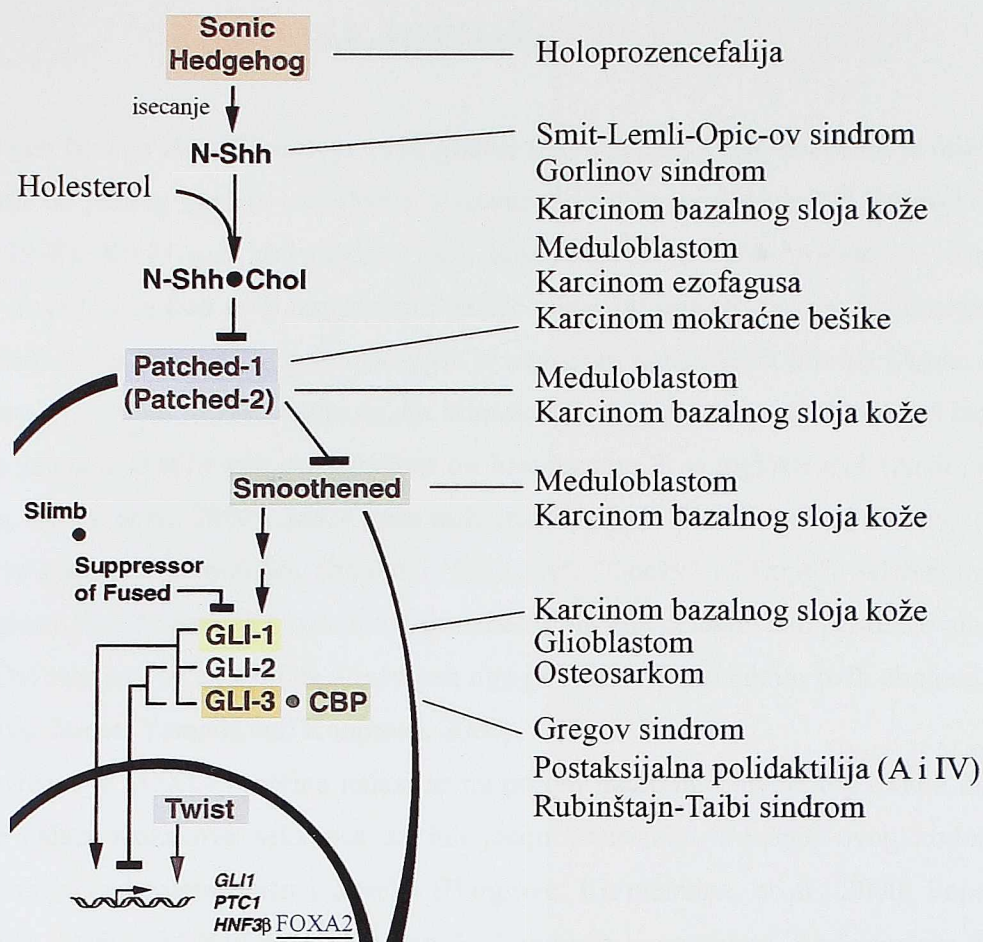
Pored toga što ima ulogu u hematopoezi, SHH ima važnu ulogu i u procesu vaskularizacije. SHH je uključen u proces de novo vaskularizacije određenih embrionalnih tkiva kao i u procesu indukovanja angiogeneze kod adulta (Pola R, 2001; Vokes SA, 2004). Eksperimenti sa transgenim miševima otkrili su da overekspresija SHH u dorzalnem delu nervne cevi dovodi do hipervaskularizacije neuroektoderma (Rowitch, et al., 1999). Sa druge strane, embrioni miševa kojima je ukinuta SHH aktivnost ispoljavaju lošu vaskularizaciju pluća (Pepicelli, et al., 1998). Mehanizam odgovoran za ovaj efekat zasniva se na tome što SHH indukuje ekspresiju proteina neophodnih za formiranje krvnih sudova: VEGF-1, angiopoetina 1 i 2 (Pola R, 2001). Međutim, još uvek nije poznat mehanizam kako SHH aktivira angiogene faktore, pošto u regulatornim regionima VEGF-1, angiopoetina 1 i 2 nije pronađeno GLI vezivno mesto (Pola R, 2001).

1.7.1. SHH signalni put kod čoveka

Za vreme razvića humanog embriona SHH je eksprimiran u notohordi, podnoj ploči nervne cevi, mozgu, zoni polarizovane aktivnosti, udovima i crevu (Odent, et al., 1999). Mutacije u humanom SHH genu dovode do holoprozencefalije (HPE [MIM 236100]), koja nastaje zbog nerazdvajanja prozencefalona u cerebralne hemisfere i lateralne ventrikule, u razdoblju od četvrte do osme nedelje trudnoće, što dovodi do pojave težih malformacija koje mogu biti nespojive sa životom i često dovode do intrauterine smrti (Villavicencio, et al., 2000). Kod novorođenčadi koja se ipak rode mogu se uočiti malformacije očiju, nosa i gornje usne, s normalnim ili graničnim odstupanjima u razvoju, konvulzijama, motornim ispadima i endokrinom disfunkcijom HPE je čest uzrok prenatalne smrti sa učestalošću 1:250, dok je učestalost kod novorođenčadi 1: 16000 (Belloni, et al., 1996; Nanni, et al., 1999; Roessler, et al., 1996).

Osim u SHH genu, mutacije su opisane i u PTCH i SMO genima. Opsežna istraživanja različitih tumora pokazala su učešće ovog signalnog puta u njihovoj etiologiji. Pokazano je da PTCH funkcioniše kao tumor supresor, a mutacije koje dovode do aktivacije SMO čine ga onkogenom (Stone, et al., 1996; Xie, et al., 2005). Mutacije u SMO genu dovode do karcinoma bazalnog sloja kože, meduloblastoma, ezofagijalnog skvamoznog karcinoma, MIM 133239, (Maesawa, et al., 1998), Gorlinovog sindroma (karcinom kože), karcinoma mokraćne bešike (Thievensen, et al., 2005) itd.

Mutacije u GLI1-3 genima koji predstavljaju efektore SHH signalnog puta, pronađene su u većem broju tumora (Villavicencio, et al., 2000). Tako na primer, GLI1 je amplifikovan u glioblastomima (Kinzler, et al., 1987; Kinzler i Vogelstein, 1990). zatim nekim osteosarkomima, rabdomiosarkomima, B limfomima i karcinomu bazalnog sloja kože (Dahmane, et al., 1997; Roberts, et al., 1989; Werner, et al., 1997). GLI1 je okarakterisan kao onkogen na osnovu svoje sposobnosti da transformiše ćelije u tumorske, u kooperaciji sa adenovirusom E1A (Ruppert, et al., 1991).

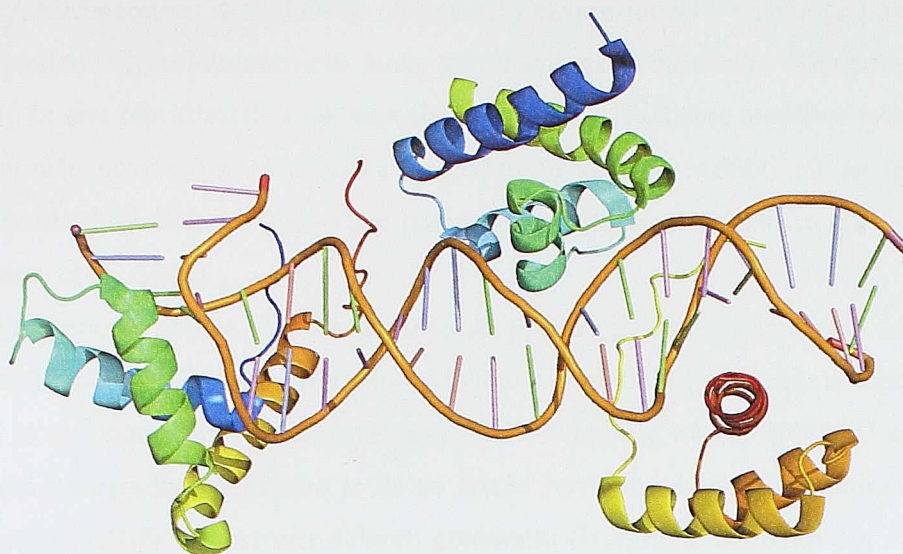


Slika 11. SHH signalni put kod čoveka. Shematski prikaz signalnog puta (levo) i mutacije u genima povezane sa opisanim oboljenjima (desno). (Preuzeto iz Villavicencio, et al., 2000).

1.8. *SOX14* gen

SOX14 gen čoveka identifikovan je 1998 godine (Arsic, et al., 1998) pri čemu je otkriveno da se gen sastoji od jednog egzona i obuhvata otvoreni okvir čitanja dužine 297 amino-kiselina (Arsic, et al., 1998). *Sox14* gen kod pileta i miša identifikovan je 2000. godine, pri čemu je pokazano da u *Sox14* genu kod ovih organizama takođe nema introna (Hargrave, Karunaratne, et al., 2000). Pozicija humanog *SOX14* gena određena je metodom radijacionih hibrida (Arsic, et al., 1998) i potvrđena primenom fluorescentne *in situ* hibridizacije (Wilmore, et al., 2000), pri čemu je pokazano da je humani *SOX14* gen pozicioniran na hromozomu 3, u regionu q23 (Arsic, et al., 1998; Hargrave, James, et al., 2000). *Sox14* gena miša mapiran je na distalnom kraju hromozoma 9 u regionu gde su mapirana neurološka oboljenja "Epilepsy", "Ducky" i "Tippy". Sekvenciranjem kodirajućeg regiona *Sox14* gena miševa sa ovim poremećajima nije detektovano prisustvo mutacija u ovom genu. Ovi rezultati su ukazali da *Sox14* gen nije povezan sa nastankom ovih oboljenja kod miševa (Hargrave, James, Yamada and Koopman, 2000).

Start translacije *SOX14* proteina nalazi se na prvom metioninu otvorenog okvira čitanja, ispred koga se nalazi Kozakova sekvenca za inicijaciju translacije. Pozicija ovog kodona za metionin očuvana je kod pileta, miša i čoveka (Hargrave, Karunaratne, et al., 2000; Popovic i Stevanovic, 2009). Dužina *SOX14* proteina varira kod amniota i anamniota. Kod amniota dužina *SOX14* proteina iznosi 240 amino kiselina, dok anamnioti imaju 1-2 amino kiseline manje (Popovic i Stevanovic, 2009). Humani *SOX14* protein sadrži 11.2% prolina, 10.8% alanina i 9.2% serina, kao i višestruka mesta za fosforilaciju (Arsic, et al., 1998). Signal za jedarnu lokalizaciju nalazi se na N terminalnom kraju HMG domena i obuhvata pozicije od 66-83. amino-kiseline (Arsic, et al., 1998). Pokazano je da mnogi *SOX* proteini imaju definisane domene uključene u transkripcionu regulaciju ili u protein-protein interakcije (Wegner, 1999), ali *SOX14* nema značajne homologije ni sa jednim od ovih definisanih domena (Hargrave, James, et al., 2000). Najbliži *SOX14* proteinu je *SOX21*, sa kojim deli 92% identičnosti u okviru HMG boxa i 66% identičnosti u C terminalnom domenu (Malas, et al., 1999).



Slika 12. Struktura SOX14 proteina.

Analiza ekspresije humanog *SOX14* gena rađena je primenom Northern blot analize i RT-PCRa (Arsic, et al., 1998). Kako bi se utvrdila dužina transkripta *SOX14* gena, urađen je Northern blot na iRNK izolovanoj iz nekoliko humanih ćelijskih linija (Arsic, et al., 1998). Tom prilikom detektovan je transkript dužine oko 1.8 kb u HepG2 ćelijskoj liniji. Northern blot je urađen i na iRNK mozga embriona čoveka, pri čemu je detektovan transkript dužine oko 2.5. kb (Malas, et al., 1999). RT-PCRom pokazana je ekspresija *SOX14* gena u fetalnom mozgu, kičmenoj moždini, timusu i nadbubrežnim žlezdama, a u adultnim tkivima: u srcu, jetri, bubrezima, testisima i crevu (Arsic, et al., 1998).

Analizom ekspresije *Sox14* gena miša i pileta dobijeno je mnogo više informacija o njegovoj ekspresiji i potencijalnoj ulozi u procesu razvića. Ekspresiju *Sox14* gena miša i pileta analiziralo je više grupa autora (Hargrave, James, et al., 2000; Hargrave, Karunaratne, et al., 2000; Uchikawa, et al., 1999; Wilmore, et al., 2000). Svi ovi radovi pokazali su ekspresiju *Sox14* gena u mozgu i kičmenoj moždini. Eksperimenti in situ hibridizacije na celim embrionima miša i pileta, pokazali su ekspresiju *Sox14* gena bilateralno simetrično u ćelijama ventralnog zadnjeg mozga, međumozga i srednjeg mozga (Hargrave, Karunaratne, et al., 2000). Ekspresija *Sox14* u kičmenoj moždini praćena je vremenski i prostorno, a rezultati su pokazali da je *Sox14* eksprimiran u interneuronima, u tačno definisanoj dorzo-ventralnoj poziciji, blizu ventralnih motoneurona

(Hargrave, Karunaratne, et al., 2000). Vremenski, ekspresija *Sox14* gena se poklapa sa završnom diferencijacijom i formiranjem veza među populacijama interneurona (Hargrave, Karunaratne, et al., 2000). In situ hibridizacijom na poprečnim preseccima kičmene moždine pileta pokazano je da *Sox14* definiše novu grupu ventralnih interneurona koji su različiti ali se ipak preklapaju sa interneuronima koji eksprimiraju druge transkripcione faktore kao što su *En1* i *Lim3* (Hargrave, Karunaratne, et al., 2000).

Ekspresiona analiza ukazala je na to da je pozicija *Sox14* pozitivnih ćelija u ventralnom delu kičmene moždine određena SHH induktivnim signalom koji potiče iz notohorde i podne ploče *in vivo* i to na dozno zavisni način (Hargrave, Karunaratne, et al., 2000). U eksperimentima sa ektopičnom notohordom pokazano je da su *Sox14* pozitivne ćelije pozicionirane u zavisnosti od koncentracije SHH-N u dorzoventralnom gradijentu (Hargrave, Karunaratne, et al., 2000). Dalja istraživanja fizioloških svojstava ćelija koje eksprimiraju ovaj gen kao i analiza ćelija kod kojih bi *Sox14* gen bio inaktiviran, pokazaće kako je sudbina nervnih ćelija regulisana *Sox14* genom.

Ekspresija *Sox14* gena pokazana je i u začecima prednjih i zadnjih udova, i to u distalnim ćelijama apikalne ektodermalne brazde (Wilmore, et al., 2000). Pored *Sox14*, u pupoljku ekstremiteta eksprimiraju se i *Sox5*, *Sox6* i *Sox9* geni (Lefebvre, et al., 1998). Moguća uloga *Sox14* gena u razviću je održavanje rasta pupoljka ekstremiteta i sprečavanje prerane hondrogeneze u mezenhimu. Postoje podaci prema kojima bi SOX14 protein mogao imati ulogu u transkripcionoj regulaciji signalnih molekula, kao što je FGF8 (Wilmore, et al., 2000).

Proučavanjem dorzalnog talamusa kod pileta došlo se do značajnih podataka o ekspresiji *Sox14* gena u ovom delu nervnog sistema. Dorzalni talamus je ključni deo prednjeg mozga Vertebrata koji ima funkciju relejnog centra i prikuplja impulse iz perifernih senzornih organa koje sprovodi do viših centara u kori velikog mozga (Steriade i Llinas, 1988). Tokom ranog razvića ovog dela mozga važnu ulogu ima Sonic hedgehog signalni put. Eksperimenti sa eksplantima pileta pokazali su da je SHH odgovoran za pravilnu ekspresiju *Sox14* gena u dorzalnog talamusu i to posredstvom Gli transkripcionih faktora. Naime, visoke doze signalnog molekula SHH i egzogenog Gli1 dovode do indukcije *Sox14* ekspresije, dok niske doze SHH i Gli2 dovode do ekspresije *Gbx2* gena (homeodomenski transkripcioni faktor ključan za razviće nukleusa dorzalnog talamusa). Zavisnost *Sox14* ekspresije od *Gli1* pokazana je u eksperimentima sa eksplantima iz embriona pileta, koji nema nijedan alel za *Gli1* gen (*Gli1*^{-/-}), kod kojeg i pri jako visokim dozama SHH nije došlo do ekspresije *Sox14* gena (Hashimoto-Torii, et al., 2003). Međutim, kada je *Gli1* elektroporisan u *Gli1*^{-/-} eksplante došlo je i do ekspresije *Sox14* gena. Nasuprot *Gli1*, egzogeni *Gli2* nije doveo do istog ishoda, što je nedvosmisleno dokazalo da je za ekspresiju *Sox14* gena u

dorzalnom talamusu neophodan *Gli1* (Hashimoto-Torii, et al., 2003). Takođe, u ovim eksperimentima pokazano je da *Gli3* nema uticaja na *Sox14* ekspresiju, kao prvo jer nema preklapanja ekspresionog profila *Gli3* i *Sox14* gena, a kao drugo u eksplantima embriona pileta koji nema nijedan alel *Gli3* gena (*Gli3*^{-/-}), nije došlo do promene u nivou ekspresije *Sox14* gena (Hashimoto-Torii, et al., 2003).

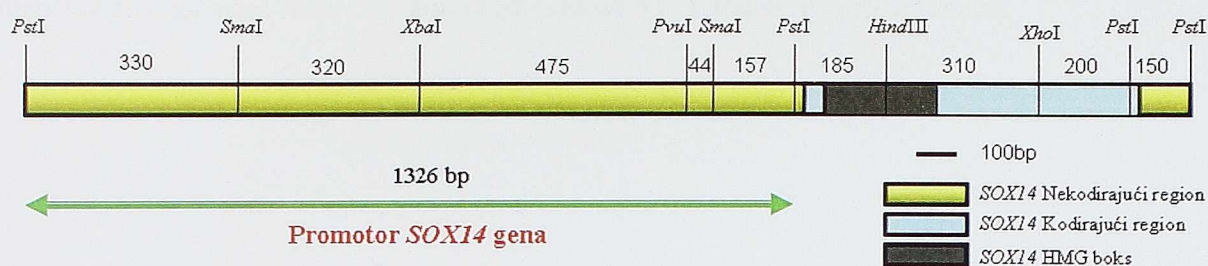
Nedavna istraživanja na ventromedijalnom hipotalamusu tek rođenih miševa pokazala su da je *Sox14* jedan od tkivno specifičnih genetičkih markera za ovaj deo hipotalamusa (Kurrasch, et al., 2007). Na osnovu ograničenih „knock down“ eksperimenata na vrsti *Danio rerio* pokazano je da je *Sox14*, zajedno sa *Fzf1*, neophodan za rano formiranje medijalnog hipotalamusa (Kurrasch, et al., 2007). Postoji sumnja da su mutacije u ovim genima odgovorne za metabolička oboljenja kod odraslih, imajući u vidu da su ovi delovi hipotalamusa odgovorni za osećaj sitosti (Kurrasch, et al., 2007).

Opsežnom analizom K-ras-transformisanih NIH3T3 ćelija korišćenjem RNK interference otkriveno je 28 gena odgovornih za Ras-posredovano epigenetsko utišavanje pro-apoptotskog gena Fas, što je jedan od faktora koji dovode do transformacije normalnih ćelija u maligne (Gazin, et al., 2007). Nakon utišavanja ovih 28 gena posredstvom sh-RNK (small hairpin RNA) doslo je do ponovne ekspresije Fas gena. U okviru ovih 28 gena identifikovan je i *Sox14*, ali njegova precizna uloga u ovom procesu nije definisana (Gazin, et al., 2007). Na osnovu ovih rezultata može se pretpostaviti da *Sox14* gen ima važnu ulogu u etiologiji kancera.

Najnovija istraživanja na vinskih mušicama pokazala su da je *Sox14* ključan tokom procesa presvlačenja insekata u procesu formiranja adultnog nervnog sistema, regulišući proces selektivne apoptoze dendritskih produžetaka nervnih ćelija (Osterloh i Freeman, 2009).

1.8.1. Analiza promotora *SOX14* gena

Analizom 5' nekodirajućeg regiona *SOX14* gena utvrđeno je da se u okviru sekvence *PstI*-*PstI* nalazi regulatorni region koji je sposoban da aktivira transkripciju cat reporter gena u HepG2 ćelijskoj liniji (Đurović, 2003).



Slika 13. Restrikciona mapa regiona u okviru koga se nalazi *SOX14* gen. Zelenom strelicom je označen *PstI/PstI* fragment u okviru koga se nalazi promotor *SOX14* gena. Ukupna dužina promotorskog regiona data je iznad strelice. Brojevi predstavljaju međusobnu udaljenost restrikcionijskih mesta u baznim parovima.

Kompjuterskom analizom promotora utvrđena su potencijalna mesta za vezivanje brojnih transkripcionih faktora, među kojima je NF-Y (nuclear factor Y). Sekvenca koju prepoznaje ovaj transkripcioni faktor, CCAAT, češće se pojavljuje u promotorima onih gena koji ne poseduju TATA boks, kakav je i promotor *SOX14* gena, i to najčešće u invertovanom obliku (Mantovani, 1998). Istraživanja usmerena na analizu transkripcione regulacije ekspresije pokazala su da je *SOX14* gen regulisan ovim opštim transkripcionim faktorom (Djurovic i Stevanovic, 2004; Đurović, 2003). Naime, nakon uvođenja mutacije u konsenzusno mesto vezivanja ovog transkripcionog faktora, pokazano je da je aktivnost promotora *SOX14* gena opala za 60% (Djurovic i Stevanovic, 2004). NF-Y je opšti transkripcioni faktor koji je sposoban da pri vezivanju za konsenzusnu sekvencu savije DNK za 62° do 80° (Ronchi, et al., 1995). Zahvaljujući tome, NF-Y ima sposobnost da remodeluje lokalnu strukturu hromatina i stupa u interakcije sa nukleozomima (Romier, et al., 2003). Formiranjem kompleksa sa DNK, NF-Y olakšava vezivanje

susednih faktora i dovodi do regrutovanja koaktivatora, poput p300 proteina (Caretta, et al., 2003; Coustry, et al., 2001; Li, et al., 1998). Funkcija NF-Y je da olakša i/ili stabilizuje vezivanje koaktivatora ili drugih transkripcionih faktora za susedne vezujuće elemente, što za posledicu ima povišen nivo transkripcije ciljnih gena (Caretta, et al., 2003). Pored *SOX14* gena, niz drugih *SOX/Sox* gena je regulisano od strane NF-Y, kao što su *Sox2* miša i *SOX3*, *SOX9* i *SOX18* čoveka (Colter, et al., 2005; Kovacevic Grujicic, et al., 2005; Krstic, et al., 2007; Petrovic, et al., 2009; Wiebe, et al., 2000). Ovi podaci ukazuju da *SOX/Sox* geni poseduju zajednički, evolutivno očuvan mehanizam regulacije ekspresije koji je zavisn od NF-Y transkripcionog faktora.

2. CILJ RADA

Dosadašnji rad na *SOX14/Sox14* genu bio je baziran na kloniranju i karakterizaciji ovog gena kao i na analizi njegove ekspresije tokom razvića i u adultnim stupnjevima. Međutim, u literaturi postoji vrlo malo podataka o transkripcionoj regulaciji ekspresije *SOX14* gena. Našim predhodnim istraživanjima, koja su bila usmerena ka definisanju promotora humanog *SOX14* gena, stekli su se uslovi za detaljnu analizu kontrolnih regiona i identifikaciju transkripcionih faktora uključenih u regulaciju ekspresije humanog *SOX14* gena (Đurović, 2003).

U istraživanjima koja su obuhvaćena ovom tezom postavljeni su sledeći ciljevi:

- Određivanje starta transkripcije humanog *SOX14* gena
- Identifikacija pozitivnih i(ili) negativnih *cis* regulatornih elemenata uključenih u modulaciju transkripcije *SOX14* gena
- Analiza transkripcionih faktora koji potencijalno učestvuju u regulaciji ekspresije *SOX14* gena
- Ispitivanje uticaja SHH signalnog molekula i GLI transkripcionih faktora na ekspresiju *SOX14* gena *in vitro*
- Komparativna analiza *SOX14* ortologa kod kičmenjaka korišćenjem sekvenci deponovanih u bazama podataka kao i novih sekvenci koje su generisane u ovom radu
- Preispitivanje predloženog modela evolucije SoxB grupe gena.

Istraživanja prikazana u radu će omogućiti detaljnija saznanja o mehanizmu regulacije ekspresije humanog *SOX14* gena i stepenu očuvanosti tokom evolucije, što će doprineti razumevanju funkcija ovog gena u procesima razvića.

3. MATERIJAL I METODE

3.1 Eksperimentalni materijal

3.1.1. Bakterijski sojevi korišćeni u radu

Soj	Karakteristike (genotip)	Referenca
XL1-Blue	recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacIqZ.M15 Tn10 (Tetr)]	(Bullock, 1987)

3.1.2. Vektori korišćeni u ovom radu

Plazmid	Veličina	Karakteristike	Referenca
pBLCAT6	4.25 kb	Vektor za analizu promotora u ćelijama sisara, koji poseduje reporterski gen za hloramfenikol-acetiltransferazu (CAT)	(Boshart, et al., 1992)
pBLCAT5	4.4 kb	Vektor za ispitivanje enhancerskih svojstava sekvenci od interesa, poseduje reporterski gen za hloramfenikol-acetiltransferazu (CAT), sadrži HSV TK- timidin kinazni promotor ispred CAT reporter gena; Amp ^r	(Boshart, et al., 1992)
pBS II KS+	2.96 kb	Prokariotski fagemidni vektor sa amp rezistencijom	Stratagene ®
pCH ₁₁₀	7.1 kb	Amp ^r , sadrži funkcionalni <i>lacZ</i> gen koji se eksprimira kod eukariota sa ranog SV40 promotora	Amersham Pharmacia Biotech ®

3.1.3. Plazmidni konstrukti korišćeni u ovom radu

Plazmid	Veličina	Karakteristike	Ref.
1300CAT6	5.573kb	<i>PstI-PstI</i> fragment iz 5' nekodirajućeg regiona humanog <i>SOX14</i> gena, dužine 1324 bp ukloniran u promotor zavisni pBLCAT6 vektor	(Djurovic i Stevanovic, 2004)
650CAT6	4.903kb	<i>PstI-XbaI</i> fragment iz 5' nekodirajućeg regiona humanog <i>SOX14</i> gena, dužine 653bp ukloniran u promotor zavisni pBLCAT6 vektor	(Djurovic i Stevanovic, 2004)
700+CAT6	4.921kb	<i>XbaI-PstI</i> fragment iz 5' nekodirajućeg regiona humanog <i>SOX14</i> gena, dužine 671bp ukloniran u promotor zavisni pBLCAT6 vektor	(Djurovic i Stevanovic, 2004)
700-CAT6	4.921kb	<i>XbaI-PstI</i> fragment iz 5' nekodirajućeg regiona humanog <i>SOX14</i> gena, dužine 671bp ukloniran u promotor zavisni pBLCAT6 vektor (inverzni klon 700+CAT6)	(Djurovic i Stevanovic, 2004)
1300 CAT5	5.726kb	<i>PstI-PstI</i> fragment iz 5' nekodirajućeg regiona humanog <i>SOX14</i> gena, dužine 1324 bp ukloniran u pBLCAT5 vektor	(Popovic J., 2010)
650 CAT5	5.050kb	<i>PstI-XbaI</i> fragment iz 5' nekodirajućeg regiona humanog <i>SOX14</i> gena, dužine 653bp ukloniran u pBLCAT5 vektor	(Popovic J., 2010)

832 CAT5	5.232kb	<i>SmaI-SmaI</i> fragment iz 5' nekodirajućeg regiona humanog <i>SOX14</i> gena, dužine 832bp ukloniran u pBLCAT5 vektor	(Popovic J., 2010)
320 CAT5	4.713kb	<i>SmaI-XbaI</i> fragment iz 5' nekodirajućeg regiona humanog <i>SOX14</i> gena, dužine 313bp ukloniran u pBLCAT5 vektor	(Popovic J., 2010)
320CAT5 mut	4.713kb	<i>SmaI-XbaI</i> fragment iz 5' nekodirajućeg regiona humanog <i>SOX14</i> gena, dužine 313bp ukloniran u pBLCAT5 vektor i kome je mutirano vezivno mesto za FOXA2 transkripcioni faktor	(Popovic J., 2010)
pHD Foxa2	~6.5 kb	U pHD vektor uklonirana cDNK mišjeg <i>Foxa2</i> gena, ispred tk promotora.	(Kaestner, et al., 1994)
pcDNA4-NLSMTGLI1	8.686kb	Eukariotski ekspresioni vektor za humani <i>GLI1</i> gen	Dr Bert Vogelstein i Dr Kenneth W. Kinzler, Johns Hopkins University, Baltimore, Maryland, USA
p4TO6MTGLI2	9.009kb	Eukariotski ekspresioni vektor za humani <i>GLI2</i> gen	Dr Fritz Aberger, University of Salzburg, Austria
pcDNA4/TO/GLI3richtig	10.201kb	Eukariotski ekspresioni vektor za humani <i>GLI3</i> gen	Dr Bert Vogelstein i Dr Kenneth W. Kinzler, Johns Hopkins University, Baltimore, Maryland, USA
P3 XbaI 2.2	5.1kb	2.2 kb insert humanog <i>SOX14</i> gena ORF + deo 5' nekodirajućeg <i>XbaI/PstI</i> ukloniran u pBS II KS+. Korišćen za sekvenciranje pri određivanju starta transkripcije	(Arsic, et al. 1998)

3.1.4. Čelijske linije korišćene u ovom radu

U ovom radu su korišćene permanentne čelijske linije HepG2, poreklom iz humanog hepatocelularnog karcinoma (ATCC HB-8065) i U87MG poreklom iz humanog glioblastoma IV gradusa (ATCC HTB-14). Obe čelijske linije su gajene u standardnim uslovima, u DMEM-u sa niskim sadržajem glukoze (Gibco BRL), 10% FBS-a (Gibco BRL) i 1x neesencijalne amino kiseline (Gibco BRL) na 37°C i 5% CO₂.

3.1.5. Antitela korišćena u ovom radu

U supershift eksperimentima korišćeno je kozje poliklonsko antitelo na FOXA2 (HNF3 β) (Santa Cruz Biotechnology, sc-6554-X). Epitop koji prepoznaje ovo antitelo nalazi se na C-terminusu FOXA2 proteina mišjeg porekla. Kao kontrolno antitelo u supershift eksperimentima korišćeno je kozje poliklonsko na NF-Y (Santa Cruz Biotechnology, sc-7712). U Western blot eksperimentima korišćena su sledeća antitela: SOX14 (Abcam, ab49047-100), Foxa2 (HNF3 β), (Santa Cruz, sc-6554-X), anti α -tubulin (Calbiochem, CP06) i anti-aktin (Santa Cruz, sc-7210) i odgovarajuća HRP-konjugovana anti-rabbit IgG (razblaženje 1:10000), anti-mouse IgG (Amersham Pharmacia Biotech) (razblaženje 1:20000) i anti-goat IgG (Sigma) (razblaženje 1:20000).

3.1.6. Oligonukleotidi korišćeni u ovom radu

Oligonukleotidi su u ovom radu korišćeni za generisanje proba u EMSA eksperimentima (wt i mutiranih), za potrebe uvođenja mutacija u vezivno mesto za FOXA2, za sekvenciranje potencijalnih mutiranih klonova kao i u RT-PCR eksperimentima. Spisak oligonukleotida i njihove sekvence dat je u tabeli x. podvučeni nukleotidi predstavljaju uvedene mutacije u FOXA2 vezivnom mestu. Malim slivima označeni su nukleotidi koji obezbeđuju obeležavanje probe ugrađivanjem [α -³²P] dCTP na komplementarnom lancu. Italic su označeni nukleotidi koji nakon mutageneze kreiraju *Xho*I restrikciono mesto.

Naziv	Sekvenca
SOX14 F36	5' TATTTGTTGACAGTGCCCGAGACAATG 3'
SOX14 R36	5' gggCATTGTCTCGGGCACTGTCAACAAATA 3'
14FOXA2 mutF	5' GGAAGAGTTTTATTTCTCGAGAGTGCCCGAGACAATG 3'
14FOXA2 mutR	5' ggCATTGTCTCGGGCACTCTCGAGAAATAAACTCTTCC 3'
SOX14 F11	5' ATGTCCAAACCTTCAGACCAC 3'
SOX14 R13	5' ACATGGCCGTAGCGTGGGCTG 3'
FOXA2 F	5' GCCCATTGTTTGTTTTAAGCC 3'
FOXA2 R	5' GGCTTAAAACAAACAATGGGC 3'
SOX14RTF1	5' CCACCCTGGGCTACCAGAA 3'
SOX14RTR1	5' GCCAGTCTTGGTCATGCCT 3'
FOXA2 RTF	5' AGGAGGAAAACGGGAAAGAA 3'
FOXA2 RTR	5' CTGCAACAACAGCAATGGAG 3'
GAPDH F	5' GGACCTGACCTGCCGTCTAG 3'
GAPDH R	5' CCACCACCCTGTTGCTGTAG 3'
SOX14 F28 seq	5' CATTTCGCGGCAAAGCTGTCC 3'
SOX14 R28 seq	5' CGGTTGTGAAAGAGAATTAGGGC 3'
SOX14 PE5	5' GATGTGGTCTGAAGGTTTGGACTGGTCCCGG 3'
SOX14 F11	5' ATGTCCAAACCTTCAGACCAC 3'
SOX14 R13	5' ACATGGCCGTAGCGTGGGCTG 3'

SOX14F12	5' ATGCACAACCTCGGAGATCAGC 3'
SOX14R3	5' ACATACCTGTCCTTCTTGAGC 3'

3.1.7. Radioaktivni izotopi

U eksperimentima elongacije prajmera i za obeležavanje DNK proba u EMSA eksperimentima korišćeni su sledeći radioaktivni izotopi: [α - 32 P] dCTP (3000Ci/mmol Amersham Pharmacia) i [γ - 32 P] dATP (5000Ci/mmol Amersham Pharmacia).

3.1.8. Komercijalni kitovi

Plazmidna DNK je izolovana i prečišćena upotrebom "Endofree plasmid maxi Kit" i "Endofree plasmid Giga Kit", proizvođača Qiagen. Merenje β -gal aktivnosti je rađeno pomoću " β -galactosidase Enzyme Assay System", proizvođača Promega. CAT aktivnost je određena "CAT ELISA" kitom, proizvođača Roche Pharmaceuticals. Sekvenciranje je rađeno pomoću "T7 Sequencing" kita, proizvođača USB. Totalna RNK za potrebe određivanja starta transkripcije izolovana je iz HepG2 ćelija uz pomoć RNeasy ® Mini kita (Qiagen). Za potrebe RT-PCRa RNK je izolovana iz 1 petri šolje konfluentnih HepG2 i U87MG ćelija u prisustvu TRI reagent® (Ambion) prema uputstvu proizvođača. RT-PCR za *SOX14* urađen je uz pomoć "KAPA 2G Fast HotStart Ready mix" 2x (Biosystems) PCR kita.

SiRNK tretman rađen je pomoću FOXA2 specifične (sc-35569, Santa Cruz Biotechnology) i kontrolne (sc-37007, Santa Cruz Biotechnology) siRNK u prisustvu transfekcionog agensa (sc-29528, Santa Cruz Biotechnology), prema uputstvima proizvođača.

3.2. Eksperimentalne metode

3.2.1. Određivanje starta transkripcije metodom elongacije oligonukleotida

"Primer extension"

Pozicija starta transkripcije humanog *SOX14* gena određena je metodom elongacije prajmera. Metoda se sastojala u komplementarnom sparivanju prajmera SOX14 PE5 sa ukupnom RNK izolovanom iz HepG2 ćelija uz pomoć RNeasy ® Mini kita (Qiagen), u prisustvu pufera A koji se sastojao od 10mM HEPES pH 7.0 i 50mM KCl i u prisustvu 2 μ l 5M betaina (Sigma). Prvo je 20 μ g ukupne RNK upareno u uparivaču i zatim rastvoreno u puferu A u koji je dodato 2 pmol oligonukleotida. Reakciona smeša je denaturisana na 90°C u trajanju od 2 min a zatim lagano hlađena do 50°C. Reakcija elongacije je urađena u prisustvu 20U Moloney murine leukemia virus reverzne transcriptaze (Amersham Pharmacia Biotech) na 37°C 20 min i u prisustvu 40U "RNA gurad™" RNaznog inhibitora (Amersham Pharmacia Biotech) u 18 μ l elongacionog pufera: 50mM Tris-HCl pH 8.3, 75mM KCl, 3mM MgCl₂, 12mM DTT, 0.05 mM ddATP, 0.05mM ddGTP, 0.05 ddTTP, 1 μ Ci [α -³²P] dCTP, u trajanju od 20 min na sobnoj temperaturi. Zatim je dodato još 2 μ l "Chase" mixa (0.16mM dNTPmix, 10.4mM DTT, 50mM Tris-HCl pH 8.3, 75mM KCl i 3mM MgCl₂) i inkubirano još 20 min na sobnoj temperaturi. Kao negativna kontrola ista reakcija je rađena sa 10 μ g tRNK kvasca. Po završenoj inkubaciji, reakciji je dodavano 3 volumena hladnog, apsolutnog etanola i precipitacija je vršena preko noći. Talog je resuspendovan u 5 μ l vode i 5 μ l boje (0.3% bromfenol plavo, 0.3% ksilencijanol, 10 mM EDTA i 97.5% formamid). Pre nanošenja na 6% poliakrilamidni denaturišući gel, reakcije su denaturisane 2 min na 95°C, a zatim naglo ohlađene na ledu. Dužine "primer extension" produkata su određene poređenjem sa reakcijama sekvenciranja pomoću T7 Sequencing kit-a (USB), koje su rađene sa istim oligonukleotidom sa kojim je rađena i "primer extension" reakcija. Takođe, u određivanju dužine produkata korišćen je radioaktivno obeleženi DNK marker dobijen digestijom *PhiX* enzimom *HinfIII*. Elektroforeza se odvijala pod sledećim uslovima: napon 1500 V, struja 40 mA, snaga 40 W (konstantna), oko 75 min. Po sušenju gela (30 min na 75°C), reakcije su vizualizovane pomoću rentgen filmova koji su eksponirani preko noći na -70°C u "intensifying screen" kasetama.

3.2.2. Sekvenciranje DNK T7 Sequencing Kit-om

Plazmidna DNK matrica, konstrukt P3 XbaI 2.2 (10 μg) je rastvorena u 9 μl ddH₂O, a zatim denaturisana sa 1 μl 5 M NaOH, u trajanju od 5 min. Denaturisana plazmidna matrica je naneta na pripremljenu Sephadex S-400 kolonu (Amersham Pharmacia), a zatim centrifugirana 2 min na 3200 rpm mikro-centrifugi. Eppendorf tuba sa DNK je odmah prebačena na led, a zatim renaturisana sa 2 μl SOX14 PE5 (10 pmol/ μl) prajmera u prisustvu 2 μl Annealing pufera (Tris-HCl, pH 7.5, 10 mM MgCl₂, 160mM DTT). Smeša je zagrejana na 65°C, pa zatim lagano hlađena do 37°C. U eppendorf tubu sa renaturisanom matricom je dodato 3 μl dCTP mešavine za obeležavanje (1.375 μM dATP, 1.375 μM dGTP, 1.375 μM dTTP, 333.3 mM NaCl), 0.25 μl [³²P α dCTP] i 2 μl prethodno razblažene T7 DNK polimeraze (T7 Sequenase, USB). Nakon inkubacije od 5 min na sobnoj temperaturi, sledi terminacija reakcije gde je u svaki od zagrejanih nukleotidnih smeša (A, C, G, T mix) dodato po 4.5 μl reakcije obeležavanja. Nakon 5 min inkubacije na 37°C, dodavano je po 5 μl STOP pufera (0.3% Bromphenol Blue, 0.3% Xylene Cyanol, 10 mM EDTA, pH 7.5, 97.5 formamid) u svaku pojedinačnu A, C, G, T reakciju.

Reakcije su čuvane na -20°C, a na denaturišući poliakrilamidni gel je nakon denaturacije nanošeno od 1 do 3 μl svake pojedinačne reakcije, uporedo sa reakcijom elongacije prajmera i radioaktivno obeleženim $\Phi\text{X 174/ Hinfl}$ DNK markerom dužina.

3.2.3. Metode subkloniranja fragmenata DNK u komercijalni vektor

3.2.3.1. Enzimska reakcija isecanja DNK restrikcionim enzimima

Smeše za digestiju su se sastojale od DNK (plazmid; ~ 1.5 μg) rastvorene u vodi, pufera određene jonske jačine i restrikcionog enzima. Optimalni uslovi za rad restrikcionog enzima podešavani su sastavom i koncentracijom pufera, koncentracijom enzima, temperaturom i dužinom inkubacije. Korišćeni su odgovarajući komercijalni puferi za svaki od enzima. Enzimi su dodavani u koncentraciji 2U/ μg DNK, reakcije su trajale od 3-5^h na 37°C.

3.2.3.2. Defosforilacija DNK

Ovom reakcijom se uklanjaju je 5'-fosfatne grupe sa DNK fragmenta. Metoda se primenjuje kod subkloniranja na linearizovanom vektoru da bi se pri ligiranju sprečila njegova recirkularizacija. Defosforilacija je vršena alkalnom fosfatazom izolovanom iz creva teleta (Calf intestinal alkaline phosphatase, CIAP). Plazmidna DNK je isecana izabranim restrikcionim enzimima, enzim je ekstrahovan fenol/hloroformom, a zatim je precipitiran sa 2 volumena 98% etanola, ohlađenog na -20°C uz prisustvo 0,3M Na-acetata. Posle sušenja DNK ($\sim 2\mu\text{g}$ precipitiranog vektora) je rastvarana u vodi, dodavan je pufer za defosforilaciju (finalno 1x koncentrovan) i 0,1U/pmol 5' krajeva alkalne fosfataze (koncentracije 0.05U/ μl) u finalnoj zapremini od 50 μl . Reakcija defosforilacije se odvijala 30 minuta na 37°C , a dejstvo alkalne fosfataze je zaustavljano izlaganjem smeše temperaturi od 85°C u trajanju od 15 minuta. Enzim je zatim inaktiviran izlaganjem reakcione smeše temperaturi od 85°C 15 min, a defosforilisani fragment je precipitiran etanolom. 2 μl defosforilisanog fragmenta je odvojeno za kontrolu samoligacije.

3.2.3.3. Ligiranje fragmenata DNK

Ligacija je enzimska reakcija povezivanja linearnih dvolančanih fragmenata DNK pomoću enzima ligaze. Reakciona smeša u zapremini od 15 μl sastojala se od linearizovanog plazmida (280 ng/0.1 pmol) i inserta (92ng/0.1 pmol) (u molarnom odnosu 1:3), pufera za ligaciju i 1U ligaze. Svi sastojci su dodavani na ledu i reakcija ligacije se odvijala preko noći na $+16^{\circ}\text{C}$.

3.2.4. Izolacija plazmidne DNK "Qiagen EndoFree® Plasmid" kitom

Qiagen kit za izolaciju plazmidne DNK se zasniva na modifikovanoj proceduri alkalne lize, nakon čega sledi vezivanje plazmidne DNK za patentirani Qiagen anjonski -jonoizmenjivački matriks, pod odgovarajućim uslovima niskih jonskih jačina i pH. RNK, proteini i ostale nečistoće se uklanjaju pranjem rastvorima srednje jonske jačine. Plazmidna DNK se eluira u pufer visoke jonske jačine, a zatim koncentriše i odsoljava izopropanolskom precipitacijom.

Kako su plazmidni izolati korišćeni i za potrebe tranzijentne transfekcije, bilo je neophodno da iz izolata budu uklonjeni bakterijski endotoksini. Endotoksini su lipo-polisaharidne komponente Gram-negativnih bakterija, kao što je *E.coli*. Prisustvo endotoksina znatno umanjuje efikasnost transfekcije eukariotskih ćelija. Korišćenjem patentiranog ER (endotoxin removal) pufera, sprečava se vezivanje endotoksina za DNK vezujući matriks.

Prilikom izolacije plazmidne DNK pomenutim kitom, strogo su poštovana uputstva proizvođača. U radu su korišćeni "EndoFree Maxi Kit" i "EndoFree Giga Kit". Finalni prinost je bio 800 µg za Maxi i 7.5 mg plazmidne DNK za Giga izolaciju. Plazmidni izolat je čuvan na -20°C do upotrebe u eksperimentima tranzijentne transfekcije.

3.2.5. Tranzijentna transfekcija HepG2 i U87MG ćelija kalcijum-fosfatnom precipitacijom

U eksperimentima tranzijentne transfekcije 3×10^6 HepG2 i 1.5×10^6 U87MG ćelija je zasejavano u Petri šolje prečnika 10 cm. Nakon 24h rasta ćelije su oprane dva puta HEPES rastvorom (6.7 mM KCl, 0.142 M NaCl, 10mM HEPES) i gajene još 2h u svežem medijumu.

Po isteku ovog vremena na ćelije je dodat kalcijum-fosfatni precipitat DNK koji je napravljen na sledeći način. Rastvoru DNK u 0.5 ml 2 x HEBS rastvora (HEPES buffered saline; 0.274 M NaCl, 42 mM HEPES, 9.6 mM KCl, 1.5 mM Na₂HPO₄; pH 7.15 - 7.23), koji je neprekidno aerisan, nakapavanjem je dodavan 0.5 ml 250 mM rastvora CaCl₂. Ovako formiran kalcijum-fosfatni precipitat dodavan je na ćelije i inkubiran 4h u standardnim uslovima za gajenje HepG2 i U87MG ćelija. Zatim je za HepG2 ćelije rađen glicerolski šok koji se sastojao u tome da se ćelije 2 min inkubiraju u 10% glicerolu napravljenom u 1x PBS-u. Nakon inkubacije precipitati su uklonjeni sa ćelija pranjem 2 puta rastvorom 1x HEPES-a.. Nakon isteka 2 min, ćelije su isprane još 2 puta 1x HEPES-om.

U87MG ćelije su nakon transfekcije isprane 1x HEPES-om bez glicerolskog šoka. Ćelije su u svežem medijumu gajene narednih 48h.

U eksperimentima tranzijentne transfekcije HepG2 i U87MG ćelijske linije su transfekovane sa 10 µg 1300CAT5, Δ960CAT5, 650CAT5, 832CAT5 ili 320CAT5 i 320CAT5mut *SOX14* promotorskih konstrukata i 6 µg pCH110 vektora (Amersham Pharmacia).

U eksperimentima kotransfekcije korišćeno je 10 µg konstrukta pHD-*Foxa2*, ekspresionog vektora koji u sebi sadrži cDNK sekvencu *Foxa2* gena miša (pHD-*Foxa2*- ljubazno ustupio Dr.

Klaus Kaestner, University of Pennsylvania School of Medicine, Philadelphia), kao i ekspresioni vektori koji sadrže GLI1-3 kodirajuće sekvence (pcDNA4NLSMTGLI1 i pcDNA4/TO/GLI3richtig ljubazno ustupili Dr Bert Vogelstein i Dr Kenneth W. Kinzler, Johns Hopkins University, Baltimore, Maryland, dok je p4TO6MTGLI2 ljubazno ustupio Dr Fritz Aberger, University of Salzburg, Austria). Vektor pBluescript (Stratagene) korišćen je za ujednačavanje ukupne količine DNK u kotransfekcijama.

3.2.6. Priprema ćelijskih ekstrakata

Ćelijski ekstrakti su pripremani 48 h nakon transfekcije. Ćelije su oprane PBS-om, struganjem odvojene od podloge u 1 ml TEN rastvora (Tris-EDTA-NaCl; 0.04 M Tris-HCl pH 7.4, 1 mM EDTA, 0.15 M NaCl) i staložene centrifugiranjem na 13200 rpm, 2 min. Talog ćelija je resuspendovan u 100 μ l 0.25 M Tris-HCl (pH 7.8 na 37°C). Liza ćelija je urađena kroz tri ciklusa zamrzavanja i odmrzavanja (3 min u tečnom azotu praćen inkubacijom na 37°C do otapanja ćelijskih taloga). Ćelijski talog je uklonjen centrifugiranjem na 13200 rpm, 10 min na +4°C, a supernatant (ćelijski ekstrakt) je korišćen u β -galaktozidaznom i CAT eseju.

3.2.7. β -galaktozidazni esej

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

β -galaktozidazni esej je uobičajen metod za određivanje aktivnosti enzima β -galaktozidaze u lizatima ćelija koje su transfekovane β -galaktosidaza reporterskim vektorom-pCH110. Standardni esej se izvodi tako što se uzorku razblaženom u Tris-HCl pH 7.8 doda jednaka količina 2X Assay Buffer-a koji sadrži 200 mM PBS, 2 mM $MgCl_2$, 100 mM β -merkaptioetanol i 1.33 mg/ml supstrata ONPG (*o*-nitrofenil- β -D-galaktopiranozid). Uzorci se inkubiraju na 37°C najmanje 30 minuta. Tokom ovog vremena β -galaktosidaza hidrolizuje bezbojan supstrat u *o*-nitrofenil koji ima žutu boju. Absorbanca je merena na Microplate reader Multiskan RC (Labsystems) aparatu na talasnoj dužini 420 nm.

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

3.2.8. CAT esej

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

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

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

Absorbanca je merena na Microplate reader Multiskan RC (Labsystems) aparatu na talasnoj dužini 405/492 nm.

Kao standardi za određivanje aktivnosti CAT-a u ispitivanim ćelijskim lizatima (za konstrukciju standardne kalibracione krive) korišćena su sledeća razblaženja CAT enzima *E. coli*: 3,125 pg, 6,25 pg, 12,5 pg, 25 pg, 50 pg, 100 pg, 200 pg.

Vrednosti dobijenih aktivnosti CAT enzima normalizovane su u odnosu na aktivnost promotorskog konstrukta 1300CAT5 (100%) i predstavljene kao srednja vrednost \pm S.E.M.(standard error mean) iz najmanje tri nezavisna eksperimenta. Srednje vrednosti relativnih aktivnosti CAT enzima poređene su Student *t*-testom, a statistička analiza je urađena programom SPSS. Samo u slučajevima kada je *p* vrednost bila manja od 0,05 rezultat je smatran statistički značajnim.

3.2.9. Izolacija jedarnih proteina

Jedarni proteini iz HepG2 i U87MG ćelija su izolovani po modifikovanoj proceduri (Dignam, et al., 1983). HepG2 i U87MG ćelije (10^9) su posle taloženja i pranja u PBS-u resuspendovane u puferu A (0.25 M saharoza, 10 mM HEPES pH 7.9, 10 mM KCl, 1.5 mM $MgCl_2$, 0.2 mM EDTA) i inkubirane 10 minuta na ledu. Nakon taloženja centrifugiranjem (1300 rpm, 5 min) ćelije su resuspendovane u 2 volumena pufera A. Ćelije su lizirane homogenizacijom u staklenom homogenizeru uz dodavanje NP-40 (0.05%). Jedra su staložena centrifugiranjem (2000 rpm, 10 minuta, $+4^\circ C$) i zatim resuspendovana i homogenizovana u puferu C (20 mM HEPES pH 7.9, 25% glicerol, 0.42 M NaCl, 1.5 mM $MgCl_2$, 0.2 mM EDTA). Nakon mešanja 30 min na $+4^\circ C$ suspenzija je centrifugirana (20000 rpm, 30 min, $+4^\circ C$). Supernatant je dijaliziran u puferu D (20 mM HEPES pH 7.9, 20% glicerol, 0.1 M KCl, 0.2 mM EDTA) 4-5 h na $+4^\circ C$. Nakon dijalize rastvor je centrifugiran (20000 rpm, 20 min, $+4^\circ C$). Dobijeni supernatant koji sadrži jedarne proteine je alikvotiran i čuvan u tečnom azotu. Puferi A i C sadrže inhibitore proteaza u sledećim koncentracijama: 0.5 mM DTT, 0.5 mM PMSF, $1\mu g/ml$ leupeptina, $1\mu g/ml$ pepstatina i $1\mu g/ml$ antipaina, a pufer D 0.5 mM DTT, 0.5 mM PMSF.

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

U EMSA reakcijama korišćene su *wt* (*wt*-wild type) i mutirana oligonukleotidne proba koja obuhvata region -516/-481 *SOX14* promotora (sekvence oligonukleotida date su u sekciji 3.1.6). Uvođenjem mutacije u vezivno mesto za FOXA2 kreirano je *XhoI* restrikciono mesto kako bi se izvršila brza selekcija mutiranih klonova. Na priloženim sekvencama mutirani nukleotidi su podvučeni, kreirano *XhoI* mesto prikazano "italic", a malim slovima su označena nespareni guanozini na 5' kraju R prajmera. Dvolančane probe su generisane reakcijama hibridizacije komplementarnih F i R prajmera (50 μg svakog prajmera) u 1 x STE puferu (0.1 M NaCl, 10 mM

Tris-Cl pH 8.0, 1 mM EDTA pH 8.0) nakon 10 min denaturacije na 98°C i postepenog hlađena do sobne temperature. Dvolančane oligonukleotidne probe su staložene etanolnom precipitacijom i rastvorene u 50µl ddH₂O.

R prajmeri su dizajnirani tako da sadrže 2 ili 3 nesparena guanozina na 5' kraju koji obezbeđuju obeležavanje probe ugrađivanjem [α -³²P] dCTP na komplementarnom lancu u reakciji sa Klenow-im fragmentom. Reakcija obeležavanja je sadržala: 300ng oligonukleotida, 0.5 µl 40 mM dNTPmix, 2 µl *Eco*Pol pufera (10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 5 mM MgCl₂, 7.5 mM DTT), 1 µl Klenow fragmenta DNK polimeraze (New England Biolabs) (5U), 2 µl [α -³²P] dCTP (3000Ci/mmol Amersham Pharmacia) i ddH₂O do 20 µl. Nakon inkubacije od 60 min na 37°C i dodavanja 50 µl ddH₂O, reakcija je propuštena kroz G-50 kolonu (Amersham Pharmacia Biotech). Proba sa konsenzusom vezivnim mestom obeležena je radioaktivno T4 polinukleotid kinazom. Reakcija obeležavanja je sadržala 300ng oligonukleotidne probe, 5 µl PNK pufera (New England Biolabs), 2 µl [γ -³²P] dATP (5000Ci/mmol Amersham Pharmacia), 1µl T4 Poly nucleotide Kinase enzima (5U, New England Biolabs) i ddH₂O do 50 µl. Nakon 30 min inkubacije na 37C u vodenom kupatilu reakcija je zaustavljena i propuštena kroz G-50 kolonu (Amersham Pharmacia Biotech). Kvalitet obeležavanja oligonukleotidnih proba proveren je merenjem u scintilacionom brojaču (LKB).

EMSA reakcije su rađene sa 12 µg jedarnih proteina iz HepG2 i 33 µg iz U87MG ćelija 2.5ng obeležene probe, u reakcionom puferu koji sadrži 5mM Tris-HCl pH 7.9, 10mM KCl, 1.25mM MgCl₂, 2% glycerol, 0.1mM EDTA pH 8.0, 0.1mM DTT, i 1µg of poly(dIdC) u volumenu od 20µl 30 minuta na 37°C. Za kompeticiju (hlađenje) korišćene su neobeležene oligonukleotidne probe (proba 36, 14FOXA2mut i FOXA2) u molarnom višku od 100 puta. U esejima smanjene elektroforetske pokretljivosti u prisustvu antitela ("superšift") jedarni proteini su inkubirani sa sledećim antitelima na sobnoj temperaturi, 20 minuta pre dodavanja obeležene probe: 6 µg FOXA2 (HNF3β) (Santa Cruz Biotechnology, sc-6554-X) i 6 µg NF-Y (Santa Cruz Biotechnology, sc-7712) koje je korišćeno kao negativna kontrola.

Kako bi smo ispitali efekat vezivanja FOXA2 za probu 36 u prisustvu njegove povećane ekspresije, izolovani su ukupni ćelijski proteini nakon kotransfekcije, kao što je opisano u sekciji 3.2.10. U reakcijama vezivanja za probu 36 sa ukupnim ćelijskim lizatima (WCL-whole cell lysates), korišćeno je 50 µg uzorka. Reakcije su izvedene pod istim uslovima kao i sa jedarnim proteinima.

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

3.2.11. Generisanje mutiranog promotorskog konstrukt *SOX14* gena

Za generisanje promotorskog konstruktata *SOX14* gena koji nosi mutaciju u konsenzus vezivnom mestu za i FOXA2 (320CAT5mut) korišćen je QuickChange Multi Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene). Ovom metodom PCR reakcijom je uvedena mutacija u *SOX14 wt* promotorski konstrukt (320CAT5) korišćenjem prajmera 14FOXA2 mutF koji nosi mutaciju FOXA2 vezivnog mesta.

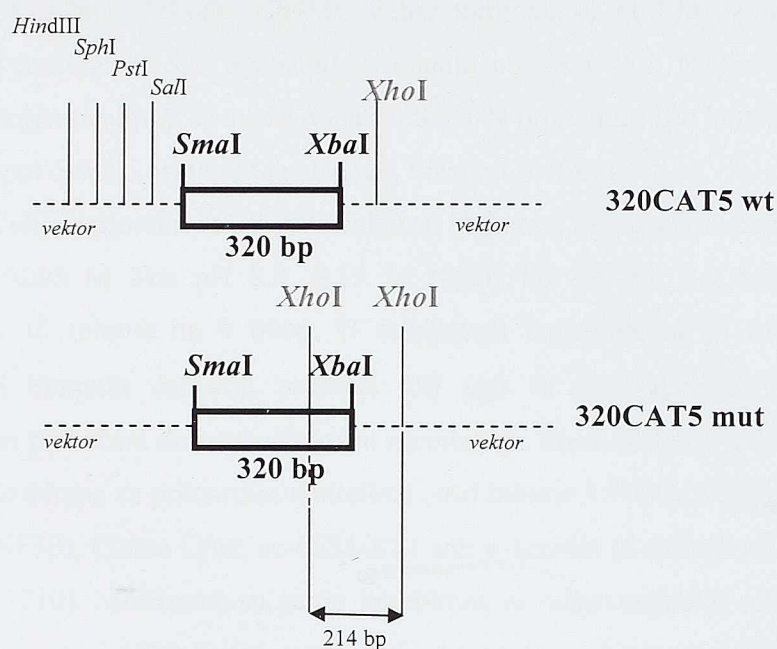
Navedeni prajmer je fosforilisan u reakciji u kojoj je 1 nmol prajmera dodat u reakciju sa 2, 5 µl 10 mM ATP, 2 µl T4 Polynucleotide Kinase (20U) (New England Biolabs), 2,5 µl 10x PNK pufera (70 mM tris-HCl, pH 7.6, 10 mM MgCl₂, 5mM DTT). Nakon inkubacije reakcione smeše 45 min na 37°C, enzim je inaktiviran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

Reakciona smeša za PCR je sastavljena od 100 ng plazmidne matrice (320CAT5), 5 µl reakcionog pufera 10x Muta Buffer (200 mM Tris-HCl, pH 8.8, 100 mM amonijum-sulfat, 100 mM KCl, 1% Triton X-100, 1 mg/ml BSA, 20 mM MgSO₄; Stratagene), 100 ng 5'OH fosforilisanog prajmera, 1 µl 25mM dNTP mix-a, 0,5 µl (1,25 U) *PfuI* Polymerase (Fermentas) i 0,5 µl VentPolymerase (1 U) (New England Biolabs), kao i ddH₂O do 50µl.

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

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

Nakon PCR reakcije, u reakcionu smešu je dodat restrikcioni enzim *DpnI* koji specifično prepoznaje metilovani adenzin motiva GATC tj. isključivo adenzin iz plazmidne matrice, a ne PCR produkta. Inkubacija enzimske reakcije je trajala 2 h na 37°C, nakon čega je rađena etanolna precipitacija. 10 µl mutirane DNK je iskorišćeno za transformaciju bakterijskog soja *E.Coli* XL1Blue. Nakon selekcije i propagacije bakterijskih kolonija izolovana je plazmidna DNK koja je testirana *XhoI* restrikcijom. Očekivane dužine fragmenata koji se dobijaju sečenjem mutiranih klonova enzimom *XhoI* su 214bp i 4503bp. Kao finalna potvrda da tokom mutageneze nije došlo do neželjenih mutacija, plazmidni izolati potencijalnih mutanata su sekvencirani u komercijalnom servisu Univerziteta u Padovi uz pomoć prajmera SOX14 F28 seq i SOX14 R28 seq. Sekvenciranje je rađeno "Big Dye Terminator v 3.1" tehnologijom u kapilarnom sekvenceru ABI 3730XL (Applied Bioscience). Analiza sekvence je rađena pomoću softvera ChromasPro.



wt TATTTGTTGACAGT

mut TATT**CTCGAG**AGT

XhoI

Slika 14. Šematski prikaz klona 320 CAT5 i pozicija *XhoI* restrikcionog mesta uvedenog mutagenom. Sekvenca wt i mut data je ispod slike. Uvedeno *XhoI* restrikciono mesto osenčeno je sivom bojom.

3.2.12. Izolacija ukupnih ćelijskih proteina i „Western blot“ analiza

Nakon transfekcije ekspresionih vektora za Foxa2 i GLI1-3 transkripcione faktore kalcijum fosfatnom precipitacijom u U87MG ćelije, kao i nakon tretmana sa Shh, ekspresija SOX14 proteina praćena je Western blot analizom.

U svrhu praćenja ekspresije *SOX14* tokom povećane ekspresije Foxa2 proteina izolovani su ukupni ćelijski proteini iz 1×10^7 U87MG ćelija transfekovanih sa 10 μ g ekspresionog vektora pHD-Foxa2. Efekat ekspresije GLI1-3 proteina na ekspresiju SOX14 proteina praćen je na isti način, nakon transfekcije 10 μ g ekspresionih plazmida: pcDNA4NLSMTGLI1, p4TO6MTGLI2, pcDNA4/TO/GLI3richtig. Takođe, U87MG ćelije tretirane su sa 100 ng/ml medijuma SHH-N rekombinantnog proteina (R&D Systems) u trajanju od 24 i 48h. Nakon prva 24h inkubacije ćelijama je zamenjen medijum sa sveže dodatim SHH-N proteinom iste koncentracije. Nakon toga izolovani su ukupni ćelijski proteini i analizirani Western blot-om.

Ukupni ćelijski proteini iz U87MG ćelija su izolovani inkubacijom ćelija 20 minuta na ledu u TNE puferu (0.05 M Tris pH 8.0, 0.15 M NaCl, 1% NP-40, i 2 mM EDTA pH 8.0) i centrifugiranjem 10 minuta na 9 000g. U dobijenom supernatantu se nalaze ukupni ćelijski proteini. Uzorci ukupnih ćelijskih proteina (50 μ g) su razdvajani na 12% SDS-PAGE i elektrotransferom prebaćeni na nitroceluloznu membranu. Posle blokade u 5% nemasnom mleku, membrane su inkubirane sa primarnim antitelima (razblaženje 1:1000), SOX14 (Abcam, ab49047-100), Foxa2 (HNF3 β), (Santa Cruz, sc-6554-X) i anti α -tubulin (Calbiochem, CP06) ili anti-aktin (Santa Cruz, sc-7210). Membrane su zatim inkubirane sa odgovarajućim sekundarnim antitelima 1h na sobnoj temperaturi, HRP-konjugovana anti-rabbit IgG (razblaženje 1:10000), anti-mouse IgG (Amersham Pharmacia Biotech) (razblaženje 1:20000) i anti-goat IgG (Sigma) (razblaženje 1:20000), a imunoblotovi su vizuelizovani ECL sistemom (Amersham Pharmacia Biotech) i SuperSignal West Femto Trial Kit (Pierce). Kvantifikacija rezultata dobijenih Western blot analizom vršena je u programu Image J. 1.41₀ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) a statistička obrada uz pomoć Student *t* testa.

3.2.13. Izolacija RNK

Za potrebe RT-PCRa RNK je izolovana iz 1 petri šolje konfluentnih HepG2 i U87MG ćelija u prisustvu TRI reagent® (Ambion) prema uputstvu proizvođača. TRI Reagent je rastvor fenola i guanin-izotiocijanata koji efikasno izoluje ukupnu RNK iz ćelija. Nakon dodavanja 1ml reagensa u petri šolju, lizati su pokupljeni i prebačeni u ependorficu. Zatim je na svaki ml korišćenog reagensa dodato 200 μ l hloroforma i centrifugirano 15min na +4°C/12000g. Dodavanjem hloroforma i centrifugiranjem izdvaja se vodena faza od organske faze u kojoj se nalazi RNK. Nakon odvajanja vodene faze RNK se precipitira izopropanolom (500 μ l izopropanola na 1ml korišćenog reagensa, zatim centrifugira 10 min na +4°C/12000g. Dobijeni talog RNK je u završnoj fazi opran 75% etanolom, kratko osušen na sobnoj temperaturi, rastvoren u 75 μ l DEPC tretirane bidestilovane vode i inkubiran 10 minuta na 55 °C kako bi se RNK dobro rastvorila. Kvalitet ovako dobijene RNK je proveren na agaroznom gelu, a spektrofotometrijski je određena koncentracija. Ovako dobijen uzorak je zatim čuvan na -70°C do korišćenja.

3.2.14. Oslobađanje RNK izolata od prisustva DNK

Kako bi se izolovana RNK oslobodila tragova DNK za potrebe RT-PCRa, izolat je tretiran enzimom DNazal (RNase-free, Roche). Ovaj enzim je glikoprotein sa endonukleaznom aktivnošću koji hidrolizuje fosfodiesterne veze dvolančane i jednolančane DNK. 50 μ g RNK je tretirano sa 10U DNazeI u prisustvu 1x inkubacionog pufera: 40mM Tris-HCl, pH 7.9, 10mM NaCl, 6mM MgCl₂, 1mM CaCl₂, i 10U RNaznog inhibitora, 20 min na 37°C. Pošto je inaktivacija DnazeI toplotom nedovoljna za potrebe RT-PCRa, tretirana RNK je propuštena kroz kolonu (Qiagen Rneasy mini kit) po protokolu za prečišćavanje (Clean-up). Pored ovog načina za eliminaciju DNK iz uzorka RNA, korišćen je i DNA-free™ kit koji je dizajniran tako da u dva koraka uklanja DNK u RNK izolatu DNazom, a potom vrši uklanjanje DNaze i divalentnih katjona iz uzorka, koji je potom spreman za cDNK sintezu.

3.2.15. Reverzna transkripcija

Reverzna transkripcija na dobijenoj RNK urađena je u prisustvu MuLV reverzne transkriptaze (Applied Biosystems) koja koristi jednolančanu RNK matricu za sintezu cDNK. U prisustvu 2.5 μ M prajmera (Random hexamers, Applied Biosystems), 2.5U MuLV reverzne transkriptaze, 10U RNaznog inhibitora, 4mM dNTPmixa (svaki 1mM), 1x pufera i 5mM MgCl₂, 1 μ g ukupne RNK je preveden u cDNK, inkubacijom 10min na sobnoj temperaturi a zatim u PCR aparatu, 15 min na 42°C, 5 min na 99°C i 5min na 5°C. Ovako sintetisanoj cDNK određena je koncentracija na nano-drop aparatu (Pharmacia) a zatim je čuvana na -20°C do korišćenja.

3.2.16. RT-PCR

Dobijena cDNK korišćena je kao matrica u semi-kvantitativnoj PCR reakciji. PCR Reakciona smeša za umnožavanje FOXA2 sekvence, uporedo sa kontrolnom GAPDH, zapremine 20 μ l, sadržavala je: 2,0 μ l 10x reakcioni pufer, 2.5mM MgCl₂ (Fermentas), 0,6 μ l 40mM dNTP (10mM dATP, 10mM dTTP, 10mM dCTP i 10mM dGTP, Pharmacia), 300ng cDNK, 0,25 μ l *Taq* polimeraza (5U/ μ l, Fermentas), po 100 pM prajmera FOXA2RTF i FOXA2RTR. Profil PCR reakcije bio je:

1. Početna denaturacija 96°C 5 min
2. 35 ciklusa umnožavanja:
 - a) denaturacija 96°C 40sec
 - b) sparivanje prajmera 55°C 40sec
 - c) polimerizacija 72°C 40sec
3. završna sinteza 72°C 7min

Za umnožavanje dela *SOX14* sekvence korišćen je "KAPA 2G Fast HotStart Ready mix" 2x (Biosystems), SOX14RTF1 i SOX14RTR1 prajmeri kao i 300ng cDNK. Uporedo sa umnožavanjem *SOX14* sekvence, kao kontrola unete cDNK u reakciju, rađena je i PCR reakcija za GAPDH sa odgovarajućim oligonukleotidima datim u tabeli 4. Profil PCR reakcije bio je:

1. Početna denaturacija 98°C 5 min, 95°C 1 min
2. 40 ciklusa umnožavanja:

1. denaturacija 96⁰C 30sec
2. sparivanje prajmera 57⁰C 30sec
3. polimerizacija 72⁰C 30sec
3. završna sinteza 72⁰C 7min

Produkti PCR reakcija razdvajani su na 2% agaroznom gelu. Očekivane dužine fragmenata date su u tabeli 4.

Gen	Dužina produkta (bp)
SOX14	182
FOXA2	137
GAPDH	248

Tabela 4. Očekivane dužine RT-PCR produkata

3.2.17. PCR u realnom vremenu (Real time PCR)

Uzorci cDNK dobijeni su na način opisan u odeljku 3.2.13. nakon čega su napravljena razblaženja 1:4. Isti alikvoti cDNK uzoraka su korišćeni za PCR u realnom vremenu sa oligonukleotidima specifičnim za *SOX14* (F12R3), *FOXA2*(FOXA2F, FOXA2R) i *GAPDH* (GAPDHF, GAPDHR) koji je korišćen kao referentni gen (sekvence oligonukleotida date su u sekciji 3.1.6.). Reakcije su izvođene u zapremini od 20 μ l i sadržavale su 500nM F i R oligonukleotida (sekvence navedene u delu) i 1x SYBER Green PCR master mix (Applied Biosystems). PCR u realnom vremenu je izvođen na aparatu ABI Prism 7500 Sequence Detection System (Applied Biosystems) i to po parametrima preporučenim od strane proizvođača (50C 2 min, 95C 10 min i 40 ciklusa u trajanju od 15 sec na 95C i 1 min na 60C). Svaka PCR reakcija je rađena u triplikatu, a u eksperiment su bile uključene i reakcije koje nisu sadržavale matricu. Rezultati su analizirani pomoću 7500 System Software (Applied Biosystems) progama i predstavljeni su kao 2^{-dCt}, gde je dCt razlika između Ct vrednosti *SOX14/FOXA2* i referentnog gena.

3.2.18. Utišavanje FOXA2 transkripcionog faktora primenom RNK kratkih interferirajućih RNK (siRNK)

Dan pre transfekcije sa siRNK 2×10^5 HepG2 ćelija je zasađeno u petri šolje prečnika 35mm. Nakon 24h tj. u trenutku kada su ćelije dostigle konfluentnost od 60-80%, pripremljene su dve komponente na sledeći način: komponenta A: $6 \mu\text{l}$ $10 \mu\text{M}$ siRNK (kontrolna ili FOXA2 specifična siRNK) + $100 \mu\text{l}$ medijuma za transfekciju (sc-36868), komponenta B: $6 \mu\text{l}$ agensa za transfekciju (sc-29528) + $100 \mu\text{l}$ medijuma za transfekciju. Nakon pripreme, komponenta A je direktno dodata u komponentu B i inkubirana 30min na RT. Za to vreme ćelije su oprane 2 puta sa Opti-MEM[®] (Invitrogen). Nakon isteka 30min inkubacije, u komponente za transfekciju je dodato $800 \mu\text{l}$ medijuma za transfekciju a zatim nakapano na ćelije. Ćelije sa siRNK su zatim inkubirane 6h na 37C u CO₂ inkubatoru. Po isteku vremena u ćelije je dodat DMEM sa 20% FCS-a i 2x antibiotik/antimikotik, a zatim je inkubacija nastavljena još narednih 24h. Sutradan je ćelijama zamenjen medijum i od tog trenutka je mereno vreme 24h tretmana, nakon čega je izolovana ukupna RNK.

3.2.19. Analiza sekvenci SOX14 ortologa

Analiza ortologa *SOX14* promotora rađena je u cilju identifikacije evolutivno očuvanih regulatornih sekvenci. Pretraživanje baza podataka dostupnih sekvenci i njihovo međusobno poređenje urađeno je korišćenjem programa NCBI (National Center for Biotechnology Informations) i ClustalW. Sekvenca promotora humanog *SOX14* gena, prijavljena pod brojem AF107043 poređena je sa sekvencama ortologih promotora šimpanze (*Pan troglodytes* NW_001232838.1); rebus majmuna (*Macaca mulatta* NW_001112571.1); goveda (*Bos Taurus* NW_001493772.1), psa (*Canis familiaris* NW_876276.1), pacova (*Rattus norvegicus* NW_047801.1) i miša (*Mus musculus* NT_039476.6).

MatInspector program (Quandt, et al., 1995) je korišćen za identifikaciju potencijalnih mesta za vezivanje poznatih transkripcionih faktora u okviru promotora *SOX14* ortologa. Prilikom ove analize korišćeni su sledeći kriterijumi: verovatnoća vezivanja za konsenzusnu sekvencu vezivnog mesta (core similarity) 1,0 i odgovarajuća nukleotidna sekvenca koja okružuje vezivno mesto (matrix similarity) 0,90.

Pretraživanjem NCBI (National Center for Biotechnology Information) baze podataka prikupljene su sekvence SOX14 ortologa. Poređenje sekvenci SOX14 proteina i identifikacija amino-kiselinskih zamena vršeni su u programu ClustalWsoftware (EMBL-EBI) i GeneDoc softveru verzija 2.6.003 (Nicholas Karl and Nicholas H. B. Jr 1997 Gene Doc: a tool for editing and annotating multiple sequence alignments.) Tom prilikom korišćene su nukleotidne sekvence i iz njih izvedene proteinske sekvence čiji su brojevi pristupa u bazi podataka prikazani u tabeli 5.

Vrsta	SOX14 Broj pristupa u bazi podataka
<i>Homo sapiens</i> (čovjek)	AJ006230
<i>Pan troglodytes</i> (šimpanza)	XM_526317
<i>Macaca mulatta</i> (rezus majmun)	XM_001114754
<i>Canis familiaris</i> (pas)	XM_542802
<i>Equus caballus</i> (konj)	NW_001799668
<i>Bos taurus</i> (goveče)	EU853676 #
<i>Capra hircus</i> (koza)	EU853675#
<i>Mus musculus</i> (miš)	AF193435
<i>Rattus norvegicus</i> (pacov)	EU853677 #
<i>Monodelphis domesticus</i> (oposum)	XM_001365234
<i>Ornithorhynchus anatinus</i> (kljunar)	AY112710
<i>Gallus gallus</i> (pile)	AF193760
<i>Xenopus tropicalis</i> (afrička žaba)	BC135637
<i>Danio rerio</i> (zebrica)	NM_001037680
<i>Oreochromis aureus</i> (tilapia)	EF431925
<i>Takifugu rubripes</i> , <i>Sox14a</i> (fugu riba)	AY277955

Tabela 5. Pristupni brojevi u bazi podataka za sekvence SOX14 proteina koje su korišćene u ovom radu. # označava sekvencu SOX14 proteina koze, govečeta i pacova koje su identifikovane u ovom radu.

Uporedna analiza SOX14 i SOX21 proteina rađena je takođe u programu ClustalWsoftware (EMBL-EBI) i GeneDoc softveru verzija 2.6.003 (Nicholas Karl and Nicholas H. B. Jr 1997 Gene Doc: a tool for editing and annotating multiple sequence alignments). Tom prilikom korišćene su SOX14 proteinske sekvence prikazane u tabeli 6 kao i sekvence SOX21 proteina prikazane u tabeli 6.

Vrsta	SOX21 Pristupni brojevi u bazi podataka
<i>Homo sapiens</i>	AAC95381
<i>Mus musculus</i>	AAN60055
<i>Gallus gallus</i>	BAA77266
<i>Monodelphis domestica</i>	XP 001366503
<i>Danio rerio</i>	NP 571361
<i>Takifugu rubripes</i>	AAQ18500

Tabela 6. Pristupni brojevi u bazi podataka za sekvence SOX21 proteina koje su korišćene u ovom radu.

3.2.20. Izolacija genomske DNK iz krvi

DNK koze izolovana je iz 5ml krvi koja je inkubirana sa Puferom za lizu 45 min. Pufer za lizu sastojao se od 0.32 M sucrose, 10 mM Tris HCl, pH 7.5, 5 mM MgCl₂ i 1x Triton X-100. Nakon inkubacije od 15 min na ledu i 15 min centrifugiranja 3000 rpm na +4°C, talog je dva puta ispran sa 10ml Fizio pufera (0.075 M NaCl i 0.025 M EDTA). Talog je zatim rastvoren u 1xTE puferu sa 20% SDSa i 10 µg/ml proteinaze K i inkubiran 65°C 1 h. Nakon toga urađena je fenol-hloroform ekstrakcija i precipitacija DNK etanolom. Talog DNK rastvoren je u 1xTE puferu.

3.2.21. Izolacija genomske DNK iz krvi CTAB metodom

DNK govečeta izolovana je iz krvi po protokolu za CTAB izolaciju. 150 μ l krvi lizirano je u prisustvu 300 μ l 8% CTABa (cetil-trimetil-amonijum-bromid). (8% rastvor CTAB-a 1.5M NaCl, 100mM Tris, 50mM EDTA pH 8.0.) koji je zagrejan na 68°C, nakon čega je lizat inkubiran 5 min na 68°C. Zatim je dodato 450 μ l hloroforma i centrifugirano 5 min na 13000 rpm. Nakon centrifugiranja, gornja faza je prebačena u novu ependorf tubu. Precipitacija DNK obavljena je u prisustvu 1/50V 5% CTAB Cetyltrimethylammonium bromide), 1.5M NaCl, 100mM TRIS, 50mM EDTA) i 1V ddH₂O, nakon čega je istaložena centrifugiranjem 5min na 13000rpm. Talog je zatim rastvoren u u 150 μ l 1,2M NaCl i ponovo precipitiran sa 375 μ l apsolutnog etanola i centrifugiran 10min na 13000rpm Talog je na kraju ispran sa 500 μ l 70% etanola i centrifugiran 5min na 13000rpm. Na kraju talog je osušen u vakuum uparivaču i rastvoren u ddH₂O. Kvalitet ovako izolovane DNK proveren je na 1% agaroznom gelu.

3.2.22. Izolacija genomske DNK iz jetre pacova

DNK pacova izolovana iz 50 mg zamrznutog tkiva jetre. Tkivo jetre pacova je isitnjeno u avanu u prisustvu tečnog azota. Tako usitnjeno tkivo je prebačeno u tubu sa 1ml rashlađenog TEN pufera (50mM Tris HCl, pH 9, 100mM EDTA pH 8, 200mM NaCl). Zatim je dodat 20% SDS-a u finalnoj koncentraciji 1% i proteinaza K finalne koncentracije 10mg/ml. Nakon inkubacije od 12h na 45°C u lizat je dodata RNKaza A (10mg/ml). Ovako izolovana DNK je prečišćena etanolnom precipitacijom a njen kvalitet i prinos provereni su na agaroznom gelu.

3.2.23. Reakcija lančanog umnožavanja DNK (PCR)

Reakcija lančanog umnožavanja DNK u svrhu identifikacije *Sox14* gena kože, pacova i govečeta rađena je na sledeći način: po 2.8 pmol SOX14F11 i SOX14R13 oligonukleotida (sekvence oligonukleotida prikazane su u sekciji 3.1.6.), 400 μ M dNTP mix, 1.5 mM MgCl₂ i 2.5 U Vent Taq polimeraze (New England Biolabs, Hitchin, UK), 100ng genomske DNK u 25 μ l reakcione smešice. Profil PCR reakcije bio je:

1. Početna denaturacija 98°C 5 min,

2. 35 ciklusa umnožavanja:

1. denaturacija 98°C 1 min

2. sparivanje prajmera i polimerizacija 71°C 3min

3. završna sinteza 72°C 7min

Dobijeni PCR produkti dužine 721bp su prečišćeni i sekvencirani prajmerima SOX14F11 i SOX14R13 u servisu za sekvenciranje (www.macrogen.com), a dobijene nukleotidne sekvence su sačuvane u bazi podataka (Gene Bank) pod brojevima označenim u tabeli 6.

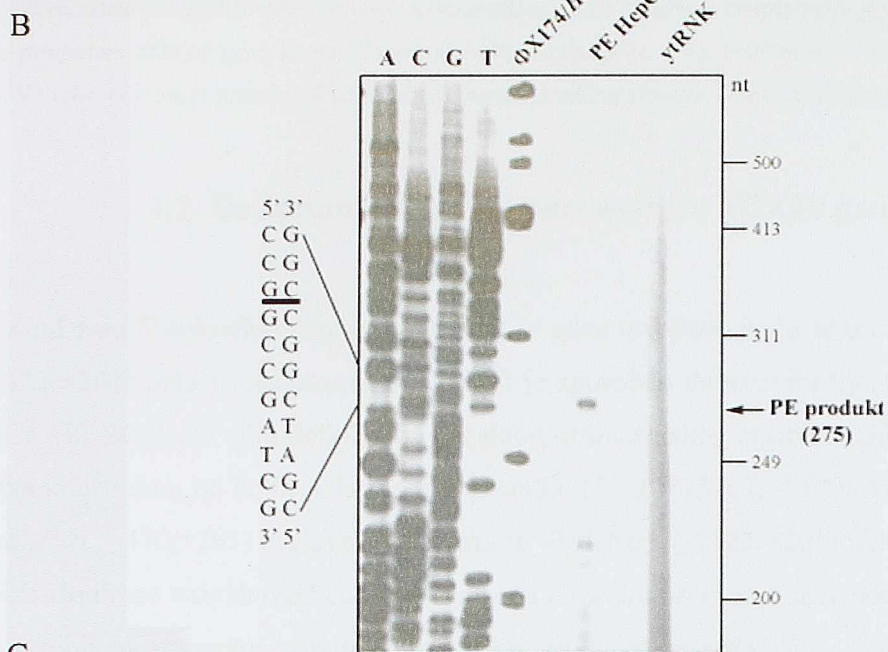
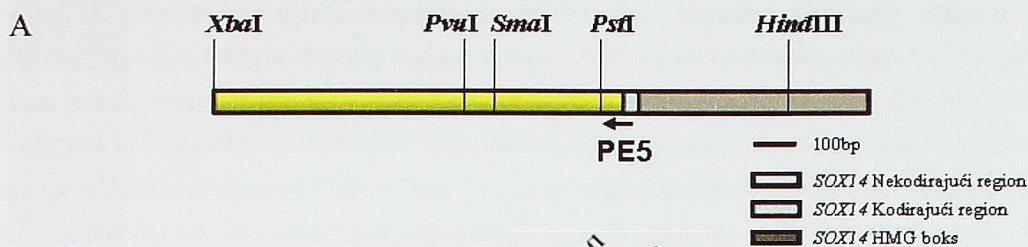
3.2.24. Određivanje hromozomskih pozicija SOXB grupe gena

Hromozomske pozicije SOXB grupe gena koje nisu identifikovane u bazama podataka određene su na osnovu pozicije susednih gena tj. sintenih regiona. Ove pozicije su određene korišćenjem „Genomic Database Map Viewer”-a (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes>) i Sanger baze podataka „Sanger Institute Ensembl database” (<http://www.ensembl.org>). Tom prilikom je određena pozicija 16 gena čija pozicija je bliska poziciji SOXB gena u humanom genomu: *BCL6*, B-cell CLL/lymphoma 6 (zinc finger protein 51); *B3GALNT1*, beta-1,3-N-acetilgalaktosaminiltransferaza 1; *TNK2*, (tirozin kinaza, non-receptor 2); *RASA2*, (RAS p21 protein aktivator 2); *CLDN18*, (klaudin 18), *RAB6B* (član RAS onkogene familije); *CEP70*, (centrozomalni protein 70 kDa); *TFDP2*, (transkripcioni faktor Dp-2 (E2F dimerizacioni partner 2)); *COL4A1*, (kolagen, tip IV, alpha 1; *ATP11A* (ATPaza, klase VI, tip 11A); *F7*, (koagulacioni faktor VII); *LAMP1*, (lizozom asocirani membranski protein 1); *TGDS*, (TDPglukozo 4,6-dehidrataza); *GPR180*, (G protein-upareni receptor 180); *DZIP1*, (DAZ interagujući protein 1); *OXGR1*, (oksoglutarate (alpha-ketoglutarat) receptor 1).

4. REZULTATI

4.1. Određivanje starta transkripcije *SOX14* gena

Početni korak u detaljnoj analizi regulacije ekspresije *SOX14* gena bilo je određivanje starta transkripcije metodom elongacije oligonukleotida u reakciji reverzne transkripcije ("primer extension"). Korišćenjem ukupne RNK poreklom iz HepG2 ćelija kao matrice i u prisustvu reverznog PE5 oligonukleotida, specifičnog za kodirajući region *SOX14* gena, reverznom transkripcijom je dobijen produkt veličine 275 nt. Njegova dužina, a samim tim i mesto otpočinjanja transkripcije, određena je u denaturišućem gelu, u prisustvu DNK markera dužina Φ X174/*Hinf*I i sekvence dobijene sekvenciranjem konstrukta SOX14P3*Xba*I 2.2, sa PE5 prajmerom (slika 15). Specifičnost reakcije potvrđena je korišćenjem tRNK kvasca. Ovim eksperimentom pokazano je da transkripcija *SOX14* gena otpočinje na G nukleotidu, 251 bp udaljenom od ATG kodona. Northern blot analiza iRNK poreklom iz HepG2 ćelija pokazala je prisustvo jednog transkripta dužine oko 1.8 kb (Arsic, et al., 1998). Dobijeni rezultat elongacije oligonukleotida je u korelaciji sa dužinom transkripta dobijenim na ovaj način.



C

```

XbaI
-475 cccagtcctag agctagcctc tetgctctag cctctctct gctctgtcc ctcacacctc
-415 tccccgccc caccagtcgc gctctctgtt tcttgaccg gctgtttggc aggtgcgccc
-355 cctcggcttc tetgctgctg attggcgccc aggttgggga gtcgcgcgcc cgcgcttatg
-295 tcagagtgg tgcagtcctc gccacctcg ctttgaact tcgcccttt tggctctctg
-235 tcaccagcct ccccgcttc tcagccaggt gcagcctag gcgcggcagc tccgggaaaag
-175 ccaoggaag ggggagccac gactggaac gcaagaggag agaagggaac tagagaaggc
-115 aaagtgagg agggggagaa ggaggagctt cttgccttgg ctaaaaaatt acctggccac
-55 ttaatcccg agactcggat acttgggtcc cagcccttgg ttctgaagc cccccGgccc
PvuI
+6 atcgccctct cctccccgc ctttctgcc cccactcgt cccccgggc tgctgggag
SmaI
+66 ctgggactgg catgatcagc tgaactttgt ggggtcagcg cttctctctg gcttcccctc
+126 agcggcgcca aggcgagggg agcgcagaac cccggctcag gacggacaga cagacggcca
PstI
+186 gccgcgccc ggctcgtctg cagaaccctt gcactcccta cccccacca cctagccgccc
+246 gggaccATGT CCAAACCTTC AGACCACATC
PE5
    
```

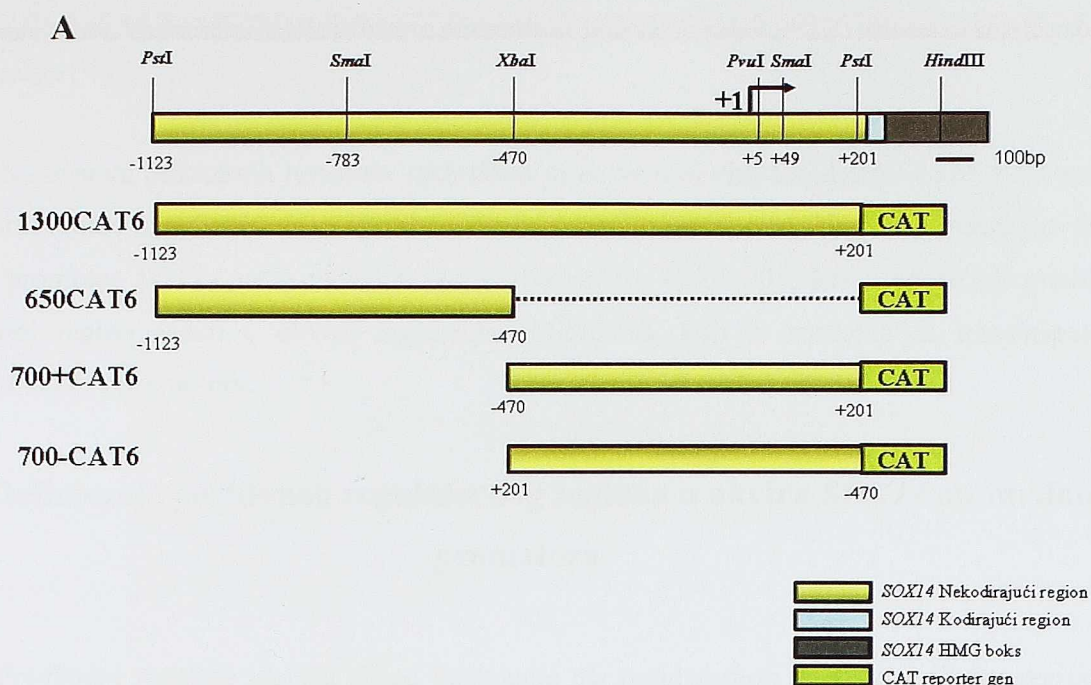
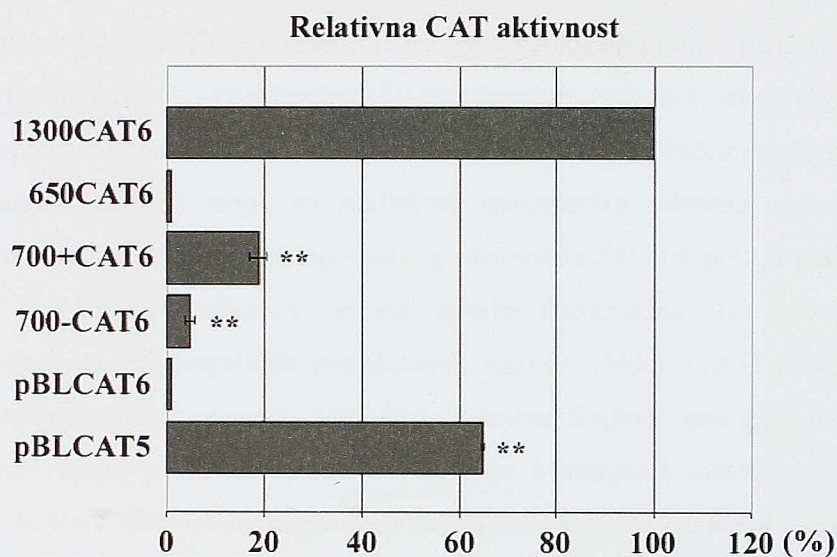

Slika 15. Određivanje starta transkripcije *SOX14* gena metodom elongacije oligonukleotida: A) Shematski prikaz promotora i dela kodirajućeg regiona humanog *SOX14* gena B) Reakcija elongacije oligonukleotida na denaturišućem poliakrilamidnom gelu: ACGT: nukleotidna sekvenca dobijena sekvenciranjem klona SOX14P3*Xba*I 2.2 reverznim oligonukleotidom PE5. Φ X174/*Hinf*I: DNK marker, dužine označene sa desne strane. PE produkt: reakcija elongacije oligonukleotida na ukupnoj RNK iz HepG2 ćelija sa odgovarajućim reverznim oligonukleotidom (PE5) koji je korišćen i za reakciju sekvenciranja. Produkt reakcije je označen strelicom. γ tRNK: kontrolna reakcija na tRNK kvasca. Sa leve strane prikazan je deo sekvence, a nukleotid od koga započinje transkripcija je podebljan i podvučen. C) Sekvenca promotora *SOX14* gena sa označenim startom transkripcije (+1), restrikcionim mestima i pozicijom PE5 prajmera. Velikim slovima je označena kodirajuća sekvenca, a malim slovima 5' nekodirajući region.

4.2. Definisane bazalnog promotora *SOX14* gena

Analizom 5' nekodirajućeg regiona *SOX14* gena utvrđeno je da se u okviru sekvence *Pst*I-*Pst*I (-1123/+201) nalazi regulatorni region koji je sposoban da aktivira transkripciju *cat* reporter gena (Đurović, 2003). U cilju definisanja bazalnog promotorskog regiona *SOX14* gena, generisana su još dva konstrukta, od kojih jedan sadrži uzvodnu (5': *Pst*I/*Xba*I, -1123/-470) a drugi nizvodnu (3': *Xba*I/*Pst*I, -470/+201) polovinu konstrukta *Pst*I-*Pst*I (-1123/+201) (slika 16A). Ova dva regiona su klonirana uzvodno od *cat* reporter gena u okviru promotor zavisnog pBLCAT6 reporter vektora. Dobijeni promotor reporter konstrukti su nazvani 650CAT6, 700CAT6+. Konstrukta 700CAT6- obuhvata region -470/+201, ukloniran u obrnutoj orijentaciji (slika 16A). CAT aktivnost ovih konstrukata je analizirana u eksperimentima tranzijentne transfekcije u HepG2 ćelijama, na način opisan u poglavlju Materijal i metode. Rezultati su statistički obrađeni i prikazani na slici 16B u vidu histograma. Uporedo sa testiranjem aktivnosti ovih promotor reporter konstrukata, radi poređenja, u ćelije je ubacivan i konstrukta 1300CAT6 koji je bio analiziran u predhodnom radu (Đurović, 2003).

CAT aktivnost konstrukta 1300CAT6 (-1123/+201) bila je približno jednaka aktivnosti *tk* promotora prisutnog u pBLCAT5 vektoru, koji je korišćen kao pozitivna kontrola. U isto vreme, konstrukta 650CAT6 nije pokazao sposobnost aktivacije *cat* reporter gena. Konstrukta 700+CAT6 (-470/+201) pokazao je značajan nivo promotorske aktivnosti u odnosu na negativnu kontrolu pBLCAT6. Njegova aktivnost bila je 5 puta manja u odnosu na aktivnost konstrukta 1300CAT6 (-1123/+201), što znači da je delecija regiona -1123/-470 (650CAT6) u okviru konstrukta 1300CAT6, dovela je do značajnog pada promotorske aktivnosti. Takođe, sekvenca koja obuhvata region -470/+201, uklonirana u obrnutoj orijentaciji u okviru promotor reporter konstrukta 700-CAT6, nije dovela do aktivacije *cat* reporter gena.

Na osnovu dobijenih rezultata zaključeno je da se u okviru promotor reporter konstrukta 700+CAT6 nalazi regulatorni region *SOX14* promotora koji je neophodan za njegovu bazalnu aktivnost. Da se u ovom regionu nalazi bazalni promotor *SOX14* gena potvrđeno je time što ovaj region, ukloniran u obrnutoj orijentaciji nije doveo do aktivacije *cat* reporter gena. Ovaj rezultat je u skladu sa podacima iz literature prema kojima je aktivnost promotorskih sekvenci zavisna od orijentacije (Gill, 1994). Takođe, dobijeni rezultati ukazali su na prisustvo *cis* regulatornog regiona od esencijalne važnosti za transkripcionu aktivnost *SOX14* promotora u okviru regiona -1123/-470.

**B**

Slika 16. Funkcionalna analiza promotorskog regiona humanog *SOX14* gena u HepG2 ćelijama: A) Promotor-reporterski konstrukti. Brojevi prikazuju pozicije 5' i 3' krajeva ispitivanih promotorskih fragmenata u odnosu na *tsp* (označen kao +1). HepG2 ćelije su tranzijentno transfektovane ili sa praznim pBLCAT6 vektorom ili sa naznačenim *SOX3* promotor-reporterskim konstruktima. Vektor pBLCAT5 (koji sadrži timidin kinazni promotor uzvodno od *cat* gena) je služio kao pozitivna kontrola. Normalizovane CAT aktivnosti su predstavljene kao procenat aktivnosti 1300CAT6 konstrukta kojoj je dodeljena vrednost 100%. Vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost \pm S.D. (standardna devijacija) iz najmanje tri nezavisne transfekcije. Vrednosti relativnih CAT aktivnosti su poređene u

Studentovom *t*-testu. Vrednosti za koje je $p < 0.05$ su predstavljene jednom zvezdicom (*), a vrednosti za koje je $p < 0.001$ sa dve zvezdice (**).

Na osnovu prikazanih rezultata zaključeno je da se u okviru fragmenta -1123/+201 nalazi regulatorni region neophodan za optimalnu aktivnost *SOX14* promotora. Takođe je pokazano da se bazalni promotor *SOX14* gena nalazi u okviru fragmenta -470/+201, kao i da se *cis* pozitivni regulatorni region nalazi u okviru fragmenta -1123/-470, koji je značajan za transkripcionu aktivnost *SOX14* promotora.

4.3. Definisanje pozitivnog regulatornog regiona u okviru *SOX14* optimalnog promotora

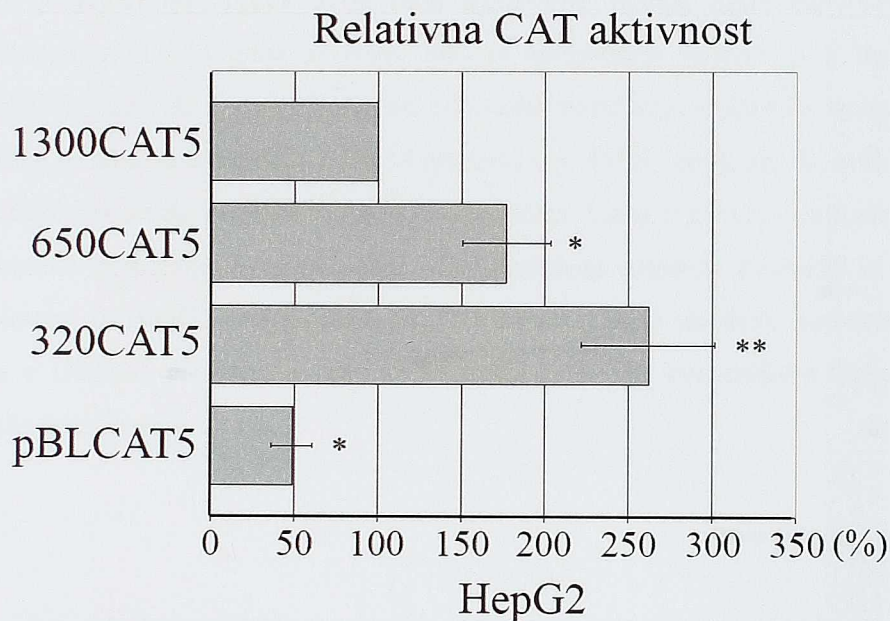
Predhodni rezultati ukazali su na postojanje *cis* regulatornog regiona u okviru regiona -1123/-470. Kako bi se preciznije definisala pozicija *cis* kontrolnog regiona u okviru *SOX14* optimalnog promotora (-1123/+201), izvršeno je njegovo subkloniranje u pBLCAT5 vektor. Ovaj vektor je pogodan za ispitivanje aktivatorskih i/ili represorskih svojstava nekog regiona zbog toga što se ispred *cat* reporter gena nalazi timidin kinazni (*tk*) promotor. Praćenjem aktivnosti reporter gena u funkcionalnim esejima mogu se analizirati enhenserska odnosno represorna svojstva fragmenata od interesa. Subkloniranjem optimalnog promotora *SOX14* gena u pBLCAT5 vektor generisana su tri preklapajuća enhenser zavisna reporter konstrukata. Svi delecioni konstrukti generisani su upotrebom odgovarajućih restrikcionih enzima (Slika 17A), a njihova aktivnost analizirana je u funkcionalnim esejima. Metodom kalcijum fosfatne precipitacije konstrukti su ubacivani u HepG2 ćelije na način opisan u poglavlju Materijal i metode, a relativna CAT aktivnost prećena je CAT eliza imunoesejom. Rezultati su statistički obrađeni i prikazani na slici 17B u vidu histograma.

Svi generisani enhenser zavisni reporter konstrukti pokazali su svojstva pozitivnih regulatora u odnosu na kontrolni pBLCAT5 vektor (slika 17B). Ovaj rezultat ukazuje da se u okviru testiranih konstrukata nalaze elementi neophodni za pozitivnu regulaciju ekspresije humanog *SOX14* gena. Konstrukat 320CAT5 (-783/-470) pokazao je najveću aktivnost koja je bila približno 2.6 puta veća od aktivnosti konstrukta 1300CAT5. Takođe, konstrukat 650CAT5 (-1123/-470) je pokazao približno 1.5 puta veću aktivnost u odnosu na 1300CAT5. Poređenjem ovih vrednosti na histogramu (slika 17B) može se zaključiti da se minimalni region koji pokazuje

pozitivno regulatorno svojstvo na *tk* promotor nalazi u okviru konstrukta 320CAT5. Ovaj rezultat ukazuje i na to da *SOX14* promotorski region sadrži jedan negativni *cis* regulatorni region u okviru fragmenta *PstI/SmaI* (-1123/-783) koji snižava ekspresiju *cat* reporter gena u okviru konstrukta 650CAT5 (slika 17B, uporediti konstrukte 650CAT i 320CAT5).



B



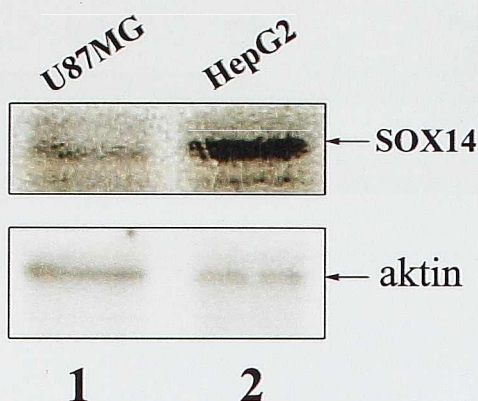
Slika 17. Funkcionalna analiza pozitivnog kontrolnog regiona *SOX14* gena u HepG2 ćelijama: A) Šematska ilustracija *SOX14* delecionih konstrukata koji su korišćeni u funkcionalnim esejima. Na slici su označeni restriktivni enzimi korišćeni u svrhu kloniranja i njihove pozicije u odnosu na tsp, *tk*- timidin kinazni promotor; CAT-hloramfenikol acetil transferaza reporter gen. B) Relativna CAT aktivnost analiziranih konstrukata u HepG2 ćelijama.

Normalizovana CAT aktivnost izražena je kao procenat u odnosu na 1300CAT6 konstrukt (-1123/+201) čija je aktivnost uzeta kao 100% i predstavljena kao srednja vrednost \pm S.E.M. iz tri nezavisna eksperimenata. Srednje vrednosti relativne CAT aktivnosti su poređene u Studentovom *t*-testu. Vrednosti za koje je $p < 0.001$ su predstavljene sa dve zvezdice (**).

Na osnovu dobijenih rezultata zaključeno je da se u konstrukt 320CAT5 u okviru fragmenta na poziciji (-783/-470) nalazi pozitivni regulatorni region.

4.4. U87MG ćelijska linija kao model sistem za proučavanje regulacije ekspresije *SOX14* gena

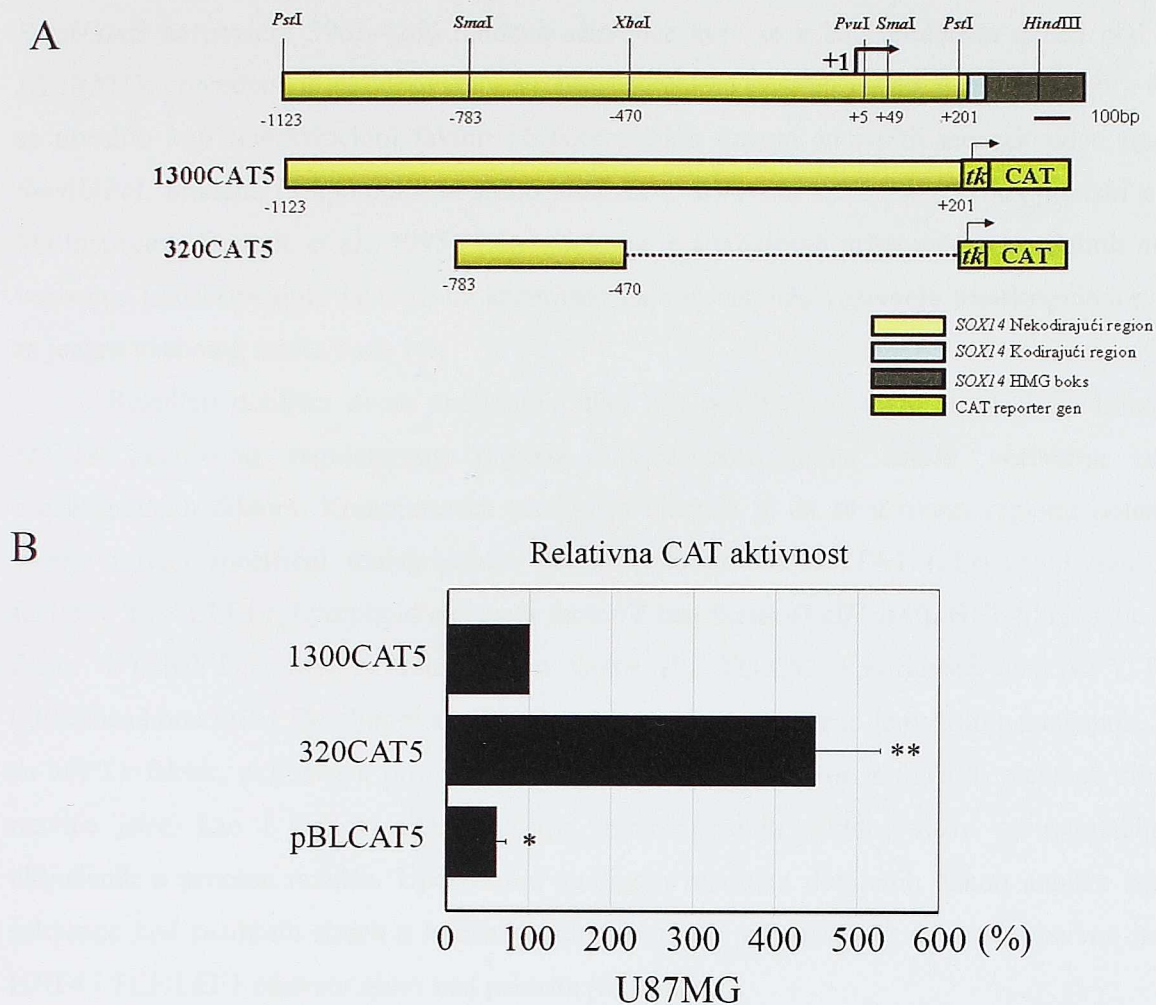
Kao dodatni model sistem u proučavanju ekspresije *SOX14* gena uvedena je U87MG ćelijska linija. To je hipodiploidna, humana, permanentna ćelijska linija poreklom iz glioblastoma IV gradusa. Naime, eksperimentalno je pokazano da ove ćelije konstitutivno eksprimiraju gene koji su obuhvaćeni SHH signalnim putem. Iz literature je poznato da je ekspresija *Sox14* gena u embrionima pileta dozno zavisna od signalnog molekula SHH (Hargrave, Karunaratne, et al., 2000). Kako je jedan od ciljeva ovog rada ispitivanje uticaja SHH signalnog molekula na ekspresiju humanog *SOX14* gena *in vitro*, bilo je neophodno ispitati da li ova ćelijska linija eksprimira *SOX14* gen i da li se u njoj može analizirati regulacija ekspresije ovog gena. U prvom koraku urađena je analiza ekspresije SOX14 proteina u U87MG ćelijama. Iz ovih ćelija izolovani su ukupni ćelijski proteini a zatim je metodom Western blota u prisutvu antitela specifičnog za SOX14 pokazana ekspresija ovog proteina. Kao pozitivna kontrola poslužili su ukupni ćelijski proteini izolovani iz HepG2 ćelija (slika 18). Na osnovu ovog rezultata potvrđena je ekspresija *SOX14* gena u U87MG ćelijama, a time su se stekli uslovi da ova ćelijska linija postane model sistem za dalja istraživanja.



Slika 18. „Western blot“ analiza ekspresije *SOX14* gena u U87MG i HepG2 ćelijama: U Western blot analizi korišćeni su ukupni proteini izolovani iz U87MG (kolona 1), HepG2 (kolona 2) i antitela specifična za SOX14 i aktin. Aktin je korišćen kao kontrola količine proteina unetih u reakciju. Strelice označavaju pozicije SOX14 proteina i aktina.

4.5. Analiza pozitivnog regulatornog regiona u U87MG ćelijama

Pošto je potvrđena ekspresija *SOX14* gena u U87MG ćelijama pristupilo se funkcionalnoj analizi predhodno definisanog pozitivnog kontrolnog regiona (slika 17) u ovoj ćelijskoj liniji. Metodom kalcijum fosfatne precipitacije konstrukti 1300CAT5 i 320CAT5 (slika 19A) su ubacivani u U87MG ćelije, a relativna CAT aktivnost prećena je CAT eliza imunoesejom kao što je opisano u poglavlju Materijal i metode. Aktivnost konstrukta 320CAT5 upoređena je sa konstruktom 1300CAT5 i pBLCAT5 kontrolnim vektorom, a dobijeni rezultati prikazani su u vidu histograma na slici 19B. Konstrukat 1300CAT5 je u U87MG ćelijama pokazao približno isti nivo aktivnosti u odnosu na kontrolni pBLCAT5 vektor u poređenju sa rezultatima iz HepG2 ćelija, dok je konstrukat 320CAT5 pokazao oko 4.5 puta veću aktivnost u odnosu na konstrukat 1300CAT5 (rezultati nisu prikazani). Na osnovu dobijenih rezultata zaključeno je da ispitivani kontrolni region *SOX14* gena pokazuje aktivatorska svojstva na *tk* promotor zavisni *cat* reporter gen i u U87MG ćelijama.



Slika 19. Funkcionalna analiza regulatornog regiona *SOX14* gena u U87MG ćelijama: Normalizovana CAT aktivnost izražena je kao procenat u odnosu na 1300CAT5 konstrukt (-1123/+201) čija je aktivnost uzeta kao 100% i predstavljena kao srednja vrednost \pm S.E.M. pet nezavisnih eksperimenata. Srednje vrednosti relativne CAT aktivnosti su poređene sa Studentovim *t* testom. Vrednosti $p \leq 0.01$ su predstavljene sa **.

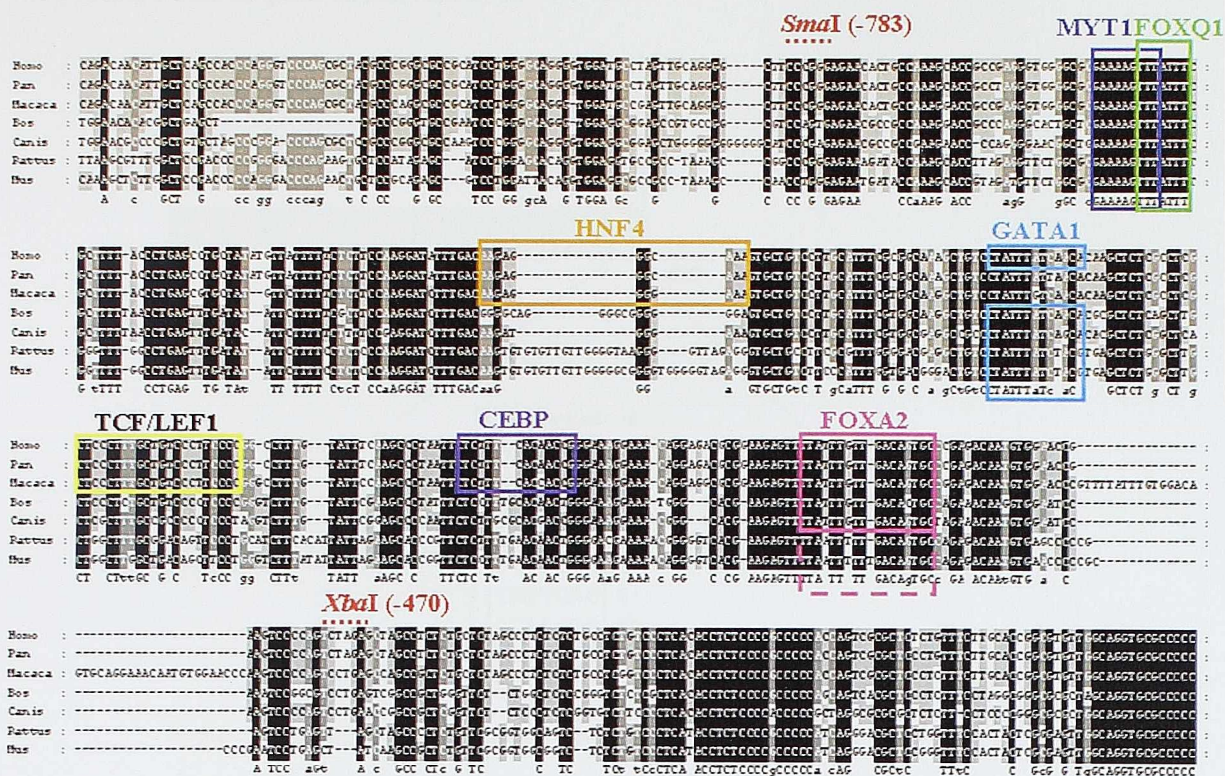
4.6. *In silico* analiza regiona *SmaI-XbaI* (320CAT5)

U literaturi je poznato da homologe nekodirajuće sekvence kod jednog ili više organizama mogu imati funkcionalni značaj. Pošto je pokazano da se u okviru konstrukta 320CAT5 nalazi pozitivan regulatorni region promotora *SOX14* gena, prvi korak je bio ispitati očuvanost sekvence ovog regiona kod različitih vrsta sisara. Genomska sekvenca promotora obuhvaćena regionom

SmaI/XbaI na poziciji 3963-4266 humane sekvence koja se u bazi podataka nalazi pod brojem AF107043, upoređena je sa odgovarajućim regionima kod različitih vrsta sisara (slika 20). Kako bi se utvrdilo koji transkripcioni faktori se potencijalno vezuju za ispitivanu sekvencu fragmenta *SmaI/XbaI*, urađena je uporedna *in silico* analiza. U tu svrhu korišćen je kompjuterski program MatInspector (Quandt, et al., 1995), pomoću koga je analizirano prisustvo potencijalnih mesta za vezivanje transkripcionih faktora, uz kriterijum da verovatnoća vezivanja transkripcionog faktora za jezgro vezivnog mesta bude 1.0.

Rezultati dobijeni ovom analizom (Slika 20) pokazali su da se u *SmaI-XbaI* fragmentu *SOX14* pozitivnog regulatornog regiona nalaze potencijalna mesta vezivanja različitih transkripcionih faktora. Kompjuterska predikcija ukazala je da se u ovom regionu potencijalno vezuju tkivno specifični transkripcioni faktori, kao što su GATA1 („Erythroid transcription factor“), TCF/LEF1 („Lymphoid enhancer factor/T cell factor (Lef/Tcf)“), HNF4 („Hepatic nuclear factor 4“), MYT1 („Myelin transkription factor 1“), FOXA2 („Forkhead box A2“), FOXQ1 („Forkhead box Q1“). Detaljnom analizom svakog faktora otkriveno je nekoliko značajnih, kao što su MYT1 faktor, uključen u primarnu neurogenezu, HNF4 faktor, nuklearni receptor ključan za razviće jetre, kao i članovi FOX familije transkripcionih faktora važni za regulaciju gena uključenih u procese razvića. Uporednom analizom rezultata dobijenih nakon analize ispitivane sekvence kod različitih sisara u MatInspector programu, otkriveno je da je su vezivna mesta za HNF4 i TCF/LEF1 očuvani samo kod primata (Slika 20).

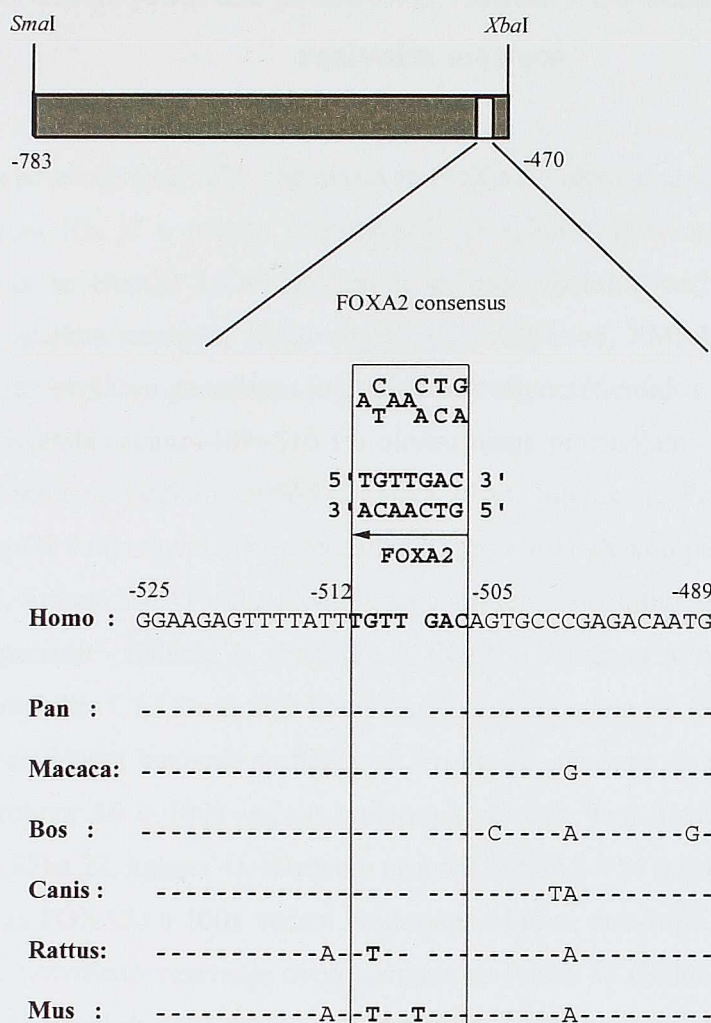
Međutim, sledeći podatke iz literature koji se odnose na regulaciju ekspresije *SOX14* gena, naša pažnja je bila usmerena na traženje onog (ili onih) transkripcionog faktora koji bi povezao aktivaciju *SOX14* gena sa SHH signalnim putem. GLI transkripcioni faktori se smatraju primarnim medijatorima SHH signalnog puta (Villavicencio, et al., 2000). Pretraživanjem ispitivanog regiona *SmaI/XbaI*, kao i optimalnog promotora *PstI/PstI* nije utvrđeno prisustvo konsenzusnog vezivnog mesta za ove transkripcione faktore. Literaturni podaci ukazali su na zavisnost ekspresije *Foxa2* gena od SHH signalnog puta (Sasaki i Hogan, 1994). Pošto je konsezusno vezivno mesto za ovaj transkripcioni faktor prisutno u regulatornom regionu *SOX14* gena, postavilo se pitanje da li ovaj transkripcioni faktor može biti medijator u aktivaciji ekspresije *SOX14* gena SHH signalnim molekulom.



Slika 20. Nukleotidna sekvenca pozitivnog kontrolnog regiona humanog *SOX14* gena i poređenje sa ortolognim sekvencama: kod čoveka-Homo (*Homo sapiens*); šimpanze-Pan (*Pan troglodytes*); rezus majmuna-Macaca (*Macaca mulatta*); govečeta-Bos (*Bos Taurus*), psa-Canis (*Canis familiaris*), pacova-Rattus (*Rattus norvegicus*) i miša-Mus (*Mus musculus*). Zasenčena sekvenca označava nukleotide koji su identični za sve ortologe promotore. Konzensusne sekvence odabranih potencijalnih mesta vezivanja transkripcionih faktora identifikovane programom MatInspector su obeležene nazivom transkripcionog faktora a njihova evolutivna očuvanost je označena pravougaonicima sa punom linijom. Isprekidanom linijom označeno je vezivno mesto koje je prisutno sa verovatnoćom vezivanja za jezgro vezivnog mesta manjom od 1.

Poređenje sekvenci čoveka, šimpanze, rezus majmuna, goveda, psa, pacova i miša pokazalo je da se konzensusno mesto za vezivanje FOXA2 transkripcionog faktora nalazi na nekodirajućem lancu, kao i da je evolutivno očuvano, kako po nukleotidnom sastavu tako i po poziciji u promotorskim regionima kod svih analiziranih ortologa (Slika 21). Međutim, kod pacova je uočena jedna nukleotidna zamena G→T na poziciji 2, dok je kod miša uočena ista zamena i jedna insercija T na poziciji 5 (slika 21). I ako su prisutne ove izmene, MatInspector program je

detektovao vezivno mesto za Foxa2 sa nešto manjom verovatnoćom vezivanja (0.78 za jezgro vezivnog mesta i 0.82 za prateću sekvencu) za obe vrste.



Slika 21. Vezivno mesto za FOXA2 transkripcioni faktor u okviru pozitivnog kontrolnog regiona SOX14 gena:

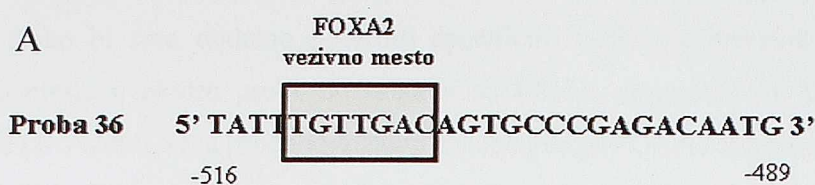
Sekvenca koja obuhvata region -525 to -490 sadrži FOXA2 vezivno mesto na poziciji -512/505 (označeno strelicom). Poređenje ortolognih sekvenci kod sisara: Homo (*Homo sapiens*); Pan (*Pan troglodytes*); Macaca (*Macaca mulatta*); Bos (*Bos Taurus*), Canis (*Canis familiaris*), Rattus (*Rattus norvegicus*); Mus (*Mus musculus*). Nukleotidne razlike u sekvencama navedene su u skladu sa pozicijom. Položaj jezgra vezivnog mesta uokviren je pravougaonikom.

Na osnovu dobijenih rezultata o očuvanosti vezivnog mesta za FOXA2 transkripcioni faktor, zatim podataka iz literature o ulozi ovog transkripcionog faktora u regulaciji ekspresije drugih SOX gena, kao i zavisnosti njegove ekspresije od SHH signalnog puta (Sasaki i Hogan,

1994), pristupilo se detaljnoj analizi uloge FOXA2 transkripcionog faktora u regulaciji ekspresije humanog *SOX14* gena.

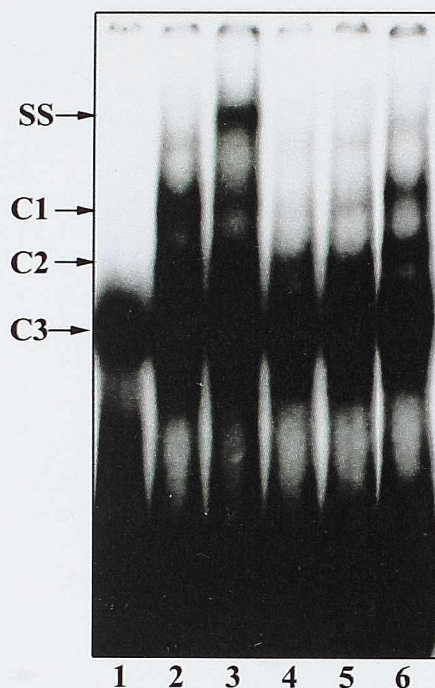
4.7. Interakcije jedarnih proteina iz HepG2 i U87MG ćelija sa FOXA2 vezivnim mestom

Analiza potencijalnog vezivnog mesta za FOXA2 u okviru pozitivnog kontrolnog elementa *SOX14* promotora išla je u pravcu identifikacije proteina koji se za njega vezuju. Interakcije jedarnih proteina iz HepG2 i U87MG ćelija sa potencijalnim vezivnim mestom za FOXA2 ispitivane su u esejima smanjene elektroforetske pokretljivosti, EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay). Tom prilikom generisana je dvolančana oligonukleotidna proba, označena kao Proba 36, koja je obuhvatala region -489/-516 i u okviru njega potencijalno vezivno mesto za FOXA2 transkripcioni faktor na poziciji -505/-512 (slika 22A). Interakcija Probe 36 i jedarnih proteina poreklom iz HepG2 ćelija dovela je do nastanka tri protein-DNK kompleksa označenih kao C1, C2 i C3 (Slika 22, kolona 2). U cilju identifikacije proteina prisutnih u formiranim kompleksima urađena je „supershift“ analiza. U prisustvu FOXA2 specifičnog antitela došlo je do dodatnog usporavanja kompleksa C1 i formiranja kompleksa označenog kao SS (Slika 22, kolona 3). Kako bi se potvrdila specifičnost vezivanja proteina za Probu 36, urađena je kompeticija neobeleženom („hladnom“) Probom 36 u 100x većem molarnom odnosu. Tom prilikom je došlo do hlađenja kompleksa C1 (Slika 22, kolona 4). Hlađenje probom FOXA2 VM (proba koja sadrži konsenzusno vezivno mesto za FOXA2) u 100x većem molarnom odnosu, dovelo je do istog efekta, na osnovu čega je dodatno potvrđeno vezivanje ovog proteina za Probu 36 (Slika 22, kolona 5). U prisustvu antitela za NF-Y transkripcioni faktor, koji specifično prepoznaje sekvencu CCAAT, koja nije prisutna u Probi 36, nije došlo do pojave „superšifta“ (Slika 22, kolona 6). Time je dodatno potvrđena specifičnost dobijenog kompleksa u prisustvu antitela na FOXA2.



B

HepG2 JP	-	+	+	+	+	+
FOXA2 Ab	-	-	+	-	-	-
Proba 36 100x	-	-	-	+	-	-
FOXA2 kons	-	-	-	-	+	-
NFY Ab	-	-	-	-	-	+



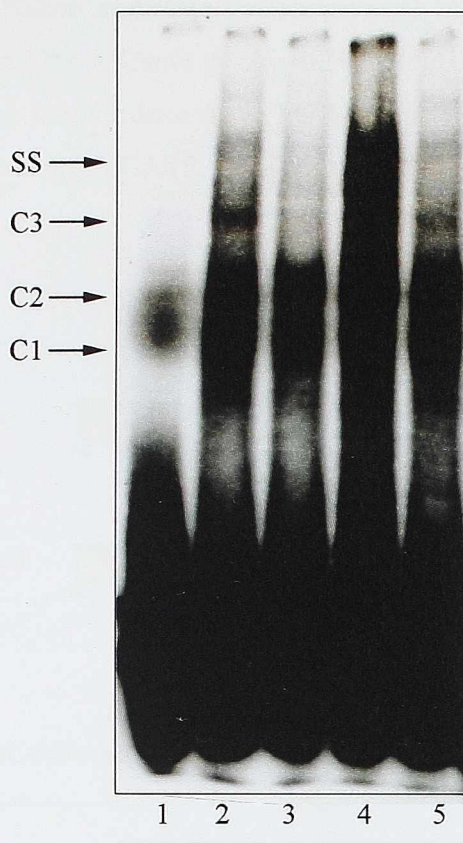
Proba 36

Slika 22. EMSA reakcije sa Probom 36 koja sadrži potencijalno FOXA2 vezivno mesto i jedarnim proteinima poreklom iz HepG2 ćelija : A) Sekvenca Probe 36 korišćene u EMSA eksperimentima koja obuhvata FOXA2 konsenzus vezivno mesto (uokvireno); B) Proba 36 je inkubirana sa jedarnim proteinima poreklom iz HepG2 ćelija. (kolone 2, 3, 4, 5, 6). Kompeticija je urađena preinkubacijom proteina sa naznačenim neobeženim probama u 100 puta većem molarnom odnosu (kolone 4 i 5). Nastali kompleksi su označeni C1-C3, a kompleks dobijen u reakciji "superšifra" obeležen je strelicom i označen sa SS (kolona 3). JP: jedarni proteini; Ab: antitelo; 100x: neobeležena proba dodata u 100 puta većem molarnom odnosu; kons: konsenzus vezivno mesto.

Kako bi smo dodatno potvrdili specifično vezivanje proteina za konsenzusno FOXA2 vezivno mesto u okviru probe 36 urađeni su EMSA eksperimenti u kojima je korišćena proba SOX14FOXA2mut. Ova proba je dizajnirana tako da je FOXA2 mesto narušeno na način prikazan na slici 23A. Dodavanje ove neobeležene probe u 100x većem molarnom odnosu nije uticalo na profil vezivanja jedarnih proteina iz HepG2 ćelija za probu 36. (Slika 23 kolona 4). U suprotnom, hlađenje neobeležene probe 36 i konsenzusnim vezivnim mestom u 100x većem molarnom odnosu, dovelo je do hlađenja kompleksa C1 i C2 (Slika 23, kolone 3 i 5). Sposobnost mutirane probe da veže jedarne proteine iz HepG2 ćelija ispitana je pod istim uslovima, pri čemu je pokazano da je njena sposobnost vezivanja u velikoj meri smanjena, dok je potpuno izostalo vezivanje u nivou kompleksa C1 (Slika 23, kolone 7-10).

Dosadašnji rezultati su pokazali specifično vezivanje jedarnih proteina iz HepG2 ćelija za probu koja sadrži potencijalno FOXA2 vezivno mesto. U cilju analize vezivanja jedarnih proteina iz U87MG ćelija za Probu 36 urađeni su eksperimenti smanjenje elektroforetske pokretljivosti. EMSA reakcije pokazale su da se za Probu 36 vezuju jedarni proteini iz U87MG ćelija (slika 24, kolona 2). Takođe su uočena tri specifična kompleksa manje elektroforetske pokretljivosti, na slici označeni C1 do C3. Prisustvo antitela na FOXA2 protein dovelo je do pojačanog vezivanja proteina za obeleženu probu kao i do dodatnog usporavanja kompleksa C1 i formiranja „supershift“ trake označene kao SS (Slika 24, kolona 4). Kako bi se potvrdila specifičnost vezivanja U87MG proteina za probu 36, urađena je kompeticija „hladnom“ Probom 36 u 100x većem molarnom odnosu (Slika 24 kolona 3). Hlađenje probom FOXA2 VM (koja sadrži konsenzus vezivno mesto za FOXA2) dovelo je do slabljenja intenziteta kompleksa C1, na osnovu čega je dodatno potvrđeno specifično vezivanje FOXA2 proteina poreklom iz U87MG jedarnih proteina za probu 36 (Slika 24, kolona 5).

U87 JP	-	+	+	+	+
Proba 36 100x	-	-	+	-	-
FOXA2 Ab	-	-	-	+	-
FOXA2 kons 100x	-	-	-	-	+



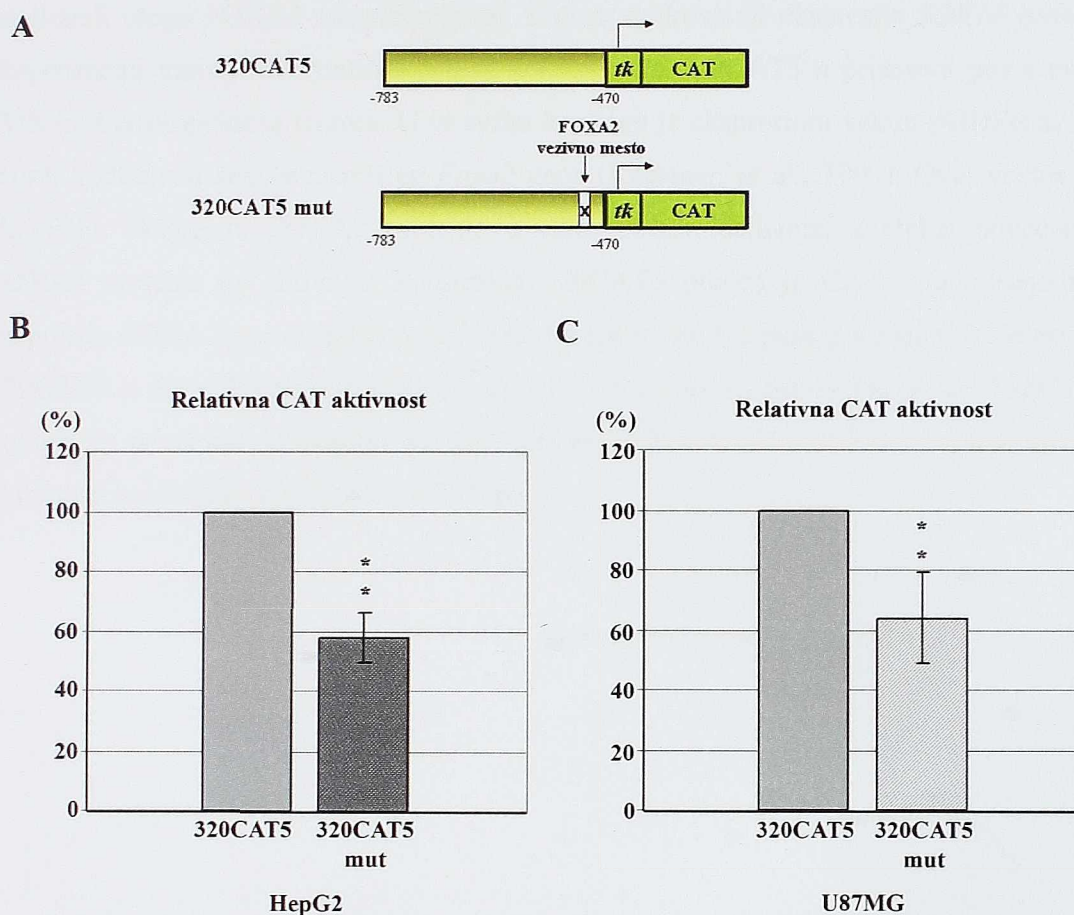
Proba 36

Slika 24. EMSA reakcije sa Probom 36 koja sadrži potencijalno FOXA2 vezivno mesto i jedarnim proteinima poreklom iz U87MG ćelija: Proba 36 je inkubirana sa jedarnim proteinima poreklom iz U87MG ćelija. (kolone 2, 3, 4, 5). Kompeticija je urađena preinkubacijom proteina sa naznačenim neobeležanim probama u 100 puta većem molarnom odnosu (kolone 3 i 5). Nastali kompleksi su označeni C1-C3, a kompleks dobijen u reakciji "supershifta" obeležen je strelicom i označen sa SS (kolona 4). JP: jedarni proteini; Ab: antitelo; 100x: neobeležena proba dodata u 100 puta većem molarnom odnosu; kons: konsenzus vezivno mesto.

4.8. Uticaj mutacije u FOXA2 vezivnom mestu na aktivnost konstrukta 320CAT5

U predhodnim eksperimentima potvrđeno je da se za konsenzusno vezivno mesto u okviru Probe 36 vezuje FOXA2 transkripcioni faktor. Kako bi se utvrdilo da li je ovo vezivno mesto

važno za aktivnost konstrukta 320CAT5 usledila je funkcionalna analiza. Oligonukleotidom SOX14FOXA2mut, koji je korišćen i u EMSA eksperimentima, uvedena je mutacija u FOXA2 vezivno mesto u okviru enhenser zavisnog reporter konstrukta 320CAT5 čime je generisan konstrukt 320CAT5mut (slika 25A), a zatim je efekat mutacije analiziran u eksperimentima transijentne transfekcije. Nakon mutiranja vezivnog mesta za FOXA2 došlo je do pada relativne CAT aktivnosti konstrukta 320CAT5mut za oko 40% u HepG2 i U87MG ćelijama u odnosu na wt konstrukt 320CAT5. Time je potvrđeno da je FOXA2 vezivno mesto bitno za aktivnost regiona *SmaI-XbaI* u okviru konstrukta 320CAT5. Dobijeni rezultati prikazani su u vidu histograma na slici 25 B i C.

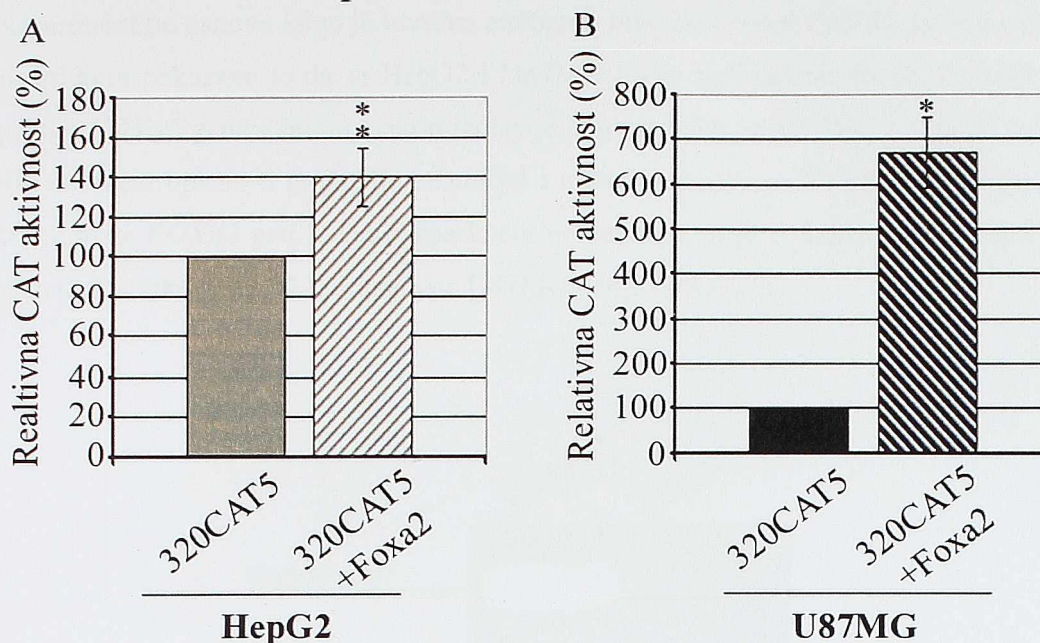


Slika 25: Efekat mutacije u FOXA2 vezivnom mestu na aktivnost konstrukta 320CAT5: A) Šematski prikaz pozicije FOXA2 vezivnog mesta koje je mutirano. B) HepG2 ćelije su transfekovane sa wt (320CAT5) SOX14

promotor-reporterskim konstruktom ili mutiranim konstruktom 320CAT5 mut. C) Isti eksperiment je urađen u U87MG ćelijama. Normalizovane CAT aktivnosti su predstavljene kao procenat aktivnosti 320CAT5 konstrukta kojoj je dodeljena vrednost 100%. Vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost \pm S.E.M. (SEM-standard error mean) iz tri nezavisne transfekcije. Vrednosti relativnih CAT aktivnosti su poređene Studentovim *t*-testom. Vrednost za koju je $p < 0.001$ označena je sa dve zvezdice (**).

4.9. Uticaj povećane ekspresije FOXA2 transkripcionog faktora na aktivnost konstrukta 320CAT5

Predhodni eksperimenti su nesumnjivo pokazali da je vezivno mesto za FOXA2 transkripcioni faktor bitno za pozitivnu regulatornu aktivnost regiona *SmaI-XbaI*. Kako bi analizirali ulogu FOXA2 transkripcionog faktora u aktivaciji ekspresije *SOX14* gena urađeni su eksperimenti tranzijentne transfekcije sa konstruktom 320CAT5 u prisustvu povećane ekspresije FOXA2 transkripcionog faktora. U tu svrhu korišćen je ekspresioni vektor pHDFoxa2, koji u sebi sadrži kodirajuću sekvencu mišjeg *Foxa2* gena (Kaestner, et al., 1999). Ovaj vektor omogućava ektopičnu ekspresiju FOXA2 proteina u eukariotskim ćelijama, a efekat povećane ekspresije FOXA2 proteina na aktivnost konstrukta 320CAT5 praćen je CAT imuno-esejom. Povećana ekspresija FOXA2 transkripcionog faktora dovela je do 1.4 puta povećane aktivnosti konstrukta 320CAT5 u HepG2 ćelijama (Slika 26A). Isti eksperiment ponovljen je u U87MG ćelijama u kojima je povećana ekspresija FOXA2 proteina dovela do približno 7 puta povećane CAT aktivnosti konstrukta 320CAT5 (slika 26B).



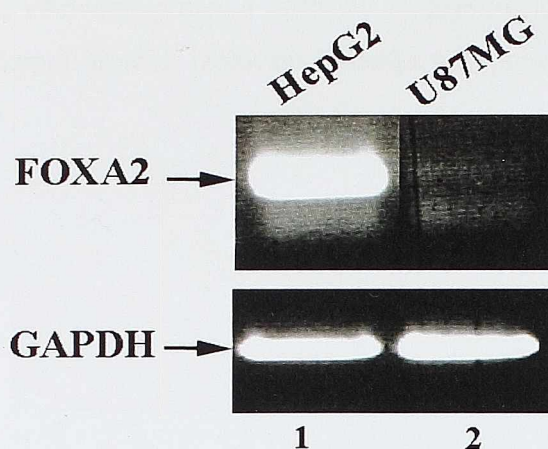
Slika 26. Efekat povećane ekspresije Foxa2 na aktivnost konstrukta 320CAT5: A) HepG2 ćelijska linija je transijentno transfekovana sa reporter konstruktom 320CAT5 bez i u prisustvu Foxa2 ekspresionog konstrukta. B) U87MG ćelijska linija je transijentno transfekovana sa reporter konstruktom 320CAT5 bez i u prisustvu Foxa2 ekspresionog konstrukta. Normalizovane CAT aktivnosti su predstavljene kao procenat aktivnosti 320CAT5 konstrukta kojoj je dodeljena vrednost 100%. Vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost \pm S.E.M. (SEM-standard error mean) iz najmanje tri nezavisne transfekcije. Vrednosti relativnih CAT aktivnosti su poređene Studentovim *t*-testom. Vrednost za koju je $p < 0.001$ označena je sa dve zvezdice (**).

Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da je kotransfekcija sa FOXA2 ekspresionim vektorom dovela do značajnog povećanja aktivnosti konstrukta 320CAT5, naročito u U87MG ćelijskoj liniji.

4.10. Razlika u ekspresiji FOXA2 transkripcionog faktora u HepG2 i U87MG ćelijama

U predhodnim eksperimentima primećeno je da povećana ekspresija FOXA2 transkripcionog faktora u HepG2 i U87MG ćelijama dovodi do različitog nivoa aktivnosti konstrukta 320CAT5. Rezultati su pokazali da je u U87MG ćelijama, aktivnost konstrukta 320CAT5 povećana sedam puta nakon kotransfekcije sa *Foxa2* ekspresionim vektorom dok je aktivnost u HepG2 ćelijama bila povećana svega 1.4 puta. Kako bi se objasnila ova razlika urađen

je eksperiment na osnovu koga je utvrđen endogeni nivo ekspresije *FOXA2* gena u ovim ćelijama. Tom prilikom pokazano je da se HepG2 i U87MG ćelije međusobno značajno razlikuju u nivou ekspresije *FOXA2* gena. Naime, nakon izolacije ukupne RNK iz U87MG i HepG2 ćelija i sinteze cDNK na način opisan u poglavlju Materijal i metode, urađen je RT-PCR sa oligonukleotidima specifičnim za *FOXA2* gen. Ovaj eksperiment pokazao je da je endogeni nivo ekspresije *FOXA2* gena značajno viši u HepG2 u odnosu na U87MG ćelije (slika 27).



Slika 27. RT-PCR analiza ekspresije FOXA2 u HepG2 i U87MG ćelijama: U RT-PCR analizi korišćene su cDNK poreklom od ukupne RNK izolovane iz HepG2 (kolona 1) i U87MG (kolona 2) ćelija, kao i oligonukleotidi specifični za *FOXA2* i *GAPDH* gen. *GAPDH* je korišćen kao kontrola količine cDNK unete u reakciju. Strelice označavaju pozicije *FOXA2* i *GAPDH* PCR produkata.

Obzirom na to da je endogeni nivo ekspresije *FOXA2* gena u U87MG ćelijama niži te da se zbog toga efekat ektopične ekspresije u njima može bolje pratiti, ove ćelije su odabrane kao model sistem u kome će se ispitati uticaj povećane ekspresije FOXA2 transkripcionog faktora na endogenu ekspresiju *SOX14* gena.

4.11. Efekat povećane ekspresije FOXA2 na vezivanje ukupnih proteina za probu 36

Kako bi utvrdili da li povećana ekspresija Foxa2 transkripcionog faktora ima uticaj na vezivanje proteina za Probu 36, izolovani su ukupni ćelijski proteini nakon transfekcije U87MG i HepG2 ćelija sa *Foxa2* ekspresionim vektorom. Ovi proteini su ponuđeni obeleženoj Probi 36 u reakciji vezivanja, a efekat povećane ekspresije FOXA2 proteina na vezivanje za Probu 36 prikazan je na slici 28. Vezivanje proteina za Probu 36 daje intenzivnije vezivanje u reakcijama u kojima su korišćeni ukupni proteini izolovani iz ćelija u kojima je povećana ekspresija FOXA2 (slika 28, kolone 3 i 5).



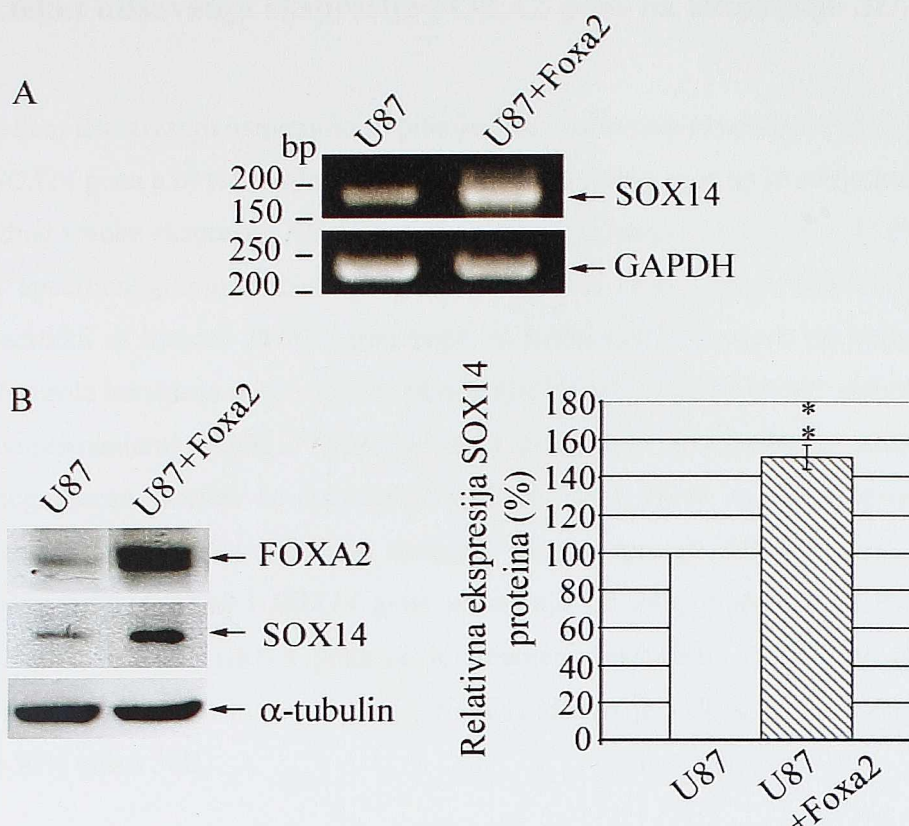
Slika 28. Efekat povećane ekspresije FOXA2 proteina na formiranje kompleksa u EMSA reakcijama sa Probom 36: U ovim reakcijama korišćena je Proba 36 i ukupni ćelijski proteini iz U87MG i HepG2 ćelija kao i ovih ćelija u kojima je nakon transfekcije povećana ekspresija FOXA2. Strelicom je označen protein-DNK kompleks koji je pokazao pojačano vezivanje u prisustvu povećane ekspresije FOXA2 proteina. ĆP: ukupni ćelijski proteini.

Dobijeni rezultati su pokazali da povećana ekspresija FOXA2 proteina dovodi do formiranja kompleksa jačeg intenziteta u EMSA eksperimentima sa probom koja sadrži FOXA2 vezivno mesto.

4.12. Efekat povećane ekspresije FOXA2 proteina na endogeni nivo ekspresije SOX14 gena u U87MG ćelijama

Kao što je već rečeno, u predhodnim eksperimentima pokazan je značajan efekat povećane ekspresije FOXA2 proteina koji je doveo do povećanja aktivnosti konstrukta 320CAT5 gotovo 7 puta u U87MG ćelijama. Kako bi se ispitaio efekat povećane ekspresije FOXA2 proteina na endogeni nivo ekspresije *SOX14* gena urađeni su eksperimenti RT-PCRa i „Western blot“-a. U RT-PCR eksperimentu korišćena je ukupna RNK izolovana iz U87MG ćelija koje su transfekovane sa *Foxa2* ekspresionim vektorom i ukupna RNK izolovana iz kontrolnih, netransfekovanih ćelija. RNK je zatim u prisustvu kratkih, heksamernih oligonukleotida prepisana u cDNK, a zatim je ovakva cDNK poslužila kao matrica u reakciji lančanog umnožavanja DNK sa oligonukleotidima specifičnim za *SOX14* gen. Uporedo sa ovom reakcijom urađena je i reakcija lančanog umnožavanja DNK sa oligonukleotidima specifičnim za *GAPDH* radi normalizacije količine cDNK unete u reakciju. Dobijeni rezultati su pokazali da je nakon povećane ekspresije FOXA2 proteina u U87MG ćelijama došlo do značajnog povećanja nivoa *SOX14* iRNK (Slika 29A).

Kako bi se utvrdilo da li do povećanja dolazi i na proteinskom nivou, urađen je Western blot. U ovom eksperimentu korišćeni su ukupni proteini poreklom iz kontrolnih, netransfekovanih U87MG ćelija i ćelija transfekovanih sa *Foxa2* ekspresionim vektorom. Rezultati su pokazali da i na proteinskom nivou dolazi do povećanja ekspresije SOX14 za oko 50% (Slika 29B).

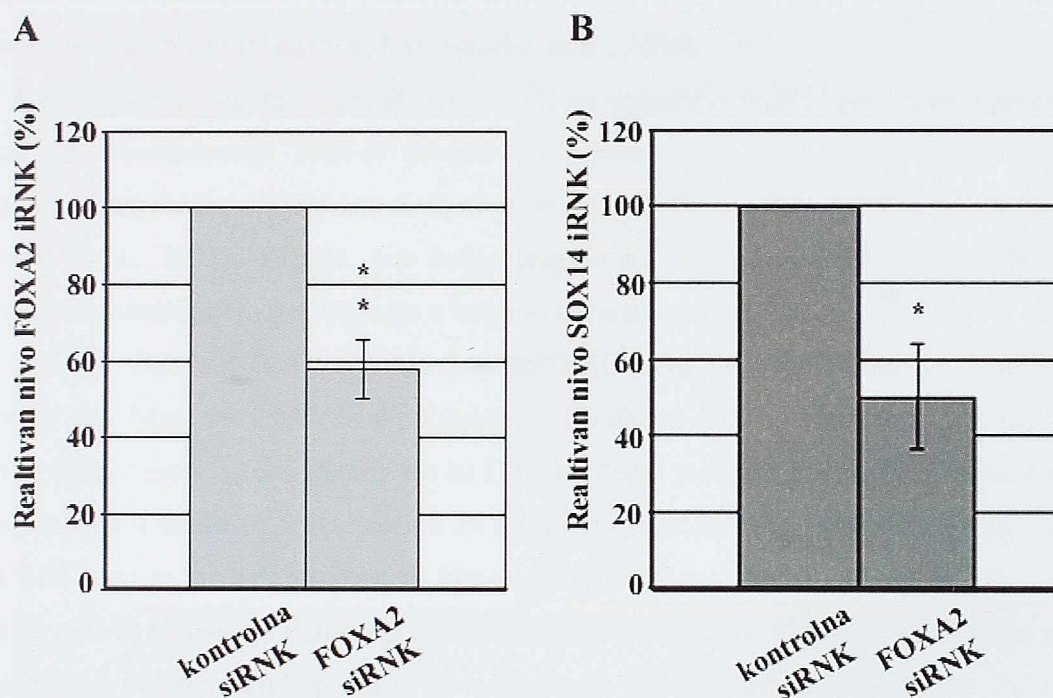


Slika 29. Analiza ekspresije *SOX14* gena nakon povećanja ekspresije *Foxa2*: A) Povećan nivo ekspresije *SOX14* gena pokazan na nivou iRNK RT-PCR-om. Strelice označavaju pozicije *SOX14* i GAPDH RT-PCR produkata. GAPDH je korišćen kao kontrola količine unete cDNK u reakciju B) Povećan nivo ekspresije *SOX14* gena na nivou proteina pokazan Western blot-om. Histogram predstavlja kvantifikaciju rezultata Western blot-a. Strelice označavaju pozicije SOX14 proteina i tubulina koji je korišćen kao kontrola količine analiziranih proteina. Relativan nivo ekspresije SOX14 proteina u ćelijama transfekovanim sa *Foxa2* ekspresionim vektorom iskazan je kao procenat u odnosu na netransfekovane ćelije kojima je dodeljena vrednost 100%. Vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost \pm S.E.M. iz najmanje tri nezavisne transfekcije. Dobijene vrednosti su poređene Studentovim *t*-testom. Vrednost za koju je $p < 0.001$ označena je sa dve zvezdice (**).

Na osnovu dobijenih rezultata zaključeno je da povećanje ekspresije FOXA2 transkripcionog faktora dovodi do povećanja endogene ekspresije humanog *SOX14* gena kako na nivou RNK tako i na proteinskom nivou.

4.13. Efekat utišavanja ekspresije *FOXA2* gena na ekspresiju *SOX14* gena

U daljem istraživanju nametnulo se pitanje kako utišavanje ekspresije *FOXA2* gena utiče na ekspresiju *SOX14* gena u *in vitro* uslovima. U tu svrhu korišćene su HepG2 ćelije kao model sistem u kome se zbog visoke ekspresije *FOXA2* efekat utišavanja može dobro pratiti. U HepG2 ćelije su u prisustvu specifičnog transfekcionog agensa ubacivani kratki interferirajući RNK molekuli (siRNK) specifični za humani *FOXA2* transkript, na način opisan u poglavlju Materijal i metode, dok je kao kontrola korišćena nespecifična siRNK. Kratki interferirajući RNK molekuli korišćeni u radu su komplementarni iRNK *FOXA2* gena, koji, nakon ubacivanja u ćelije u prisustvu transfekcionog agensa, dovode do degradacije ove specifične iRNK na način opisan u Uvodnom poglavlju 1.1.4. i na taj način snižavaju endogeni nivo ekspresije *FOXA2* gena. Efekat dejstva siRNK na ekspresiju *FOXA2* i *SOX14* gene u trajanju od 24h, praćen je PCR-om u realnom vremenu. Rezultat primene siRNA pokazao je smanjenje ekspresije *FOXA2* na oko 58% (slika 30A). Istovremeno, smanjen nivo ekspresije *FOXA2* doveo je i do smanjene ekspresije *SOX14* gena na oko 50% (slika 30B).



Slika 30. Uticaj smanjenog nivoa ekspresije *FOXA2* na ekspresiju *SOX14* gena: A) U prisustvu *FOXA2* siRNK došlo je do pada endogenog nivoa ekspresije *FOXA2* u poređenju sa efektom kontrolne siRNK. B) Pad nivoa

endogenog FOXA2 doveo je i do pada ekspresije *SOX14* gena. Relativan nivo FOXA2 i *SOX14* iRNK izražen je u odnosu na nivo iRNK u ćelijama koje su transfekovane sa kontrolnom siRNK koji je prikazan kao 100%. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm S.E.M. najmanje tri nezavisna eksperimenta. Srednje vrednosti su poređene Studentovim *t*-testom. Vrednosti za koje je $p \leq 0.01$ predstavljene su sa dve zvezdice (**) a vrednosti za koje je $p \leq 0.05$ sa jednom zvezdicom (*).

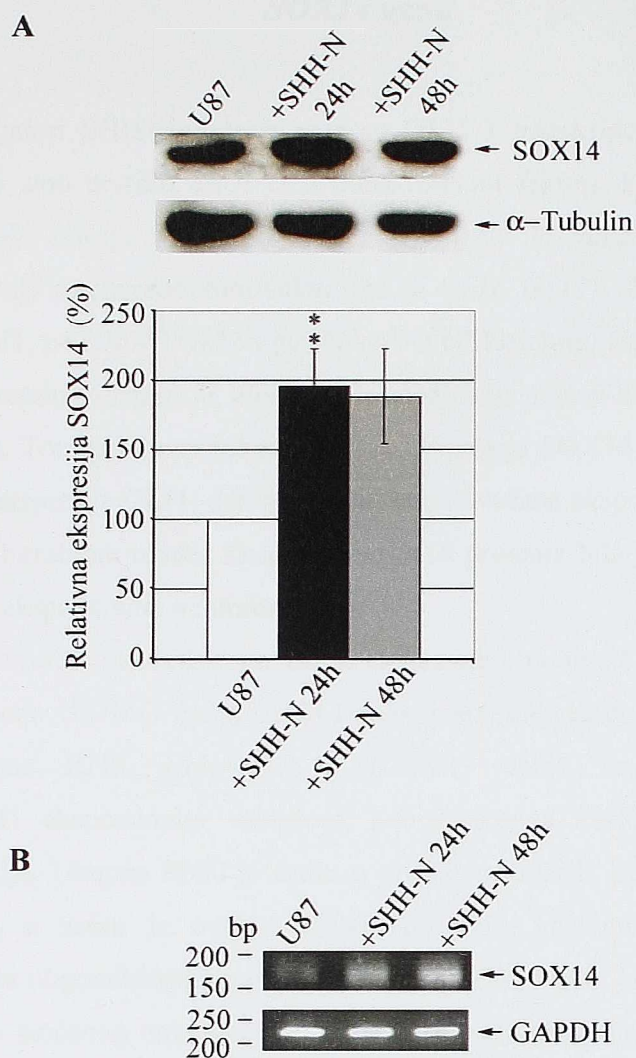
Eksperimenti u kojima je korišćena FOXA2 specifična siRNK pokazali su da utišavanje ekspresije FOXA2 transkripcionog faktora dovodi do pada nivoa ekspresije *SOX14* gena u HepG2 ćelijama. Na ovaj način je potvrđen uticaj FOXA2 transkripcionog faktora na endogenu ekspresiju *SOX14* gena.

4.14. Uticaj signalnog molekula „Sonic Hedgehog“ na ekspresiju *SOX14* gena

Kao što je već napomenuto, iz literature je poznato da je ekspresija *Sox14* gena zavisna od SHH signalnog molekula (Hargrave, Karunaratne, et al., 2000). Rezultati dobijeni u eksperimentima sa embrionima pileta i miša ukazuju na to da je pozicija *Sox14* pozitivnih ćelija u ventralnom delu kičmene moždine određena SHH induktivnim signalom koji potiče iz notohorde, i to na dozno zavisni način (Hargrave, Karunaratne, et al., 2000).

Kako bi se ispitalo da li postoji efekat SHH na ekspresiju *SOX14* gena u *in vitro* uslovima, korišćeni su rekombinantni SHH-N protein i U87MG ćelije. Ove ćelije imaju svojstvo da konstitutivno ekspimiraju SHH kao i članove ovog signalnog puta: *PTCH1*, *GLI1*, *GLI2*, *GLI3* (Dahmane, et al., 2001). Takođe, ove ćelije reaguju na ciklopamin, specifični inhibitor SHH signalnog puta, smanjenjem proliferacije u kulturi (Dahmane, et al., 2001).

SHH je ekstracelularni signalni molekul koji ostvaruje svoju funkciju vezujući se za receptor na membrani na način detaljno opisan u Uvodnom delu, poglavlje 1.7. Uticaj SHH na ekspresiju *SOX14* gena praćen je tako što su U87MG ćelije tretirane dodavanjem rekombinantnog SHH-N proteina u medijum u trajanju od 24 i 48h. Iz ćelija su zatim izolovani ukupni proteini i ukupna RNK koji su analizirani Western blot-om i RT-PCR-om. Dobijeni rezultati pokazali su da SHH-N dovodi do povećanja ekspresije *SOX14* gena, kako na nivou RNK, tako i na nivou proteina. Na proteinskom nivou uočen je povećan nivo ekspresije SOX14, naročito nakon prva 24h tretmana (Slika 31A). RT-PCR-om je pokazano da je nakon 24h došlo do povećanog nivoa ekspresije *SOX14* koje je nastavljeno i nakon 48h (Slika 31B). Na osnovu dobijenih rezultata zaključeno je da SHH utiče na povećanje endogenog nivoa ekspresije *SOX14* gena *in vitro*.

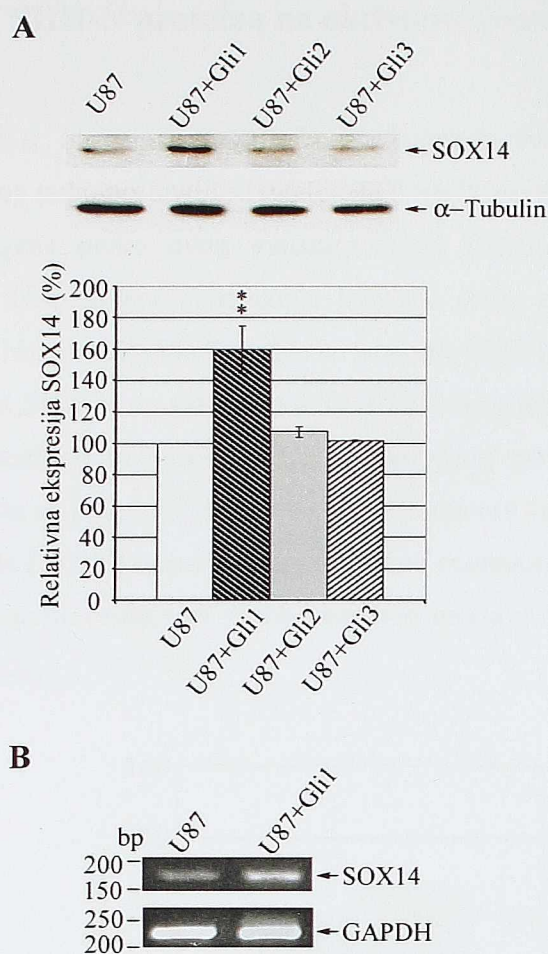


Slika 31. Uticaj SHH-N proteina na ekspresiju *SOX14* gena u U87MG ćelijama: A) Western blot analiza ukupnih ćelijskih proteina nakon tretmana sa rekombinantnim SHH-N proteinom. U eksperimentu su korišćeni ukupni proteini izolovani iz kontrolnih, netretiranih U87MG i ovih ćelija tretiranih SHH-N peptidom u trajanju od 24 i 48h. Tubulin je korišćen kao kontrola količine analiziranih proteina. Histogram predstavlja kvantifikaciju rezultata Western blot-a. Strelice označavaju pozicije SOX14 proteina i tubulina. Relativna ekspresija SOX14 proteina u tretiranim ćelijama izražena je kao procenat u odnosu na netretirane U87MG ćelije, koje su prikazane kao 100%. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm S.E.M. iz tri nezavisna eksperimenta. Srednje vrednosti su upoređene Studentovim t testom i statistička značajnost $p \leq 0.01$ je označena sa **. B) RT-PCR analiza *SOX14* ekspresije nakon tretmana U87MG ćelija sa SHH-N rekombinantnim proteinom. GAPDH je korišćen kao kontrola količine cDNK unete u reakciju. Strelice sa desne strane označavaju PCR produkte očekivane dužine za *SOX14* i *GAPDH*. Sa leve strane prikazan je marker dužina.

4.15. Uticaj povećane ekspresije *Gli1-3* transkripcionih faktora na ekspresiju *SOX14* gena

Glavni medijatori SHH signalnog puta su GLI1-3 transkripcioni faktori (Koebernick i Pieler, 2002). Da bi smo utvrdili da li GLI transkripcioni faktori, kao nizvodni efektori SHH signalnog puta, imaju uticaja na ekspresiju *SOX14* gena *in vitro*, urađeni su eksperimenti transijentne transfekcije sa ekspresionim vektorima za *GLI1*, *GLI2* i *GLI3* transkripcione faktore: pcDNA4NLSMTGLI1, p4TO6MTGLI2 i pcDNA4/TO/GLI3richtig. Nakon transfekcija, izolovani su ukupni ćelijski proteini a zatim je Western blot analizom praćen efekat na ekspresiju SOX14 proteina (Slika 32A). Tom prilikom pokazano je se ekspresija SOX14 proteina povećava samo u uslovima povećane ekspresije GLI1, dok se u uslovima povećane ekspresije GLI2 i GLI3, SOX14 protein zadržava na bazalnom nivou. Ekspresija SOX14 proteina bila je za oko 60% veća nakon transfekcije sa GLI1 ekspresionim vektorom.

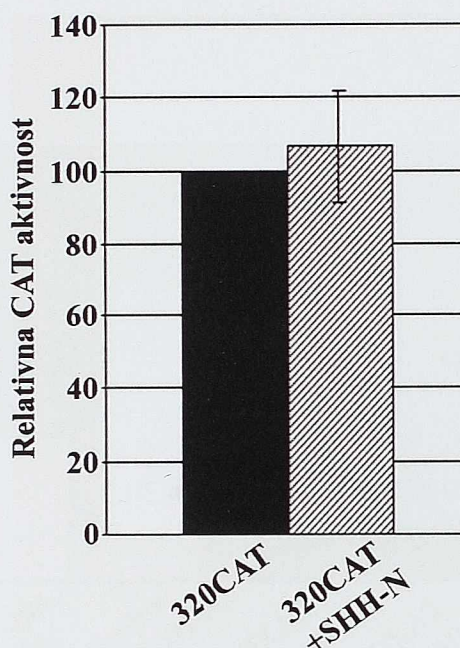
Kako bi se utvrdio efekat GLI1 povećane ekspresije i na nivo *SOX14* iRNK urađen je RT-PCR nakon transfekcije U87MG ćelija sa GLI1 ekspresionim vektorom. U ovom eksperimentu korišćena je ukupna RNK izolovana iz U87MG ćelija koje su transfekovane sa pcDNA4NLSMTGLI1 ekspresionim vektorom, kao i ukupna RNK izolovana iz kontrolnih, netransfekovanih ćelija. Ukupna RNK je zatim u prisustvu kratkih, heksamernih oligonukleotida prepisana u cDNK, a zatim je ovakva cDNK poslužila kao matrica u reakciji lančanog umnožavanja DNK sa oligonukleotidima specifičnim za *SOX14* gen. Uporedo sa ovom reakcijom urađena je i reakcija lančanog umnožavanja DNK sa oligonukleotidima specifičnim za *GAPDH* radi normalizacije tj. poređenja nivoa ekspresije pre i nakon transfekcije. Dobijeni rezultati su pokazali da je u uslovima povećane ekspresije GLI1 proteina u U87MG ćelijama došlo do značajnog povećanja nivoa *SOX14* iRNK (Slika 32B).



Slika 32. Uticaj GLI proteina na ekspresiju *SOX14* gena u U87MG ćelijama: A) Western blot analiza U87MG ukupnih ćelijskih proteina nakon transfekcije sa GLI1, GLI2 i GLI3 ekspresionim vektorima. Tubulin je korišćen kao kontrola količine analiziranih proteina. Strelice označavaju pozicije SOX14 proteina i tubulina. Količina SOX14 proteina u transfekovanim ćelijama izražena je kao procenat u odnosu na kontrolne, netransfekovane U87MG ćelije, koje su prikazane kao 100%. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm S.E.M. iz tri nezavisna eksperimenta. Srednje vrednosti su upoređene Studentovim *t* testom i statistička značajnost $p \leq 0.01$ je označena sa **. B) RT-PCR analiza *SOX14* ekspresije nakon transfekcije U87MG ćelija sa GLI1 ekspresionim vektorom. GAPDH je korišćen kao kontrola količine cDNK unete u reakciju. Strelice sa desne strane označavaju PCR produkte očekivane dužine za *SOX14* i *GAPDH*. Sa leve strane prikazan je marker dužina.

4.16. Uticaj SHH-N proteina na aktivnost konstrukta 320CAT5

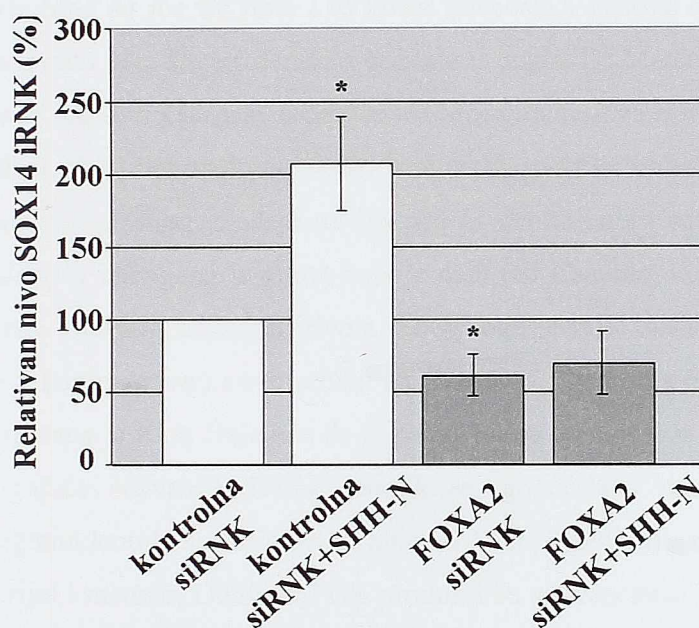
Pošto su podaci iz literature ukazali da je ekspresija FOXA2 transkripcionog faktora zavisna od SHH signalnog puta, postavilo se pitanje da li SHH ostvaruje svoje aktivatorsko dejstvo na ekspresiju *SOX14* gena preko ovog transkripcionog faktora. Kako bi smo ispitali ovu pretpostavku urađen je eksperiment transfekcije U87MG ćelija sa enhenser zavisnim reporter konstruktom 320CAT5. Nakon transfekcije ćelije su tretirane SHH-N rekombinantnim proteinom u trajanju od 48h, a efekat SHH-N na aktivnost 320CAT5 konstrukta praćen je CAT eliza imunoesejom. Dobijeni rezultati su pokazali da nema značajnog povećanja aktivnosti konstrukta 320CAT5 nakon tretmana sa rekombinantnim SHH-N proteinom (slika 33). Na osnovu dobijenih rezultata zaključeno je da FOXA2 transkripcioni faktor ne posreduje u indukciji ekspresije *SOX14* gena SHH-N rekombinantnim proteinom preko vezivnog mesta u okviru konstrukta 320CAT5 (-783/-470).



Slika 33: Uticaj rekombinantnog SHH-N proteina na aktivnost konstrukta 320CAT5: Normalizovana CAT aktivnost izražena je kao procenat u odnosu na transfekcije sa 320CAT5 konstruktom bez tretmana čija je aktivnost uzeta kao 100% i predstavljena kao srednja vrednost \pm S.E.M. iz tri nezavisna eksperimenta.

4.17. Uticaj *FOXA2* siRNK na indukciju ekspresije *SOX14* gena SHH-N rekombinantnim proteinom

Kako bi smo dodatno proverili hipotezu po kojoj *FOXA2* posreduje u odgovoru *SOX14* gena na aktivaciju SHH-N, urađen je eksperiment utišavanja ekspresije *FOXA2* primenom specifične siRNK i tretman sa SHH rekombinantnim proteinom. HepG2 ćelije su transfekovane sa kontrolnom i *FOXA2* specifičnom siRNK, tretirane sa SHH-N rekombinantnim proteinom, a zatim je praćen efekat na ekspresiju *SOX14* gena (slika 34). Naime, tretman ćelija transfekovanih sa kontrolnom siRNK i SHH-N peptidom, u trajanju od 24h, doveo je do porasta nivoa ekspresije *SOX14* gena na oko 200% u odnosu na netretirane ćelije, što je u skladu sa predhodno dobijenim rezultatima opisanim u poglavlju 4.13. Istovremeno, tretman sa SHH-N, u prisustvu *FOXA2* specifične siRNK, nije doveo do očekivanog povećanja ekspresije *SOX14* gena. Ekspresija *SOX14* gena ostala je na istom nivou koji je dobijen i nakon tretmana sa *FOXA2* siRNK, tj. na oko 60% (slika 34).



Slika 34. Efekat smanjene ekspresije *FOXA2* na indukciju ekspresije *SOX14* gena SHH-N rekombinantnim proteinom: Tretman sa *FOXA2* siRNK doveo je do pada nivoa iRNK *SOX14* gena ali i smanjenog odgovora na indukciju SHH-N (uporediti bele stupce sa sivim). Relativan nivo *SOX14* iRNK izražen je u odnosu na nivo iRNK u ćelijama koje su transfekovane sa kontrolnom siRNK koji je prikazan kao 100%. Rezultati su predstavljeni kao srednja

vrednost \pm S.E.M. najmanje tri nezavisna eksperimenta. Srednje vrednosti su poređene u Studentovom *t*-testu. Vrednosti za koje je $p \leq 0.05$ predstavljene su sa jednom zvezdicom (*).

Ovi rezultati ukazuju na to da utišavanje *FOXA2* smanjuje sposobnost SHH-N da indukuje ekspresiju *SOX14* gena u HepG2 ćelijama, što navodi na zaključak da je aktivacija *SOX14* gena SHH-N signalnim peptidom zavisna od *FOXA2* transkripcionog faktora.

4.18. Analiza SOX14 proteina

Pored analize promotorskog regiona, urađena je i komparativna analiza kodirajućeg regiona *SOX14* gena i proteinske sekvence. Ova analiza je rađena kako bi se utvrdio stepen očuvanosti kodirajuće sekvence tokom evolucije kao i da bi se identifikovali specifični domeni karakteristični za ovaj protein. Pretraživanjem baze podataka sekvenciranih genoma različitih kičmenjaka, pronađene su kodirajuće sekvence *Sox14* gena kod trinaest vrsta. Ove vrste su obuhvatile sledeće klase kičmenjaka: *Osteichthyes* (ribe sa koštanim skeletom), *Amphibia* (vodozemci), *Aves* (ptice) i *Mammalia* (sisari). Najveći broj analiziranih vrsta pripadao je klasi sisara. U komparativnu analizu *Sox14* gena uključene su jos tri vrste i to koze, govečeta i pacova čija je sekvenca *Sox14* gena utvrđena u ovom radu, kao što je detaljno opisano u poglavlju Materijal i Metode. Naime, koza i goveče spadaju u red *Artiodactyla*, jedan od najbrojnijih redova sisara koji je rasprostranjen na svim kontinentima. Ovaj red obuhvata veliki broj vrsta među kojima su svinje, ovce i kamile, koje su od izuzetnog ekonomskog značaja za čoveka. U evolutivnom smislu, od zajedničkog pretka dansnjih *Artiodactyla* izdvojena je grana koja je dala red *Cetacea*, koji obuhvata kitove i delfine, sisare prilagođene vodenim uslovima života. Zbog toga je bilo značajno uvrstiti sekvence iz ove grupe životinja u komparativnu i evolutivnu analizu *Sox14* gena. Sa druge strane, sekvenca *Sox14* gena pacova odabrana je zbog činjenice da je pacov jedna od najčešće korišćenih eksperimentalnih životinja. Kodirajuće sekvence *Sox14* gena koze, govečeta i pacova dobijene su PCR-om, korišćenjem oligonukleotida specifičnih za humani *SOX14* gen, čije sekvence su date u tabeli 4 u poglavlju Materijal i metode. Dobijeni PCR produkti su sekvencirani a sekvence su deponovane u bazi podataka pod sledećim brojevima: koza (*Capra hircus*) EU853675, goveče (*Bos taurus*) EU853676 i pacov (*Rattus norvegicus*) EU853677.

Poređenje kodirajuće sekvence *SOX14/Sox14* gena kod svih šesnaest vrsta ukazalo je na visok stepen evolutivne očuvanosti kako u okviru HMG boksa tako i izvan njega (slika 39D). Procenat identičnosti u odnosu na sekvencu humanog *SOX14* gena prikazan je u tabeli 7.

Vrsta	Identičnost nukleotidne sekvence u poređenju sa humanim <i>SOX14</i> genom (%)	Identičnost proteinske sekvence u poređenju sa humanim <i>SOX14</i> proteinom (%)
<i>Homo sapiens</i>	-	-
<i>Pan troglodytes</i>	99	100
<i>Macaca mulatta</i>	98	100
<i>Canis familiaris</i>	96	100
<i>Equus caballus</i>	96	100
<i>Capra hircus</i>	96	100
<i>Bos taurus</i>	96	100
<i>Mus musculus</i>	95	99
<i>Rattus norvegicus</i>	95	99
<i>Monodelphis domesticus</i>	84	94
<i>Ornithorinchus anatinus</i>	88*	94*
<i>Gallus gallus</i>	84	96
<i>Xenopus tropicalis</i>	76	89
<i>Danio rerio</i>	77	91
<i>Oreochromis aureus</i>	79	90
<i>Takifugu rubripes</i>	78	90

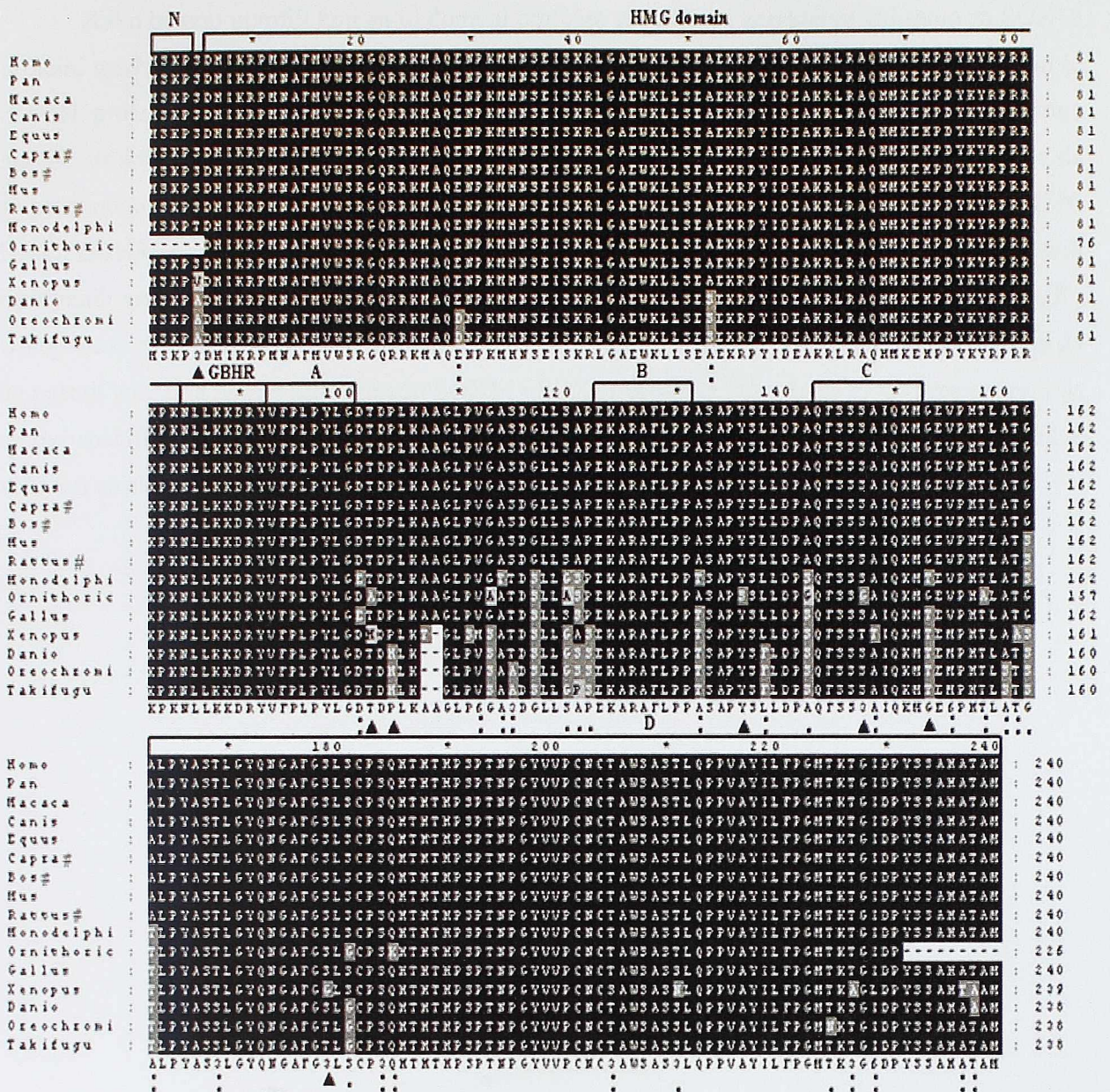
Tabela 7. Analiza sekvence *SOX14* ortologa: *Homo sapiens* (čovjek), *Pan troglodytes* (šimpanza), *Macaca mulatta* (rezus majmun), *Canis familiaris* (pas), *Equus caballus* (konj), *Bos taurus* (goveče), *Capra hircus* (koza), *Mus musculus* (miš), *Rattus norvegicus* (pacov), *Monodelphis domesticus* (oposum), *Ornithorhynchus anatinus* (kljunar), *Gallus gallus* (pile), *Xenopus tropicalis* (afrička žaba), *Danio rerio* (zebrica), *Oreochromis aureus* (tilapia), *Takifugu rubripes* (*fugu* riba). * Rezultati dobijeni na osnovu nekompletne sekvence u bazi podataka

Poređenje sekvence humanog *SOX14* proteina sa *SOX14* odgovarajućim sekvencama ortologa pokazalo je takođe visok stepen identičnosti (slika 35) a procenat identičnosti u odnosu na sekvencu humanog *SOX14* proteina prikazan je u tabeli 7.

Pošto su predhodne analize pokazale prisustvo konzerviranih domena u okviru *SOXB* grupe proteina (Uchikawa, et al., 1999), pristupilo se analizi evolutivne očuvanosti ovih regiona

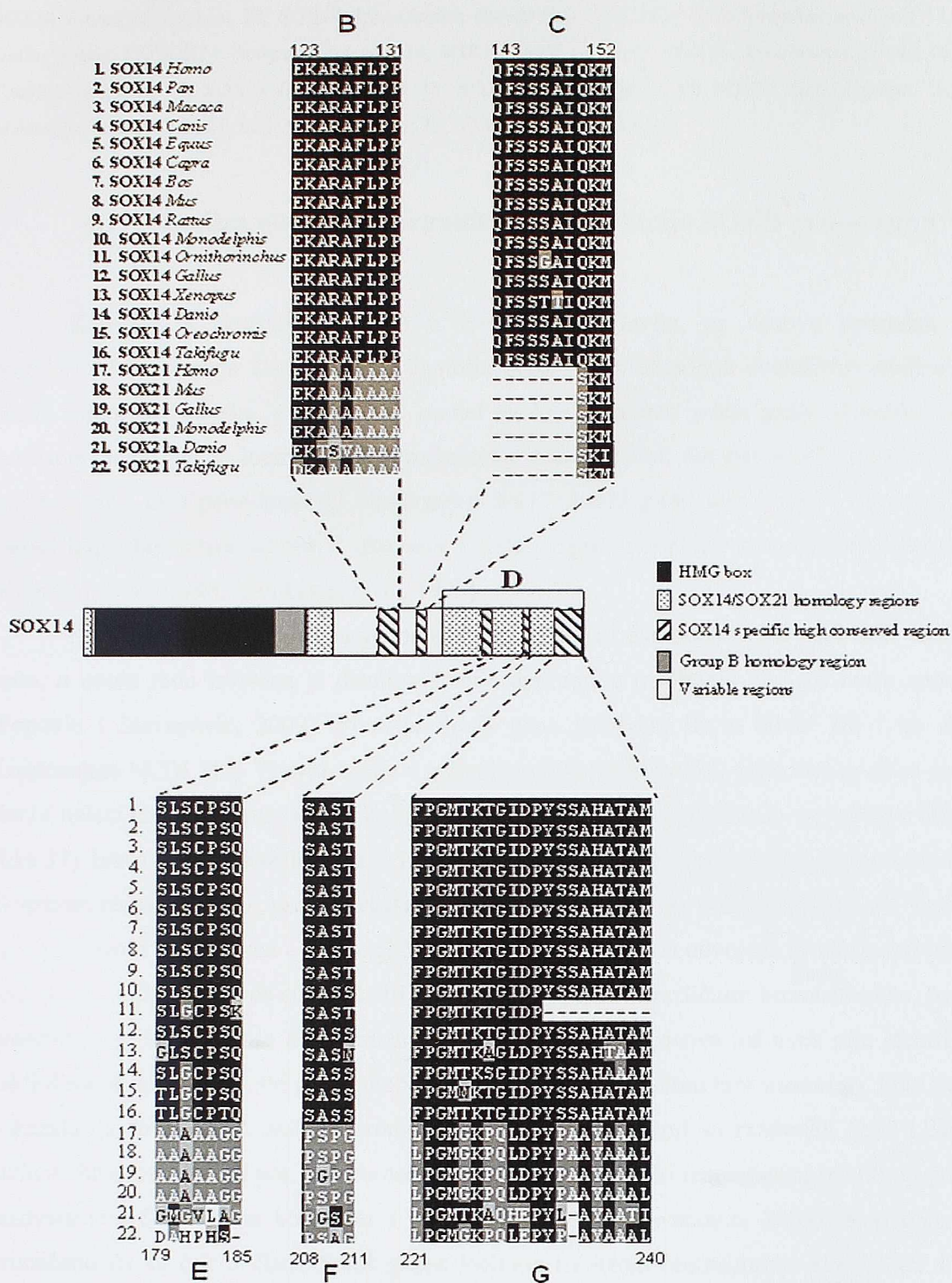
(slika 35). Analiza sekvence je pokazala da kod svih ispitivanih vrsta SOX14 protein počinje sa istom sekvencom dužine četiri amino-kiseline (MSKP) što je na slici 35 označeno kao blok N. Ranije je pokazano da je ovaj blok amino-kiselina specifičan za podgrupu SOXB2 proteina (SOX14 i SOX21) (Uchikawa, et al., 1999). U ovom radu potvrđena je njegova očuvanost kod svih ispitivanih vrsta, što ukazuje na funkcionalni značaj ovog regiona. Kao što je i očekivano, najviši stepen očuvanosti sekvence potvrđen je u okviru HMG domena. Jedine izmene primećene su na pozicijama 29 i 52 kod tilapije i fugu ribe. Takođe, pokazano je da su predhodno identifikovan signal za nuklearnu lokalizaciju (sekvenca deponovana pod brojem AJ006230, pozicije od 66-83 ak u humanom SOX14 proteinu, (Arsic, et al., 1998)), kao i visoko konzerviran region karakterističan za B grupu SOX proteina (GBHR, pozicija 85-92 slika 35) (Uchikawa, et al., 1999). identični kod svih ispitivanih vrsta. Pored toga, identifikovana su još dva bloka amino-kiselina, na slici označeni kao blokovi A (pozicija 93-100) i B (pozicija 123-131) koji poseduju potpuno očuvane amino kiseline kod svih analiziranih vrsta. U okviru blokova C i D primećene su konzervisane i polukonzervisane amino-kiselinske zamene na pozicijama 148, 163, 169, 181, 185, 211, 225, 227, 237 i 238. Nekonzervisane amino-kiselinske zamene na pozicijama 148 i 179 primećene su kod kljunara i afričke žabe. Takođe, u okviru regiona C i D primećena je potpuna očuvanost ovih regiona kod sisara.

Na ovaj način su identifikovani visoko konzervirani regioni SOX14 proteina koji su očuvani tokom evolucije kod svih analiziranih vrsta.



Slika 35. Poređenje amnio-kiselinske sekvence SOX14 ortologa: Identične amino-kiseline su osenčene crnom bojom dok su slične amino-kiseline osenčene sivom bojom. Amino-kiselinske zamene (:) konzervisane; (.) polu-konzervisane; (▲) nekonzervisane; # sekvencu SOX14 proteina koze, govečeta i pacova, prvi put definisana u ovom radu. N, N-terminus SOX14 specifičan za B2 podgrupu SOX proteina. HMG domen, “high mobility group” vezujući domain; GBHR, homologni region B grupe; A, B, C, D, visoko konzervirani regioni SOX14 proteina.

Kako bi smo utvrdili koji su to domeni proteina specifični i karakteristični samo za SOX14 protein, urađeno je poređenje SOX14 i SOX21 ortologa (slika 36). Za ovo poređenje odabran je SOX21 protein, koji zajedno sa SOX14 proteinom, sačinjava SOXB2 podgrupu, koji pokazuje najviše strukturnih i funkcionalnih sličnosti sa SOX14 proteinom. Ovom analizom pokazano je da su predhodno identifikovani zajednički konzervisani regioni SOX14 i SOX21 proteina: blokovi N, HMG, GBHR, A, i kratki segmenti u okviru regiona D (Uchikawa, et al., 1999), identični kod svih ispitivanih vrsta. Ova analiza je takođe omogućila definisanje 5 regiona označenih kao B, C, E, F i G koji su se pokazali specifičnim za SOX14 protein. Naime, u okviru ovih regiona pokazano je da ne postoji značajna homologija između SOX14 i SOX21 proteina, tako da se može pretpostaviti da su ovi specifični blokovi amino-kiselina upravo oni domeni koji su od strukturne i funkcionalne važnosti za aktivnost SOX14 proteina.



Slika 36. Šematska ilustracija organizacije SOX14 proteina kao i poređenje sa SOX21 proteinom: B, C, E, F i G, SOX14-specifični regioni. 1. SOX14 *Homo sapiens*; 2. SOX14 *Pan troglodytes*; 3. SOX14 *Macaca mulatta*; 4. SOX14 *Canis familiaris*; 5. SOX14 *Equus caballus*; 6. SOX14 *Capra hircus*; 7. SOX14 *Bos taurus*; 8. SOX14 *Mus musculus*; 9.

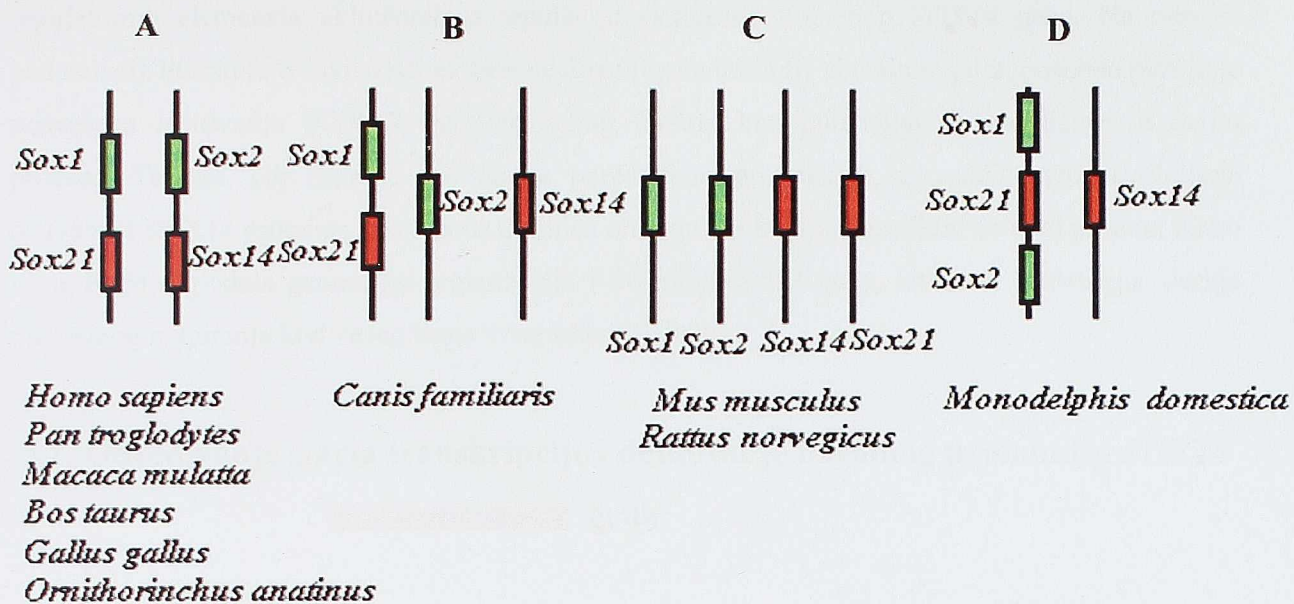
SOX14 *Rattus norvegicus*; 10, SOX14 *Monodelphis domestica*; 11, SOX14 *Ornithorinchus anatinus*; 12, SOX14 *Gallus gallus*; 13, SOX14 *Xenopus tropicalis*, 14, SOX14 *Danio rerio*, 15, SOX14 *Oreochromis aureus*; 16, SOX14 *Takifugu rubripes*; 17, SOX21 *Homo sapiens*; 18, SOX21 *Mus musculus*; 19, SOX21 *Gallus gallus*; 20, SOX21 *Monodelphis domestica*; 21, SOX21 *Danio rerio*; 22, SOX21 *Takifugu rubripes*.

4.19. Analiza genomske organizacije i evolucije SOXB grupe gena

Kao što je detaljnije opisano u Uvodnom poglavlju, na osnovu uporedne analize hromozomskih lokacija članova SoxB familije gena kod međusobno evolutivno udaljenih vrsta pileta, kljunara i čoveka, predložen je model evolucije za ovu grupu gena. U skladu sa ovim modelom *Sox3* gen je lociran na X hromozomu dok su ostali članovi SoxB grupe locirani na autozomima i to u parovima koji obuhvataju: *Sox1* i *Sox21* gene, kao i *Sox2* i *Sox14* gene. Ovi parovi koji obuhvataju po jedan aktivator i jedan represor locirani su na istim hromozomima (Kamachi, et al., 1998; Uchikawa, et al., 1999).

Kako bi se bolje sagledala genomska organizacija i evolucija SoxB gena kod većeg broja vrsta, u ovom radu izvršena je detaljna studija uporednog mapiranja kod još osam vrsta sisara (Popovic i Stevanovic, 2009). Pozicije SoxB gena prikazane su u tabeli D2 i na slici 37. Korišćenjem NCBI Map Viewer opcije u pretraživanju baze podataka, pokazano je da se par *Sox2-Sox14* nalazi na istom hromozomu kod čoveka, šimpanze, rebus majmuna i govečeta (Tabela D1, slika 37). Ista analiza pokazala je da se i par *Sox1-Sox21* nalazi na istim hromozomima kod čoveka, šimpanze, rebus majmuna, psa, govečeta i oposuma, dok je kod psa pokazano da se par *Sox1-Sox21* nalazi na istom hromozomu a par *Sox2-Sox14* je razdvojen na dva odvojena hromozoma. Međutim, kod miša je pokazano je da su sva četiri gena pozicionirana na različitim hromozomima. Analizom susednih genetičkih lokusa koji okružuju *Sox1* gen koji kod pacova još uvek nije identifikovan, zaključeno je da su sva četiri gena takođe pozicionirana na različitim hromozomima. Ova analiza je pokazala da su se desili dodatni hromozomski rearanžmani koji su razdvojili *Sox2* i *Sox14* na različite hromozome kod psa, dok su neki složeniji hromozomski rearanžmani rezultirali potpunim razdvajanjem SoxB gena kod miša i pacova (Popovic i Stevanovic, 2009). Kod oposuma je primećeno da su čak 3 člana SoxB grupe locirana na istom hromozomu: *Sox1*, *Sox2* i *Sox21*. Moguće je da je tokom evolucije ove vrste, nakon organizacije SoxB gena u dve grupe (aktivator-represor), došlo do nejednakog krosing-overa i translokacije *Sox2* gen na hromozom na kom su se nalazili *Sox1* i *Sox21*. Ako izuzmemo ove dodatne rearanžmane koji su se desili kod psa, oposuma,

pacova i miša, organizacija SoxB gena kod amniota je u skladu sa predloženim modelom evolucije (Okuda, et al., 2006).



Slika 37. Shematska ilustracija hromozomskih lokacija SoxB grupe gena kod različitih vrsta Vertebrata: Zelenom bojom su predstavljeni aktivatori *Sox1* i *Sox2*, crvenom bojom su predstavljeni represori *Sox14* i *Sox21*. A,B,C,D: Hromozomalne pozicije SoxB gena kod navedenih vrsta određene su na osnovu literaturnih podataka i pretraživanjem baze podataka.

5. DISKUSIJA

Cilj ovog rada bilo je određivanje starta transkripcije *SOX14* gena i definisanje novih regulatornih elemenata uključenih u regulaciju ekspresije humanog *SOX14* gena. Na osnovu podataka iz literature o zavisnosti ekspresije *Sox14* gena od SHH signalnog puta, posebna pažnja je posvećena ispitivanju FOXA2 transkripcionog faktora kao potencijalnog medijatora u ovom procesu. Takođe, cilj rada je bio da se poređenjem proteinskih sekvenci utvrdi evolutivna očuvanost SOX14 proteina, kao i da se definišu oni domeni koji su specifični za ovaj protein. Kako bi se bolje sagledala genomska organizacija i evolucija SoxB gena, izvršena je detaljna studija uporednog mapiranja kod većeg broja vrsta kičmenjaka.

5.1. Određivanje starta transkripcije i definisanje bazalnog promotora *SOX14* gena

Precizna analiza 5' nekodirajućeg regiona nekog gena uključuje eksperimentalno određivanje starta transkripcije. U ovom radu korišćenjem totalne RNK izolovane iz HepG2 ćelija i primenom metode elongacije oligonukleotida ("primer extension") određen je start transkripcije *SOX14* gena. Ovim eksperimentom pokazano je da transkripcija *SOX14* gena otpočinje na G nukleotidu, 251 bp udaljenom od ATG kodona (Slika 15) (Djurovic i Stevanovic, 2004). U eksperimentima tokom kojih je identifikovan humani *SOX14* gen otkriveno je da ovaj gen kodira protein dužine 240 amino-kiselina, što implicira da je dužina kodirajuće sekvence 720 bp (Arsic, et al., 1998). Analiza strukture *SOX14* gena i definisanje 3' kraja, korišćenjem 3'RACE metode (Arsic, et al., 1998), pokazalo je da nizvodno od kodirajućeg regiona sledi 826 bp dugačka 3' nekodirajuća sekvenca sa poliA sekvencom na kraju. Rezultat dobijen određivanjem starta transkripcije *SOX14* gena koji je udaljen 251bp od ATG kodona, ukazuje da je ukupna dužina *SOX14* transkripta 1770nt. Dobijeni rezultat je u korelaciji sa dužinom *SOX14* iRNK koja je identifikovana Northern blot analizom u HepG2 ćelijama (Arsic, et al., 1998).

U cilju razumevanja molekularnih mehanizama odgovornih za regulaciju ekspresije *SOX14* gena, dalja istraživanja su bila usmerena ka definisanju i analizi promotorskog regiona ovog gena. Naime, sledeći korak u ispitivanju 5' nekodirajućeg regiona *SOX14* gena bio je generisanje promotor-reporter konstrukata, a aktivnost dobijenih delecionih konstrukata analizirana je u

eksperimentima tranzijentne transfekcije u HepG2 ćelijama. Funkcionalna analiza prikazana u ovom radu je ukazala da region -470/+201, sadrži regulatorne elemente neophodne za bazalnu transkripcionu aktivnost humanog *SOX14* gena i da samim tim predstavlja minimalni promotorski region (Slika 16) (Djurovic i Stevanovic, 2004). Reporterski konstrukt u kome je ovaj isti region ukloniran u obrnutoj orijentaciji nije doveo do aktivacije reporterskog gena, što predstavlja očekivani rezultat, s obzirom na to da je prema podacima iz literature aktivnost promotorskih sekvenci zavisna od orijentacije (Gill, 1994). Deleciona analiza promotor-reporter konstrukata, zahvaljujući kojoj je definisan minimalni promotorski region *SOX14* gena, razotkrila je i prisustvo pozitivnih *cis* regulatornih elemenata u okviru regiona -1123/-470, koji su neophodni za optimalnu, ali ne i za bazalnu promotorsku aktivnost *SOX14* gena (Slika 16) (Djurovic i Stevanovic, 2004). U prisustvu oba regiona (-1123/-470 i -470/+201) obezbeđena je puna promotorska aktivnost *SOX14* gena (Slika 16).

5.2. Definisane pozitivnog kontrolnog regiona *SOX14* promotora

Na početku eksperimentalne analize pozitivnog *cis* regulatornog elementa, izvršeno je kloniranje fragmenta *PstI-PstI* (1326bp) u pBLCAT5 vektor koji je pogodan za ispitivanje aktivatorskih i/ili represorskih svojstava regiona od interesa, zbog toga što je u ovom vektoru ispred *cat* reporter gena ukloniran timidin kinazni promotor (*tk*). U cilju definisanja pozitivnog kontrolnog elementa humanog *SOX14* promotora, izvršeno je subkloniranje regiona -1123/-470 u pBLCAT5 vektor (slika 3). Tom prilikom dobijen je konstrukt 650CAT5, čijim daljim subkloniranjem je dobijen konstrukt 320CAT5. Analizom CAT aktivnosti ovih promotor-reporterskih konstrukata u HepG2 ćelijama pokazano je da je njihova aktivnost veća približno 1.7 i 2.6 puta u odnosu na konstrukt 1300CAT5 (slika 17). Najveću aktivnost je pokazao upravo najkraći delecioni konstrukt 320CAT5 koji obuhvata region -783/-470. Ovi rezultati su nesumnjivo pokazali da se u okviru regiona -783/-470 nalazi pozitivan kontrolni region. Takođe, na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da se u regionu -1123/-783 nalazi negativni kontrolni element(i), što ukazuje na modularnu prirodu *cis* regulatornih elemenata uključenih u transkripcionu regulaciju *SOX14* gena. Naime, nakon delecije ovog regiona iz konstrukta 650CAT5 (konstrukt 320CAT5) došlo je do povećanja CAT aktivnosti, što se jasno može videti na histogramu prikazanom na slici 17. Na osnovu dobijenih rezultata definisan je pozitivan kontrolni region (*SmaI-XbaI*) u okviru *SOX14* optimalnog promotora koji je dalje bio predmet analize.

5.3. U87MG ćelijska linija kao novi model sistem u proučavanju ekspresije *SOX14* gena

Ekperimenti u kojima je definisan bazalni promotor *SOX14* gena kao i pozitivni kontrolni region u okviru optimalnog promotora urađeni su u HepG2 ćelijama koje su poreklom iz hepatocelularnog karcinoma. Kako je jedan od ciljeva ovog rada ispitivanje uticaja SHH signalnog molekula na ekspresiju humanog *SOX14* gena *in vitro*, za naredne eksperimente bilo je neophodno odabrati ćelijsku liniju koja konstitutivno eksprimira gene uključene u SHH signalni put. U trenutku kada su eksperimenti definisanja bazalnog promotora urađeni, u literaturi nije bilo podataka o aktivnom SHH signalnom putu u HepG2 ćelijama. Zbog toga je za dalja istraživanja odabrana U87MG ćelijska linija, poreklom iz humanog glioblastoma, upravo zbog svoje osobine da konstitutivno eksprimira gene koji su obuhvaćeni SHH signalnim putem. Pored ovih podataka bilo je neophodno ispitati da li ova ćelijska linija eksprimira *SOX14* gen, odnosno da li se u ovim ćelijama može analizirati regulacija ekspresije *SOX14* gena. U Western blot eksperimentima potvrđena je ekspresija *SOX14* gena u ovim ćelijama, a na osnovu prikazanih rezultata (slika 18) može se zaključiti da je nivo ekspresije *SOX14* proteina u U87MG ćelijama niži u poređenju sa HepG2 ćelijama. Kako bi se utvrdilo da li reporter konstrukti korišćeni za definisanje minimalnog pozitivnog kontrolnog regiona *SOX14* gena u HepG2 ćelijama pokazuju aktivatorska svojstva i u U87MG ćelijama, ponovljeni su eksperimenti tranzijentne transfekcije sa konstruktima 1300CAT5 i 320CAT5. Na osnovu dobijenih rezultata zaključeno je da pozitivan kontrolni region *SOX14* gena prisutan u reporter konstruktu 320CAT5, ima aktivatorsko svojstvo ne samo u HepG2 već i u U87MG ćelijama (slika 19). Poređenjem aktivnosti pozitivnog kontrolnog regiona (-783/-470) u okviru reporter konstrukta 320CAT5, u odnosu na reporter konstrukt 1300CAT5, zaključeno je da je aktivnost ovog regiona približno dva puta veća u U87MG ćelijama u poređenju sa HepG2 ćelijama. Ovi rezultati su dodatno ukazali da U87MG ćelijska linija može biti dobar model sistem za dalja istraživanja vezana za analizu regulacije ekspresije *SOX14* gena.

5.4. Kompjuterska analiza pozitivnog kontrolnog regiona *SmaI-XbaI*

Pretraživanje pozitivnog kontrolnog regiona (-783/-470) programom MatInspector (Quandt, et al., 1995) u cilju identifikacije transkripcijskih faktora koji su potencijalno odgovorni za njegovu aktivatorsku sposobnost, pokazalo je niz vezivnih mesta za različite transkripcijske faktore. Detaljnom analizom svakog faktora izdvojeno je nekoliko interesantnih:

MYT1 (Myelin transcription factor 1) kodira DNK vezujući protein sa cinkanim prstićima, koji pripada grupi neuralno specifičnih proteina koji se vezuje za promotorske regione gena koji su važni za razviće nervnog sistema (Booher, et al., 1997)

FOXQ1 (Forkhead box Q1) je član familije Fox transkripcijskih faktora i nedavno je otkrivena njegova uloga u sekreciji želudačne kiseline i ekspresiji mucina kod miša (Verzi, et al., 2008). Takođe, pokazano je da je humani FOXQ1 ekspresiran stomaku, trahejama, bešici, pljuvačnim žlezdama kao i u kolorektalnom karcinomu (Bieller, et al., 2001).

HNF4 (Hepatocyte Nuclear Factor 4) spada u grupu nuklearnih receptora i je ključan za razviće jetre. Ekspresiran je još u crevima, bubrezima i beta ćelijama pankreasa. Kod čoveka postoje 2 izoforme ovog proteina (alfa i gama) koji su kodirani od strane *HNF4α* i *HNF4γ* gena (Chartier, et al., 1994). Mutacije u *HNF4α* povezane su sa nastankom dijabetesa tipa 1 (MODY1) (Fajans, et al., 2001). Vezivanjem linoleinske kiseline kao liganda, HNF4 prepoznaje konsenzus sekvencu AGGTCAaAGGTCA i potpomaže aktivaciju transkripcije (X. Yuan, et al., 2009).

GATA 1 (Erythroid transcription factor) je član familije GATA transkripcijskih faktora uključenih u regulaciju ćelijskog rasta i nastanak kancera (Caiulo, et al., 1991). GATA1 protein ima važnu ulogu u razviću crvenih krvnih zrnaca, regulišući ekspresiju globina tokom prelaska iz fetalne u adultnu formu (Ohneda i Yamamoto, 2002). Mutacije u egzonu 2 *GATA1* gena prisutne su kod gotovo svih pacijenata sa Daunovim sindromom i akutnom megakarioblastičnom leukemijom (Wechsler, et al., 2002).

TCF/LEF1 (Lymphoid enhancer factor/T cell factor (Lef/Tcf)) transkripcijski faktori formiraju kompleks sa beta-kateninom koji je glavni medijator Wnt signalnog puta. Prenošenje signala preko beta-katenina ostavruje se njegovom degradacijom i nuklearnom translokacijom. U finalnom koraku beta-katenin-Tcf/Lef signalnog puta, beta-katenin vezuje pontin52-TATA vezujući protein i izmešta Groucho-srodne ili CREB vezujuće korepresore od Tcf/Lef kompleksa, što zatim dovodi do aktivacije transkripcije. Tokom razvića beta-katenin-Tcf/Lef signalni put je

uključen u formiranje dorzalnog mezoderma i dorzalne ose. Poremećaji u ovom signalnom putu povezani su sa nastankom kancera (Novak i Dedhar, 1999).

FOXA2 (HNF3 β) je član Forkhead familije proteina važan za različite procese tokom razvića (Friedman i Kaestner, 2006). Embrioni miša koji nemaju nijedan funkcionalan *Foxa2* alel, nemaju notohordu, zbog čega nastaje poremećaj u formiranju dorzoventralne organizacije nervne cevi i somita (Weinstein, et al., 1994). Pokazano je da ekspresija nekoliko članova *Fox* familije gena uključujući i *Foxa2*, zavise od SHH–Ptch–Smo–Gli signalnog puta (Sasaki, et al., 1997).

Jezgra vezivnih mesta za navedene transkripcione faktore prepoznata su od strane MatInspector programa sa verovatnoćom od 100% u okviru regulatorne sekvence humanog *SOX14* gena. Takođe, poređenje sekvenci čoveka, šimpanze, zec, govečeta, psa, pacova i miša pokazalo je da su mesta za vezivanje MYT1, FOXQ1 i FOXA2 transkripcione faktore očuvana i po nukleotidnom sastavu i po poziciji u promotorskim regionima, kod svih analiziranih ortologa (Slika 20) (Kovacevic-Grujicic, et al., 2008). Očuvanost sekvence i pozicije vezivnih mesta za ove transkripcione faktore može da ukaže na njihov funkcionalni značaj.

5.5. Potencijalna uloga FOXA2 transkripcionog faktora u posredovanju SHH signalnog puta tokom regulacije ekspresije *SOX14* gena

Razviće nervnog sistema regulisano je sekretornim signalnim molekulima tj, morfogenima na način koji je strogo regulisan vremenski i postorno. Jedan od najvažnijih morfogena u CNS-u uključuje članove HH (Hedgehog) i FGF (fibroblast growth factor) signalnih puteva. Na osnovu *in vivo* studija ekspresije *Sox14* gena, koji su pokazali da visoke doze signalnog peptida SHH-N i egzogenog Gli1 dovode do indukcije ekspresije *Sox14* gena u eksplantima poreklom iz dorzalnog talamusa, naša pažnja je bila usmerena na traženje onog (ili onih) transkripcionog faktora koji bi posredovao u aktivaciji *SOX14* gena signalnim molekulom SHH. Literaturni podaci ukazuju da je ekspresija *Sox14* gena dozno zavisna od signalnog molekula "Sonic hedgehog" (SHH) koji je sekretovan od strane notohorde. Ekspresija *Sox14* gena indukovana je pri nižim koncentracijama ovog signalnog molekula, dok pri višim koncentracijama *Sox14* nije detektovan. Ovi rezultati ukazuju na to da je pozicija *Sox14* pozitivnih ćelija u ventralnom delu kičmene moždine određena koncentracijom Shh signalnog molekula koji potiče iz notohorde i podne ploče ("floor plate"-morfološki: ventralni deo nervne cevi) *in vivo* i to na dozno zavisni način. U eksperimentima sa eksplantima notohorde pokazano je da su *Sox14* pozitivne

ćelije pozicionirane u zavisnosti od koncentracije SHH u dorzoventralnom gradijentu (Hargrave, Karunaratne, et al., 2000). Duž dorzo-ventralne zone kičmene moždine postoji fini gradijent koncentracije SHH signalnog molekula (Goodrich i Scott, 1998), od koga zavisi pozicioniranje motoneurona i interneurona tokom razvića. Važno je istaći ovom prilikom da se *Sox14* pozitivni interneuroni nalaze na tačno određenoj poziciji u odnosu na ventralne motoneurone i u odnosu na ventralni deo kičmene moždine, koji je centar sekrecije SHH, što ukazuje, i u ovom slučaju, na doznu zavisnost ekspresije *Sox14* gena od SHH (Hargrave, Karunaratne, et al., 2000).

Pretraživanjem kako pozitivnog kontrolnog regiona (*SmaI-XbaI*) tako i sekvence optimalnog promotora (*PstI-PstI*) nije utvrđeno prisustvo vezivnog mesta za GLI transkripcione faktore. Međutim, literaturni podaci ukazali su na vezu između transkripcionog faktora FOXA2 i SHH signalnog puta, što je dovelo do ideje da se uloga ovog transkripcionog faktora detaljnije ispita. Naime, *Foxa2* je aktivator ekspresije *Shh* gena u aksijalnom mezodermu i podnoj ploči (Ang i Rossant, 1994; Echelard, et al., 1993; Marti, et al., 1995; Monaghan, et al., 1993; Sasaki i Hogan, 1993). Takođe, potvrđeno je da SHH indukuje ekspresiju *Foxa2* do trenutka kada njegova koncentracija ne dostigne određeni nivo, a zatim sam *Foxa2* pozitivnom povratnom spregom održava ekspresiju *Shh* gena (Sasaki i Hogan, 1994).

Sekvenca konsenzus vezivnog mesta za FOXA2 koja glasi AC/TAAC/AT/CG/A (Ceelie, et al., 2003) detektovana je na – lancu regulatornog regiona *SOX14* gena, na poziciji -512/-505. Kao što je već napomenuto, poređenjem ortolognih sekvenci ovog regiona kod sisara pokazano je da je FOXA2 vezivno mesto evolutivno očuvano, kako po nukleotidnom sastavu tako i po poziciji.

Međutim, kod glodara su primećena izvesna odstupanja u sekvenci vezivnog mesta za ovaj transkripcioni faktor (slika 21). I ako su prisutne ove izmene, MatInspector program je i kod glodara prepoznao vezivno mesto za *Foxa2* sa nešto manjom verovatnoćom vezivanja (0.78 za jezgro vezivnog mesta i 0.82 za prateću sekvencu). Nedavna istraživanja *in vivo* vezivanja *Foxa2* za promotorske regione ortolognih gena u primarnim hepatocitama pokazala su da je vezivanje ovog transkripcionog faktora specifično za vrstu, tako da pomenute promene u nukleotidnoj sekvenci i manja verovatnoća vezivanja ne isključuju mogućnost vezivanja *Foxa2* transkripcionog faktora za odgovarajući region kod miša i pacova (Odom, et al., 2007).

Na osnovu prikazanih rezultata o očuvanosti vezivnog mesta za FOXA2 transkripcioni faktor, zatim podataka iz literature o ulozi ovog transkripcionog faktora u regulaciji ekspresije drugih *SOX* gena, kao i zavisnost njegove ekspresije od SHH signalnog puta (Sasaki i Hogan, 1994), urađena je detaljna analiza uloge FOXA2 transkripcionog faktora u regulaciji ekspresije humanog *SOX14* gena

5.6. Uloga FOXA2 transkripcionog faktora u regulaciji ekspresije *SOX14* gena

Potencijalna uloga FOXA2 transkripcionog faktora u regulaciji ekspresije *SOX14* gena detaljno je ispitana u ovom radu. EMSA i „superšift“ reakcijama sa jedarnim proteinima iz HepG2 i U87MG ćelija pokazano je da se za Probu 36, koja sadrži konsenzus vezivno mesto za FOXA2 transkripcioni faktor, formiraju specifični protein-DNK kompleksi. U prisutvu FOXA2 specifičnog antitela došlo je do formiranja „superšifta“ čime je pokazano da se za Probu 36 vezuje FOXA2 transkripcioni faktor iz jedarnih proteina obe ćelijske linije (slike 22 i 24). Specifičnost vezivanja ovog proteina za Probu 36 dokazana je, kako kompeticijom sa neobebeženom probom koja sadrži konsenzusno vezivno mesto (slika 22) tako i EMSA eksperimentima sa mutiranom probom, gde je narušeno njegovo vezivno mesto (slika 23). Mutirana proba nije dovela do „hlađenja“ kompleksa C1 (slika 23), niti je bila sposobna da formira komplekse sa jedarnim proteinima poreklom iz HepG2 ćelija (slika 23). Kako bi smo utvrdili da li povećana ektopična ekspresija *Foxa2* transkripcionog faktora ima uticaj na vezivanje proteina za Probu 36, izolovani su ukupni ćelijski proteini nakon transfekcije *Foxa2* ekspresionog vektora u U87MG i HepG2 ćelije. Vezivanje proteina za Probu 36 dalo je intenzivnije komplekse u reakcijama u kojima su korišćeni ukupni proteini izolovani iz ćelija u kojima je povećana ekspresija FOXA2 (slika 28).

Da je vezivanje ovog transkripcionog faktora bitno za regulaciju ekspresije *SOX14* gena potvrđeno je funkcionalnim esejima u kojima je uvedena mutacija u FOXA2 vezivno mesto. Mutaciona analiza konsenzusnog mesta za FOXA2 (-512/-505) dovela je do pada aktivnosti konstrukta 320CAT5 na 60% u obe ispitivane ćelijske linije, ukazujući na značaj tog regiona u transkripcionoj aktivnosti *SOX14* promotora (Slika 25).

Sledeći korak u ovim istraživanjima bio je da se ispita efekat povećane ektopične ekspresije FOXA2 proteina na aktivnost konstrukta 320CAT5 u HepG2 i U87MG ćelijama. Povećana nivo ekspresije *Foxa2* transkripcionog faktora doveo je do 1.4 puta povećane aktivnosti konstrukta 320CAT5 u HepG2 ćelijama (Slika 26A). Isti eksperiment ponovljen je u U87MG ćelijama pri čemu je povećana ektopična ekspresija FOXA2 proteina dovela do približno 7 puta povećane aktivnosti konstrukta 320CAT5 (slika 26B). Ovako dramatičnu razliku u odgovoru na povećan nivo ekspresije *Foxa2* u HepG2 i U87MG ćelijama možemo objasniti različitim nivoom endogene ekspresije *FOXA2* gena. Naime, RT-PCR-om je pokazano da je endogeni nivo ekspresije FOXA2 znatno niži u U87MG nego u HepG2 ćelijama (slika 27). Zbog toga je povećanje relativne CAT aktivnosti od 1.4 puta u HepG2 ćelijama nakon kotransfekcija sa *Foxa2* ekspresionim vektorom

najverovatnije posledica visoke enogene ekspresije ovog proteina. U ovakvom nativnom okruženju efekat povećane ekspresije *Foxa2* se može bolje pratiti u sistemu u kome ga inače ima u maloj količini, kao što je pokazano u U87MG ćelijama. Zbog ovog svojstva U87MG ćelije su odabrane za ispitivanje uticaja FOXA2 transkripcionog faktora na endogeni nivo ekspresije *SOX14* gena. Efekat povećanog nivoa ekspresije FOXA2 na endogenu ekspresiju *SOX14* gena praćen je u U87MG ćelijama i na nivou iRNK i na nivou proteina. Dobijeni rezultati su pokazali da je nakon povećane ekspresije FOXA2 proteina došlo do značajnog povećanja nivoa *SOX14* iRNK (Slika 29A). Takođe, rezultati su pokazali da povećan nivo ekspresije FOXA2 dovodi do povećanja ekspresije i SOX14 proteina za oko 50% (Slika 29B).

Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da se FOXA2 transkripcioni faktor vezuje za regulatorni region *SOX14* gena, da mutacija u vezivnom mestu za ovaj transkripcioni faktor dovodi do pada aktivatorske sposobnosti pozitivnog kontrolnog regiona, kao i to da FOXA2 transkripcioni faktor dovodi do povećanja endogenog nivoa ekspresije *SOX14* gena.

5.7. Uloga GLI1 transkripcionog faktora i SHH signalnog peptida u regulaciji ekspresije *SOX14* gena

Kao što je već napomenuto, SHH signalni put reguliše specifikaciju podne ploče, motornih neurona i interneurona u kičmenoj moždini, aktivirajući ciljne gene na dozno zavisani način (Ericson, et al., 1997; Roelink, et al., 1995). Genetičke i biohemijske studije pokazale su da SHH signalni put posredovan Gli transkripcionim faktorima (Hooper i Scott, 2005; Jacob i Briscoe, 2003). Literaturni podaci ukazuju da je *Sox14* gen jedan od ciljnih gena SHH signalnog puta (Hashimoto-Torii, et al., 2003).

Naime, već je pomenuto da su eksperimenti sa eksplantima embriona pileta pokazali da je SHH odgovoran za pravilnu ekspresiju *Sox14* gena u dorzalnom talamusu i to posredstvom Gli transkripcionih faktora. Naime, visoke doze signalnog molekula SHH i egzogenog Gli1 dovode do indukcije *Sox14* ekspresije. Zavisnost *Sox14* ekspresije od Gli1 pokazana je u eksperimentima sa eksplantima embriona pileta, koji nema nijedan alel za *Gli1* gen (*Gli1*^{-/-}) i kod koga i pri jako visokim dozama SHH nije došlo do ekspresije *Sox14* gena. Međutim, kada je *Gli1* gen elektroporisan u *Gli1*^{-/-} eksplante došlo je do ekspresije *Sox14* gena. Nasuprot Gli1, egzogeni Gli2 nije doveo do povećanja ekspresije *Sox14* gena, što je nedvosmisleno dokazalo da je ekspresija *Sox14* gena u dorzalnom talamusu zavisna od *Gli1*. Takođe, u ovim eksperimentima pokazano je

da ni Gli3 nema uticaja na *Sox14* ekspresiju, jer u zoni ekspresije *Sox14* gena nije detektovana ekspresija *Gli3* gena, a u skladu sa tim, kod embriona pileta koji su *Gli3*^{-/-} mutanti nije došlo do promene u nivou ekspresije *Sox14* gena. Ovi *in vitro* eksperimenti pokazali su da je neophodna visoka koncentracija SHH i Gli1 kako bi došlo do ekspresije *Sox14* gena (Hashimoto-Torii, et al., 2003).

Kako su svi podaci iz literature o zavisnosti ekspresije *Sox14* gena od SHH signalnog molekula dobijeni u eksperimentima sa embrionima pileta, bilo je neophodno utvrditi da li se ovaj efekat može pratiti u humanom ćelijskom model sistemu. Pošto je efekat FOXA2 transkripcionog faktora na endogeni nivo ekspresije *SOX14* gena praćen u U87MG ćelijama i pošto je poznato da ove ćelije konstitutivno ekspimiraju SHH, kao i sve članove ovog signalnog puta, odabrano je da se u njima ispita uticaj SHH i GLI na ekspresiju *SOX14* gena.

Da bi se proverio uticaj SHH signalnog peptida na ekspresiju *SOX14* gena *in vitro*, U87MG ćelije su tretirane SHH-N rekombinantnim proteinom u trajanju od 24 i 48h. Dobijeni rezultati su pokazali da je tretman SHH doveo do povećanja ekspresije *SOX14* gena, kako na nivou iRNK, tako i na nivou proteina (slika 31). Ovim rezultatima je pokazano da ekspresija humanog *SOX14* gena zavisi od SHH signalnog puta *in vitro*.

Rezultati prikazani u ovom radu pokazali su da povećan nivo ekspresije *GLI1* gena nakon kotransfekcije sa *GLI1* ekspresionim vektorom, dovodi do povećanja ekspresije *SOX14* gena u U87MG ćelijama (slika 32). Uticaj GLI1 transkripcionog faktora na povećanje ekspresije *SOX14* gena pokazan je, kako na nivou iRNK, tako i na nivou proteina. Ovaj efekat nije primećen prilikom kotransfekcije sa *GLI2* i *GLI3* ekspresionim vektorima, što je u skladu sa predhodno navedenim rezultatima iz literature (Hashimoto-Torii, et al., 2003).

5.8. Efekat utišavanja FOXA2 transkripcionog faktora na indukciju *SOX14* gena SHH signalnim peptidom

Početna hipoteza ovog rada bila je da SHH signalni molekul ostvaruje svoje aktivatorsko dejstvo na ekspresiju *SOX14* gena preko FOXA2 transkripcionog faktora. Ako se ima u vidu da je relativna CAT aktivnost konstrukta 320CAT5 povećana u prisustvu *Foxa2* ekspresionog vektora (slika 26), moglo se očekivati da i tretman SHH-N signalnim peptidom dovede do povećanja ove aktivnosti. Međutim, naši rezultati u U87MG ćelijama pokazali su da nakon tretmana sa rekombinantnim SHH-N transfekovanih U87MG ćelija nema značajnog povećanja aktivnosti

reporter konstrukta 320CAT5 (slika 33). Na osnovu ovih rezultata zaključeno je da FOXA2 vezivno mesto (-512/-505) u okviru ispitivanog pozitivnog regulatornog regiona nije uključeno u indukciju ekspresije *SOX14* gena SHH proteinom.

Za SHH signalni put je pokazano da je uključen u etiologiju mnogih tumora, kao što su karcinom bazalnog sloja kože, karcinom pluća, meduloblastom, karcinom prostate, želudca i pankreasa (Dahmane, et al., 1997; Ma, et al., 2005; Sanchez, et al., 2004; Thayer, et al., 2003; Watkins, et al., 2003). Istraživanja na hepatocelularnim karcinomima, kako na uzorcima tkiva tako i na permanentnim ćelijskim linijama, pokazala su da je ovaj signalni put odgovoran za nastanak i ovog tipa tumora (Patil, et al., 2006). Tom prilikom je pokazano da HepG2 ćelije imaju aktivan SHH signalni put, kao i to da tretman sa specifičnim inhibitorom SHH signalnog puta, ciklopaminom dovodi do apoptoze (Patil, et al., 2006). Nakon ovih saznanja iz literature, postalo je jasno da i HepG2 ćelije mogu biti model za ispitivanje uloge SHH u regulaciji ekspresije *SOX14* gena.

Uporedo sa predhodnim eksperimentom urađeno je utišavanje *FOXA2* ekspresije uz pomoć specifične siRNK. Eksperimenti utišavanja *FOXA2* gena rađeni su na HepG2 ćelijama zbog toga što je u njima ekspresija ovog gena visoka pa je samim tim bilo moguće pratiti efekat utišavanja. U cilju praćenja efekta utišavanja ekspresije *FOXA2* na ekspresiju *SOX14* gena, HepG2 ćelije su transfekovane sa nespecifičnom siRNK kao i siRNK koja specifično prepoznaje transcript FOXA2. Nakon toga su tretirane sa SHH-N a efekat ovih tretmana na ekspresiju *SOX14* praćen je PCR-om u realnom vremenu. U HepG2 ćelijama koje su transfekovane sa kontrolnom siRNK, a nakon toga tretirane sa SHH-N u trajanju od 24h, došlo je do porasta ekspresije *SOX14* gena na oko 200% u odnosu na netretirane HepG2 ćelije u koje je transfekovana kontrolna siRNK. Ovaj rezultat je u skladu sa predhodno dobijenim rezultatima Western blota i RT-PCRa na U87MG ćelijama (slike 31 i 34). Istovremeno, tretman sa SHH-N, u prisustvu *FOXA2* specifične siRNK, nije doveo do povećanja ekspresije *SOX14* gena. Pri tom, ekspresija *SOX14* gena zadržao se na nivou koji je dobijen nakon tretmana sa FOXA2 siRNK, tj. na oko 60% (slika 34). Ovi rezultati ukazuju da utišavanje *FOXA2* ekspresije ipak smanjuje sposobnost SHH-N da indukuje ekspresiju *SOX14* gena, što navodi na zaključak da je aktivacija *SOX14* gena SHH signalnim peptidom zavisna od FOXA2 transkripcionog faktora u HepG2 ćelijama (Popovic J., 2010). Sličan model regulacije opisan je kod gena koji kodira T-boks transkripcioni faktor 1, (Tbx1) (Yamagishi, et al., 2003). Istraživanja rađena na miševima pokazala su da je haploinsuficijencija Tbx1 gena tokom razvića faringealnih lukova odgovorna za nastanak deformiteta u aortinim lukovima (Chapman, et al., 1996). Poremećaj u razviću faringealnih lukova kod čoveka dovodi do kraniofacijalnih deformiteta

i aortnih lukova koji su prisutni kod pacijenata sa Di Džordž sindromom (Garg, et al., 2001). *In vitro* i *in vivo* studije na faringealnom endodermu i mezenhimu glave embriona miševa pokazale su da je SHH signalni put reguliše transkripciju *Tbx1* gena posredstvom članova *Fox* familije transkripcionih faktora (Garg, et al., 2001). Eksperimentalno je potvrđeno da SHH signalni put održava ekspresiju *Foxa2* i *Foxc2* gena koji zatim aktiviraju ekspresiju *Tbx1* (Yamagishi, et al., 2003).

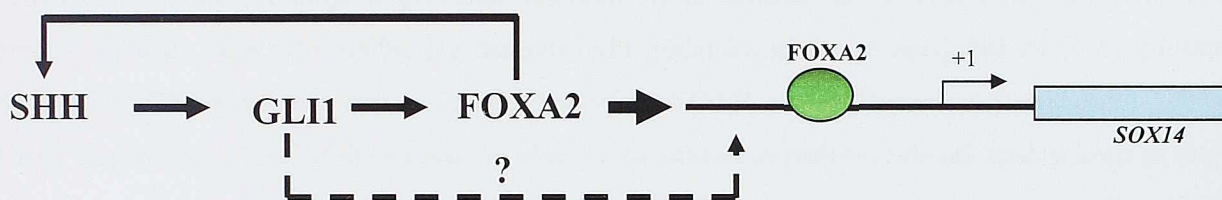
Da su članovi FOX familije transkripcionih faktora posrednici u prenošenju SHH signala predloženo je i u slučaju *WNT5A* gena (M. Katoh, 2009). Ovaj gen je povezan sa invazivnim metastazama melanoma i kancera dojke, pankreasa i želudca (Gregorieff i Clevers, 2005; Lejeune, et al., 1995). Za ekspresiju ovog gena odgovorni su različiti signalni putevi kao što su: NF- κ B, Hedgehog, TGF β i Notch (M. Katoh, 2007). Kada je u pitanju *Shh* signalni put, istraživanja su pokazala da se u regulatornom regionu *WNT5A* gena ne nalazi GLI vezivno mesto koje bi moglo biti odgovorno za regulaciju *WNT5A* gena SHH signalnim molekulom. Međutim, postojanje četiri kopije vezivnog mesta za FOX transkripcione faktore u intronu 1 navelo je na analizu mehanizma po kome SHH signalni put ostvaruje indukciju ekspresije *WNT5A* upravo preko članova FOX familije transkripcionih faktora (M. Katoh, 2009).

5.9. Potencijalni model regulacije ekspresije *SOX14* gena

Na osnovu dobijenih rezultata možemo predpostaviti da FOXA2 posreduje u regulaciji ekspresije *SOX14* gena SHH signalnim putema, ali po svemu sudeći konsenzus vezivno mesto u okviru konstrukta 320CAT5, nije uključeno u posredovanje SHH signala. Možemo predpostaviti da udaljeni regulatorni regioni *SOX14* gena, koji nisu uključeni u ovu analizu, imaju dodatna vezivna mesta za ovaj transkripcioni faktor. Takođe, ne možemo isključiti mogućnost da se u regulatornim elementima, koja nisu obuhvaćena ovom analizom nalazi i GLI1 vezivno mesto(a) koje je odgovorno za posredovanje SHH signala. Takav primer regulacije ekspresije SHH signalnim putem opisan je kod *SOX9* gena. Naime, 1.1 Mb uzvodno od *SOX9* gena nalazi se regulatorni element sa svojstvom enhensera (Bien-Willner, et al., 2007), u okviru koga je *in silico* analizom otkriveno vezivno mesto za GLI1 transkripcioni faktor. Ovako udaljeni regulatorni regioni su opisani za mnoge gene koji su važni tokom razvića, između ostalog i za sam *SHH* (Lettice, et al., 2002). Imunoprecipitacijom hromatina pokazano je da se GLI1 vezuje za ovu regulatornu sekvencu *SOX9* gena kao i da je ovo vezivanje direktna posledica tretmana sa SHH

(Bien-Willner, et al., 2007). Takođe, tretman primarnih hondrocita sa signalnim molekulom SHH doveo je do povećanja ekspresije *SOX9* gena (Tavella, et al., 2004). Literaturni podaci ukazuju na to da je *Sox9* gen takođe regulisan *Foxa2* transkripcionim faktorom. Naime, u progenitorskim ćelijama pankreasa identifikovano je nekoliko ključnih transkripcionih faktora među kojima su *Foxa2*, *Tcf2* i *Onecut1* (Jacquemin, et al., 2003) za koje je pokazano da su regulisani *Sox9* genom (Lynn, et al., 2007). Takođe, dokazano je da *Foxa2* i *Tcf2* regulišu ekspresiju *Sox9* gena čime je pokazana povratna regulatorna sprega među ovim genima tokom razvića pankreasa (Lynn, et al., 2007).

Svi dobijeni rezultati mogu se sumirati na predloženom modelu regulacije ekspresije *SOX14* gena SHH signalnim putem koji je prikazan na slici 38. Po predloženom modelu efekat SHH na regulaciju ekspresije *SOX14* gena posredovan je FOXA2 transkripcionim faktorom. Međutim, ovaj model ne isključuje mogućnost direktnog uticaja GLI1 transkripcionog faktora na regulaciju ekspresije *SOX14* gena, što je na slici 38 predstavljeno isprekidanom linijom.



Slika 38. Šematski prikaz modela regulacije *SOX14* gena SHH signalnim putem: Punim strelicama označeni su međusobni odnosi SHH, GLI1 i FOXA2. Pretpostavljeni direktni uticaj GLI1 na ekspresiju *SOX14* gena prikazan je isprekidanom linijom.

Može se pretpostaviti da GLI1 transkripcioni faktor deluje kao glavni medijator SHH signalnog puta tokom regulacije ekspresije *SOX14* gena, a da FOXA2 transkripcioni faktor, kao deo istog signalnog puta, deluje kao fini modulator ekspresije *SOX14* gena, zajedno sa drugim, još neidentifikovanim transkripcionim faktorima. Kako bi se do kraja rasvetlio mehanizam regulacije ekspresije *SOX14* gena SHH signalnim putem neophodna su dalja istraživanja.

5.10. Analiza SOX14 proteinske sekvence

Uporedo sa analizom promotorskog regiona urađena je i analiza kodirajućeg regiona *SOX14* gena. Ova analiza rađena je kako bi se utvrdio stepen očuvanosti kodirajuće sekvence tokom evolucije kao i da bi se identifikovali specifični domeni karakteristični samo za SOX14 protein. Nedavna istraživanja vezana za uporednu analizu SOX2 ortolognih proteina kod vertebrata pokazala su da je procenat identičnosti u odnosu na sekvencu humanog SOX2 proteina takođe visok i iznosi od 88.1% do 98.4% (Y. Katoh i Katoh, 2005). Takođe, komparativna analiza SOX3 ortologa kod četrnaest vrsta pokazala je da procenat identičnosti u odnosu na sekvencu humanog SOX3 proteina iznosi od 67 do 99% (Mojsin M., 2010). Analiza i drugih članova SOXB grupe gena SOX1 i SOX21 takođe je pokazala visok stepen očuvanosti (neobjavljeni rezultati). Poređenje kodirajuće sekvence *SOX14/Sox14* gena ukazalo je na veliki stepen evolutivne očuvanosti ovog gena, kako u okviru HMG boksa, tako i izvan njega. Procenat identičnosti u odnosu na sekvencu humanog *SOX14* gena iznosio je 77 do 99%. Takođe, poređenje sekvence humanog SOX14 proteina sa proteinskim sekvencama ortologa pokazalo je izuzetno visok stepen očuvanosti tokom evolucije a procenat identičnosti u odnosu na sekvencu humanog SOX14 proteina iznosio je 89 do 100%. Na osnovu ovih podataka može se zaključiti da je evolutivna očuvanost SOX14 proteina najveća među članovima SOXB grupe (Popovic i Stevanovic, 2009). Visok stepen očuvanosti SOX14 proteina ukazuje na snažan evolutivni pritisak tokom koga je ovaj protein zadržao svoja funkcionalna svojstva. To je u skladu sa podacima da do danas nije opisan fenotip koji bi bio doveden u vezu sa mutacijama u *SOX14/Sox14* genu. Evolutivna konzerviranost i nedostatak opisanih poremećaja koji se dovode u vezu sa *SOX14/Sox14* genom, mogu ukazati na to da je ovaj gen od esencijalnog značaja u procesu razvića i da je gubitak njegove funkcije letalan.

Uporedna analiza ortologa kod različitih kičmenjaka može pružiti informacije o specifičnim domenima proteina koji su od funkcionalnog značaja. Uporedna analiza SOX14 ortologa i ortologa njemu najsrodnijeg proteina, SOX21, omogućila je definisanje 5 regiona označenih kao B,C,E,F i G koji su se pokazali specifičnim za SOX14 protein. Naime, u okviru ovih regiona pokazano je da postoji vrlo mali stepen homologije između SOX14 i SOX21 proteina, tako da se može pretpostaviti da su ovi specifični blokovi amino-kiselina upravo oni domeni koji su od strukturne i funkcionalne važnosti za aktivnost SOX14 proteina. (slika 36).

5.11. Osvrt na evoluciju SOXB grupe gena

Po predloženom modelu evolucije SOXB grupe gena postoji konzervisana hromozomalna organizacija članova B grupe u dva para (*Sox1-Sox21* i *Sox2-Sox14*) (Kirby, et al., 2002). Kako bi se bolje sagledala genomska organizacija i evolucija SoxB gena izvršena je opsežnija studija uporednog mapiranja kod većeg broja vrsta kičmenjaka (Popovic i Stevanovic, 2009). Ova analiza je pokazala da su se desili dodatni hromozomski rearanžmani koji su razdvojili *Sox2* i *Sox14* na različite hromozome kod psa, dok su neki složeniji hromozomski rearanžmani rezultirali potpunim razdvajanjem SoxB gena kod miša i pacova (slika 37) (Popovic i Stevanovic, 2009). Kod oposuma je došlo do takvih rearanžmana da su čak 3 člana SoxB grupe locirana na istom hromozomu i to: *Sox1*, *Sox2* i *Sox21*. Moguće je da je nakon organizacije SoxB gena u dve grupe (aktivator-represor) došlo do nejednakog krosing-overa koji je translocirao *Sox2* gen na hromozom na kom su se predhodno nalazili *Sox1* i *Sox21*. Ako izuzmemo ove dodatne rearanžmane koji su se desili kod psa, pacova i miša, uporedna analiza organizacije SoxB gena kod amniota koja je prikazana u ovom radu u skladu je sa predloženim modelom evolucije (Kirby, et al., 2002) koji je detaljno opisan u uvodnom poglavlju 1.4.

Analiza hromozomske organizacije SOXB gena kod riba pokazala je da je kod ove grupe životinja tokom evolucije došlo do kompleksnijih promena u organizaciji koje su nastale kao rezultat višestrukih rearanžmana i duplikacija zajedno sa gubitkom kopija određenih *Sox* gena (Kirby, et al., 2002). Precizno mapiranje *Sox* gena kod riba omogućilo bi da se detaljno sagleda kompleksna evolucija SOX/Sox gena.

6. ZAKLJUČCI

U ovoj tezi su prikazani rezultati ispitivanja regulacije ekspresije *SOX14* gena. Analiza je obuhvatala određivanje starta transkripcije, kao i definisanje pozitivnog kontrolnog regiona *SOX14* gena. Takođe, pokazano je da je ekspresija humang *SOX14* gena zavisna od SHH signalnog molekula u *in vitro* uslovima. Rezultati prezentovani u ovom radu po prvi put su pokazali da je tkivno specifični FOXA2 transkripcioni faktor važan za regulaciju ekspresije *SOX14* gena, kao i to da je upravo ovaj transkripcioni faktor odgovoran za posredovanje uticaja SHH signalnog puta na ekspresiju *SOX14* gena.

Na osnovu svega navedenog u ovom radu mogu se izvesti sledeći zaključci:

1. Metodom elongacije reverznog oligonukleotida određen je start transkripcije humanog *SOX14* gena. Za nukleotid od koga otpočinje transkripcija, određen je guanin na poziciji 251 uzvodno od ATG kodona *SOX14* gena.

2. Korišćenjem promotor-reporterskih konstrukata definisan je minimalni promotorski region *SOX14* gena (-470/+201) koji sadrži regulatorne elemente neophodne za bazalnu transkripcionu aktivnost. Takođe, delecionom analizom optimalnog promotora identifikovan je pozitivni regulatorni region, na poziciji -783/-470, koji je obuhvaćen konstruktom 320CAT5.

3. U okviru ovog regulatornog regiona *in silico* analizom je otkriveno potencijalno vezivno mesto za FOXA2 transkripcioni faktor na poziciji -512/-505, koje je evolutivno očuvano kod sisara, kako po poziciji tako i po nukleotidnom sastavu.

4. Analizom interakcije jedarnih proteina iz HepG2 i U87MG ćelija i korišćenjem antitela na FOXA2 transkripcioni faktor pokazano je specifično vezivanje ovog proteina za vezivno mesto identifikovano u regulatornom regionu *SOX14* gena. Uvođenje mutacije u FOXA2 vezivno mesto dovelo je do pada aktivnosti konstrukta 320CAT5 za oko 40% u obe ćelijske linije, dok je povećana ekspresija FOXA2 transkripcionog faktora dovela je do povećanja aktivnosti ovog konstrukta za oko 1.4 puta u HepG2 i oko 7 puta u U87MG ćelijama.

5. Eksperimentima u U87MG ćelijama pokazano je da povećana ekspresija Foxa2 transkripcionog faktora dovodi i do povećanja ekspresije endogenog *SOX14* gena, kako na nivou iRNK tako i na nivou proteina. Utišavanje ekspresije *FOXA2* gena pokazalo je da je ekspresija *SOX14* gena zavisna od ovog transkripcionog faktora i u HepG2 ćelijama.

6. Tretman U87MG ćelija sa SHH-N signalnim peptidom pokazao je povećanje ekspresije *SOX14* gena, kako na nivou iRNK, tako i na nivou proteina. Takođe, transfekcijom ovih ćelija sa ekspresionim vektorima za GLI1-3 transkripcione faktore pokazano je da jedino GLI1 dovodi do povećanja ekspresije *SOX14* gena na iRNK i proteinskom nivou.

7. Utišavanje FOXA2 ekspresije umanjilo je sposobnost SHH-N da indukuje ekspresiju *SOX14* gena u U87MG ćelijama, čime je potvrđeno da je aktivacija *SOX14* gena SHH-N signalnim peptidom zavisna od FOXA2 transkripcionog faktora.

8. U ovom radu određena je sekvenca *Sox14* gena koze (*Capra hircus*), pacova (*Rattus norvegicus*) i govečeta (*Bos taurus*) čime je dopunjena baza podataka deponovanih sekvenci *Sox14* gena kičmenjaka. Uporedna analiza proteinske sekvence SOX14 ortologa pokazala je izuzetno visok stepen evolutivne očuvanosti, a poređenjem SOX14 i SOX21 proteina identifikovani su domeni specifični za SOX14 protein koji mogu biti značajni za aktivnost ovog proteina.

9. Uporednim mapiranjem SOXB gena kod različitih kičmenjaka izvršena je dopuna predloženog modela evolucije ove grupe gena.

7. DODATAK

Slika 39D. Usporedna analiza kodirajuće sekvence *SOX14/Sox14* gena kod kičmenjaka. Homo-human (*Homo sapiens*, genomska sekvenca AF107043); Pan-šimpanza (*Pan troglodytes*, genomska sekvenca NW_001232838.1); *Macaca*-Rezus majmun (*Macaca mullata*, genomska sekvenca NW_001112571.1); Bos-goveče (*Bos taurus*, genomska sekvenca NW_001493772.1); Canis-pas (*Canis familiaris*, genomska sekvenca NW_876276.1); Rattus- pacov (*Rattus norvegicus*, genomska sekvenca NW_047801.1); Mus-miš (*Mus musculus*, genomska sekvenca NT_039476.6).

```

homo      : atgtcccaaaccttcaagacacacatcaagccggcccatgaaacgcccacatggttatggtcccccgggggcccacgctggccagatggtcc
pan       : atgtcccaaaccttcaagacacacatcaagccggcccatgaaacgcccacatggttatggtcccccgggggcccacgctggccagatggtcc
macaca   : atgtcccaaaccttcaagacacacatcaagccggcccatgaaacgcccacatggttatggtcccccgggggcccacgctggccagatggtcc
canis     : atgtcccaaaccttcaagacacacatcaagccggcccatgaaacgcccacatggttatggtcccccgggggcccacgctggccagatggtcc
bos       : atgtcccaaaccttcaagacacacatcaagccggcccatgaaacgcccacatggttatggtcccccgggggcccacgctggccagatggtcc
mus       : atgtcccaaaccttcaagacacacatcaagccggcccatgaaacgcccacatggttatggtcccccgggggcccacgctggccagatggtcc
rattus   : atgtcccaaaccttcaagacacacatcaagccggcccatgaaacgcccacatggttatggtcccccgggggcccacgctggccagatggtcc
monodelphi : atgtcccaaaccttcaagacacacatcaagccggcccatgaaacgcccacatggttatggtcccccgggggcccacgctggccagatggtcc
gallus   : atgtcccaaaccttcaagacacacatcaagccggcccatgaaacgcccacatggttatggtcccccgggggcccacgctggccagatggtcc
danto    : atgtcccaaaccttcaagacacacatcaagccggcccatgaaacgcccacatggttatggtcccccgggggcccacgctggccagatggtcc
oreochor : atgtcccaaaccttcaagacacacatcaagccggcccatgaaacgcccacatggttatggtcccccgggggcccacgctggccagatggtcc
mi        : atgtcccaaaccttcaagacacacatcaagccggcccatgaaacgcccacatggttatggtcccccgggggcccacgctggccagatggtcc
takifugu : atgtcccaaaccttcaagacacacatcaagccggcccatgaaacgcccacatggttatggtcccccgggggcccacgctggccagatggtcc
xenopus  : atgtcccaaaccttcaagacacacatcaagccggcccatgaaacgcccacatggttatggtcccccgggggcccacgctggccagatggtcc
ATGTC AAACC c GAACA ATCAAG G CCAATGAA GCCTTCATGCT TGGTCCCG GCGCAG Gg G AAGATGCC

```

```

homo      : caaggaaaaccccaaggatgcacaaaatccgggagatpaaagaaacagcctagggtgcgggaaatggaaagccttctgttccggaggcagagaag
pan       : caaggaaaaccccaaggatgcacaaaatccgggagatpaaagaaacagcctagggtgcgggaaatggaaagccttctgttccggaggcagagaag
macaca   : caaggaaaaccccaaggatgcacaaaatccgggagatpaaagaaacagcctagggtgcgggaaatggaaagccttctgttccggaggcagagaag
canis     : caaggaaaaccccaaggatgcacaaaatccgggagatpaaagaaacagcctagggtgcgggaaatggaaagccttctgttccggaggcagagaag
bos       : caaggaaaaccccaaggatgcacaaaatccgggagatpaaagaaacagcctagggtgcgggaaatggaaagccttctgttccggaggcagagaag
mus       : caaggaaaaccccaaggatgcacaaaatccgggagatpaaagaaacagcctagggtgcgggaaatggaaagccttctgttccggaggcagagaag
rattus   : caaggaaaaccccaaggatgcacaaaatccgggagatpaaagaaacagcctagggtgcgggaaatggaaagccttctgttccggaggcagagaag
monodelphi : caaggaaaaccccaaggatgcacaaaatccgggagatpaaagaaacagcctagggtgcgggaaatggaaagccttctgttccggaggcagagaag
danto    : caaggaaaaccccaaggatgcacaaaatccgggagatpaaagaaacagcctagggtgcgggaaatggaaagccttctgttccggaggcagagaag
oreochor : caaggaaaaccccaaggatgcacaaaatccgggagatpaaagaaacagcctagggtgcgggaaatggaaagccttctgttccggaggcagagaag
mi        : caaggaaaaccccaaggatgcacaaaatccgggagatpaaagaaacagcctagggtgcgggaaatggaaagccttctgttccggaggcagagaag
takifugu : caaggaaaaccccaaggatgcacaaaatccgggagatpaaagaaacagcctagggtgcgggaaatggaaagccttctgttccggaggcagagaag
xenopus  : caaggaaaaccccaaggatgcacaaaatccgggagatpaaagaaacagcctagggtgcgggaaatggaaagccttctgttccggaggcagagaag
CAGGA AA CCCAA ATGCACAACCTCGAGATCAAGCAA G CT GCGGCCGA TGAAGCT CTGTCCGAGG C GAGAAg

```

```

homo      : cgggccatcacatcggatggaaggccaaagcgggctacggcgcctaaagcccatgaaaggaggccaccctggactacaaaggtaaccggaccctctggcgcg
pan       : cgggccatcacatcggatggaaggccaaagcgggctacggcgcctaaagcccatgaaaggaggccaccctggactacaaaggtaaccggaccctctggcgcg
macaca   : cgggccatcacatcggatggaaggccaaagcgggctacggcgcctaaagcccatgaaaggaggccaccctggactacaaaggtaaccggaccctctggcgcg
canis     : agggccgtcacatcggatggaaggccaaagagggtacggcgcctaaagcccatgaaaggaggccaccctggactacaaaggtaaccggaccctctggcgcg
bos       : cgggccgtcacatcggatggaaggccaaagagggtacggcgcctaaagcccatgaaaggaggccaccctggactacaaaggtaaccggaccctctggcgcg
mus       : cgggccgtcacatcggatggaaggccaaagagggtacggcgcctaaagcccatgaaaggaggccaccctggactacaaaggtaaccggaccctctggcgcg
rattus   : cgggccgtcacatcggatggaaggccaaagagggtacggcgcctaaagcccatgaaaggaggccaccctggactacaaaggtaaccggaccctctggcgcg
monodelphi : cgggccgtcacatcggatggaaggccaaagagggtacggcgcctaaagcccatgaaaggaggccaccctggactacaaaggtaaccggaccctctggcgcg
gallus   : cgggccgtcacatcggatggaaggccaaagagggtacggcgcctaaagcccatgaaaggaggccaccctggactacaaaggtaaccggaccctctggcgcg
danto    : cgggccgtcacatcggatggaaggccaaagagggtacggcgcctaaagcccatgaaaggaggccaccctggactacaaaggtaaccggaccctctggcgcg
oreochor : cgggccgtcacatcggatggaaggccaaagagggtacggcgcctaaagcccatgaaaggaggccaccctggactacaaaggtaaccggaccctctggcgcg
mi        : cgggccgtcacatcggatggaaggccaaagagggtacggcgcctaaagcccatgaaaggaggccaccctggactacaaaggtaaccggaccctctggcgcg
takifugu : cgggccgtcacatcggatggaaggccaaagagggtacggcgcctaaagcccatgaaaggaggccaccctggactacaaaggtaaccggaccctctggcgcg
xenopus  : cgggccgtcacatcggatggaaggccaaagagggtacggcgcctaaagcccatgaaaggaggccaccctggactacaaaggtaaccggaccctctggcgcg
G CC TACATCGA GA GCCAAG GgCT cG GC CAGCACATGAAGGA CACC GACTACAAGTAc G CC cggcgc

```


Vrsta	<i>Sox2/Sox14</i>		<i>Sox1/Sox21</i>	
<i>Homo sapiens</i>	3	3	13	13
<i>Pan troglodytes</i>	3	3	13	13
<i>Macaca mulatta</i>	2	2	17	17
<i>Bos taurus</i>	1	1	12	12
<i>Gallus gallus</i>	9	9	1	1
<i>Canis familiaris</i>	34	23	22	22
<i>Mus musculus</i>	3	9	8	14
<i>Monodelphis domestica</i>	7	4	7	7
<i>Danio rerio</i>	22	6	1/9	6
<i>Equus caballus</i>	19	16	NA	17
<i>Rattus norvegicus</i>	2	8	NA	15
<i>Ornithorhynchus anatinus</i>	1	1	20	NM

Tabela 8D. Hromozomalne pozicije SOXB grupe gena kod različitih vrsta Vertebrata prema literaturnim podacima, NCBI Map Viewer i Ensembl bazi podataka. NA –sekvence nisu poznate, NM- poznate sekvence koje nisu mapirane (Popovic i Stevanovic, 2009).

8. LITERATURA

- Alberts, B. (1994). *Molecular biology of the cell* (3rd ed.). New York: Garland Pub.
- Alvarez-Bolado, G., Zhou, X., Cecconi, F., & Gruss, P. (2000). Expression of Foxb1 reveals two strategies for the formation of nuclei in the developing ventral diencephalon. *Dev Neurosci*, 22(3), 197-206.
- Ang, S. L., & Rossant, J. (1994). HNF-3 beta is essential for node and notochord formation in mouse development. *Cell*, 78(4), 561-574.
- Arnosti, D. N., & Kulkarni, M. M. (2005). Transcriptional enhancers: Intelligent enhanceosomes or flexible billboards? *J Cell Biochem*, 94(5), 890-898.
- Arsic, N., Rajic, T., Stanojcic, S., Goodfellow, P. N., & Stevanovic, M. (1998). Characterisation and mapping of the human SOX14 gene. *Cytogenet Cell Genet*, 83(1-2), 139-146.
- Avner, P., & Heard, E. (2001). X-chromosome inactivation: counting, choice and initiation. *Nat Rev Genet*, 2(1), 59-67.
- Babu, M. M., Luscombe, N. M., Aravind, L., Gerstein, M., & Teichmann, S. A. (2004). Structure and evolution of transcriptional regulatory networks. *Curr Opin Struct Biol*, 14(3), 283-291.
- Bergsland, M., Werme, M., Malewicz, M., Perlmann, T., & Muhr, J. (2006). The establishment of neuronal properties is controlled by Sox4 and Sox11. *Genes Dev*, 20(24), 3475-3486.
- Bhardwaj, G., Murdoch, B., Wu, D., Baker, D. P., Williams, K. P., Chadwick, K., et al. (2001). Sonic hedgehog induces the proliferation of primitive human hematopoietic cells via BMP regulation. *Nat Immunol*, 2(2), 172-180.
- Bieller, A., Pasche, B., Frank, S., Glaser, B., Kunz, J., Witt, K., et al. (2001). Isolation and characterization of the human forkhead gene FOXQ1. *DNA Cell Biol*, 20(9), 555-561.
- Bien-Willner, G. A., Stankiewicz, P., & Lupski, J. R. (2007). SOX9cre1, a cis-acting regulatory element located 1.1 Mb upstream of SOX9, mediates its enhancement through the SHH pathway. *Hum Mol Genet*, 16(10), 1143-1156.
- Blixt, A., Mahlapuu, M., Aitola, M., Pelto-Huikko, M., Enerback, S., & Carlsson, P. (2000). A forkhead gene, FoxE3, is essential for lens epithelial proliferation and closure of the lens vesicle. *Genes Dev*, 14(2), 245-254.
- Booher, R. N., Holman, P. S., & Fattaey, A. (1997). Human Myt1 is a cell cycle-regulated kinase that inhibits Cdc2 but not Cdk2 activity. *J Biol Chem*, 272(35), 22300-22306.
- Boshart, M., Kluppel, M., Schmidt, A., Schutz, G., & Luckow, B. (1992). Reporter constructs with low background activity utilizing the cat gene. *Gene*, 110(1), 129-130.
- Bourguignon, C., Li, J., & Papalopulu, N. (1998). XBF-1, a winged helix transcription factor with dual activity, has a role in positioning neurogenesis in *Xenopus* competent ectoderm. *Development*, 125(24), 4889-4900.
- Bowles, J., Schepers, G., & Koopman, P. (2000). Phylogeny of the SOX family of developmental transcription factors based on sequence and structural indicators. *Dev Biol*, 227(2), 239-255.
- Brennan, J. M., O'Dwyer, P. J., Ozols, R. F., & LaCreta, F. P. (1993). High-performance liquid chromatographic determination of the S- and R-diastereoisomers of L-buthionine (SR)-sulfoximine in human plasma and urine. *J Chromatogr*, 620(1), 121-128.
- Brivanlou, A. H., & Darnell, J. E., Jr. (2002). Signal transduction and the control of gene expression. *Science*, 295(5556), 813-818.
- Brownell, I., Dirksen, M., & Jamrich, M. (2000). Forkhead Foxe3 maps to the dysgenetic lens locus and is critical in lens development and differentiation. *Genesis*, 27(2), 81-93.

- Brunkow, M. E., Jeffery, E. W., Hjerrild, K. A., Paeper, B., Clark, L. B., Yasayko, S. A., et al. (2001). Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfin, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nat Genet*, 27(1), 68-73.
- Bullock, W. O., Fernandez, J.M., Short, J.M. (1987). XL1 Blue. *Biotechniques*, 5(4), 376-378.
- Butler, J. E., & Kadonaga, J. T. (2002). The RNA polymerase II core promoter: a key component in the regulation of gene expression. *Genes Dev*, 16(20), 2583-2592.
- Bylund, M., Andersson, E., Novitch, B. G., & Muhr, J. (2003). Vertebrate neurogenesis is counteracted by Sox1-3 activity. *Nat Neurosci*, 6(11), 1162-1168.
- Caiulo, A., Nicolis, S., Bianchi, P., Zuffardi, O., Bardoni, B., Maraschio, P., et al. (1991). Mapping the gene encoding the human erythroid transcriptional factor NFE1-GF1 to Xp11.23. *Hum Genet*, 86(4), 388-390.
- Cameron, F. J., & Sinclair, A. H. (1997). Mutations in SRY and SOX9: testis-determining genes. *Hum Mutat*, 9(5), 388-395.
- Caretti, G., Salsi, V., Vecchi, C., Imbriano, C., & Mantovani, R. (2003). Dynamic recruitment of NF-Y and histone acetyltransferases on cell-cycle promoters. *J Biol Chem*, 278(33), 30435-30440.
- Carlsson, P., & Mahlapuu, M. (2002). Forkhead transcription factors: key players in development and metabolism. *Dev Biol*, 250(1), 1-23.
- Cavalli, G. (2002). Chromatin as a eukaryotic template of genetic information. *Curr Opin Cell Biol*, 14(3), 269-278.
- Ceelie, H., Spaargaren-Van Riel, C. C., De Jong, M., Bertina, R. M., & Vos, H. L. (2003). Functional characterization of transcription factor binding sites for HNF1-alpha, HNF3-beta (FOXA2), HNF4-alpha, Sp1 and Sp3 in the human prothrombin gene enhancer. *J Thromb Haemost*, 1(8), 1688-1698.
- Cerf, C., Lippens, G., Ramakrishnan, V., Muyldermans, S., Segers, A., Wyns, L., et al. (1994). Homo- and heteronuclear two-dimensional NMR studies of the globular domain of histone H1: full assignment, tertiary structure, and comparison with the globular domain of histone H5. *Biochemistry*, 33(37), 11079-11086.
- Cha JY, K. H., Kim KS, Hur MW, Ahn YH,. (2000). Identification of transacting factors responsible for the tissue-specific expression of human glucose transporter type 2 isoform gene. Cooperative role of hepatocyte nuclear factors 1a and 3b. *J. Biol Chem*, 275, 18358-18365.
- Chapman, D. L., Garvey, N., Hancock, S., Alexiou, M., Agulnik, S. I., Gibson-Brown, J. J., et al. (1996). Expression of the T-box family genes, Tbx1-Tbx5, during early mouse development. *Dev Dyn*, 206(4), 379-390.
- Chartier, F. L., Bossu, J. P., Laudet, V., Fruchart, J. C., & Laine, B. (1994). Cloning and sequencing of cDNAs encoding the human hepatocyte nuclear factor 4 indicate the presence of two isoforms in human liver. *Gene*, 147(2), 269-272.
- Chen, J., Knowles, H. J., Hebert, J. L., & Hackett, B. P. (1998). Mutation of the mouse hepatocyte nuclear factor/forkhead homologue 4 gene results in an absence of cilia and random left-right asymmetry. *J Clin Invest*, 102(6), 1077-1082.
- Cheung, M., Abu-Elmagd, M., Clevers, H., & Scotting, P. J. (2000). Roles of Sox4 in central nervous system development. *Brain Res Mol Brain Res*, 79(1-2), 180-191.
- Cirillo, L. A., & Zaret, K. S. (1999). An early developmental transcription factor complex that is more stable on nucleosome core particles than on free DNA. *Mol Cell*, 4(6), 961-969.
- Cohen, M. M., Jr. (2003). The hedgehog signaling network. *Am J Med Genet A*, 123A(1), 5-28.
- Collignon, J., Sockanathan, S., Hacker, A., Cohen-Tannoudji, M., Norris, D., Rastan, S., et al. (1996). A comparison of the properties of Sox-3 with Sry and two related genes, Sox-1 and Sox-2. *Development*, 122(2), 509-520.

- Colter, D. C., Piera-Velazquez, S., Hawkins, D. F., Whitecavage, M. K., Jimenez, S. A., & Stokes, D. G. (2005). Regulation of the human Sox9 promoter by the CCAAT-binding factor. *Matrix Biol*, 24(3), 185-197.
- Connor, F., Wright, E., Denny, P., Koopman, P., & Ashworth, A. (1995). The Sry-related HMG box-containing gene Sox6 is expressed in the adult testis and developing nervous system of the mouse. *Nucleic Acids Res*, 23(17), 3365-3372.
- Coustry, F., Hu, Q., de Crombrughe, B., & Maity, S. N. (2001). CBF/NF-Y functions both in nucleosomal disruption and transcription activation of the chromatin-assembled topoisomerase II α promoter. Transcription activation by CBF/NF-Y in chromatin is dependent on the promoter structure. *J Biol Chem*, 276(44), 40621-40630.
- Currie, P. D., & Ingham, P. W. (1996). Induction of a specific muscle cell type by a hedgehog-like protein in zebrafish. *Nature*, 382(6590), 452-455.
- Dahmane, N., Lee, J., Robins, P., Heller, P., & Ruiz i Altaba, A. (1997). Activation of the transcription factor Gli1 and the Sonic hedgehog signalling pathway in skin tumours. *Nature*, 389(6653), 876-881.
- Darnell, J. E., Jr. (1982). Variety in the level of gene control in eukaryotic cells. *Nature*, 297(5865), 365-371.
- De Felice, M., Ovitt, C., Biffali, E., Rodriguez-Mallon, A., Arra, C., Anastassiadis, K., et al. (1998). A mouse model for hereditary thyroid dysgenesis and cleft palate. *Nat Genet*, 19(4), 395-398.
- Denny, P., Swift, S., Brand, N., Dabhade, N., Barton, P., & Ashworth, A. (1992). A conserved family of genes related to the testis determining gene, SRY. *Nucleic Acids Res*, 20(11), 2887.
- Dieterlen-Lievre, F. (1998). Hematopoiesis: progenitors and their genetic program. *Curr Biol*, 8(20), R727-730.
- Dignam, J. D., Lebovitz, R. M., & Roeder, R. G. (1983). Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei. *Nucleic Acids Res*, 11(5), 1475-1489.
- Djurovic, J., & Stevanovic, M. (2004). Structural and functional characterization of the human SOX14 promoter. *Biochim Biophys Acta*, 1680(1), 53-59.
- Dong, C., Wilhelm, D., & Koopman, P. (2004). Sox genes and cancer. *Cytogenet Genome Res*, 105(2-4), 442-447.
- Droge, P., & Muller-Hill, B. (2001). High local protein concentrations at promoters: strategies in prokaryotic and eukaryotic cells. *Bioessays*, 23(2), 179-183.
- Dubin, R. A., Coward, P., Lau, Y. F., & Ostrer, H. (1995). Functional comparison of the *Mus musculus molossinus* and *Mus musculus domesticus* Sry genes. *Mol Endocrinol*, 9(12), 1645-1654.
- Dunn, T. L., Mynett-Johnson, L., Wright, E. M., Hosking, B. M., Koopman, P. A., & Muscat, G. E. (1995). Sequence and expression of Sox-18 encoding a new HMG-box transcription factor. *Gene*, 161(2), 223-225.
- Đurović, J. (2003). *Analiza promotorskog regiona humanog SOX14 gena*. Unpublished Magistarska teza, Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet.
- Echelard, Y., Epstein, D. J., St-Jacques, B., Shen, L., Mohler, J., McMahon, J. A., et al. (1993). Sonic hedgehog, a member of a family of putative signaling molecules, is implicated in the regulation of CNS polarity. *Cell*, 75(7), 1417-1430.
- Ekonomou, A., Kazanis, I., Malas, S., Wood, H., Alifragis, P., Denaxa, M., et al. (2005). Neuronal migration and ventral subtype identity in the telencephalon depend on SOX1. *PLoS Biol*, 3(6), e186.
- Episkopou, V. (2005). SOX2 functions in adult neural stem cells. *Trends Neurosci*, 28(5), 219-221.

- Ericson, J., Briscoe, J., Rashbass, P., van Heyningen, V., & Jessell, T. M. (1997). Graded sonic hedgehog signaling and the specification of cell fate in the ventral neural tube. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 62, 451-466.
- Ericson, J., Morton, S., Kawakami, A., Roelink, H., & Jessell, T. M. (1996). Two critical periods of Sonic Hedgehog signaling required for the specification of motor neuron identity. *Cell*, 87(4), 661-673.
- Fajans, S. S., Bell, G. I., & Polonsky, K. S. (2001). Molecular mechanisms and clinical pathophysiology of maturity-onset diabetes of the young. *N Engl J Med*, 345(13), 971-980.
- Ferri, A. L., Cavallaro, M., Braida, D., Di Cristofano, A., Canta, A., Vezzani, A., et al. (2004). Sox2 deficiency causes neurodegeneration and impaired neurogenesis in the adult mouse brain. *Development*, 131(15), 3805-3819.
- Freyaldenhoven, B. S., Freyaldenhoven, M. P., Iacovoni, J. S., & Vogt, P. K. (1997). Avian winged helix proteins CWH-1, CWH-2 and CWH-3 repress transcription from Q₁ binding sites. *Oncogene*, 15(4), 483-488.
- Friedman, J. R., & Kaestner, K. H. (2006). The Foxa family of transcription factors in development and metabolism. *Cell Mol Life Sci*, 63(19-20), 2317-2328.
- Garg, V., Yamagishi, C., Hu, T., Kathiriya, I. S., Yamagishi, H., & Srivastava, D. (2001). Tbx1, a DiGeorge syndrome candidate gene, is regulated by sonic hedgehog during pharyngeal arch development. *Dev Biol*, 235(1), 62-73.
- Garry, D. J., Meeson, A., Elterman, J., Zhao, Y., Yang, P., Bassel-Duby, R., et al. (2000). Myogenic stem cell function is impaired in mice lacking the forkhead/winged helix protein MNF. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(10), 5416-5421.
- Gazin, C., Wajapeyee, N., Gobeil, S., Virbasius, C. M., & Green, M. R. (2007). An elaborate pathway required for Ras-mediated epigenetic silencing. *Nature*, 449(7165), 1073-1077.
- Ghosh, G., & Van Duyne, G. D. (1996). Pieces of the puzzle: assembling the preinitiation complex of Pol II. *Structure*, 4(8), 891-895.
- Giese, K., Kingsley, C., Kirshner, J. R., & Grosschedl, R. (1995). Assembly and function of a TCR alpha enhancer complex is dependent on LEF-1-induced DNA bending and multiple protein-protein interactions. *Genes Dev*, 9(8), 995-1008.
- Gill, G. (1994). Transcriptional initiation. Taking the initiative. *Curr Biol*, 4(4), 374-376.
- Goodrich, L. V., & Scott, M. P. (1998). Hedgehog and patched in neural development and disease. *Neuron*, 21(6), 1243-1257.
- Grant, C. E., Vasa, M. Z., & Deeley, R. G. (1995). cIRF-3, a new member of the interferon regulatory factor (IRF) family that is rapidly and transiently induced by dsRNA. *Nucleic Acids Res*, 23(12), 2137-2146.
- Graves, J. A. (1998). Evolution of the mammalian Y chromosome and sex-determining genes. *J Exp Zool*, 281(5), 472-481.
- Gregorieff, A., & Clevers, H. (2005). Wnt signaling in the intestinal epithelium: from endoderm to cancer. *Genes Dev*, 19(8), 877-890.
- Grewal, S. I., & Elgin, S. C. (2002). Heterochromatin: new possibilities for the inheritance of structure. *Curr Opin Genet Dev*, 12(2), 178-187.
- Grewal, S. I., & Moazed, D. (2003). Heterochromatin and epigenetic control of gene expression. *Science*, 301(5634), 798-802.
- Gubbay, J., Collignon, J., Koopman, P., Capel, B., Economou, A., Munsterberg, A., et al. (1990). A gene mapping to the sex-determining region of the mouse Y chromosome is a member of a novel family of embryonically expressed genes. *Nature*, 346(6281), 245-250.
- Hamilton, A. J., & Baulcombe, D. C. (1999). A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science*, 286(5441), 950-952.
- Hannon, G. J. (2002). RNA interference. *Nature*, 418(6894), 244-251.

- Hargrave, M., James, K., Nield, K., Toomes, C., Georgas, K., Sullivan, T., et al. (2000). Fine mapping of the neurally expressed gene SOX14 to human 3q23, relative to three congenital diseases. *Hum Genet*, 106(4), 432-439.
- Hargrave, M., James, K., Yamada, T. & Koopman, P. (2000). *Sox14* maps to mouse Chromosome 9 and shows no mutations in the neurological mouse mutants ducky and tippy. *Mamm. Genome* 11, 231-233
- Hargrave, M., Karunaratne, A., Cox, L., Wood, S., Koopman, P., & Yamada, T. (2000). The HMG box transcription factor gene *Sox14* marks a novel subset of ventral interneurons and is regulated by sonic hedgehog. *Dev Biol*, 219(1), 142-153.
- Harley, V. R., Lovell-Badge, R., & Goodfellow, P. N. (1994). Definition of a consensus DNA binding site for SRY. *Nucleic Acids Res*, 22(8), 1500-1501.
- Hashimoto-Torii, K., Motoyama, J., Hui, C. C., Kuroiwa, A., Nakafuku, M., & Shimamura, K. (2003). Differential activities of Sonic hedgehog mediated by Gli transcription factors define distinct neuronal subtypes in the dorsal thalamus. *Mech Dev*, 120(10), 1097-1111.
- Hatini, V., Huh, S. O., Herzlinger, D., Soares, V. C., & Lai, E. (1996). Essential role of stromal mesenchyme in kidney morphogenesis revealed by targeted disruption of Winged Helix transcription factor BF-2. *Genes Dev*, 10(12), 1467-1478.
- Heeg-Truesdell, E., & LaBonne, C. (2004). A slug, a fox, a pair of sox: transcriptional responses to neural crest inducing signals. *Birth Defects Res C Embryo Today*, 72(2), 124-139.
- Herzog, W., Zeng, X., Lele, Z., Sonntag, C., Ting, J. W., Chang, C. Y., et al. (2003). Adenohypophysis formation in the zebrafish and its dependence on sonic hedgehog. *Dev Biol*, 254(1), 36-49.
- Hiraoka, Y., Ogawa, M., Sakai, Y., Kido, S., & Aiso, S. (1998). The mouse *Sox5* gene encodes a protein containing the leucine zipper and the Q box. *Biochim Biophys Acta*, 1399(1), 40-46.
- Holen, T., Amarzguioui, M., Wiiger, M. T., Babaie, E., & Prydz, H. (2002). Positional effects of short interfering RNAs targeting the human coagulation trigger Tissue Factor. *Nucleic Acids Res*, 30(8), 1757-1766.
- Hong, H. K., Noveroske, J. K., Headon, D. J., Liu, T., Sy, M. S., Justice, M. J., et al. (2001). The winged helix/forkhead transcription factor *Foxq1* regulates differentiation of hair in satin mice. *Genesis*, 29(4), 163-171.
- Honore, S. M., Aybar, M. J., & Mayor, R. (2003). *Sox10* is required for the early development of the prospective neural crest in *Xenopus* embryos. *Dev Biol*, 260(1), 79-96.
- Hooper, J. E., & Scott, M. P. (2005). Communicating with Hedgehogs. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 6(4), 306-317.
- Hosking, B. M., Wyeth, J. R., Pennisi, D. J., Wang, S. C., Koopman, P., & Muscat, G. E. (2001). Cloning and functional analysis of the Sry-related HMG box gene, *Sox18*. *Gene*, 262(1-2), 239-247.
- Hulander, M., Wurst, W., Carlsson, P., & Enerback, S. (1998). The winged helix transcription factor *Fkh10* is required for normal development of the inner ear. *Nat Genet*, 20(4), 374-376.
- Jacob, J., & Briscoe, J. (2003). Gli proteins and the control of spinal-cord patterning. *EMBO Rep*, 4(8), 761-765.
- Jacquemin, P., Lemaigre, F. P., & Rousseau, G. G. (2003). The Onecut transcription factor HNF-6 (OC-1) is required for timely specification of the pancreas and acts upstream of *Pdx-1* in the specification cascade. *Dev Biol*, 258(1), 105-116.
- Jensen, S., Gassama, M. P., & Heidmann, T. (1999). Cosuppression of I transposon activity in *Drosophila* by I-containing sense and antisense transgenes. *Genetics*, 153(4), 1767-1774.
- Jenuwein, T., & Allis, C. D. (2001). Translating the histone code. *Science*, 293(5532), 1074-1080.

- Johnson, L., Cao, X., & Jacobsen, S. (2002). Interplay between two epigenetic marks. DNA methylation and histone H3 lysine 9 methylation. *Curr Biol*, 12(16), 1360-1367.
- Kaestner, K. H., Hiemisch, H., Luckow, B., & Schutz, G. (1994). The HNF-3 gene family of transcription factors in mice: gene structure, cDNA sequence, and mRNA distribution. *Genomics*, 20(3), 377-385.
- Kaestner, K. H., Hiemisch, H., & Schutz, G. (1998). Targeted disruption of the gene encoding hepatocyte nuclear factor 3gamma results in reduced transcription of hepatocyte-specific genes. *Mol Cell Biol*, 18(7), 4245-4251.
- Kaestner, K. H., Katz, J., Liu, Y., Drucker, D. J., & Schutz, G. (1999). Inactivation of the winged helix transcription factor HNF3alpha affects glucose homeostasis and islet glucagon gene expression in vivo. *Genes Dev*, 13(4), 495-504.
- Kaestner, K. H., Silberg, D. G., Traber, P. G., & Schutz, G. (1997). The mesenchymal winged helix transcription factor Fkh6 is required for the control of gastrointestinal proliferation and differentiation. *Genes Dev*, 11(12), 1583-1595.
- Kalinichenko, V. V., Lim, L., Shin, B., & Costa, R. H. (2001). Differential expression of forkhead box transcription factors following butylated hydroxytoluene lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 280(4), L695-704.
- Kamachi, Y., Sockanathan, S., Liu, Q., Breitman, M., Lovell-Badge, R., & Kondoh, H. (1995). Involvement of SOX proteins in lens-specific activation of crystallin genes. *Embo J*, 14(14), 3510-3519.
- 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(13), 2521-2532.
- Kamachi, Y., Uchikawa, M., & Kondoh, H. (2000). Pairing SOX off: with partners in the regulation of embryonic development. *Trends Genet*, 16(4), 182-187.
- 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 Dev*, 15(10), 1272-1286.
- Kanai, Y., Kanai-Azuma, M., Noce, T., Saido, T. C., Shiroishi, T., Hayashi, Y., et al. (1996). Identification of two Sox17 messenger RNA isoforms, with and without the high mobility group box region, and their differential expression in mouse spermatogenesis. *J Cell Biol*, 133(3), 667-681.
- Katoh, M. (2007). Networking of WNT, FGF, Notch, BMP, and Hedgehog signaling pathways during carcinogenesis. *Stem Cell Rev*, 3(1), 30-38.
- Katoh, M. (2009). Transcriptional mechanisms of WNT5A based on NF-kappaB, Hedgehog, TGFbeta, and Notch signaling cascades. *Int J Mol Med*, 23(6), 763-769.
- Katoh, Y., & Katoh, M. (2005). Comparative genomics on SOX2 orthologs. *Oncol Rep*, 14(3), 797-800.
- Kaufman, R. J. (1999). Double-stranded RNA-activated protein kinase mediates virus-induced apoptosis: a new role for an old actor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(21), 11693-11695.
- Kennison, J. A., & Southworth, J. W. (2002). Transvection in Drosophila. *Adv Genet*, 46, 399-420.
- Kidson, S. H., Kume, T., Deng, K., Winfrey, V., & Hogan, B. L. (1999). The forkhead/winged-helix gene, Mf1, is necessary for the normal development of the cornea and formation of the anterior chamber in the mouse eye. *Dev Biol*, 211(2), 306-322.
- Kiefer, J. C. (2007). Back to basics: Sox genes. *Dev Dyn*, 236(8), 2356-2366.
- Kirby, P. J., Waters, P. D., Delbridge, M., Svartman, M., Stewart, A. N., Nagai, K., et al. (2002). Cloning and mapping of platypus SOX2 and SOX14: insights into SOX group B evolution. *Cytogenet Genome Res*, 98(1), 96-100.

- Koebornick, K., & Pieler, T. (2002). Gli-type zinc finger proteins as bipotential transducers of Hedgehog signaling. *Differentiation*, 70(2-3), 69-76.
- Kogerman, P., Grimm, T., Kogerman, L., Krause, D., Unden, A. B., Sandstedt, B., et al. (1999). Mammalian suppressor-of-fused modulates nuclear-cytoplasmic shuttling of Gli-1. *Nat Cell Biol*, 1(5), 312-319.
- Korver, W., Roose, J., Wilson, A., & Clevers, H. (1997). The winged-helix transcription factor Trident is expressed in actively dividing lymphocytes. *Immunobiology*, 198(1-3), 157-161.
- Kovacevic-Grujicic, N., Mojsin, M., Djurovic, J., Petrovic, I., & Stevanovic, M. (2008). Comparison of promoter regions of SOX3, SOX14 and SOX18 orthologs in mammals. *DNA Seq*, 19(3), 185-194.
- 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. *Arch Biochem Biophys*, 467(2), 163-173.
- Kume, T., Deng, K., & Hogan, B. L. (2000). Murine forkhead/winged helix genes Foxc1 (Mf1) and Foxc2 (Mfh1) are required for the early organogenesis of the kidney and urinary tract. *Development*, 127(7), 1387-1395.
- Kuroiwa, A., Uchikawa, M., Kamachi, Y., Kondoh, H., Nishida-Umehara, C., Masabanda, J., et al. (2002). Chromosome assignment of eight SOX family genes in chicken. *Cytogenet Genome Res*, 98(2-3), 189-193.
- Labosky, P. A., Winnier, G. E., Jetton, T. L., Hargett, L., Ryan, A. K., Rosenfeld, M. G., et al. (1997). The winged helix gene, Mf3, is required for normal development of the diencephalon and midbrain, postnatal growth and the milk-ejection reflex. *Development*, 124(7), 1263-1274.
- Lai, E., Clark, K. L., Burley, S. K., & Darnell, J. E., Jr. (1993). Hepatocyte nuclear factor 3/fork head or "winged helix" proteins: a family of transcription factors of diverse biologic function. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90(22), 10421-10423.
- Laudet, V., Stehelin, D., & Clevers, H. (1993). Ancestry and diversity of the HMG box superfamily. *Nucleic Acids Res*, 21(10), 2493-2501.
- Lee, J., Platt, K. A., Censullo, P., & Ruiz i Altaba, A. (1997). Gli1 is a target of Sonic hedgehog that induces ventral neural tube development. *Development*, 124(13), 2537-2552.
- 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. *Int J Biochem Cell Biol*, 39(12), 2195-2214.
- Lefebvre, V., Huang, W., Harley, V. R., Goodfellow, P. N., & de Crombrughe, B. (1997). SOX9 is a potent activator of the chondrocyte-specific enhancer of the pro alpha1(II) collagen gene. *Mol Cell Biol*, 17(4), 2336-2346.
- Lefebvre, V., Li, P., & de Crombrughe, B. (1998). A new long form of Sox5 (L-Sox5), Sox6 and Sox9 are coexpressed in chondrogenesis and cooperatively activate the type II collagen gene. *Embo J*, 17(19), 5718-5733.
- Lejeune, S., Huguette, E. L., Hamby, A., Poulson, R., & Harris, A. L. (1995). Wnt5a cloning, expression, and up-regulation in human primary breast cancers. *Clin Cancer Res*, 1(2), 215-222.
- Lettice, L. A., Horikoshi, T., Heaney, S. J., van Baren, M. J., van der Linde, H. C., Breedveld, G. J., et al. (2002). Disruption of a long-range cis-acting regulator for Shh causes preaxial polydactyly. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(11), 7548-7553.
- Levin, M., Johnson, R. L., Stern, C. D., Kuehn, M., & Tabin, C. (1995). A molecular pathway determining left-right asymmetry in chick embryogenesis. *Cell*, 82(5), 803-814.

- Lewis, K. E., & Eisen, J. S. (2001). Hedgehog signaling is required for primary motoneuron induction in zebrafish. *Development*, 128(18), 3485-3495.
- Li, Q., Herrler, M., Landsberger, N., Kaludov, N., Ogryzko, V. V., Nakatani, Y., et al. (1998). Xenopus NF-Y pre-sets chromatin to potentiate p300 and acetylation-responsive transcription from the Xenopus hsp70 promoter in vivo. *Embo J*, 17(21), 6300-6315.
- Locker, J. (2001). *Transcription Factors*: BIOS Scientific Publishers Limited.
- Lum, L., & Beachy, P. A. (2004). The Hedgehog response network: sensors, switches, and routers. *Science*, 304(5678), 1755-1759.
- Lynn, F. C., Smith, S. B., Wilson, M. E., Yang, K. Y., Nekrep, N., & German, M. S. (2007). Sox9 coordinates a transcriptional network in pancreatic progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(25), 10500-10505.
- Ma, X., Chen, K., Huang, S., Zhang, X., Adegboyega, P. A., Evers, B. M., et al. (2005). Frequent activation of the hedgehog pathway in advanced gastric adenocarcinomas. *Carcinogenesis*, 26(10), 1698-1705.
- Maesawa, C., Tamura, G., Iwaya, T., Ogasawara, S., Ishida, K., Sato, N., et al. (1998). Mutations in the human homologue of the Drosophila patched gene in esophageal squamous cell carcinoma. *Genes Chromosomes Cancer*, 21(3), 276-279.
- Mahlapuu, M., Enerback, S., & Carlsson, P. (2001). Haploinsufficiency of the forkhead gene Foxf1, a target for sonic hedgehog signaling, causes lung and foregut malformations. *Development*, 128(12), 2397-2406.
- Malas, S., Duthie, S., Deloukas, P., & Episkopou, V. (1999). The isolation and high-resolution chromosomal mapping of human SOX14 and SOX21; two members of the SOX gene family related to SOX1, SOX2, and SOX3. *Mamm Genome*, 10(9), 934-937.
- Mantovani, R. (1998). A survey of 178 NF-Y binding CCAAT boxes. *Nucleic Acids Res.*, 26(5), 1135-1143.
- Marian, A. J., & Roberts, R. (1993). An overview of nucleic acids and gene regulation. *Herz*, 18(4), 203-212.
- Marjori Matzke, A. J. M. M., Jan M. Kooter. (2001). RNA: Guiding Gene Silencing. *Science*, 293, 1080 - 1083.
- Marti, E., Bumcrot, D. A., Takada, R., & McMahon, A. P. (1995). Requirement of 19K form of Sonic hedgehog for induction of distinct ventral cell types in CNS explants. *Nature*, 375(6529), 322-325.
- McMahon, A. P. (2000). More surprises in the Hedgehog signaling pathway. *Cell*, 100(2), 185-188.
- Mertin, S., McDowall, S. G., & Harley, V. R. (1999). The DNA-binding specificity of SOX9 and other SOX proteins. *Nucleic Acids Res*, 27(5), 1359-1364.
- Moazed, D. (2001). Common themes in mechanisms of gene silencing. *Mol Cell*, 8(3), 489-498.
- Mojsin M., K. G. N., Krstic A., Popovic J., Milivojevic M., Stevanovic M., , , . (2010). Comparative analysis of SOX3 protein orthologues: Expansion of homopolymeric amino acid tracts during vertebrate evolution. *Biochemical genetics, Prihvaćen rad*.
- Monaghan, A. P., Kaestner, K. H., Grau, E., & Schutz, G. (1993). Postimplantation expression patterns indicate a role for the mouse forkhead/HNF-3 alpha, beta and gamma genes in determination of the definitive endoderm, chordamesoderm and neuroectoderm. *Development*, 119(3), 567-578.
- Nakayama, J., Rice, J. C., Strahl, B. D., Allis, C. D., & Grewal, S. I. (2001). Role of histone H3 lysine 9 methylation in epigenetic control of heterochromatin assembly. *Science*, 292(5514), 110-113.

- Nehls, M., Pfeifer, D., Schorpp, M., Hedrich, H., & Boehm, T. (1994). New member of the winged-helix protein family disrupted in mouse and rat nude mutations. *Nature*, 372(6501), 103-107.
- Nimwegen, E. (2003). Scaling laws in the functional content of genomes. *Trends in Genetics*, 9(19), 479-484.
- 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 Dev*, 12(6), 776-781.
- Novak, A., & Dedhar, S. (1999). Signaling through beta-catenin and Lef/Tcf. *Cell Mol Life Sci*, 56(5-6), 523-537.
- Nykanen, A., Haley, B., & Zamore, P. D. (2001). ATP requirements and small interfering RNA structure in the RNA interference pathway. *Cell*, 107(3), 309-321.
- Odent, S., Atti-Bitach, T., Blayau, M., Mathieu, M., Aug, J., Delezo de, A. L., et al. (1999). Expression of the Sonic hedgehog (SHH) gene during early human development and phenotypic expression of new mutations causing holoprosencephaly. *Hum Mol Genet*, 8(9), 1683-1689.
- Odom, D. T., Dowell, R. D., Jacobsen, E. S., Gordon, W., Danford, T. W., MacIsaac, K. D., et al. (2007). Tissue-specific transcriptional regulation has diverged significantly between human and mouse. *Nat Genet*, 39(6), 730-732.
- Ohneda, K., & Yamamoto, M. (2002). Roles of hematopoietic transcription factors GATA-1 and GATA-2 in the development of red blood cell lineage. *Acta Haematol*, 108(4), 237-245.
- Okuda, Y., Yoda, H., Uchikawa, M., Furutani-Seiki, M., Takeda, H., Kondoh, H., et al. (2006). Comparative genomic and expression analysis of group B1 sox genes in zebrafish indicates their diversification during vertebrate evolution. *Dev Dyn*, 235(3), 811-825.
- Osaki, E., Nishina, Y., Inazawa, J., Copeland, N. G., Gilbert, D. J., Jenkins, N. A., et al. (1999). Identification of a novel Sry-related gene and its germ cell-specific expression. *Nucleic Acids Res*, 27(12), 2503-2510.
- Osterloh, J. M., & Freeman, M. R. (2009). Neuronal death or dismemberment mediated by Sox14. *Nat Neurosci*, 12(12), 1479-1480.
- Park, Y., & Kuroda, M. I. (2001). Epigenetic aspects of X-chromosome dosage compensation. *Science*, 293(5532), 1083-1085.
- Patil, M. A., Zhang, J., Ho, C., Cheung, S. T., Fan, S. T., & Chen, X. (2006). Hedgehog signaling in human hepatocellular carcinoma. *Cancer Biol Ther*, 5(1), 111-117.
- Pepicelli, C. V., Lewis, P. M., & McMahon, A. P. (1998). Sonic hedgehog regulates branching morphogenesis in the mammalian lung. *Curr Biol*, 8(19), 1083-1086.
- Petrovic, I., Kovacevic-Grujicic, N., & Stevanovic, M. (2009). ZBP-89 and Sp3 down-regulate while NF-Y up-regulates SOX18 promoter activity in HeLa cells. *Mol Biol Rep*, 36(5), 993-1000.
- Pevny, L., & Placzek, M. (2005). SOX genes and neural progenitor identity. *Curr Opin Neurobiol*, 15(1), 7-13.
- Pevny, L. H., & Lovell-Badge, R. (1997). Sox genes find their feet. *Curr Opin Genet Dev*, 7(3), 338-344.
- Poh, A., Karunaratne, A., Kolle, G., Huang, N., Smith, E., Starkey, J., et al. (2002). Patterning of the vertebrate ventral spinal cord. *Int J Dev Biol*, 46(4), 597-608.
- Pola R, L. L., Silver M. (2001). The morphogen sonic hedgehog is an indirect angiogenic agent upregulating two families of angiogenic growth factors. *Nat Med*, 7, 706.
- Popovic, J., & Stevanovic, M. (2009). Remarkable evolutionary conservation of SOX14 orthologues. *J Genet*, 88(1), 15-24.

- Popovic J., K. A., Petrovic I., Stevanovic M. (2010). Tissue-specific Forkhead protein FOXA2 up-regulates SOX14 gene expression. *Biochim Biophys Acta*.
- Pusch, C., Hustert, E., Pfeifer, D., Sudbeck, P., Kist, R., Roe, B., et al. (1998). The SOX10/Sox10 gene from human and mouse: sequence, expression, and transactivation by the encoded HMG domain transcription factor. *Hum Genet*, 103(2), 115-123.
- Quandt, K., Frech, K., Karas, H., Wingender, E., & Werner, T. (1995). MatInd and MatInspector: new fast and versatile tools for detection of consensus matches in nucleotide sequence data. *Nucleic Acids Res*, 23(23), 4878-4884.
- Rahnama, F., Shimokawa, T., Lauth, M., Finta, C., Kogerman, P., Teglund, S., et al. (2006). Inhibition of GLI1 gene activation by Patched1. *Biochem J*, 394(Pt 1), 19-26.
- Ramakrishnan, V., Finch, J. T., Graziano, V., Lee, P. L., & Sweet, R. M. (1993). Crystal structure of globular domain of histone H5 and its implications for nucleosome binding. *Nature*, 362(6417), 219-223.
- Rea, S., Eisenhaber, F., O'Carroll, D., Strahl, B. D., Sun, Z. W., Schmid, M., et al. (2000). Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases. *Nature*, 406(6796), 593-599.
- Reinhart, B. J., & Bartel, D. P. (2002). Small RNAs correspond to centromere heterochromatic repeats. *Science*, 297(5588), 1831.
- 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 Dev*, 17(16), 2048-2059.
- 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. *Nat Genet*, 36(3), 247-255.
- Roberts, W. M., Douglass, E. C., Peiper, S. C., Houghton, P. J., & Look, A. T. (1989). Amplification of the gli gene in childhood sarcomas. *Cancer Res*, 49(19), 5407-5413.
- Roelink, H., Porter, J. A., Chiang, C., Tanabe, Y., Chang, D. T., Beachy, P. A., et al. (1995). Floor plate and motor neuron induction by different concentrations of the amino-terminal cleavage product of sonic hedgehog autoproteolysis. *Cell*, 81(3), 445-455.
- Romier, C., Cocchiarella, F., Mantovani, R., & Moras, D. (2003). The NF-YB/NF-YC structure gives insight into DNA binding and transcription regulation by CCAAT factor NF-Y. *J Biol Chem*, 278(2), 1336-1345.
- Ronchi, A., Bendorini, M., Mongelli, N., & Mantovani, R. (1995). CCAAT-box binding protein NF-Y (CBF, CP1) recognizes the minor groove and distorts DNA. *Nucleic Acids Res.*, 23(22), 4565-4572.
- Ruppert, J. M., Vogelstein, B., & Kinzler, K. W. (1991). The zinc finger protein GLI transforms primary cells in cooperation with adenovirus E1A. *Mol Cell Biol*, 11(3), 1724-1728.
- Sanchez, P., Hernandez, A. M., Stecca, B., Kahler, A. J., DeGueme, A. M., Barrett, A., et al. (2004). Inhibition of prostate cancer proliferation by interference with SONIC HEDGEHOG-GLI1 signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(34), 12561-12566.
- Sandberg, M., Kallstrom, M., & Muhr, J. (2005). Sox21 promotes the progression of vertebrate neurogenesis. *Nat Neurosci*, 8(8), 995-1001.
- Sasaki, H., & Hogan, B. L. (1993). Differential expression of multiple fork head related genes during gastrulation and axial pattern formation in the mouse embryo. *Development*, 118(1), 47-59.
- Sasaki, H., & Hogan, B. L. (1994). HNF-3 beta as a regulator of floor plate development. *Cell*, 76(1), 103-115.

- Sasaki, H., Hui, C., Nakafuku, M., & Kondoh, H. (1997). A binding site for Gli proteins is essential for HNF-3beta floor plate enhancer activity in transgenics and can respond to Shh in vitro. *Development*, 124(7), 1313-1322.
- Schepers, G. E., Bullejos, M., Hosking, B. M., & Koopman, P. (2000). Cloning and characterisation of the Sry-related transcription factor gene Sox8. *Nucleic Acids Res*, 28(6), 1473-1480.
- 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. *Dev Cell*, 3(2), 167-170.
- Scholpp, S., Wolf, O., Brand, M., & Lumsden, A. (2006). Hedgehog signalling from the zona limitans intrathalamica orchestrates patterning of the zebrafish diencephalon. *Development*, 133(5), 855-864.
- Sharp, P. A., & Zamore, P. D. (2000). Molecular biology. RNA interference. *Science*, 287(5462), 2431-2433.
- Shen, W., Scearce, L. M., Brestelli, J. E., Sund, N. J., & Kaestner, K. H. (2001). Foxa3 (hepatocyte nuclear factor 3gamma) is required for the regulation of hepatic GLUT2 expression and the maintenance of glucose homeostasis during a prolonged fast. *J Biol Chem*, 276(46), 42812-42817.
- Shih, D. Q., Navas, M. A., Kuwajima, S., Duncan, S. A., & Stoffel, M. (1999). Impaired glucose homeostasis and neonatal mortality in hepatocyte nuclear factor 3alpha-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(18), 10152-10157.
- Sinner, D., Rankin, S., Lee, M., & Zorn, A. M. (2004). Sox17 and beta-catenin cooperate to regulate the transcription of endodermal genes. *Development*, 131(13), 3069-3080.
- Sisson, J. C., Ho, K. S., Suyama, K., & Scott, M. P. (1997). Costal2, a novel kinesin-related protein in the Hedgehog signaling pathway. *Cell*, 90(2), 235-245.
- Smale, S. T., & Kadonaga, J. T. (2003). The RNA polymerase II core promoter. *Annu Rev Biochem*, 72, 449-479.
- Soppe, W. J., Jasencakova, Z., Houben, A., Kakutani, T., Meister, A., Huang, M. S., et al. (2002). DNA methylation controls histone H3 lysine 9 methylation and heterochromatin assembly in Arabidopsis. *Embo J*, 21(23), 6549-6559.
- Sottile, V., Li, M., & Scotting, P. J. (2006). Stem cell marker expression in the Bergmann glia population of the adult mouse brain. *Brain Res*, 1099(1), 8-17.
- Stamatakis, D., Ulloa, F., Tsoni, S. V., Mynett, A., & Briscoe, J. (2005). A gradient of Gli activity mediates graded Sonic Hedgehog signaling in the neural tube. *Genes Dev*, 19(5), 626-641.
- Stark, G. R., Kerr, I. M., Williams, B. R., Silverman, R. H., & Schreiber, R. D. (1998). How cells respond to interferons. *Annu Rev Biochem*, 67, 227-264.
- Steriade, M., & Llinas, R. R. (1988). The functional states of the thalamus and the associated neuronal interplay. *Physiol Rev*, 68(3), 649-742.
- Stevanovic, M., Zuffardi, O., Collignon, J., Lovell-Badge, R., & Goodfellow, P. (1994). The cDNA sequence and chromosomal location of the human SOX2 gene. *Mamm Genome*, 5(10), 640-642.
- Stolt, C. C., Schlierf, A., Lommes, P., Hillgartner, S., Werner, T., Kosian, T., et al. (2006). SoxD proteins influence multiple stages of oligodendrocyte development and modulate SoxE protein function. *Dev Cell*, 11(5), 697-709.
- Stolt, C. C., & Wegner, M. (2010). SoxE function in vertebrate nervous system development. *Int J Biochem Cell Biol*, 42(3), 437-440.
- Stone, D. M., Hynes, M., Armanini, M., Swanson, T. A., Gu, Q., Johnson, R. L., et al. (1996). The tumour-suppressor gene patched encodes a candidate receptor for Sonic hedgehog. *Nature*, 384(6605), 129-134.

- Stone, D. M., Murone, M., Luoh, S., Ye, W., Armanini, M. P., Gurney, A., et al. (1999). Characterization of the human suppressor of fused, a negative regulator of the zinc-finger transcription factor Gli. *J Cell Sci*, 112 (Pt 23), 4437-4448.
- Sudbeck, P., & Scherer, G. (1997). Two independent nuclear localization signals are present in the DNA-binding high-mobility group domains of SRY and SOX9. *J Biol Chem*, 272(44), 27848-27852.
- Sund, N. J., Ang, S. L., Sackett, S. D., Shen, W., Daigle, N., Magnuson, M. A., et al. (2000). Hepatocyte nuclear factor 3beta (Foxa2) is dispensable for maintaining the differentiated state of the adult hepatocyte. *Mol Cell Biol*, 20(14), 5175-5183.
- Taipale, J., Cooper, M. K., Maiti, T., & Beachy, P. A. (2002). Patched acts catalytically to suppress the activity of Smoothened. *Nature*, 418(6900), 892-897.
- Tamaru, H., & Selker, E. U. (2001). A histone H3 methyltransferase controls DNA methylation in *Neurospora crassa*. *Nature*, 414(6861), 277-283.
- Tavella, S., Biticchi, R., Schito, A., Minina, E., Di Martino, D., Pagano, A., et al. (2004). Targeted expression of SHH affects chondrocyte differentiation, growth plate organization, and Sox9 expression. *J Bone Miner Res*, 19(10), 1678-1688.
- Thayer, S. P., di Magliano, M. P., Heiser, P. W., Nielsen, C. M., Roberts, D. J., Lauwers, G. Y., et al. (2003). Hedgehog is an early and late mediator of pancreatic cancer tumorigenesis. *Nature*, 425(6960), 851-856.
- Thievensen, I., Wolter, M., Prior, A., Seifert, H. H., & Schulz, W. A. (2005). Hedgehog signaling in normal urothelial cells and in urothelial carcinoma cell lines. *J Cell Physiol*, 203(2), 372-377.
- Tsukui, T., Capdevila, J., Tamura, K., Ruiz-Lozano, P., Rodriguez-Esteban, C., Yonei-Tamura, S., et al. (1999). Multiple left-right asymmetry defects in Shh(-/-) mutant mice unveil a convergence of the shh and retinoic acid pathways in the control of Lefty-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(20), 11376-11381.
- Turner, B. M., Birley, A. J., & Lavender, J. (1992). Histone H4 isoforms acetylated at specific lysine residues define individual chromosomes and chromatin domains in *Drosophila* polytene nuclei. *Cell*, 69(2), 375-384.
- 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. *Mech Dev*, 84(1-2), 103-120.
- Uwanogho, D., Rex, M., Cartwright, E. J., Pearl, G., Healy, C., Scotting, P. J., et al. (1995). Embryonic expression of the chicken Sox2, Sox3 and Sox11 genes suggests an interactive role in neuronal development. *Mech Dev*, 49(1-2), 23-36.
- van de Wetering, M., Oosterwegel, M., van Norren, K., & Clevers, H. (1993). Sox-4, an Sry-like HMG box protein, is a transcriptional activator in lymphocytes. *Embo J*, 12(10), 3847-3854.
- Vavricka, S. R., Jung, D., Fried, M., Grutzner, U., Meier, P. J., & Kullak-Ublick, G. A. (2004). The human organic anion transporting polypeptide 8 (SLCO1B3) gene is transcriptionally repressed by hepatocyte nuclear factor 3beta in hepatocellular carcinoma. *J Hepatol*, 40(2), 212-218.
- Verzi, M. P., Khan, A. H., Ito, S., & Shivdasani, R. A. (2008). Transcription factor foxq1 controls mucin gene expression and granule content in mouse stomach surface mucous cells. *Gastroenterology*, 135(2), 591-600.
- Villavicencio, E. H., Walterhouse, D. O., & Iannaccone, P. M. (2000). The sonic hedgehog-patched-gli pathway in human development and disease. *Am J Hum Genet*, 67(5), 1047-1054.

- Vokes SA, Y. T., Heimark RL. (2004). Hedgehog signaling is essential for endothelial tube formation during vasculogenesis. *Development*, 131, 4371.
- Wallrath, L. L., Lu, Q., Granok, H., & Elgin, S. C. (1994). Architectural variations of inducible eukaryotic promoters: preset and remodeling chromatin structures. *Bioessays*, 16(3), 165-170.
- 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. *J Comp Neurol*, 497(1), 88-100.
- Watkins, D. N., Berman, D. M., Burkholder, S. G., Wang, B., Beachy, P. A., & Baylin, S. B. (2003). Hedgehog signalling within airway epithelial progenitors and in small-cell lung cancer. *Nature*, 422(6929), 313-317.
- Wechsler, J., Greene, M., McDevitt, M. A., Anastasi, J., Karp, J. E., Le Beau, M. M., et al. (2002). Acquired mutations in GATA1 in the megakaryoblastic leukemia of Down syndrome. *Nat Genet*, 32(1), 148-152.
- Wegner, M. (1999). From head to toes: the multiple facets of Sox proteins. *Nucleic Acids Res.*, 27(6), 1409-1420.
- Wegner, M., & Stolt, C. C. (2005). From stem cells to neurons and glia: a Soxist's view of neural development. *Trends Neurosci*, 28(11), 583-588.
- Wehr, R., Mansouri, A., de Maeyer, T., & Gruss, P. (1997). Fkh5-deficient mice show dysgenesis in the caudal midbrain and hypothalamic mammillary body. *Development*, 124(22), 4447-4456.
- Weigel, D., Jurgens, G., Kuttner, F., Seifert, E., & Jackle, H. (1989). The homeotic gene fork head encodes a nuclear protein and is expressed in the terminal regions of the Drosophila embryo. *Cell*, 57(4), 645-658.
- Weinstein, D. C., Ruiz i Altaba, A., Chen, W. S., Hoodless, P., Prezioso, V. R., Jessell, T. M., et al. (1994). The winged-helix transcription factor HNF-3 beta is required for notochord development in the mouse embryo. *Cell*, 78(4), 575-588.
- Weiss, M. A. (2001). Floppy SOX: mutual induced fit in hmg (high-mobility group) box-DNA recognition. *Mol Endocrinol*, 15(3), 353-362.
- Werner, C. A., Dohner, H., Joos, S., Trumper, L. H., Baudis, M., Barth, T. F., et al. (1997). High-level DNA amplifications are common genetic aberrations in B-cell neoplasms. *Am J Pathol*, 151(2), 335-342.
- Wiebe, M. S., Wilder, P. J., Kelly, D., & Rizzino, A. (2000). Isolation, characterization, and differential expression of the murine Sox-2 promoter. *Gene*, 246(1-2), 383-393.
- Wilmore, H. P., Smith, M. J., Wilcox, S. A., Bell, K. M., & Sinclair, A. H. (2000). SOX14 is a candidate gene for limb defects associated with BPES and Mobius syndrome. *Hum Genet*, 106(3), 269-276.
- Wilson, M., & Koopman, P. (2002). Matching SOX: partner proteins and co-factors of the SOX family of transcriptional regulators. *Curr Opin Genet Dev*, 12(4), 441-446.
- Wissmuller, S., Kosian, T., Wolf, M., Finzsch, M., & Wegner, M. (2006). The high-mobility-group domain of Sox proteins interacts with DNA-binding domains of many transcription factors. *Nucleic Acids Res*, 34(6), 1735-1744.
- Wolffe, A. P. (1994). Architectural transcription factors. *Science*, 264(5162), 1100-1101.
- Wolffe, A. P., & Pruss, D. (1996). Targeting chromatin disruption: Transcription regulators that acetylate histones. *Cell*, 84(6), 817-819.
- Wolfrum, C., Besser, D., Luca, E., & Stoffel, M. (2003). Insulin regulates the activity of forkhead transcription factor Hnf-3beta/Foxa-2 by Akt-mediated phosphorylation and nuclear/cytosolic localization. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(20), 11624-11629.

- Wolfrum, C., Shih, D. Q., Kuwajima, S., Norris, A. W., Kahn, C. R., & Stoffel, M. (2003). Role of Foxa-2 in adipocyte metabolism and differentiation. *J Clin Invest*, 112(3), 345-356.
- Wright, E., Hargrave, M. R., Christiansen, J., Cooper, L., Kun, J., Evans, T., et al. (1995). The Sry-related gene Sox9 is expressed during chondrogenesis in mouse embryos. *Nat Genet*, 9(1), 15-20.
- Wright, E. M., Snopek, B., & Koopman, P. (1993). Seven new members of the Sox gene family expressed during mouse development. *Nucleic Acids Res*, 21(3), 744.
- Wunderle, V. M., Critcher, R., Ashworth, A., & Goodfellow, P. N. (1996). Cloning and characterization of SOX5, a new member of the human SOX gene family. *Genomics*, 36(2), 354-358.
- Xuan, S., Baptista, C. A., Balas, G., Tao, W., Soares, V. C., & Lai, E. (1995). Winged helix transcription factor BF-1 is essential for the development of the cerebral hemispheres. *Neuron*, 14(6), 1141-1152.
- Yamada, T., Karunaratne, A., & Hargrave, M. (1999). Molecular control of cell type diversity in the developing spinal cord. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 26(9), 741-745.
- Yamagishi, H., Maeda, J., Hu, T., McAnally, J., Conway, S. J., Kume, T., et al. (2003). Tbx1 is regulated by tissue-specific forkhead proteins through a common Sonic hedgehog-responsive enhancer. *Genes Dev*, 17(2), 269-281.
- Yin, J. Q., & Wan, Y. (2002). RNA-mediated gene regulation system: now and the future (Review). *Int J Mol Med*, 10(4), 355-365.
- Yuan, H., Corbi, N., Basilico, C., & Dailey, L. (1995). Developmental-specific activity of the FGF-4 enhancer requires the synergistic action of Sox2 and Oct-3. *Genes Dev*, 9(21), 2635-2645.
- Yuan, X., Ta, T. C., Lin, M., Evans, J. R., Dong, Y., Bolotin, E., et al. (2009). Identification of an endogenous ligand bound to a native orphan nuclear receptor. *PLoS One*, 4(5), e5609.







РД 20745



300161905

СОBISS