

Univerzitet u Beogradu
Biološki fakultet

Danijela Drakulić

ANALIZA EFEKTA POVEĆANE EKSPRESIJE
SOX2 GENA NA ODRŽAVANJE PLURIPOTENTNOSTI,
PROLIFERACIJU I NEURALNU DIFERENCIJACIJU
EMBRIONALNIH KARCINOMSKIH NT2/D1 ČELIJA

Doktorska disertacija

Beograd, 2011.

Univerzitet u Beogradu

Biološki fakultet

Danijela Drakulić

**ANALIZA EFEKTA POVEĆANE EKSPRESIJE SOX2 GENA NA
ODRŽAVANJE PLURIPOTENTNOSTI, PROLIFERACIJU I
NEURALNU DIFERENCIJACIJU EMBRIONALNIH
KARCINOMSKIH NT2/D1 ĆELIJA**

Doktorska disertacija

Beograd, 2011

ČLANOVI KOMISIJE:

dr Milena Stevanović, naučni savetnik, dopisni član SANU

Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Univerzitet u
Beogradu

dr Goran Brajušković, docent

Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

dr Svetlana Radović, vanredni profesor

Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

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

Ovom prilikom se zahvaljujem dr Mileni Stevanović na ukazanom poverenju, savetima i kritičkoj analizi ovog rada.

Dr Svetlana Radović je bila član za odbranu moje magistarske teze i sada je član komisije za odbranu ovog rada. Zahvaljujem joj se za pažnju, pomoć i kritičku analizu ovog rada.

Dr Goranu Brajuškoviću se zahvaljujem na ukazanom strpljenju u pregledanju i oceni ove teze.

Veliko hvala Aleksandru Krstiću na nesebičnoj pomoći i prijateljstvu.

Mojim kolegama Nataši, Jeleni, Mariji, Andrijani, Mileni, Isidori, Dijani, Slobodanu, Danijeli i Željku veliko hvala na pomoći, razumevanju i prijateljskoj atmosferi u kojoj je bilo zadovoljstvo raditi.

Veliko hvala i svim kolegama Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo.

Posebno želim da se zahvalim mojoj porodici, čije su mi razumevanje i podrška bili od neprocenjivog značaja i njima posvećujem ovaj rad.

APSTRAKT

SOX2 transkripcioni faktor predstavlja univerzalni marker pluripotentnih matičnih ćelija. Ovaj faktor poseduje značajne uloge tokom embrionalnog razvića kičmenjaka i jedan je od ključnih regulatora neuralne diferencijacije. Takođe, SOX2 transkripcioni faktor u različitim ćelijama promovira ili reprimira ćelijsku proliferaciju. NT2/D1, pluripotentna embrionalna karcinomska ćelijska linija koja vodi poreklo od malignog testikularnog teratokarcinoma, je slična ranim embrionalnim matičnim ćelijama. U prisustvu retinoične kiseline ove ćelije se diferenciraju u različite tipove ćelija, uključujući i zrele neurone. Imajući u vidu značajnu ulogu SOX2 gena u održavanju pluripotentnosti, proliferaciji i neuralnoj diferencijaciji, u ovoj disertaciji analiziran je uticaj povećane ekspresije ovog gena na ekspresiju markera pluripotentnosti, proliferaciju i neuralnu diferencijaciju NT2/D1 ćelija.

Stabilnom transfekcijom NT2/D1 ćelija SOX2/pcDNA3.1 konstruktom generisana su dva ćelijska klonova sa povećanom ekspresijom SOX2 gena (klonovi su označeni kao F5 i G3). Ovom metodom generisana su i tri NT2/D1 ćelijska klonova sa inducibilnom ekspresijom SOX2 gena kod kojih je ekspresija ovog gena regulisana različitim koncentracijama doksiciklina (klonovi su označeni kao E2, H9 i I7). Rezultati semi-kvantitativnog RT-PCR- a ukazuju da povećana ekspresija SOX2 gena dovodi do promene ekspresije ključnih markera pluripotentnosti (OCT4 i NANOG). Takođe, NT2/D1 ćelijski klonovi sa povećanom ekspresijom SOX2 gena (F5 i G3) ulaze u neuralnu diferencijaciju indukovanu retinoičnom kiselinom čak i u uslovima povećane ekspresije SOX2 gena. Tretman retinoičnom kiselinom u trajanju od tri nedelje doveo je do povećanja ekspresije markera neuralne diferencijacije (neuroD1 i sinaptofizin) kod NT2/D1 ćelijskih klonova sa povećanom ekspresijom SOX2 gena u poređenju sa ekspresijom ovih markera detektovanom kod tretiranih NT2/D1 ćelija. Testom za određivanje proliferativnog kapaciteta ćelija (MTT testom) je pokazano da je stopa rasta G3 ćelijskog klona povećana približno 1,3 puta u poređenju sa stopom rasta NT2/D1 ćelija.

U ovoj disertaciji su po prvi put prikazani rezultati koji pokazuju da povećana ekspresija SOX2 gena kod NT2/D1 ćelija dovodi do promene ekspresije ključnih markera pluripotentnosti, do promene proliferacije ovih ćelija, kao i do promene ekspresije markera neuralne diferencijacije nakon tri nedelje tretmana retinoičnom kiselinom.

Ključne reči: SOX2, NT2/D1, pluripotentnost, proliferacija ćelija, neuralna diferencijacija

ABSTRACT

SOX2, an universal marker of pluripotent stem cells, is a transcription factor that plays significant roles during embryonic development in vertebrates and it is one of the key regulators of neural differentiation. Furthermore, in different cellular contexts this transcription factor represses or promotes proliferation. NT2/D1, pluripotent embryonal carcinoma cell line originating from malignant testicular teratocarcinomas, resembles early embryonic stem cells. In the presence of retinoic acid, these cells differentiate into various cell types, including mature neurons. Given the critical role of SOX2 transcription factor in regulation of pluripotency, cell proliferation and neural differentiation, our aim has been to analyze effects of *SOX2* overexpression on expression of key pluripotency genes, cell proliferation and expression of neural markers during retinoic acid treatment of NT2/D1 cell line.

Two *SOX2*-overexpressing NT2/D1 cell clones (designated as F5 and G3) have been generated by stable transfection using *SOX2*/pcDNA3.1 expression construct. Furthermore, we have generated three inducible *SOX2*-overexpressing NT2/D1 cell clones (designated as E2, H9 and I7) in which *SOX2* expression is regulated by various concentrations of doxycycline. Results of semi-quantitative RT-PCR analysis demonstrated that *SOX2* overexpression in NT2/D1 cell clones resulted in altered expression of key pluripotency genes *OCT4* and *NANOG*. Furthermore, *SOX2*-overexpressing NT2/D1 cell clones (F5 and G3 cell clones) are able to enter into RA-dependent neural differentiation even in the presence of elevated *SOX2* expression. It is shown that upon three weeks of treatment by retinoic acid, expression of neural markers (*neuroD1* and synaptophysin) is higher in treated cell clones compared to treated parental NT2/D1 cells. In addition, results of cell proliferation assay (MTT test) demonstrated higher growth rate of G3 cell clone compared to the growth rate of parental cells.

By data presented here, for the first time, we demonstrated that *SOX2* overexpression in NT2/D1 cell line resulted in altered expression of pluripotency-related genes and proliferation rate and in altered expression of neural markers after three weeks of treatment by retinoic acid.

Key words: *SOX2*, NT2/D1, pluripotency, cell proliferation, neural differentiation

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Matične ćelije	2
1.1.1. Embrionalne matične ćelije	5
1.2. Embrionalne karcinomske ćelije	7
1.2.1. Humana embrionalna karcinomska NT2/D1 ćelijska linija	8
1.2.1.1. NT2/D1 i neuralna diferencijacija	9
1.3. <i>SOX/Sox</i> geni	12
1.3.1. Klasifikacija <i>SOX/Sox</i> gena	12
1.3.2. SOX proteini kao transkripcioni faktori	15
1.3.2.1. Domenska struktura SOX proteina	15
1.3.2.2. Vezivanje SOX proteina za DNK	16
1.3.2.3. Posttranslacione modifikacije SOX proteina	17
1.3.3. Funkcije SOX proteina	17
1.3.3.1. SOX proteini i determinacija pola	19
1.3.3.2. SOX proteini i neuralno razviće	20
1.3.3.3. SOX proteini i razviće nervne kreste	21
1.3.3.4. SOX proteini i razviće sočiva	22
1.3.3.5. SOX proteini i hondrogeneza	22
1.3.3.6. SOX proteini i hematopoeza	23
1.3.3.7. SOX proteini i razviće dlake, kardiogeneza i angiogeneza	23
1.3.4. Oboljenja prouzrokovana <i>SOX</i> genima	23
1.4. <i>SoxB</i> grupa gena	24
1.5. <i>SOX2</i> gen	25
1.5.1. Regulacija ekspresije <i>SOX2/Sox2</i> gena	26
1.5.1.1. Enhenseri <i>Sox2</i> gena	28
1.5.2. Funkcije <i>SOX2/Sox2</i> gena	30
1.5.2.1. SOX2, embriogeneza i neuralna diferencijacija	30
1.5.2.2. SOX2 i pluripotentnost	32

1.5.2.3. SOX2 i proliferacija	33
1.5.3. Modulacija <i>Sox2</i> ekspresije	34
1.5.4. <i>SOX2</i> i matične ćelije	36
1.5.5. <i>SOX2</i> i indukovane pluripotentne matične (iPS) ćelije	36
1.5.6. <i>SOX2</i> i NT2/D1 ćelije	37
1.6. Transfekcije	38
1.6.1. Tranzijentna transfekcija	39
1.6.2. Stabilna transfekcija	39
1.7. Ekspresioni vektori kod sisara	40
1.7.1. pcDNA3.1 ekspresioni vektor	41
1.7.2. pCXN2 ekspresioni vektor	42
1.7.3. Inducibilni ekspresioni sistemi	43
1.7.3.1. "Tet-On/Tet-Off" sistemi (tetraciklin-inducibilni ekspresioni sistemi)	44
2. CILJ RADA	46
3. MATERIJAL I METODE	47
3.1. Eksperimentalni material	47
3.1.1. Bakterijski soj korišćen u radu	47
3.1.2. Vektori korišćeni u radu	47
3.1.3. Plazmidni konstrukti korišćeni u radu	48
3.1.4. NT2/D1 ćelijska linija	48
3.1.5. Antitela korišćena u radu	49
3.1.6. Oligonukleotidi korišćeni u radu	49
3.1.7. Komercijalni kitovi	50
3.2. Eksperimentalne metode	51
3.2.1. Metode subkloniranja fragmenata DNK u komercijalni vector	51
3.2.1.1. Enzimaska reakcija isecanja DNK restrikcionim enzimima	51
3.2.1.2. Ligiranje fragmenata DNK	51
3.2.2. Elektroforeza DNK na gelu od agaroze	51
3.2.3. Elucija DNK iz gelova od agaroze	52
3.2.4. Metode rada sa bakterijama	52
3.2.4.1. Kultivisanje bakterija	52

3.2.4.2. Pripremanje bakterija za elektro-transformaciju	52
3.2.4.3. Elektro-transformacija bakterija	53
3.2.5. Metode izolovanja plazmidne DNK	53
3.2.5.1. Izolovanje plazmidne DNK "Wizard" kitom	53
3.2.5.2. Izolovanje plazmidne DNK "Endofree plasmid Maxi Kit"-om	54
3.2.6. Testiranje NT2/D1 ćelija na rezistenciju na antibiotike	54
3.2.7. Stabilna i tranzijentna transfekcija NT2/D1 ćelija kalcijum - fosfatnom precipitacijom	55
3.2.8. Izolacija genomske DNK	56
3.2.9. PCR detekcija insercije konstrukta u genom domaćina	57
3.2.10. "Southern blot" analiza	59
3.2.10.1. Generisanje probe za "Southern blot" analizu	59
3.2.10.2. Obeležavanje probe za "Southern" i "Northern blot" analize	59
3.2.10.3. Transfer DNK na membranu	60
3.2.10.4. Hibridizacija sa obeleženom probom	61
3.2.11. Izolacija totalne RNK	61
3.2.11.1. Izolacija totalne RNK po metodi objavljenoj od strane Favaloro i saradnika	61
3.2.11.2. Izolacija totalne RNK primenom "TRI reagent"-a	62
3.2.12. "Northern blot" analiza	63
3.2.13. Oslobođanje totalne RNK od ostataka genomske DNK	63
3.2.14. Sinteza komplementarne DNK (cDNK) - reverzna transkripcija	64
3.2.15. Semi-kvantitativni reverzna transkripcija PCR (RT-PCR)	64
3.2.16. PCR u realnom vremenu	65
3.2.17. "Western blot" analiza	66
3.2.17.1. Izolacija ukupnih ćelijskih proteina	66
3.2.17.2. Merenje koncentracije proteina po Bradfordu	67
3.2.17.3. Analiza ukupnih ćelijskih proteina "Western blot" analizom	67
3.2.18. MTT test	69
3.2.19. Analiza faza ćelijskog ciklusa fluorescentnom protočnom citometrijom	69

3.2.20. "Wound scratch" test	70
3.2.21. Kvantifikacija luminiscentnih signala luciferaza primenom "Dual-Luciferase Reporter Assay" sistema	70
4. REZULTATI	72
4.1. Analiza SOX2 proteina kod NT2/D1 ćelija tretiranih RK	73
4.2. Generisanje NT2/D1 ćelijskih klonova sa povećanom ekspresijom SOX2 gena primenom SOX2/pcDNA3.1 konstrukta	73
4.2.1. Generisanje SOX2/pcDNA3.1 konstrukta	73
4.2.2. Testiranje NT2/D1 ćelija na rezistenciju na G418	76
4.2.3. Generisanje stabilnih NT2/D1 ćelijskih klonova korišćenjem SOX2/pcDNA3.1 konstrukta	77
4.2.4. Analiza insercije konstrukta u genom ćelijskih klonova	78
4.2.5. "Southern blot" analiza NT2/D1 ćelijskih klonova	80
4.2.6. Analiza ekspresije egzogenog SOX2 gena kod stabilnih NT2/D1 ćelijskih klonova	82
4.2.6.1. "Northern blot" analiza ekspresije egzogenog SOX2 gena	82
4.2.6.2. Semi-kvantitativna RT-PCR analiza ekspresije egzogenog SOX2 gena	83
4.2.6.2.1. Analiza ekspresije egzogenog SOX2 gena korišćenjem oligonukleotida specifičnih za sekvencu veštačkog poli A signala	83
4.2.6.2.2. Analiza ekspresije egzogenog SOX2 gena primenom oligonukleotida specifičnih za egzogenu kopiju SOX2 gena	85
4.2.7. Analiza ukupne ekspresije SOX2 gena u NT2/D1 ćelijskim klonovima	87
4.2.8. Analiza SOX2 proteina kod NT2/D1 ćelijskih klonova sa povećanom ekspresijom SOX2 gena	88
4.2.9. Analiza ekspresije markera pluripotentnosti (OCT4, NANOG) kod F5 i G3 ćelijskih klonova	90
4.2.10. Povećana ekspresija SOX2 gena i neuralna diferencijacija	92
4.2.10.1. Diferencijacija stabilnih NT2/D1 ćelijskih klonova u prisustvu retinoične kiseline	92
4.2.10.2. Analiza ekspresija SOX2 gena kod NT2/D1 ćelijskih klonova	

tokom tri nedelje tretmana retinoičnom kiselinom	94
4.2.11. Analiza ekspresija OCT4 i NANOG gena u ćelijskim klonovima F5 i G3 tokom tretmana RK	95
4.2.12. Analiza SOX2 i SOX3 proteina kod F5 i G3 ćelijskih klonova u toku tretmana RK	100
4.2.13. Analiza ekspresije markera tri faze neuralne diferencijacije NT2/D1 ćelija kod F5 i G3 ćelijskih klonova u toku tretmana RK	101
4.2.13.1. Analiza ekspresije <i>nestin</i> gena	102
4.2.13.2. Analiza ekspresije <i>neuroD1</i> gena	103
4.2.13.3. Analiza ekspresije gena za sinaptofizin	106
4.2.14. Analiza proliferativnog kapaciteta F5 i G3 ćelijskih klonova	108
4.2.14.1. Stopa rasta ćelijskih klonova sa povećanom ekspresijom <i>SOX2</i> gena	108
4.2.14.2. Analiza distribucije ćelija po fazama ćelijskog ciklusa kod F5 i G3 ćelijskih klonova	108
4.2.15. Analiza migracije i invazivnosti F5 i G3 ćelijskih klonova	111
4.3. Generisanje NT2/D1 ćelijskih klonova sa povećanom ekspresijom <i>SOX2</i> gena primenom <i>SOX2/pCXN2</i> konstrukta	113
4.3.1. Generisanje <i>SOX2/pCXN2</i> konstrukta	113
4.3.2. Generisanje NT2/D1 ćelijskih klonova korišćenjem <i>SOX2/pCXN2</i> konstrukta	113
4.4. NT2/D1 ćelijski klonovi sa povećanom ekspresijom <i>SOX2</i> gena generisani primenom inducibilnog "Tet-on" sistema	114
4.4.1. Regulatorni i "response" plazmid korišćeni za generisanje NT2/D1 ćelijskih klonova sa povećanom ekspresijom <i>SOX2</i> gena	115
4.4.2. Testiranje NT2/D1 ćelija na rezistenciju na higromicin B	116
4.4.3. Generisanje NT2/D1 ćelijskih klonova sa stabilno integrisanim regulatornim plazmidom	117
4.4.4. PCR detekcija insercije regulatornog plazmida u genom NT2/D1 ćelija	118
4.4.5. Testiranje ćelijskih klonova sa stabilno integrisanim regulatornim plazmidom primenom reporter eseja	120

4.4.6. Analiza ekspresije <i>SOX2</i> gena kod NT2/D1 ćelijskih klonova sa integrisanim regulatornim plazmidom transfektovanih sa pTRE- <i>SOX2</i> -neo "response" plazmidom	125
4.4.7. Analiza ekspresije <i>SOX2</i> gena kod ćelijskih klonova sa inducibilno povećanom ekspresijom <i>SOX2</i> gena nakon tretmana retinoičnom kiselinom	128
4.4.8. Analiza ekspresije markera pluripotentnosti (<i>OCT4</i> , <i>NANOG</i>) kod NT2/D1 ćelijskih klonova sa inducibilno povećanom ekspresijom <i>SOX2</i> gena	131
4.4.9. Ekspresija markera pluripotentnosti (<i>OCT4</i> , <i>NANOG</i>) kod NT2/D1 ćelijskih klonova sa inducibilno povećanom ekspresijom <i>SOX2</i> gena tokom tretmana retinoičnom kiselinom	133
4.4.10. Ekspresija markera prve faze neuralne diferencijacije NT2/D1 ćelija kod NT2/D1 ćelijskih klonova sa inducibilno povećanom ekspresijom <i>SOX2</i> gena tokom tretmana retinoičnom kiselinom	136
5. DISKUSIJA	138
5.1. Generisanje NT2/D1 ćelijskih klonova sa povećanom ekspresijom <i>SOX2</i> gena	139
5.1.1. Generisanje NT2/D1 ćelijskih klonova sa povećanom ekspresijom <i>SOX2</i> gena primenom <i>SOX2</i> /pcDNA3.1 konstrukta	139
5.1.2. Generisanje NT2/D1 ćelijskih klonova sa povećanom ekspresijom <i>SOX2</i> gena primenom <i>SOX2</i> /pCXN2 konstrukta	141
5.1.3. Generisanje NT2/D1 ćelijskih klonova sa povećanom ekspresijom <i>SOX2</i> gena primenom inducibilnog "Tet-on" sistema	142
5.2. Povećana ekspresija <i>SOX2</i> gena i morfologija ćelija	144
5.3. Povećana ekspresija <i>SOX2</i> gena i ekspresija markera pluripotentnosti	144
5.3.1. Povećana ekspresija <i>SOX2</i> gena i ekspresija <i>OCT4</i> markera pluripotentnosti	144
5.3.2. Povećana ekspresija <i>SOX2</i> gena i ekspresija <i>NANOG</i> markera pluripotentnosti	145
5.4. Povećana ekspresija <i>SOX2</i> gena i proliferacija	146

5.5. Povećana ekspresija <i>SOX2</i> gena i neuralna diferencijacija	147
5.5.1. Povećana ekspresija <i>SOX2</i> gena, tretman RK i morfologija ćelija	148
5.5.2. Analiza ekspresije <i>SOX2</i> gena kod NT2/D1 ćelijskih klonova sa povećanom ekspresijom <i>SOX2</i> gena tokom tretmana RK	149
5.5.3. Analiza SOX2 i SOX3 proteina kod F5 i G3 ćelijskih klonova u toku tretmana RK	150
5.5.4. Analiza ekspresije markera pluripotentnosti kod NT2/D1 ćelijskih klonova sa povećanom ekspresijom <i>SOX2</i> gena u toku tretmana RK	151
5.5.5. Analiza ekspresije markera neuralne diferencijacije NT2/D1 ćelija kod NT2/D1 ćelijskih klonova sa povećanom ekspresijom <i>SOX2</i> gena u toku tretmana RK	151
6. ZAKLJUČCI	154
7. LITERATURA	159

1. UVOD

Organizam čoveka sadrži preko 200 različitih tipova ćelija organizovanih u tkiva i organe koji obezbeđuju funkcije neophodne za normalan razvoj i reprodukciju (Watt i Driskell, 2010). Ovi različiti tipovi ćelija vode poreklo od jedne totipotentne matične ćelije (Boyer, 2005). Dve osnovne karakteristike matičnih ćelija su održavanje pluripotentnosti i sposobnost samo-obnavljanja (Watt i Driskell, 2010). Proučavanje molekularnih mehanizama koji kontrolišu samo-obnavljanje i održavanje pluripotentnosti matičnih ćelija je značajno imajući u vidu da su ovi mehanizmi ključni u regulaciji razvića (Young, 2011). Takođe, održavanje pluripotentnosti i sposobnost samo-obnavljanja čine ove ćelije dragocenim sredstvom za potencijalnu primenu u regenerativnoj medicini i u terapiji zamene tkiva nakon povrede ili bolesti. Kao ključni regulatori održavanja pluripotentnosti i samo-obnavljanja identifikovani su transkripcioni faktori OCT4, SOX2 i NANOG (Lensch, 2006; Mountford, 2008) i rasvetljavanje uloge ovih faktora predstavlja osnov za razumevanje procesa razvića.

SOX2 protein pripada familiji SOX proteina koji sadrže DNK- vezujući HMG (high-mobility group) domen (Wegner, 1999). Tokom nekoliko poslednjih godina, ovi proteini su okarakterisani kao važni transkripcioni regulatori održavanja pluripotentnosti, determinacije pola, neuralnog razvića, razvića nervne kreste i sočiva, hondrogeneze, hematopoeze, kardiogeneze i angiogeneze (Lefebvre, 2007).

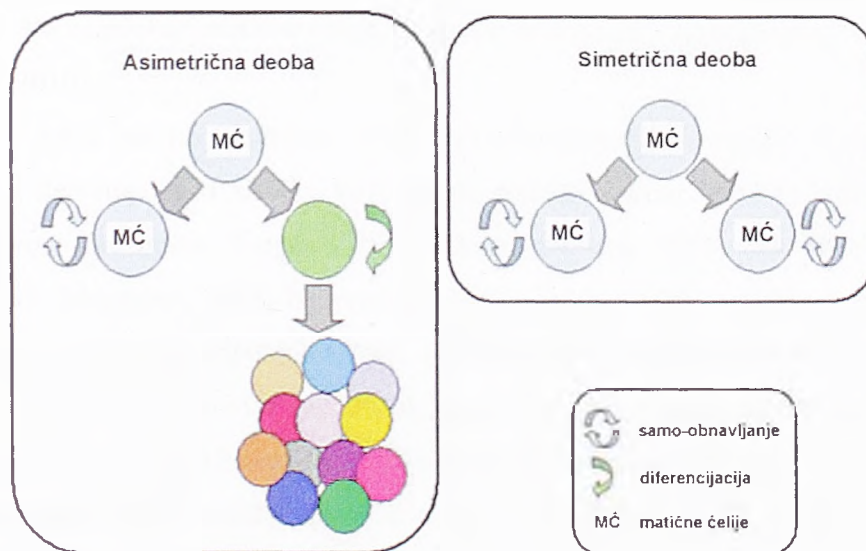
Imajući u vidu moralne, pravne i etičke dileme vezane za dobijanje matičnih ćelija iz embriona čoveka, za proučavanje markera pluripotentnosti i mehanizama koji regulišu ćelijsku diferencijaciju tokom embrionalnog razvića koriste se i embrionalne karcinomske (EK) ćelijske linije koje predstavljaju nediferencirane matične ćelije teratokarcinoma (Taketo, 1985). NT2/D1, pluripotentna EK ćelijska linija, je slična ranim embrionalnim matičnim ćelijama po morfologiji, obrascima ekspresije antigena, biohemijskim svojstvima, potencijalu diferencijacije u različite tipove ćelija i regulaciji ekspresije gena (Andrews, 1984a, 1998). U prisustvu retinoične kiseline ove ćelije se diferenciraju u različite tipove ćelija, uključujući i zrele neurone. Na osnovu ekspresije markera neuralne diferencijacije, tokom tretmana NT2/D1 ćelija retinoičnom kiselinom, može se zaključiti da postoji sličnost neuralne diferencijacije ovih ćelija sa

neurogenezom kičmenjaka *in utero* što ukazuje da ova ćelijska linija predstavlja dobar model sistem za proučavanje neurogeneze kičmenjaka.

1.1. Matične ćelije

Matične ćelije su ćelije koje karakterišu dve osnovne osobine: sposobnost samo-obnavljanja i održavanje pluripotencnosti (Mountford, 2008).

Sposobnost samo-obnavljanja (Slika 1) podrazumeva da pri deobi matičnih ćelija nastaju ćerka ćelija koja je identična kopija roditeljske ćelije i po svojim osobinama ostaje matična ćelija, i ćerka ćelija koja može takođe da bude identična kopija roditeljske ćelije (simetrična deoba) ili može da krene u diferencijaciju (asimetrična deoba) (Mountford, 2008). Simetrične deobe kojima se povećava broj matičnih ćelija su česte tokom razvića, ali su veoma retke postnatalno.



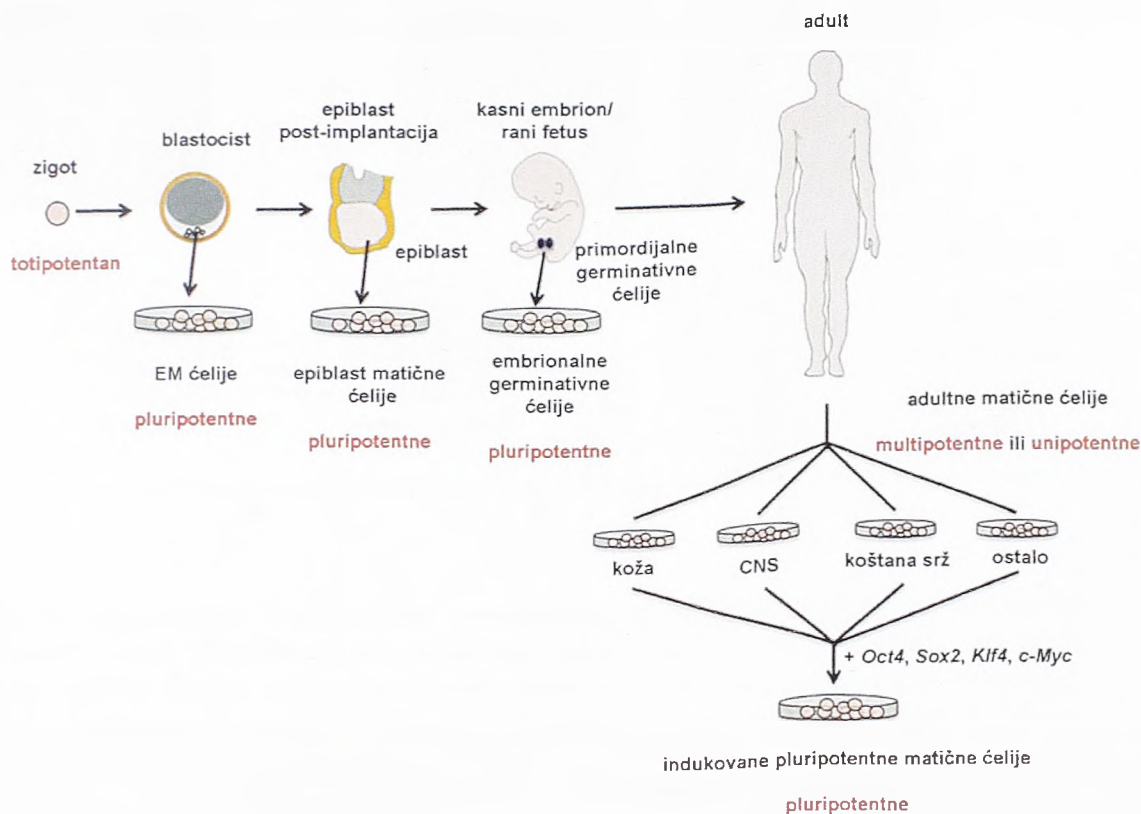
Slika 1. Deobe kojima se postiže samo-obnavljanje matičnih ćelija. Asimetrična deoba održava broj matičnih ćelija, dok se simetričnom deobom povećava broj matičnih ćelija. (preuzeto iz (Mountford, 2008)).

Pluripotencnost se definiše kao sposobnost diferencijacije u različite tipove ćelija (Masui, 2010). Tokom razvića matične ćelije postaju sve ograničenije u pogledu njihovog kapaciteta diferencijacije, odnosno u kasnijim fazama razvića jedna matična ćelija ima

spособnost diferencijacije u manji broj tipova ćelija u poređenju sa ranijim fazama razvića (Verfaillie, 2009).

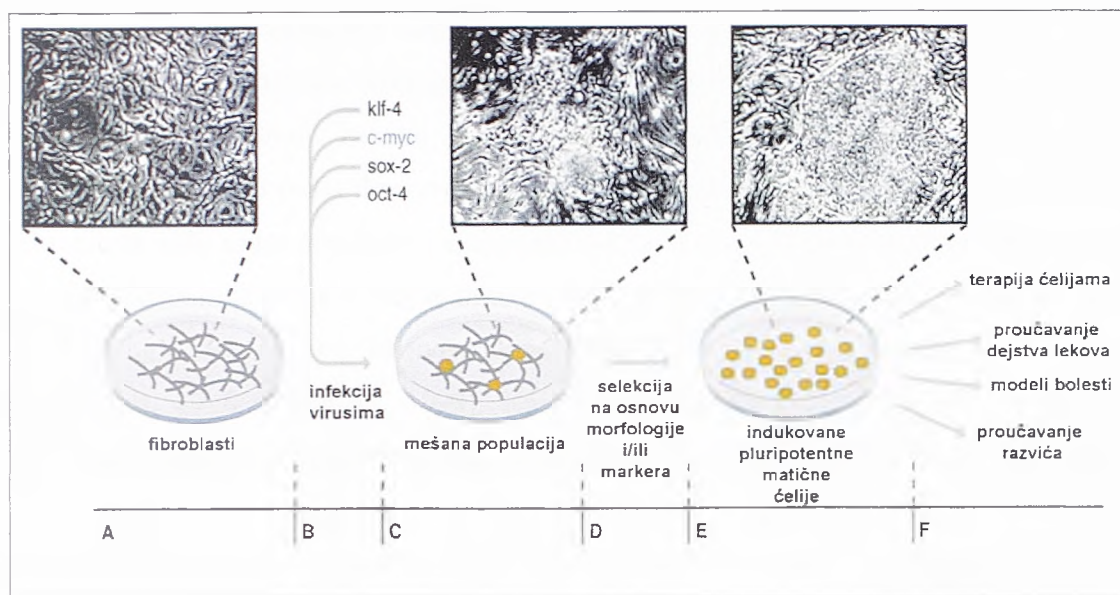
U zavisnosti od toga u koliko različitih tipova ćelija mogu da se diferenciraju razlikuju se totipotentne, pluripotentne, multipotentne i unipotentne matične ćelije (Slika 2) (Watt i Driskell, 2010). Totipotentne matične ćelije mogu da se diferenciraju u sve tipove ćelija jednog organizma, uključujući i embrionalne ovojnice (Gage, 2000). U totipotentne matične ćelije ubrajaju se oplođena jajna ćelija i blastomere (Watt i Driskell, 2010). Pluripotentne matične ćelije mogu da se diferenciraju u sve ćelije organizma, izuzev trofoblasta placentе (Gage, 2000); u ove matične ćelije ubrajaju se ćelije koje vode poreklo od unutrašnje ćelijske mase blastocista, epiblasta i primordijalnih germinativnih ćelija (Watt i Driskell, 2010). Multipotentne matične ćelije imaju sposobnost diferencijacije u mnogo ograničeniji broj tipova ćelija, odnosno od ovih ćelija mogu da nastanu različiti tipovi ćelija jednog tkiva (Watt i Driskell, 2010). Primer multipotentnih matičnih ćelija su hematopoetske ćelije (Austin i Lagasse, 2003). Unipotentne matične ćelije, kao što su adultne matične ćelije, mogu da se diferenciraju u jedan tip ćelija (Watt i Driskell, 2010).

Sem u toku razvića, matične ćelije su detektovane u mnogim tkivima adulta uključujući hematopoetski sistem, kožu, jetru, mišiće skeleta, centralni nervni sistem, masno tkivo i mrežnjaču (Tropepe, 2000; Hawke i Garry, 2001; Zuk, 2001; Alonso i Fuchs, 2003; Morshead, 2004; Newsome, 2004; Lensch, 2006). Adultne matične ćelije sem što mogu da budu unipotentne (npr. satelitske ćelije mišića od kojih se isključivo formiraju miotube (Hawke i Garry, 2001)), mogu da budu i bipotentne (npr. ovalne ćelije jetre od kojih se formiraju hepatociti i epitelijalne ćelije žučnih kanala (Newsome, 2004)) ili multipotentne (npr. neuralne matične ćelije od kojih se formiraju brojni glijalni i neuronalni tipovi ćelija (Morshead, 2004)).



Slika 2. Tipovi matičnih ćelija. U zavisnosti od potencijala diferencijacije razlikuju se totipotentne, pluripotentne, multipotentne i unipotentne matične ćelije (preuzeto iz (Watt i Driskell, 2010)).

Nedavno je pokazano da se somatske ćelije čoveka i miša mogu uvesti u stanje pluripotentnosti forsiranom ekspresijom četiri transkripciona faktora c-MYC, SOX2, OCT4, KLF4 (Slika 3) (Takahashi i Yamanaka, 2006; Takahashi, 2007). Ovako generisane pluripotentne ćelije su označene kao indukovane pluripotentne matične ćelije (Takahashi i Yamanaka, 2006; Takahashi, 2007; Lowry, 2008; Park, 2008). Na osnovu podataka iz literature može se zaključiti da su ključni faktori neophodni za reprogramiranje SOX2 i OCT4, dok ostali transkripcioni faktori omogućavaju povećanje efikasnosti reprogramiranja remodelovanjem hromatina somatskih ćelija (Verfaillie, 2009).



Slika 3. Generisanje indukovanih pluripotentnih matičnih ćelija. A) inficiranje somatskih ćelija (fibroblasti) virusima koji sadrže faktore reprogramiranja, B) unos transkripcionih faktora kojima se postiže reprogramiranje, C) u populaciji inficiranih ćelija formiraju se kolonije ćelija, D) kolonije inficiranih ćelija mogu da budu selektovane na osnovu morfologije, fluorescencije ili rezistencije na antibiotike, E) selektovane kolonije se dalje propagiraju i formiraju ćelijske linije indukovanih pluripotentnih matičnih ćelija, F) ovako generisane ćelijske linije koriste se za niz aplikacija (preuzeto iz (Fenno, 2008)).

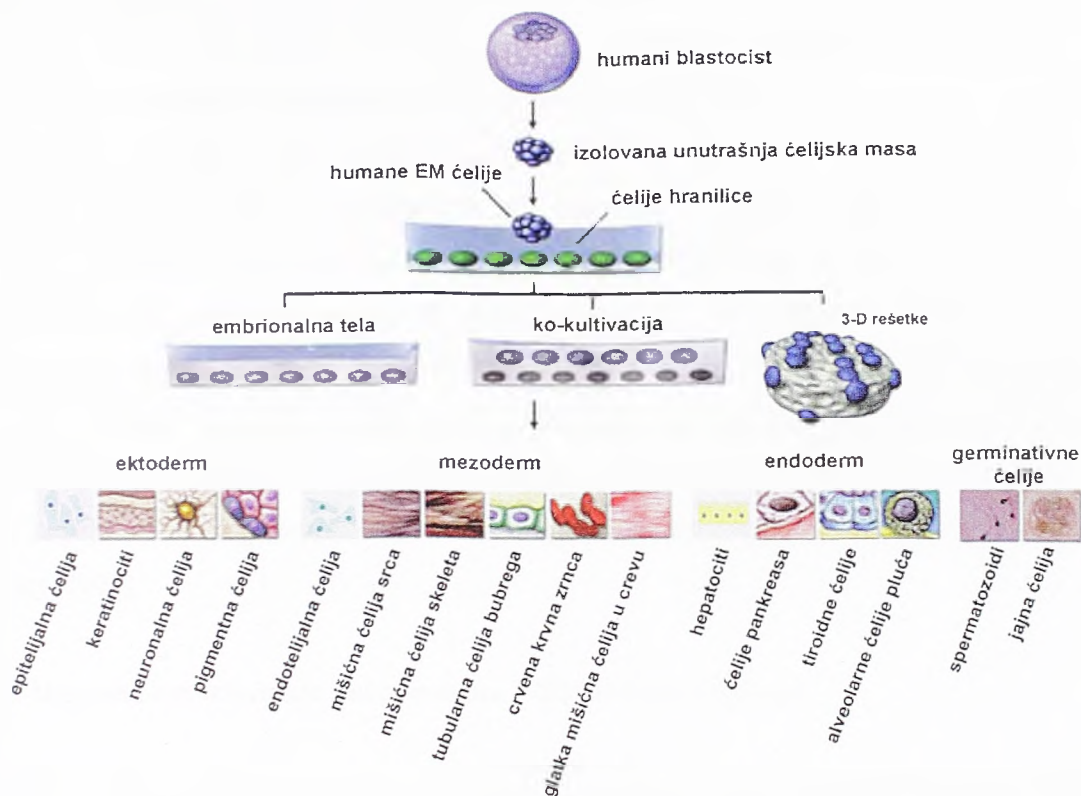
1.1.1. Embrionalne matične ćelije

Embrionalne matične (EM) ćelije su pluripotentne ćelije koje vode poreklo od unutrašnje ćelijske mase blastocista (Pan i Thomson, 2007). Poseduju sposobnost da se *in vitro* i *in vivo* diferenciraju u ćelije koje vode poreklo od sva tri klicina lista (Evans i Kaufman, 1981; Thomson, 1998). Pored toga, EM ćelije su prepoznate kao zlatni standard za proučavanje održavanja pluripotentnosti i procesa diferencijacije (Deng, 2010). Pluripotentnost ovih ćelija se utvrđuje na osnovu njihove sposobnosti da formiraju teratoma tumore (Fenno, 2008), dok se potencijal diferencijacije testira na osnovu sposobnosti da formiraju embrionalna tela (Fenno, 2008).

EM ćelije su prvi put izolovane iz pre-implantacionog blastocista zeca (Cole, 1966). Osamdesetih godina prošlog veka tri grupe su nezavisno generisale ćelijske linije EM ćelija miša (Evans i Kaufman, 1981; Martin, 1981; Axelrod, 1984). Ove ćelijske linije mogu da se održavaju u kulturi u prisustvu fibroblasta embriona miša kao

permanentne, nediferencirane ćelijske linije (Sell, 2004). Na ovaj način propagirane EM ćelije mogu da formiraju teratoma tumore nakon transplantacije u imunodeficientne miševе i da formiraju himera miševе nakon injekcije u blastocist (Sell, 2004). Pluripotentnost ovih ćelija demonstrirana je *in vitro* tako što su se EM ćelije u odsustvu fibroblasta miša samo-grupisale u embrionalna tela, a nakon toga dolazilo je do spontane diferencijacije ovih ćelija u brojne tipove ćelija koje vode poreklo od sva tri klicina lista (Verfaillie, 2009). *In vitro* kultivisanje humanih EM ćelija je objavljeno 1998. godine (Shamblott, 1998; Thomson, 1998). Kao i EM ćelije miša, i EM ćelije čoveka su generisane gajenjem ćelija unutrašnje ćelijske mase na ćelijama hranilicama; ove ćelijske linije diferenciraju u ćelije mezoderma, endoderma i ektoderma prilikom formiranja embrionalnih tela ili teratoma (ubrizgavanjem *in vivo* u imunodeficientne životinje) (Slika 4) (Verfaillie, 2009).

Sposobnost diferencijacije u ćelije poreklom od sva tri klicina lista čini EM ćelije neprocenjivim za potencijalnu primenu u regenerativnoj medicini i u terapiji zamene tkiva nakon povrede ili bolesti (Pan i Thomson, 2007).



Slika 4. Izolacija, propagacija i diferencijacija EM ćelija. EM ćelije vode poreklo od unutrašnje ćelijske mase blastocista. Pre kultivisanja u prisustvu ćelija hranilica, unutrašnja ćelijska masa se odvaja od trofektoderma. Kultivisane humane EM ćelije mogu da se diferenciraju u različite tipove ćelija upotrebom metoda kao što su formiranje embrionalnih tela, ko-kultivacija sa somatskim ćelijama ili kultivacija na trodimenzionalnim rešetkama (preuzeto iz (Hyslop, 2005), uz dodatak (Ahmad, 2007; Hay, 2007; Wang, 2007)).

1.2. Embrionalne karcinomske ćelije

Embrionalne karcinomske (EK) ćelije su pluripotentne matične ćelije koje vode poreklo od teratokarcinoma, malignih tumora germinativnih ćelija. Ovi tumori sadrže nediferenciranu komponentu koja obuhvata embrionalne karcinomske ćelije, kao i diferenciranu komponentu koja uključuje ćelije koje vode poreklo od sva tri klicina lista (Andrews, 2002; Yu i Thomson, 2008). Kleinsmith i Pierce su 1964. g pokazali da EK ćelije miša imaju sposobnost samo-obnavljanja i multilinijske diferencijacije (Kleinsmith i Pierce, 1964). EK ćelije miša koje mogu da se propagiraju u kulturi su uspostavljene 70-

tih godina prošlog veka (Kahan i Ephrussi, 1970). Pokazano je da ove ćelije eksprimiraju antigene i proteine slične onima detektovanim u ćelijama prisutnim u unutrašnjoj ćelijskoj masi embriona (Gachelin, 1977; Solter i Knowles, 1978).

Humane EK ćelije su prvi put uspostavljene 1977. godine (Hogan, 1977). Poređenja humanih EM i EK ćelija su pokazala da ova dva tipa ćelija dele brojne morfološke i fenotipske karakteristike (Thomson, 1998; Pera, 2000). Naime, po morfološkim karakteristikama, kao i po profilu ekspresije antigenskih determinanti, biohemijskim svojstvima, potencijalu za diferencijaciju i regulaciji ekspresije gena, EK ćelije pokazuju veliku sličnost sa EM ćelijama (Andrews, 1998). Zbog navedenih osobina, humane EK ćelije predstavljaju veoma važan model sistem za proučavanje diferencijacije ćelija na način koji je sličan događajima koji se dešavaju tokom embriogeneze (Andrews, 1998; Stewart, 2003).

1.2.1. Humana embrionalna karcinomska NT2/D1 ćelijska linija

NT2/D1 ćelijska linija je humana EK ćelijska linija koja vodi poreklo od malignog testikularnog teratokarcinoma (Andrews, 1984a). Ova ćelijska linija ispoljava osobine slične osobinama EM ćelija ili veoma ranih neuroepitelijalnih progenitora (Coyle, 2011).

Nakon tretmana retinoičnom kiselinom (RK), NT2/D1 ćelije se diferenciraju u brojne tipove ćelija uključujući i post-mitotičke neurone, astrocite i oligodendrocite (Andrews, 1984a; Lee i Andrews, 1986; Pleasure, 1992; Pleasure i Lee, 1993; Sandhu, 2002). RK je derivat vitamina A koji poseduje značajnu ulogu u razviću centralnog nervnog sistema kičmenjaka (Maden, 2002). Pokazano je da ovaj agens indukuje diferencijaciju mnogih tipova ćelija, uključujući epitelijalne ćelije i ćelije kancera (Cheung, 1999). Za razliku od RK, tretman NT2/D1 ćelija koštanim morfogenetskim proteinima (eng. "bone morphogenetic proteins"-BMPs) prouzrokuje diferencijaciju ovih ćelija u ćelije koje predominantno ispoljavaju epitelijalni fenotip (Caricasole, 2000). Pored RK i BMPs, diferencijacija NT2/D1 ćelija može da se indukuje i bromodeoksiuridinom (BudR) i heksametil bisacetamidom (HMBA) (Andrews, 1990).

Podaci iz literature ukazuju da BUdR indukuje neuralnu diferencijaciju (Andrews, 1990), dok HMBA dovodi do diferencijacije u ćelije epiderma (Simoes i Ramos, 2007).

1.2.1.1. NT2/D1 i neuralna diferencijacija

Neuronalna diferencijacija je složen proces koji obuhvata proliferaciju neuralnih prekursora, migraciju neurona do ciljnih regiona i sazrevanje neurona koje obuhvata formiranje neurita i sinapsi, specifikaciju neurotransmitera i sticanje sposobnosti provodljivost nervnih impulsa (Spitzer, 2006). Podaci iz literature ukazuju da su promene u ekspresiji gena tokom neuralne diferencijacije NT2/D1 ćelija slične promenama detektovanim tokom diferencijacije ćelija nervne cevi embriona u toku razvića (Przyborski, 2000). Ovaj precizno regulisan profil ekspresije gena ukazuje da se diferencijacija NT2/D1 ćelija u neurone *in vitro* dešava na način sličan onom koji je primećen tokom neurogeneze kičmenjaka *in vivo* (Przyborski, 2000). Na osnovu ekspresije gena uključenih u formiranje nervnog sistema kičmenjaka, diferencijacija NT2/D1 ćelija u neurone može da se podeli u tri faze (Przyborski, 2000).

Tokom prve faze koja se dešava u prvoj nedelji diferencijacije, detektovan je porast ekspresije gena za *nestin*. Ovaj gen kodira intermedijarne filamente čije je prisustvo karakteristično za neuroepitelijalne ćelije koje proliferišu (Dahlstrand, 1992; Tohyama, 1992). Tokom neuralne diferencijacije, najviši nivo ekspresije *nestin* gena detektovan je trećeg dana tretmana RK, a nakon toga se ekspresija drastično smanjuje (Przyborski, 2000). Ovaj profil ekspresije gena za *nestin* sugeriše pojavu neuroprogenitorskih ćelija tokom ranih faza RK- indukovane diferencijacije NT2/D1 ćelija (Przyborski, 2000).

Ekspresija gena za *nestin* se drastično smanjuje tokom druge faze diferencijacije NT2/D1 ćelija koja se dešava početkom druge nedelje tretmana RK. Za ovu fazu neuralne diferencijacije karakterističan je porast ekspresija *neuroD1* gena. Ovaj gen kodira bHLH (eng. "basic helix-loop-helix") transkripcioni faktor za koji je pokazano da se akumulira u neuroprogenitorima koji su napustili ćelijski ciklus i koji su predodređeni ka neuralnoj diferencijaciji (Lee, 1995). Najviši nivo ekspresije *neuroD1* gena detektovan je sedmog dana tretmana i ovaj nivo ekspresije se zadržava tokom sledećih četrnaest dana

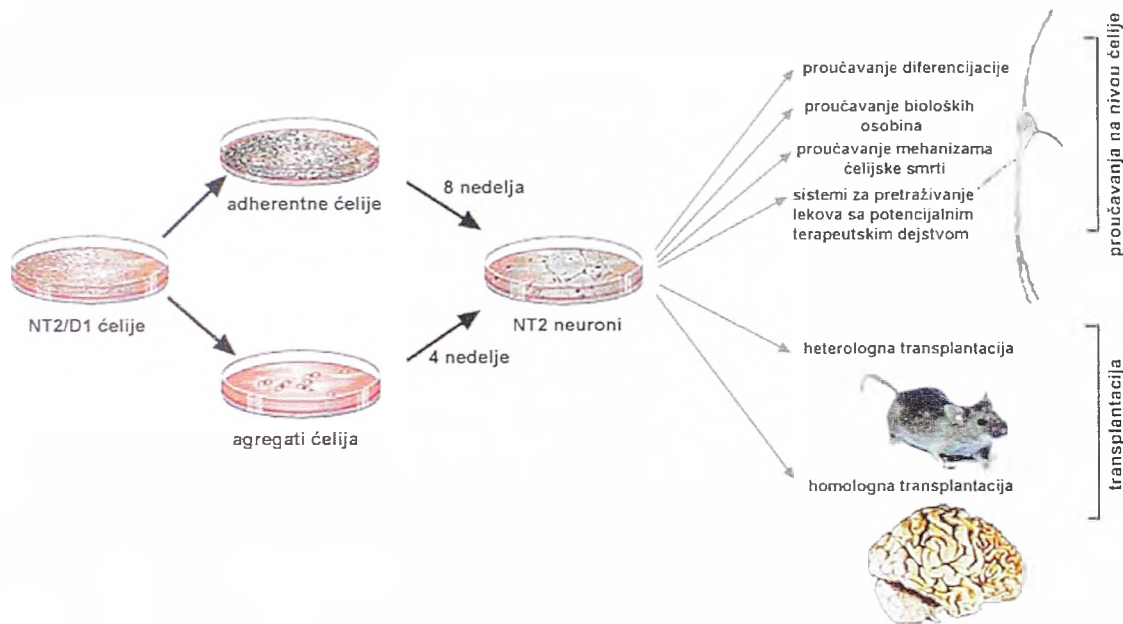
(Przyborski, 2000). Površinski glikolipidni antigen koga ekspimiraju neuralne ćelije koje su napustile ćelijski ciklus, detektovan je takođe tokom druge faze neuralne diferencijacije primenom monoklonalnog antitela A2B5 (Przyborski, 2000).

Ekspresija gena za sinaptofizin, markera zrelih neuralnih ćelija, je povećana tokom treće faze neuralne diferencijacije NT2/D1 ćelija. Gen za sinaptofizin kodira membranski protein specifičan za sinaptičke vezikule (Sudhof, 1987). Podaci iz literature ukazuju da je ovaj gen ekspimiran i kod nediferenciranih ćelija, ali se maksimum ekspresije detektuje nakon tri nedelje tretmana RK (Przyborski, 2000).

Terminalni neuroni (NT2N) poreklom od NT2/D1 ćelija formiraju funkcionalne sinapse, ekspimiraju neurofilamente, tetrodotoksin-senzitivne natrijumske kanale, glutamatne receptore, naponom-kontrolisane kalcijumske kanale i imaju sposobnost da generišu akcione potencijale (Rendt, 1989; Squires, 1996; Przyborski, 2003; Coyle, 2011). Takođe, pokazano je da ove ćelije ekspimiraju, oslobađaju i reaguju na neurotransmitere (Rendt, 1989; Squires, 1996; Przyborski, 2003; Coyle, 2011). Zatim, neuroni poreklom od NT2/D1 ćelija ispoljavaju osobine GABAergičkih, glutamatergičkih, kateholaminergičkih, holinergičkih, dopaminergičkih i serotonergičkih neurona (Zeller i Strauss, 1995; Yoshioka, 1997; Guillemain, 2000; Iacovitti, 2001; Schwartz, 2005; Coyle, 2011).

Tokom diferencijacije NT2/D1 ćelija u prisustvu RK manje od 10% ćelija se diferencira u neurone (Simoes i Ramos, 2007). U literaturi je opisano nekoliko različitih metoda za generisanje postmitotskih neurona (Slika 5). Najčešće korišćen protokol za neuralnu diferencijaciju NT2/D1 ćelija uključuje 5-6 nedelja tretmana ovih ćelija RK, zatim dva rasejavanja ćelija (2 dana), tretman sa inhibitorima mitoze (7-10 dana) i 1-2 selektivna koraka tripsinizacije u cilju prečišćavanja neurona (Pleasure, 1992). Osnovni nedostatak ovog protokola je njegova dužina trajanja (Paquet-Durand i Bicker, 2007). Drugi protokol obuhvata kultivaciju NT2/D1 ćelija u formi tzv. agregata ćelija (ćelije se gaje u Petri posudama čije su karakteristike takve da onemogućavaju adheziju ćelija za podlogu, već se ćelije međusobno grupišu u male grupacije); agregati se tretiraju RK četrnaest dana, zatim se zasejavaju na Petri posude obložene sa poli-D-lizinom i lamininom koji olakšavaju adheziju ćelija za podlogu i tretiraju inhibitorima mitoze sedam dana (Cheung, 1999). Iako ovaj protokol omogućava generisanje neurona u

kraćem vremenskom intervalu, njegov nedostatak je to što agregati sadrži mali procenat neuronalnih ćelija (Leypoldt, 2001).



Slika 5. Diferencijacija NT2/D1 ćelija i primena humanih NT2 neurona. Proučavanja NT2 neurona doprinose boljem razumevanju neuralne diferencijacije i funkcije neurona. NT2N su korišćeni u transplantacijama kod eksperimentalnih životinja i čoveka (preuzeto iz (Paquet-Durand i Bicker, 2007)).

NT2/D1 ćelije se koriste kao model sistem za proučavanje ekspresije gena tokom neuralne diferencijacije, kao i za proučavanje osobina generisanih neurona (Paquet-Durand i Bicker, 2007). Imajući u vidu da su mehanizmi koji indukuje smrt neurona još uvek nedovoljno proučeni, primena ovih ćelija može da doprinese rasvetljavanju ovih mehanizama (Paquet-Durand i Bicker, 2007). Takođe, NT2 neuroni predstavljaju značajan model sistem za proučavanje dejstva lekova (Paquet-Durand i Bicker, 2007). NT2N neuroni su korišćeni i za transplantaciji kod modela moždanog udara pacova gde ispoljavaju funkcionalnu integraciju, kao i u I i II fazi kliničkih ispitivanja kod pacijenata sa moždanim udarom (Pleasure, 1992; Younkin, 1993; Hardy, 1994; Squires, 1996; Borlongan, 1998; Hartley, 1999; Guillemain, 2000; Bliss, 2006; Hara, 2008). Bitna osobina ovih neurona je odsustvo sposobnosti da formiraju tumore nakon transplantacije (Coyle, 2011).

1.3. *SOX/Sox* geni

Familija *SOX/Sox* gena je prvi put identifikovana kod sisara 1990. godine (Pevny i Lovell-Badge, 1997; Wegner, 1999). Ova familija gena kodira SOX proteine koji pripadaju HMG (high-mobility group) superfamiliji DNK vezujućih proteina (Pevny i Lovell-Badge, 1997; Wegner, 1999). Zajednička osobina ovih proteina je da kao DNK vezujući domen poseduju HMG boks domen, dužine 79 aminokiselina (Laudet, 1993).

Prvi identifikovani član *Sox* familije je bio *Sry* gen koji je odgovoran za determinaciju muškog pola (Gubbay, 1990; Sinclair, 1990). Ostali članovi ove genske familije otkriveni su na osnovu homologije sa *Sry* genom u okviru HMG boks domena. Naime, proteini čiji HMG domeni imaju približno 50% ili više sličnosti u aminokiselinskom sastavom sa SRY-om označeni su kao SOX proteini (Sry-related HMG-box), a odgovarajući geni su označeni kao *SOX/Sox* geni (Wegner, 1999; Bowles, 2000).

SOX proteini poseduju osobine kako klasičnih transkripcionih faktora (vezuju se za specifičnu DNK sekvencu i utiču na transkripciju odgovarajućih gena), tako i arhitektonskih komponenti hromatina (interaguju sa manjim žljebom DNK zavojnice što za posledicu ima savijanje DNK zavojnice) (Pevny i Lovell-Badge, 1997).

Članovi ove familije su identifikovani kod brojnih vertebrata i invertebrata (Wegner, 1999), a kod miša i ljudi je identifikovano oko 20 *Sox* gena (Schepers, 2002).

1.3.1. Klasifikacija *SOX/Sox* gena

SOX/Sox geni su na osnovu poređenja amino kiselinskog sastava proteina koji oni kodiraju (unutar i van HMG boks domena) svrstani u 8 grupa (A-H), pri čemu je grupa B podeljena na podgrupe B1 i B2. U Tabeli 1. dat je prikaz *Sox* gena miša i čoveka. Pored *Sox* gena prikazanih u Tabeli 1. u literature su opisani i *Sox31* gen žabe (*Xenopus laevis*) i *SoxJ* gen crva (*Caenorhabditis elegans*) koji nemaju ortologe među *Sox* genima kičmenjaka (Bowles, 2000).

SOX proteini unutar jedne grupe poseduju visok stepen identičnosti proteinske sekvence (70-95%) unutar i van HMG boksa, dok SOX proteini različitih grupa poseduju

delimičnu identičnost proteinske sekvence ($\geq 46\%$) u okviru HMG boks domena i nemaju sličnosti van HMG boksa (Lefebvre, 2007). SOX proteini jedne grupe imaju slične biohemijske osobine i imaju tendenciju da funkcionišu redundantno kada su koeksprimirani (Wegner, 2010). Za razliku od njih, SOX proteini različitih grupa obično imaju različite funkcije čak i kada su koeksprimirani (Wegner, 2010).

Grupa	Gen	Lokus	Schema
A	<i>Sry</i>	YC3	
B1	<i>Sox1</i>	8 A1-A2	
	<i>Sox2</i>	3 A2-B	
	<i>Sox3</i>	X A7.3-B	
B2	<i>Sox14</i>	9 E3.3	
	<i>Sox21</i>	14 E4	
C	<i>Sox4</i>	13 A3-A5	
	<i>Sox11</i>	12 A3	
	<i>Sox12</i>	2 G3	
D	<i>Sox5</i>	6 G3	
	<i>L-Sox5</i>	6 G3	
	<i>Sox6</i>	7 F1	
	<i>Sox13</i>	1 E4	
E	<i>Sox8</i>	17 A3	
	<i>Sox9</i>	11 E2	
	<i>Sox10</i>	15 E1	
F	<i>Sox7</i>	14 C3	
	<i>Sox17</i>	1 A1	
	<i>Sox18</i>	2 H4	
G	<i>Sox15</i>	11 B3	
H	<i>Sox30</i>	11 B1.1	

Tabela 1. Klasifikacija *Sox* gena miša i čoveka, sa oznakom grupe, lokacije na hromozomima i strukturnom organizacijom proteina. Na shemi organizacije proteina pravougaonici označavaju funkcionalne domene: crni - HMG boks domen, uzdužne linije - transaktivacioni domen, poprečne linije - transpresorski domen, dijagonalne linije - dimerizacioni domen. Preuzeto iz (Lefebvre, 2007).

Većina *SOX/Sox* gena ima 1-3 egzona i jednu varijantu primarnog RNK transkripta, dok *Sox* geni grupa D i H sadrže više egzona koji mogu dati primarne transkripte različitih dužina i izmenjenih karakteristika (Wunderle, 1996; Hiraoka, 1998; Lefebvre, 1998; Osaki, 1999). *SOX/Sox* geni grupe A, B, C i G ne poseduju introne. Sem *SRY* i *SOX3* gena, svi ostali humani *SOX* geni su locirani na autozomima i razasuti po celom genomu (Prior i Walter, 1996).

1.3.2. SOX proteini kao transkripcioni faktori

1.3.2.1. Domenska struktura SOX proteina

Većina SOX proteina sadrži nekoliko funkcionalnih domena (Gubbay, 1992; Connor, 1995; Dunn, 1995; Takamatsu, 1995; Collignon, 1996; Kanai, 1996; Sudbeck, 1996; Kido, 1998; Kuhlbrodt, 1998; Pusch, 1998; Kamachi, 1999; Hargrave, 2000; Schepers, 2000; Takash, 2001).

Najznačajniji je HMG boks domen koji obezbeđuje ostvarivanje funkcija, kao što su vezivanje proteina za DNK, konformacione promene DNK, interakcije sa drugim proteinima i transport proteina unutar i van jedra (Lefebvre, 2007). Za razliku od većine DNK - vezujućih domena koji ostvaruju interakcije sa DNK preko velikog žljeba, HMG domeni interaguju sa malim žljebom što za posledicu ima savijanje DNK, pri čemu ugao savijanja može da varira između 30° i 110° (Wegner, 1999; Weiss, 2001). Konsenzus motiv za koji se vezuju SOX proteini je heptamerna DNK sekvenca 5'-(A/T)(A/T)CAA(A/T)G-3' (Harley, 1994). Zatim, svaki SOX protein poseduje dva različita signala za transport proteina u jedro (NLS – eng. "Nuclear Localisation Signal") koji su međusobno nezavisni i evolutivno visoko očuvani kod svih SOX proteina (Sudbeck i Scherer, 1997). NLS-ovi su locirani na N-terminalnom i C-terminalnom delu HMG boks domena (Malki, 2010). N-terminalni NLS vezuje kalmodulin i regulisan je intracelularnim kalcijumom, dok C-terminalni NLS vezuje importin-β i regulisan je signalnim putevima, kao što je ciklični AMP/protein kinaza A signalni put (Malki, 2010). Oba NLS-a su neophodna da bi došlo do transporta SOX proteina u jedro (Poulat, 1995; Sudbeck i Scherer, 1997). Takođe, ovi NLS-ovi su uključeni i u vezivanje za DNK

(Malki, 2010). Signal za izlazak proteina iz jedra u citoplazmu je takođe prisutan na HMG boks domenu SOX proteina (Malki, 2010).

Domeni SOX proteina izvan HMG boks domena su visoko evolutivno očuvani kod ortologa i članova iste grupe, a različiti kod pripadnika različitih grupa (Lefebvre, 2007). Ovi domeni uključuju transaktivacione, transrepresorske i domene odgovorne za dimerizaciju proteina (Lefebvre, 2007). Brojni SOX proteini (SOX B1, C, E, F) sadrže transaktivacione domene locirane na C-terminalnom delu proteina čija je aktivnost obično promotor ili partner zavisna (Bernard i Harley, 2010). SOXB2 proteini poseduju snažan represorski domen C- terminalno u odnosu na HMG boks (Uchikawa, 1999). Članovi SOXD grupe poseduju HMG domen ali nemaju transaktivacione domene (Chew i Gallo, 2009).

1.3.2.2. Vezivanje SOX proteina za DNK

SOX proteini poseduju nizak afinitet vezivanja za DNK, tako da se visok afinitet i specifičnost vezivanja postižu preko interakcija sa drugim transkripcionim faktorima, kao što su homeodomenski proteini, proteini koji poseduju cinkane prstiće, HLH proteini i proteini sa strukturom leucinskog rajsferšlusa (Remenyi, 2003; Wissmuller, 2006). Molekularne interakcije sa drugim transkripcionim faktorima su veoma bitne zbog toga što je svaki protein ove familije eksprimiran u različitim tipovima ćelija i specifičan tip ćelije može da koeksprimira brojne SOX faktore (Wegner, 1999). Interakcija partner faktora i SOX proteina zavisi od tipa ćelije i promotorske sekvence, odnosno određena je specifičnošću DNK sekvence uz mesto vezivanja SOX proteina i dostupnošću partner faktora u ćeliji (Wegner, 1999; Kondoh i Kamachi, 2010). Pored toga, u toku razvika embriona transkripciona regulacija koja se zasniva na kooperaciji SOX - partner faktor se menja od jedne do druge faze i nije bitna samo za progresiju procesa razvika, već učestvuje u generisanju i održavanju diferenciranih ćelija (Kondoh i Kamachi, 2010).

1.3.2.3. Posttranslacione modifikacije SOX proteina

Kao i u slučaju drugih regulatornih faktora, aktivnost SOX proteina je modulirana različitim tipovima posttranslacionih modifikacija. Ove modifikacije regulišu proteinska svojstva kao što su stabilnost, aktivnost, intracelularna lokalizacija i interakcije sa partnerima (Benayoun i Veitia, 2009). Eksperimentalno je potvrđena fosforilacija SRY i SOX9 proteina (Desclozeaux, 1998; Huang, 2000). Fosforilacija ova dva proteina povećava efikasnost njihovog vezivanja i sposobnost da aktiviraju ili inhibiraju transkripciju ciljnih gena (Desclozeaux, 1998; Huang, 2000). Pored toga, podaci iz literature ukazuju da acetilacija reguliše ulogu SRY u determinaciji pola (Thevenet, 2004), dok je acetilacija SOX9 bitna za ostvarivanje njegove funkcije u hondrocitima (Bernard i Harley, 2010). SOX3, SOX4, SOX6 i SOXE proteini mogu biti modifikovani sumoilacijom ili ubikvitinacijom *in vitro*, čime se menjaju karakteristike ovih proteina kao što su stabilnost, ćelijska lokalizacija, transaktivacioni potencijal i afinitet vezivanja za DNK (Savare, 2005; Girard i Goossens, 2006; Hattori, 2006; Pan, 2006). Pokazano je da je transkripciona aktivnost SOX3 proteina reprimirana sumoilacijom (Savare, 2005).

1.3.3. Funkcije SOX proteina

Tokom nekoliko poslednjih godina, SOX proteini su okarakterisani kao važni regulatori brojnih procesa u toku razvića. Opisana je njihova funkcija u matičnim ćelijama, tokom rane embriogeneze, gastrulaciji, neuralnoj indukciji, formiranju različitih organa i tkiva, kao i njihov značaj za specifikaciju i diferencijaciju brojnih tipova ćelija (Guth i Wegner, 2008). Ovi transkripcioni faktori indukuju ili suprimiraju osobine progenitorskih ćelija, kao što su proliferacija i multipotencijalnost, ili iniciraju programe diferencijacije aktivirajući ekspresiju tkivno-specifičnih gena (Chew i Gallo, 2009).

Geni unutar *Sox* grupe obično dele iste/slične funkcije. Pored toga, geni unutar jedne grupe mogu da imaju suprotstavljene funkcije genima druge grupe (Kiefer, 2007). Takođe, jedan *Sox* gen može da ostvaruje funkciju na različitim stupnjevima razvića

jednog tipa ćelija i/ili u procesima razvića više tipova ćelija (Kiefer, 2007). U Tabeli 2. dat je sažet pregled funkcija *Sox* gena.

Grupa	Gen	Uloga
A	<i>Sry</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Determinacija pola (Polanco i Koopman, 2007) • Regulacija dopaminergičnih neurona nigrostriatalnog sistema (Dewing, 2006)
B1	<i>Sox1</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Razviće oka (Kondoh, 2004) • Neurogeneza (Bylund, 2003; Pevny i Placzek, 2005)
	<i>Sox2</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Održavanje pluripotentnosti embrionalnih matičnih ćelija (Avilion, 2003) • Neurogeneza (Pevny i Placzek, 2005; Wegner i Stolt, 2005) • Razviće oka (Kamachi, 1998; Kondoh, 2004) • Razviće hipofize (Kelberman, 2006) • Razviće čulnih kvržica (Okubo, 2006)
	<i>Sox3</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Neurogeneza (Bylund, 2003; Pevny i Placzek, 2005) • Razviće oka (Kamachi, 1998; Kondoh, 2004) • Razviće hipofize (Rizzoti, 2004) • Razviće gonada (Weiss, 2003)
B2	<i>Sox14</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Neurogeneza (Sandberg, 2005)
	<i>Sox21</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Neurogeneza (Sandberg, 2005)
C	<i>Sox4</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Kardiogeneza (Schilham, 1996) • Limfopoeza (Schilham, 1996) • Razviće pankreasa (Wilson, 2005) • Neurogeneza (Bergsland, 2006)
	<i>Sox11</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Kardiogeneza (Sock, 2004) • Razviće oka, pluća, pankreasa, skeleta i slezine (Sock, 2004) • Neurogeneza (Bergsland, 2006)
	<i>Sox12</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Nepoznata
D	<i>Sox5</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Razviće skeleta (Smits, 2001) • Razviće nervne kreste (Perez-Alcala, 2004) • Gliogeneza (Stolt, 2006)
	<i>Sox6</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Provodljivost srčanog mišića (Hagiwara, 2000) • Razviće skeleta (Smits, 2001) • Gliogeneza (Stolt, 2006) • Eritropoeza (Dumitriu, 2006; Yi, 2006)
	<i>Sox13</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Limfopoeza (Melichar, 2007)

Grupa	Gen	Uloga
E	<i>Sox8</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Gliogeneza (Stolt, 2004; Stolt, 2005) • Razviće testisa (Chaboissier, 2004) • Osteogeneza (Schmidt, 2005) • Formiranje nervne kreste (Maka, 2005; O'Donnell, 2006)
	<i>Sox9</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Determinacija pola (Kobayashi, 2005; Barrionuevo, 2006) • Hondrogeneza (Bi, 1999; Akiyama, 2002) • Razviće nervne kreste (Cheung, 2005) • Gliogeneza (Stolt, 2003; Wegner i Stolt, 2005) • Održavanje ćelija notohorda (Barrionuevo, 2006) • Kardiogeneza (Akiyama, 2004) • Formiranje unutrašnjeg uha (Taylor i Labonne, 2005) • Formiranje folikula dlake (Vidal, 2005) • Razviće pankreasa (Seymour, 2007) • Razviće epitela creva (Moniot, 2004)
	<i>Sox10</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Razviće nervne kreste (Wegner i Stolt, 2005; Kelsh, 2006) • Formiranje unutrašnjeg uha (Taylor i Labonne, 2005)
F	<i>Sox7</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Kardiogeneza (Zhang, 2005)
	<i>Sox17</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Formiranje endoderma (Kanai-Azuma, 2002) • Angiogeneza (Matsui, 2006)
	<i>Sox18</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Kardiogeneza (Pennisi, 2000; Zhang, 2005) • Angiogeneza (Downes i Koopman, 2001; Matsui, 2006) • Razviće folikula dlake (Pennisi, 2000)
G	<i>Sox15</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Regeneracija skeletne muskulature (Lee, 2004; Meeson, 2007)
H	<i>Sox30</i>	<ul style="list-style-type: none"> • nepoznata

Tabela 2. Pregled funkcija *Sox* gena. Preuzeto iz (Lefebvre, 2007).

1.3.3.1. SOX proteini i determinacija pola

Podaci iz literature ukazuju na značaj *Sry*, *Sox3* i *Sox9* gena u determinaciji pola. Tokom razvića, ekspresija ovih gena je detektovana veoma rano u genitalnoj brazdi (Wegner, 1999). Pokazao je da su SRY i SOX9 uključeni u determinaciju muškog pola (Koopman, 2005). Ekspresija *Sry* u određenim somatskim ćelijama genitalne brazde aktivira diferencijaciju ovih ćelija u Sertolijeve ćelije i na taj način inicira diferencijaciju nediferenciranih gonada u testise (Wegner, 1999). *Sox9* je inicijalno ekspimiran u genitalnim brazdama mužjaka i ženki; ubrzo nakon utišavanja *Sry* ekspresije, *Sox9* ekspresija postaje ograničena na muške gonade (Kent, 1996; Wegner, 1999). Ekspresija

ovog gena detektovana je tokom diferencijacije Sertolijevih ćelija i smatra se da SOX9 funkcioniše kao kritičan faktor diferencijacije Sertolijevih ćelija (Kent, 1996; Wegner, 1999).

Mutacije u *SRY* genu dovode do XY reverzije pola kod ljudi, a XX miševi koji sadrže *Sry* transgen se razvijaju u mužjake (Sinclair, 1990; Koopman, 1991). Podaci iz literature ukazuju da *SOX9* heterozigotne mutacije često prouzrokuju XY reverziju pola kod ljudi (od muškog ka ženskom polu) (Foster, 1994; Wagner, 1994), dok se XY nediferencirane gonade miša sa homozigotnom delecijom *Sox9* gena razvijaju u ovarijume *in vitro* (Chaboissier, 2004).

SOX3 nije neophodan za determinaciju pola miša, ali je važan za normalno razviće oocita i diferencijaciju testisa mužjaka, kao i za gametogenezu kod jedinki oba pola (Weiss, 2003). Kod miševa kod kojih je deletiran *Sox3* gen nije detektovana reverzija pola. Međutim, ženke miševa imaju folikularnu atreziju i smanjenu fertilitnost (Weiss, 2003), dok je kod mužjaka detektovana disfunkcija Sertolijevih ćelija sa veoma izraženom vakuolizacijom, gubitak germinativnih ćelija i redukcija broja spermatozoida (Weiss, 2003). Kod ljudi, mutacije u *SOX3* genu prouzrokuju značajan defekt gonada, uključujući male testise u kombinaciji sa X-vezanim hipopituitarizmom, recesivnim hipoparatiroidizmom i mentalnom retardacijom (Rousseau, 1991; Laumonnier, 2002).

Pored ekspresije u somatskim ćelijama gonada (*Sry*, *Sox3* i *Sox9*), ekspresija *Sox* gena detektovana je i u germinativnim ćelijama. Naime, *Sox17* je detektovan u premejotičkim spermatogonijama, a *Sox5* i *Sox6* su detektovani u postmejotičkim germinativnim ćelijama kod adultnih miševa, sa najvišim nivoom ekspresije u okruglim spermatidama (Wegner, 1999). Pored toga, *Sox2* transkript je pronađen u oocitama (Collignon, 1996).

1.3.3.2. SOX proteini i neuralno razviće

Podaci iz literature ukazuju na značaj *SOXB*, *SOXC*, *SOXD* i *SOXE* grupe gena u neuralnom razviću. Ekspresija *Sox* gena je detektovana u neuralnim progenitorima, neuroblastima i diferenciranim neuronima (Kiefer, 2007).

SoxB1 geni su eksprimirani u ćelijama koje su predodređene da postanu neuroni centralnog nervnog sistema (CNS) (Bylund, 2003). Pokazano je da se ekspresija ovih gena smanjuje nakon diferencijacije (Bylund, 2003). Podaci iz literature ukazuju da konstitutivna ekspresija *Sox1-3* u neuralnim progenitorima sprečava njihovu diferencijaciju i održava ih u proliferativnom stanju (Bylund, 2003; Graham, 2003). Za razliku od SOX1-3 proteina, SOX21 protein promoviše diferencijaciju neuralnih ćelija (Sandberg, 2005). Naime, pokazano je da proteini koji su ključni regulatori neurogeneze (proneuralni proteini) iniciraju porast ekspresije *Sox21* gena (Sandberg, 2005). Takođe, podaci iz literature ukazuju da ektopična ekspresija *Sox21* gena u neuroblastima indukuje smanjenje ekspresije markera progenitora, izlazak iz ćelijskog ciklusa i neuronalnu diferencijaciju (Sandberg, 2005).

Proneuralni proteini takođe aktiviraju ekspresiju *SoxC* gena (*Sox4* i *Sox11*) (Bergsland, 2006). Ekspresija *SoxC* gena u postmitotičkim neuroblastima sugerise da ovi geni regulišu kasnije stupnjeve neuralnog razvića (Bergsland, 2006). Pored toga, eksperimentalno je pokazano da povećana ekspresija *SoxC* gena aktivira ekspresiju panneuronalnih markera Tuj1 i MAP2 (Kiefer, 2007).

Podaci iz literature ukazuju na značaj *SoxE* i *SoxD* grupe gena za gliogenezu (razviće oligodendrocita, astrocita i Švanovih ćelija) u centralnom i perifernom nervnom sistemu (Stolt, 2004; Stolt, 2005; Wegner i Stolt, 2005). Specifikacija i diferencijacija oligodendrocita zavisi od *SoxE* grupe gena, uglavnom *Sox9* i *Sox10* (Kiefer, 2007). *Sox9* je eksprimiran u glijalnim prekursorima, a *Sox10* u diferenciranim oligodendrocitima i astrocitima (Britsch, 2001; Stolt, 2002; Stolt, 2003). *SoxD* geni (*Sox5* i *Sox6*) regulišu razviće oligodendrocita tako što onemogućavaju transkripcionim faktorima SOXE grupe da aktiviraju ekspresiju ciljnih gena (Kiefer, 2007). Ekspresija *Sox5* i *Sox6* gena je inicirana neposredno pre specifikacije oligodendrocita, održava se u progenitorima oligodendrocita i smanjuje se u terminalno diferenciranim ćelijama (Stolt, 2006).

1.3.3.3. SOX proteini i razviće nervne kreste

Ćelije nervne kreste su multipotentni progenitori koji migriraju iz dorzalne nervne cevi u specifične regione embriona gde doprinose razviću brojnih struktura, uključujući

srce, neurone i glije perifernog nervnog sistema, skelet glave, oči i melanocyte (Kiefer, 2007; Lefebvre, 2007). Podaci iz literature ukazuju da su članovi *SoxE* grupe gena (*Sox8*, *Sox9*, *Sox10*) neophodni za generisanje ćelija nervne kreste, njihovo preživljavanje i održavanje pluripotentnosti (Hong i Saint-Jeannet, 2005; Kiefer, 2007). *Sox10* je eksprimiran u ćelijama nervne kreste u trenutku njihovog pojavljivanja (Kuhlbrodt, 1998a). Ovaj gen održava multipotentnost ovih ćelija, njihovu proliferativnost i inhibira njihovu diferencijaciju (Kim, 2003). Pored toga, *Sox10* gen kontroliše ekspresiju nekoliko mijelinskih gena, uključujući mijelin bazni protein i proteolipid protein, i održava fenotip diferenciranih oligodendrocita (Wegner i Stolt, 2005). *Sox8* i *Sox9* su takođe eksprimirani u toku razvića nervne kreste (Maka, 2005; Taylor i Labonne, 2005). Pokazano je da povećana ekspresija *Sox9* gena u nervnoj cevi pileta indukuje ekspresiju markera nervne kreste u ćelijama koje bi u protivnom postale neuroni CNS (Cheung i Briscoe, 2003).

Pored *SoxE* grupe gena, eksperimentalno je pokazano i da je *Sox5* gen eksprimiran u ranim ćelijama nervne kreste (Chew i Gallo, 2009).

1.3.3.4. SOX proteini i razviće sočiva

Podaci iz literature ukazuju da su u toku razvića sočiva pileta *Sox1-3* geni koeksprimirani (Wegner, 1999). Proteini koje kodiraju ovi geni stimulišu ekspresiju δ -kristalin gena (Kamachi, 1995). Pokazano je da za razliku od SOX1 i SOX2 koji aktiviraju DC5 enhensera $\delta 1$ - kristalin gena, SOX14 i SOX21 inhibiraju njegovu aktivnost (Uchikawa, 1999).

Kod miša, *Sox3* nije eksprimiran u toku razvića sočiva, a *Sox2* ekspresija je smanjena u momentu aktiviranja *Sox1* ekspresije (Kamachi, 1998).

1.3.3.5. SOX proteini i hondrogeneza

Skeletogeneza je kod embriona inicirana nakon uspostavljanja pluripotentnih mezenhimalnih ćelija (Lefebvre, 2007). Pokazano je da je *Sox9* gen predominantno eksprimiran u kondenzacijama mezenhimalnih ćelija iz kojih se razvija skelet (Wegner,

1999). Podaci iz literature ukazuju da je ovaj gen glavni regulator hondrogeneze i da reguliše brojne stupnjeve razvića hrskavice (Kiefer, 2007). Delecija *Sox9* gena iz nediferenciranog mezenhima u pupoljcima udova onemogućava kondenzacije mezenhimalnih ćelija, razviće osteoblasta, zrele hrskavice i kostiju, što ukazuje da je *Sox9* neophodan za specifikaciju osteohondroprogenitora (Kiefer, 2007). Pored toga, pokazano je i da povećana ekspresija *Sox9* gena vodi ka formiranju hrskavice (Chew i Gallo, 2009). Drugi član *SoxE* grupe, *Sox8*, je eksprimiran u hondrocitima tokom embriogeneze miša, kao i u osteoblastima (Guth i Wegner, 2008). *Sox5*, *L-Sox5* i *Sox6* su takođe neophodni za hondrogenezu (Bernard i Harley, 2010). U toku diferencijacije hondroblasta *Sox5* i *Sox6* promovišu razviće proliferišuće populacije hondroblasta (Chew i Gallo, 2009).

1.3.3.6. SOX proteini i hematopoeza

Literaturni podaci ukazuju da je *Sox4* gen eksprimiran u timusu i da promoviše ekspanziju pro-B limfocita i diferencijaciju T limfocita (Schilham, 1996). Pored toga, *Sox6* gen je opisan kao važan stimulator eritropoeze (Dumitriu, 2006).

1.3.3.7. SOX proteini i razviće dlake, kardiogeneza i angiogeneza

U razviće endoderma, kardiogenezu, angiogenezu i razviće dlake su uključeni članovi *SoxF* grupe (*Sox7*, *Sox17* i *Sox18*) (Lefebvre, 2007). Pored toga, literaturni podaci ukazuju da *Sox6* promoviše diferencijaciju kardiomiocita (Chew i Gallo, 2009).

1.3.4. Oboljenja prouzrokovana SOX genima

Delecije i mutacije *SOX* gena obično rezultuju defektima u toku razvića i kongenitalnim oboljenjima kod čoveka (Wegner, 1999). Pokazano je da su heterozigotne mutacije *SOX2* gena kod ljudi povezane sa anoftalmijom i mikroftalmijom (Kelberman, 2006). Pored toga, kod nosioca ovih mutacija detektovan je zastoj u razvoju, poteškoće u učenju, ezofagealna atrezija, sensorineuralni gubitak sluha i genitalne abnormalnosti

(Kelberman, 2006). Takođe, mutacije u *SOX2* genu mogu da dovedu do hipogonadotropnog hipogonadizma sa anteriornom hipoplazijom hipofize i deficijencijom gonadotropina (Chew i Gallo, 2009). Podaci iz literature ukazuju da je ekspanzija od 7 alanina u okviru prvog polialaninskog trakta *SOX3* proteina povezana sa hipopituitarizmom, hipoplazijom adenohipofize i odsustvom infundibuluma (Woods, 2005). Zatim, kod čoveka heterozigotne mutacije *SOX9* gena prouzrokuju ozbiljne malformacije skeleta i dovode do pojave sindroma poznatog kao kampomelična displazija (Foster, 1994; Wagner, 1994). Takođe, heterozigotne mutacije *SOX9* gena kod osoba muškog pola dovodi i do autozomalne reverzije pola (Foster, 1994; Wagner, 1994). Kod čoveka, heterozigotne mutacije *SOX10* gena prouzrokuju "Waardenburg-Hirschsprung" sindrom (Pingault, 1998) koga karakteriše odsustvo enteričnih ganglija u debelom crevu (enterična agangliogeneza), defekti pigmentacije i gluvoća (Kuhlbrodt, 1998b). Pored toga, kod pacijenata sa šizofrenijom, *SOX10* je visoko metilovan i njegova ekspresija je značajno smanjena (Iwamoto, 2005). Mutacije u *SOX18* genu prouzrokuju hipotrihosis-limfedema-teleangiektazija sindrom koga karakteriše oskudna dlaka, edemi i vaskularne anomalije (Irrthum, 2003).

Povećana ekspresija *SOX* gena detektovana je i kod karcinoma. Naime, povećana ekspresija *SOX4* i *SOX11* gena je uočena kod meduloblastoma (Lee, 2002; Yokota, 2004). Zatim, visok nivo *SOX2*, *SOX6*, *SOX8*, *SOX11* i *SOX13* ekspresije je detektovan u gliomima kod čoveka (Ueda, 2004; Weigle, 2005; Schlierf, 2007).

1.4. *SoxB* grupa gena

Ovu grupu *SOX* gena sačinjavaju dve podgrupe okarakterisane na osnovu sličnosti u okviru HMG domena: *SOXB1* koja obuhvata transkripcione aktivatore (*SOX1*, *SOX2*, *SOX3*) i *SOXB2* koja obuhvata transkripcione represore (*SOX14*, *SOX21*). Članovi ove grupe poseduju visok stepen homologije u okviru HMG domena. Takođe, nizvodno od HMG domena sledi kratki segment dužine 8 amino kiselina koji je zajednički za sve članove *SOXB* grupe (Uchikawa, 1999).

Podaci iz literature ukazuju na značaj *SoxB* gena u procesu samo-obnavljanja i u održavanju pluripotentnosti matičnih ćelija (Guth i Wegner, 2008). Pored toga, ovi geni

su uključeni u specifikaciju, procese sazrevanja i terminalnu diferencijaciju matičnih ćelija (Guth i Wegner, 2008). Eksperimenti kod pileta ukazuju da su *SoxB1* geni neophodni za održavanje neuralnih progenitora u pluripotentnom i proliferišućem stanju tokom ranog razvića CNS-a; ovi geni sprečavaju prevremeni izlazak iz ćelijskog ciklusa i diferencijaciju reprimirajući aktivnost proneuralnih gena (Bylund, 2003; Graham, 2003). Za razliku od *SoxB1* podgrupe gena, članovi *SoxB2* podgrupe promovišu progresiju neurogeneze u toku razvića CNS regulišući ekspresiju transkripcionih aktivatora podgrupe *SoxB1* (Sandberg, 2005). Ovo ukazuje da odluka neuralnih prekursora o samoobnavljanju ili neuronalnoj diferencijaciji zavisi od finog balansa SOXB1 i SOXB2 proteina (Wegner i Stolt, 2005). Takođe, proneuralni proteini indukuju neurogenezu tako što dovode do povećanja ekspresije *Sox21* gena. Smatra se da nakon dostizanja određenog nivoa ekspresije, SOX21 inhibira aktivnost *Sox3* gena, čime se ostvaruju uslovi za neuralnu diferencijaciju (Sandberg, 2005).

SoxB geni su takođe bitan faktor za razviće plakoda (Guth i Wegner, 2008). Plakode su strukture specifične za kičmenjake koje vode poreklo od ektoderma i neophodne su za razviće senzornih organa (Guth i Wegner, 2008). Pokazano je da mutacije u *Sox2* genu prouzrokuju ozbiljne malformacije unutrašnjeg uha kod miša, kao i anoftalmiju kod ljudi (Fantès, 2003; Kiernan, 2005), dok *Sox1*-deficijentni miševi ispoljavaju kataraktu (Nishiguchi, 1998).

1.5. *SOX2* gen

Humani *SOX2* gen pripada podgrupi *SOXB1* gena, sadrži jedan egzon i lokalizovan je na dugom kraku hromozoma 3 u regionu q26.3-q27. Ovaj gen kodira protein od 317 amino kiselina (Stevanovic, 1994). SOX2 protein poseduje N-terminalni domen nepoznate funkcije, DNK-vezujući domen i C-terminalni aktivacioni domen (Alatzoglou, 2009). Podaci iz literature ukazuju da je *SOX2* gen lociran unutar introna gena označenog kao *SOX2OT* (eng. "*Sox2* overlapping transcript") koji se transkribuje u istoj orijentaciji kao i *SOX2* gen (Fantès, 2003). Ovaj *SOX2OT* transkript (nekodirajuća RNK) je veličine 3,4 kb i poseduje 88% identičnosti sa ortolognim sekvencama miša

(Fantes, 2003). Smatra se da *SOX2OT* učestvuje u regulaciji ekspresije *SOX2* gena (Fantes, 2003).

Sox2 gen je eksprimiran tokom različitih faza embriogeneze. Visok nivo ekspresije ovog gena detektovan je embrionalnim matičnim ćelijama, neuralnim matičnim ćelijama, nervnoj ploči, nervnoj cevi, kao i ventrikularnoj i subventrikularnoj zoni fetalnog mozga (Bylund, 2003; Graham, 2003; Ellis, 2004; Bani-Yaghoub, 2006). *Sox2* gen je eksprimiran i u ranom stadijumu razvića sočiva (Nishiguchi, 1998). Takođe, *SOX2* je eksprimiran i u adultnom mozgu u regionima koji sadrže neuralne matične ćelije (subventrikularna zona oko lateralnih ventrikula, region sa rostralnim migratornim ćelijama, subgranularni hipokampalni sloj) (Pevny i Placzek, 2005). Pored toga, ovaj gen je eksprimiran i u glioma tumorima (Schmitz, 2007), karcinomu skvamoznih ćelija gastrointestinalnog trakta (Long i Hornick, 2009), mikrocelularnom karcinomu pluća (Maddison, 2010), kolorektalnom kanceru (Fang, 2010) i karcinomu dojku (Rodriguez-Pinilla, 2007).

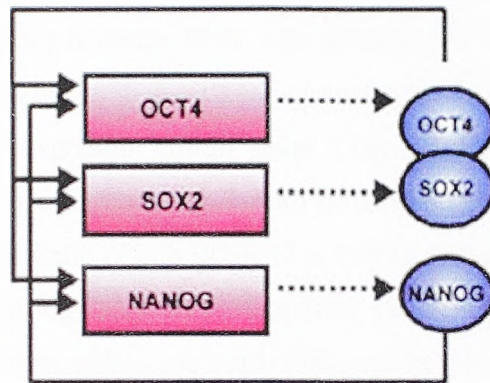
Podaci iz literature ukazuju da miševi kojima je deletiran *Sox2* gen umiru ubrzo posle implantacije (Avilion, 2003). Kod jedne trećine heterozigotnih *Sox2* miševa detektovana je perinatalna letalnost, dok je kod ostalih detektovan manji rast i redukcija fertiliteta kod mužjaka (Boyer, 2005). Heterozigotne mutacije *SOX2* gena čoveka su povezane sa bilateralnom anoftalmijom ili mikroftalmijom u kombinaciji sa hipopituitarizmom (Fantes, 2003; Williamson, 2006).

Podaci iz literature ukazuju da *SOX2* predstavlja univerzalni marker pluripotentnih matičnih ćelija (Graham, 2003). Neophodan je za različite procese u toku razvića koji uključuju održavanje pluripotentnosti EM ćelija (Avilion, 2003), specifikaciju i održavanje identiteta neuralnih matičnih ćelija (Graham, 2003), kao i diferencijaciju vlaknastih ćelija sočiva (Kamachi, 1998; Kondoh, 2004).

1.5.1. Regulacija ekspresije *SOX2/Sox2* gena

Podaci iz literature ukazuju da ekspresija *Sox2* gena može da bude regulisana transkripcionim faktorima (Boyer, 2005), na nivou hromatinske strukture (Sikorska, 2008), kao i na post-transkripcionom nivou (Tay, 2008).

Transkripcioni faktori za koje je pokazano da utiču na ekspresiju *Sox2* gena u EM ćelijama miša i čoveka su SOX2, OCT4 i NANOG (Boyer, 2005). Naime, ova tri transkripciona faktora se kao kompleks vežu za promotore vlastitih gena i formiraju autoregulatorne mreže (Slika 6) (Boyer, 2005).



Slika 6. Transkripciona regulacija *SOX2* gena. SOX2 se u kompleksu sa OCT4 i NANOG-om veže za promotor *SOX2* gena i na taj način reguliše sopstvenu ekspresiju (preuzeto od (Boyer, 2005)).

Pokazano je i da opšti transkripcioni faktori (NF-Y, Sp1 i MAZ), kao i članovi TALE (eng. "three amino acid loop extension") familije (PBX1 i MEIS1) utiču na nivo SOX2 proteina u NT2/D1 ćelijama (Milivojević M, 2010). Naime, povećana ekspresija NF-Y (eng. "nuclear factor Y") dovodi do blagog porasta nivoa SOX2 proteina, dok povećana ekspresija Sp1 (eng. "Specificity protein 1") transkripcionog faktora dovodi do značajnog porasta ekspresije SOX2 proteina (Milivojević M, 2010). Takođe, povećana ekspresija MAZ (eng. "Myc-associated zinc finger protein") transkripcionog faktora dovodi do povećanja nivoa SOX2 proteina (Milivojević M, 2010). Zatim, povećana ekspresija članova TALE familije PBX1 (eng. "pre-B cell leukemia transcription factor 1") i MEIS1 (eng. "myeloid ecotropic viral integration site 1 homolog") dovodi do povećanja nivoa endogenog SOX2 proteina, dok TGIF (eng. "5'-TG-3' interacting factor") ne utiče na SOX2 ekspresiju (Milivojević M, 2010).

Pored transkripcionih faktora i epigenetički status enhensera (SRR1 i SRR2) utiče na ekspresiju *SOX2* gena u nediferenciranim i difrenciranim NT2/D1 ćelijama (Sikorska, 2008). Naime, oba enhensera su nemetilovana i povezana sa acetilovanim histonom H3 kod NT2/D1 progenitora kod kojih je detektovan visok nivo *SOX2* ekspresije (Sikorska,

2008). Zatim, kod astrocita i neurona detektovana je razlika u metilaciji i acetilaciji ovih enhensera; metilacija SRR2 enhensera je specifična za neurone, dok je SRR1 enhenser metilovan i kod astrocita i kod neurona (Sikorska, 2008). Pokazano je da je metilacija SRR1 enhensera karakteristična za izlazak NT2/D1 ćelija iz ćelijskog ciklusa i detektovana je u uslovima smanjene ekspresije *SOX2* gena (Sikorska, 2008).

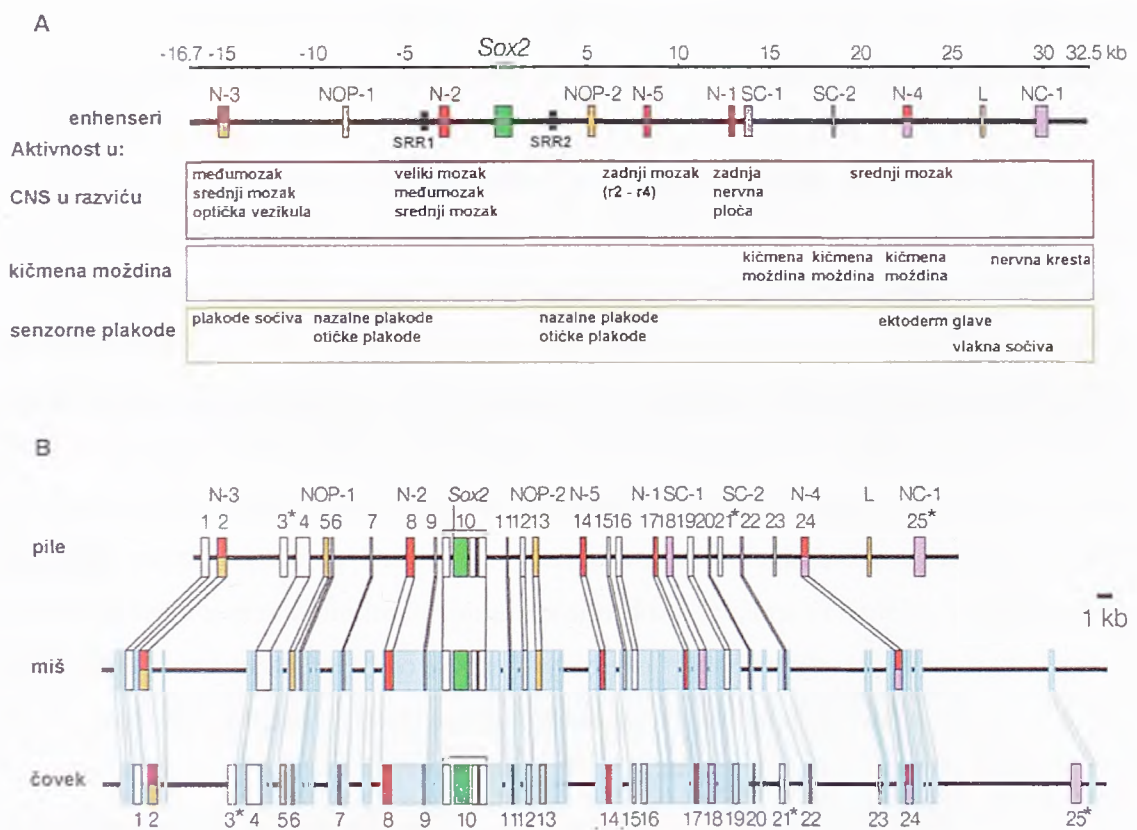
MikroRNK (miRNK) su kratke RNK koje se vezuju za komplementarne sekvence na iRNK i iniciraju degradaciju ili narušavaju translaciju ciljnih iRNK, odnosno post-transkripciono regulišu ekspresiju ciljnih gena (Tay, 2008; Xu, 2009). Generalno, transkript jednog gena može da bude reprimiran od strane više miRNK i jedna miRNK može da reprimira više različitih ciljnih iRNK (Xu, 2009). Pokazano je da miR-134 u EM ćelijama miša učestvuje u regulaciji ekspresije *Sox2* gena. Naime, tretman retinoičnom kiselinom dovodi do porasta ekspresije miR-134 koja se vezuje za ciljne sekvence u kodirajućem regionu *Sox2* gena što dovodi do smanjenja ekspresije ovog gena (Tay, 2008). Takođe, podaci iz literature ukazuju da je endogeni nivo *SOX2* gena u EM ćelijama čoveka kontrolisan post-transkripciono od strane miRNK-145; nivo miR-145 je relativno nizak kod nediferenciranih ćelija i tokom diferencijacije detekovan je porast nivoa što je praćeno smanjenjem ekspresije *SOX2* gena (Xu, 2009).

1.5.1.1. Enhenseri *Sox2* gena

Podaci iz literature ukazuju da je ekspresija *Sox2* gena regulisana kombinovanim delovanjem mnogobrojnih enhensera (Kamachi, 2009). DNK sekvence tih enhensera pokazuju visok stepen homologije kod kičmenjaka (Kamachi, 2009).

Kod embriona pileta unutar genomske sekvence veličine 50 kb, koja sadrži i *Sox2* gen, identifikovano je jedanaest enhensera *Sox2* gena (Slika 7) (Kamachi, 2009). Pet enhensera, koji su označeni od N-1 do N-5, je aktivno u CNS embriona (Kamachi, 2009). N-1 i N-2 su aktivni u najranijoj embriogenezi i regulišu ekspresiju *Sox2* gena u prednjoj (N-2) i zadnjoj (N-1) nervnoj ploči (Kamachi, 2009). Analize na embrionima miša ukazuju da enhenser N2 učestvuje u regulaciji *Sox2* ekspresije tokom najranijih faza razvića, uključujući epiblast, EM ćelije i najverovatnije unutrašnju ćelijsku masu blastocista (Iwafuchi-Doi, 2011). Zatim, pokazano je da POU transkripcioni faktori

direktno aktiviraju ekspresiju *Sox2* gena preko N2 enhensera (Iwafuchi-Doi, 2011). Enhenser N-3 je aktivan u međumozgu, optičkoj vezikuli (buduća retina) i srednjem mozgu (Kamachi, 2009). Zatim, enhenser N-4 pokazuje aktivnost posteriorno u odnosu na srednji mozak sa odsustvom aktivnosti u regionu zadnjeg mozga. Takođe, enhenser N-4 je aktivan i u cefaličnom ektodermu od koga nastaju senzorne plakode (Kamachi, 2009). Za enhenser N-5 je pokazano da je aktivan u regionu zadnjeg mozga (Kamachi, 2009).



Slika 7. Enhenseri *Sox2* gena. A) Pozicija enhensera *Sox2* gena pileta unutar genomske sekvence veličine 50 kb i regioni ispoljavanja aktivnosti ovih enhensera. B) Sekvenca *Sox2* genskog lokusa. Regioni visoke homologije pileta i sisara označeni su boksovima. Identifikovano je 25 regiona visoke homologije. Kod pileta i miša nije detektovana homologija tri regiona (blokovi označeni kao 3*, 21* i 25*). Regioni visoke homologije miša i čoveka označeni su plavo (preuzeto od (Kamachi, 2009)).

U kasnijim stupnjevima embrionalnog razvića aktivni su enhenseri označeni kao SC-1 i SC-2 (aktivni u kičmenoj moždini) i NC-1 (aktivan u ćelijama neuralne kreste koje vode poreklo od dorzalne kičmene moždine) (Kamachi, 2009). Zatim, za tri enhensera je pokazano da ispoljavaju aktivnost u senzornim sistemima u razviću: NOP-1 i NOP-2 u nazalnim i otičkim plakodama i enhenser L u vlaknima sočiva (Kamachi, 2009).

Upoređujući sekvencu *Sox2* genskog lokus pileta i čoveka utvrđeno je 25 regiona sa visokim stepenom homologije (Slika 7B) (Kamachi, 2009). Unutar ovih regiona locirane su sekvence deset funkcionalno definisanih enhensera, dok sekvencu enhensera označenog kao L nije detektovana kod sisara što je u saglasnosti sa gubitkom *Sox2* ekspresije u vlaknima sočiva sisara (Kamachi, 2009).

Kod miša su detektovana dva enhensera locirana približno 4 kb uzvodno (SRR1-*Sox2* regulatorni region 1) i približno 4 kb nizvodno (SRR2-*Sox2* regulatorni region 2) od starta transkripcije *Sox2* gena (Uchikawa, 2003; Catena, 2004; Miyagi, 2004; Miyagi, 2006). Pokazano je da su ova dva enhensera uključena u kontrolu *Sox2* ekspresije tokom neuralnog razvića (Uchikawa, 2003; Catena, 2004; Miyagi, 2004; Miyagi, 2006). SRR1 i SRR2 pokazuju visok stepen homologije sa sekvencama ovih enhensera kod čoveka (Tomioka, 2002). SRR1 sadrži vezivna mesta za POU transkripcione faktore, dok SRR2 enhenser sadrži bipartitna Oct4-*Sox2* vezivna mesta i funkcioniše specifično u EM ćelijama, kao i u neuralnim matičnim/progenitorskim ćelijama (Tomioka, 2002; Miyagi, 2004). SRR2 enhenser poseduje snažnu regionalnu specifikaciju, odnosno funkcionalan je u ograničenim zonama velikog mozga (Tomioka, 2002; Miyagi, 2004).

1.5.2. Funkcije *SOX2/Sox2* gena

1.5.2.1. *SOX2*, embriogeneza i neuralna diferencijacija

U zreloj oociti miša detektovan je akumuliran maternalni *SOX2* protein (Guth i Wegner, 2008) što ukazuje na značaj ovog transkripcionog faktora u veoma ranim fazama razvića. Na stupnju oocite, *SOX2* je lokalizovan u citoplazmi (Malki, 2010), da bi postfertilizaciono, na stupnju dve ćelije, bio translociran u jedro (Malki, 2010).

Ekspresija *Sox2* gena embriona započinje na stupnju morule i pod kontrolom je dva enhensera: SRR1 i SRR2 (Zappone, 2000; Miyagi, 2004). Na stupnju blastocista, SOX2 transkripcioni faktor je eksprimiran u EM ćelijama unutrašnje ćelijske mase kao protein jedra, dok je u ćelijama trofoblasta ovaj transkripcioni faktor lokalizovan u citoplazmi (Avilion, 2003). U EM ćelijama unutrašnje ćelijske mase SOX2 održava pluripotentnost ovih ćelija (Avilion, 2003). Sa daljim razvićem blastocista miša, *Sox2* ekspresija postaje ograničena na epiblast (Collignon, 1996; Wood i Episkopou, 1999). Kod embriona miša koji je homozigot za *Sox2*-"null" mutaciju nedostaju matične ćelije koje čine rani epiblast, što vodi ka letalitetu ranih embriona odmah nakon implantacije (Avilion, 2003). Tokom stadijuma gastrule, ekspresija *Sox2* gena je ograničena na ektoderm (Guth i Wegner, 2008), da bi nakon formiranja ektoderma ekspresija ovog transkripcionog faktora postala ograničena na neuroektoderm (Guth i Wegner, 2008). Podaci iz literature ukazuju da SOX2 predstavlja ključni faktor u formiranju neuroektoderma (Rex, 1997; Streit, 1997; Wood i Episkopou, 1999)

Nakon neuralne indukcije, *Sox2*, zajedno sa ostalim članovima *SoxB* grupe, je eksprimiran u neuroektodermalnim ćelijama i smatra se da su ovi faktori ključni regulatori ranog razvića centralnog nervnog sistema (CNS) (Guth i Wegner, 2008). U ranoj nervnoj cevi miša i pileta, SOX2, SOX1 i SOX3 su široko eksprimirani i pokazuju preklapajući profil ekspresije (Collignon, 1996; Wood i Episkopou, 1999). Sa početkom neurogeneze, ova tri faktora postaju ograničena na ventrikularnu zonu gde su locirani proliferišući, samo-obnavljajući i multipotentni neuroepitelijalni prekursori (neuralne matične ćelije) (Guth i Wegner, 2008). Ekspresija *Sox2* gena nije detektovana samo u neuralnim matičnim ćelijama u toku embrogeneze, već i u neuralnim matičnim ćelijama neurogenih regiona CNS- a adulta (subventrikularna zona oko lateralnih ventrikula, region sa rostralnim migratornim ćelijama, subgranularni hipokampalni sloj) (Pevny i Placzek, 2005). Ove ćelije imaju sposobnost diferencijacije u neurone, astrocite, oligodendrocite i glatke mišićne ćelije (Mujtaba, 1998). Pretpostavlja se da SOX2 održava neuralne matične ćelije u adultnom mozgu, što je podržano zapažanjem da redukovana *Sox2* ekspresija kod adultnih miševa rezultuje gubitkom neuralnih prekursora i neurodegeneracijom kao što je primećeno kod Hantingtonove i Alchajmerove bolesti (Ferri, 2004). Eksperimenti kod pileta ukazuju da su *SoxB1* geni potrebni za održavanje

neuralnih progenitora u pluripotentnom i proliferišućem stanju tokom ranih faza razvića CNS (Guth i Wegner, 2008). Pored toga, ovi geni sprečavaju prevremeni izlazak iz ćelijskog ciklusa i diferencijaciju reprimirajući aktivnost proneuralnih gena koji kodiraju bHLH transkripcione faktore (Bylund, 2003; Graham, 2003).

Tokom daljeg razvića CNS, ekspresija svakog SOXB proteina se ograničava na određene regione CNS-a i određene podgrupe zrelih neurona (Guth i Wegner, 2008). SOX2 ekspresija je detektovana u kortikalnim, strijatalnim i mnogim talamusnim GABAergičkim neuronima (Guth i Wegner, 2008). Istraživanja su pokazala da je SOX2 neophodan za sazrevanje neurona, praktično za sazrevanje GABAergičkih neurona korteksa i olfaktornog bulbusa (Cavallaro, 2008). Naime, kod miša kod kog ekspresija *Sox2* gena iznosi 25-30% vrednosti detektovane kod *wt* miša, broj ovih neurona se smanjuje, a njihova morfologija je izmenjena (Cavallaro, 2008). Pored toga, kod ovih *Sox2*-deficijentnih miševa detektovani su proliferativni defekti neuralnih matičnih i prekursorskih ćelija hipokampusa i periventrikularne zone (Ferri, 2004). Zatim, neuralne matične ćelije ovih miševa produkuju redukovani broj zrelih neurona, ali generišu normalne ćelije glije (Cavallaro, 2008).

1.5.2.2. SOX2 i pluripotentnost

SOX2, zajedno sa OCT4 i NANOG-om, je identifikovan kao glavni regulator koji diriguje embriogenezu sisara (Rizzino, 2008). Podaci iz literature ukazuju da ova tri faktora zauzimaju centralno mesto u transkripcionoj regulatornoj hijerarhiji koja određuje identitet EM ćelija (Boyer, 2005)

Pokazano je da SOX2 ispoljava najmanje četiri osobine na osnovu kojih se može smatrati jednim od glavnih regulatora embriogeneze sisara: neophodan je za razviće sisara; pomaže u regulaciji transkripcije drugih gena koji su neophodni za proces razvića; utiče na sopstvenu ekspresiju pozitivnom i negativnom povratnom spregom i funkcioniše kao molekularni reostat u kontroli samo-obnavljanja i pluripotentnosti EM ćelija (Rizzino, 2009) Podaci iz literature ukazuju da SOX2, OCT4 i NANOG kontrolišu pluripotentnost EM ćelija preko aktiviranja gena kritičnih za samo-obnavljanje i reprimiranja gena koji iniciraju diferencijaciju (Sun, 2006).

1.5.2.3. SOX2 i proliferacija

Prethodna istraživanja su pokazala da SOX2 promoviše ili inhibira proliferaciju u zavisnosti od ćelijskog konteksta. Pokazano je da je SOX2 neophodan za proliferaciju matičnih ćelija epiblasta (Avilion, 2003). Takođe, ovaj gen je neophodan i za proliferaciju neuralnih matičnih/prekursorskih ćelija mozga adultnog miša (Ferri, 2004). Naime, eksperimentalno je utvrđeno da je proliferacija prekursorskih ćelija u neurogenim regionima smanjena kod *Sox2* "knockout" miševa (Taranova, 2006). ChiP-ChiP eksperimenti sugerišu da SOX2, OCT4 i NANOG regulišu ekspresiju *CDC7* gena (Boyer, 2005). Ovaj gen kodira protein kinazu za koju je pokazano da je neophodna za progresiju tokom S faze ćelijskog ciklusa (Boyer, 2005). Takođe, SOX2 i NANOG regulišu ekspresiju CDC2-CDK1 protein kinaze, koja je neophodna za tranziciju iz G1 u S i G2 u M fazu ćelijskog ciklusa (Boyer, 2005). Ciljni gen SOX2 transkripcionog faktora je i *Ciklin D1* koji je važan regulator tranzicije iz G1 u S fazu ćelijskog ciklusa (Boyer, 2005).

Podaci iz literature ukazuju da se SOX2 i OCT4 vezuju za promotorski region mir-302, klastera od 8 mikroRNK koje se eksprimirane u EM ćelijama, i aktiviraju ekspresiju mir-302 klastera (Card, 2008). miR-302a reprimira translaciju *Ciklin D1* iRNK i na taj način promoviše smanjenje broja ćelija u G1 fazi i povećava broj ćelija u S fazi ćelijskog ciklusa (Card, 2008).

U slušnom nervu nakon ozlede (Lang, 2011) i respiratornim epitelijalnim ćelijama (Tompkins, 2011) povećanje *SOX2* ekspresije je povezano sa povećanjem proliferacije ćelija. Pored toga, Taranova i saradnici su pokazali da progenitorske ćelije retine sa kondicionalno deletiranim *Sox2* genom gube sposobnost proliferacije (Taranova, 2006). Nasuprot ovome, u epitelijanim ćelijskim linijama želuca, egzogena ekspresija *SOX2* gena inhibira ćelijsku proliferaciju (Otsubo, 2008). Zatim, kod neuralnih matičnih/progenitorskih ćelija miša, koje vode poreklo od reaktivnih astrocita izolovanih iz zone moždanog udara, povećana ekspresija *Sox2* gena ne utiče na proliferaciju ćelija (Quinlan, 2011).

Podaci iz literature ukazuju da u ćelijama kancera dojke povećana ekspresija *SOX2* gena promoviše proliferaciju ćelija transkripciono regulišući *ciklinD1* gen (Chen,

2008). Naime, SOX2 se specifično vezuje za *SOX* vezujuće mesto u promotoru *ciklinD1* gena i aktivira njegovu transkripciju (Chen, 2008). Nasuprot ovome, u kancerima želuca egzogena ekspresija *SOX2* gena reprimira ekspresiju *Cyclin-D1* gena, a samim tim i proliferaciju (Otsubo, 2008).

1.5.3. Modulacija *Sox2* ekspresije

U cilju razjašnjavanja mehanizama koji kontrolišu pluripotentnost/samobnavljane matičnih ćelija i diferencijaciju ćelija, nekoliko studija je bilo fokusirano na proučavanje efekata modulacije *Sox2* ekspresije.

Pokazano je da *Sox2* "knockdown" malim interferišućim RNK indukuje diferencijaciju EM ćelija u trofektoderm. Naime, EM ćelija miša transfektovane sa ovim RNK su se razlikovale po morfologiju (veće ćelije) u poređenju sa netransfektovanim ćelijama i eksprimirale su markere karakteristične za trofektoderm (Li, 2007). Pored toga, kod transfektovanih EM ćelija detektovana je i poliploidija (Li, 2007). Isti efekat je primećen i pri korišćenju dominantno-negativne forme SOX2 (Li, 2007). Naime, uvođenje mutacija u sekvence NLS-a *Sox2* gena miša rezultuje formiranjem dominantno negativnog mutanta SOX2 koji je izgubio sposobnost da interaguje sa OCT4 i koji inhibira aktivnost *wt* SOX2 (Li, 2007). Pokazano je da stabilna ekspresija ovog mutanta u EM ćelijama indukuje diferencijaciju u trofektoderm i poliploidiju (Li, 2007). Zatim, Masui i saradnici su pokazali da *Sox2* "null" EM ćelije miša se diferenciraju u ćelije koje podsećaju na ćelije trofektoderma (Masui, 2007). Takođe, smanjenje ekspresije *SOX2* gena u EM ćelijama čoveka indukuje diferencijaciju u trofektoderm i delimično u endoderm (Adachi, 2010). Pokazano je i da *Sox2*-deficijentne neuralne matične ćelije ostaju multipotentne, najverovatnije kao rezultat ekspresije *Sox3* gena, ali je kapacitet za generisanje neurona redukovan (Miyagi, 2008). Eksperimenti kod embriona pileta su pokazali da dominantno negativna forma SOX2 proteina (HMG boks SOX2 fuzionisan sa represornim domenom "Engrailed" proteina *D. melanogaster*) izaziva prevremenu diferencijaciju proliferišućih, multipotentnih neuralnih prekursora (Bylund, 2003).

U poslednjih nekoliko godina nekoliko studija je bilo fokusirano na praćenje efekta povećane ekspresije *SOX2/Sox2* gena u EM i EK ćelijama (Mitsui, 2003; Zhao,

2004; Boer, 2007; Kopp, 2008; Adachi, 2010). Podaci iz literature ukazuju da povećana ekspresija *Sox2* gena u EM ćelijama miša indukuje masovnu ćelijsku smrt, neuronalnu diferencijaciju ili diferencijaciju u širok spektar ćelijskih tipova (Mitsui, 2003; Zhao, 2004; Kopp, 2008). Naime, Mitsui i saradnici nisu uspjeli da generišu EM ćelije koje konstitutivno eksprimiraju *Sox2*, zbog masovne smrti ćelija (Mitsui, 2003). S druge strane, Zhao i saradnici su detektovali da forsirana ekspresija *Sox2* gena u EM ćelijama miša ne menja nediferencirani, samo-obnavljajući fenotip ovih ćelija (Zhao, 2004). Međutim, nakon tri dana *in vitro* diferencijacije, ovi autori su uočili preko 90% neuralnih progenitora kod EM ćelija sa povećanom ekspresijom *Sox2* gena, u poređenju sa izvornim ćelijama kod kojih je detektovano manje od 20% neuronalnih progenitora (Zhao, 2004). Ovi rezultati ukazuju da tokom diferencijacije ćelija, povećana ekspresija *Sox2* gena stimuliše diferencijaciju u neuroektoderm (Zhao, 2004). Za razliku od ovih autora, Kopp i saradnici su pokazali da malo povećanje ekspresije *Sox2* gena (povećanje od oko 2 puta iznad endogenog nivoa) redukuje samo-obnavljanje ćelija i promoviše diferencijaciju EM ćelija miša u ćelije koje eksprimiraju markere povezane sa širokim spektrom diferenciranih tipova ćelija, uključujući neuroektoderm, mezoderm i trofoektoderm, ali ne i endoderm (Kopp, 2008). Takođe, ovi autori smatraju da su visoke koncentracije SOX2 veoma toksične za EM ćelije miša, dok mala povećanja indukuju diferencijaciju ćelija sa favorizovanjem diferencijacije ka neuroektodermu (Kopp, 2008). Zatim, pokazano je da u EM ćelijama čoveka povećana ekspresija *SOX2* gena indukuje diferencijaciju u trofoektoderm (Adachi, 2010). Kod EK ćelija (F9 ćelije) tranzijentno povećanje *Sox2* ekspresije redukuje endogenu ekspresiju *Sox2*, *Oct3/4*, *Nanog*, *Fgf-4* i *Utf1* gena (Boer, 2007).

Forsirana ekspresija *Sox2* gena u toku formiranja nervne kreste pileta dovodi do ekspanzije neuroektoderma i gubitka neuralne kreste (Wakamatsu, 2004).

Graham i saradnici su pokazali da konstitutivna ekspresija *Sox2* gena ima za rezultat održavanje stanja neuralnih matičnih/progenitorskih ćelija i blokiranje neuronalne diferencijacije (Graham, 2003).

Kod *Xenopus*-a mikroinjeciranje dominantno - negativnih formi *Sox2* iRNK inhibira neuralnu diferencijaciju (Kishi, 2000). Zatim, gubitak *Sox2* ekspresije u retini miša prouzrokuje gubitak proliferativne sposobnosti i kapaciteta diferencijacije neuralnih

progenitora retine (Miyagi, 2009), dok forsirana *Sox2* ekspresija indukuje diferencijaciju progenitorskih ćelija retine miša u amakrine ćelije (Lin, 2009).

1.5.4. *SOX2* i matične ćelije

Podaci iz literature ukazuju da je *SOX2* gen eksprimiran u totipotentnim, pluripotentnim i multipotentnim matičnim ćelijama (Avilion, 2003; Ellis, 2004; Chew, 2005; Wu, 2011). Naime, ekspresija *SOX2* gena je detektovana u embrionu na stadijumu četiri blastomere, zatim u EM ćelijama, matičnim ćelijama epiblasta i germinativnim ćelijama (Avilion, 2003; Chew, 2005; Wu, 2011). Tokom razvića ekspresija ovog gena postaje ograničena na multipotentne neuralne matične ćelije (Ellis, 2004). Ove ćelije su detektovane tokom razvića CNS, kao i u određenim regionima mozga kod odraslih jedinki (Ellis, 2004). Pokazano je da je *SOX2* neophodan za samo-obnavljanje i pluripotentnosti EM ćelija (Rizzino, 2009).

1.5.5. *SOX2* i indukovane pluripotentne matične (iPS) ćelije

SOX2, u kombinaciji sa drugim transkripcionim faktorima, može ponovo da uspostavi pluripotentnost terminalno diferenciranih ćelija reprogramirajući ih do iPS ćelija (Takahashi i Yamanaka, 2006).

iPS ćelije su generisane reprogramiranjem somatskih ćelija do pluripotentnog stanja forsiranom ekspresijom nekoliko embrionalnih transkripcionih faktora (Takahashi i Yamanaka, 2006; Stadtfeld i Hochedlinger, 2010). Ove ćelije su prvi put generisane od embrionalnih i adultnih fibroblasta miša retrovirusnom transdukcijom četiri transkripciona faktora Oct3/4, Sox2, Klf4 i c-Myc (Takahashi i Yamanaka, 2006). Zatim, iPS ćelije su generisane i od adultnih humanih fibroblasta kože (Takahashi, 2007). Humane iPS ćelije su slične humanim EM ćelijama po morfologiji, proliferativnoj sposobnosti, ekspresiji površinskih antigena, ekspresiji gena, epigenetičkom statusu gena markera pluripotentnosti i telomeraznoj aktivnosti (Takahashi, 2007). Pored toga ove iPS ćelije mogu da formiraju teratome i da se *in vitro* diferenciraju u ćelije koje vode poreklo od sva tri klicina lista (Takahashi, 2007). Podaci iz literature ukazuju da iPS ćelije

(primenom Oct3/4, Sox2, Klf4 i c-Myc) mogu biti generisane i od keratinocita (Aasen, 2008; Maherali, 2008), neuralnih ćelija (Eminli, 2008; Kim, 2008), ćelija stomaka i jetre (Aoi, 2008), melanocita (Utikal, 2009), β ćelija pankreasa (Stadtfeld, 2008) i terminalno diferenciranih limfocita (Hanna, 2007; Eminli, 2008).

Generisanje iPS ćelija je otvorilo mogućnost uspostavljanja pacijent- i bolest-specifičnih pluripotentnih matičnih ćelija (Hanna, 2007; Wernig, 2008). Pacijent-specifične iPS ćelije predstavljaju izvor autolognih ćelija i korišćenjem ovih ćelija rešava se problem odbacivanja transplantata (Durnaoglu, 2011). Pre potencijalnog korišćenje ovih ćelija za transplantaciju neophodna je genetička korekcija iPS ćelija generisanih od pacijenata sa neurogenetičkim oboljenjima (Durnaoglu, 2011). Zatim, bolest-specifične iPS ćelije predstavljaju značajan model sistem za proučavanje neurogenetičkih i neurodegenerativnih oboljenja; ove ćelije omogućavaju pretraživanje gena i lekova koji modifikuju proces oboljenja (Durnaoglu, 2011). Terapeutski potencijal iPS ćelija je demonstriran na animalnim modelima anemije srpastih ćelija i Parkinsonove bolesti (Hanna, 2007; Wernig, 2008).

Kako retrovirusnom transdukcijom generisane iPS ćelije sadrže brojne integracije viralnog vektora, što ih čini nepogodnim za kliničku primenu, stabilne iPS ćelije su generisane i direktnim ubacivanjem u ćeliju četiri "reprogramming proteina" (OCT4, SOX2, KLF4 i c-MYC) fuzionisana sa CPP (eng. "cell - penetrating peptide") (Kim, 2009).

1.5.6. *SOX2* i NT2/D1 ćelije

SOX2 gen je visoko eksprimiran u nediferenciranim NT2/D1 ćelijama (Lei, 2005). Transkript ovog gena je takođe prisutan i u astrocitima, ali ne i u neuronima koji vode poreklo od NT2/D1 ćelija (Lei, 2005). Nivo ekspresije *SOX2* gena postepeno se smanjuje tokom četiri nedelje tretmana RK na manje od 40% vrednosti detektovane kod nediferenciranih ćelija (Lei, 2005). Lei i saradnici smatraju da ovaj nivo ekspresije najverovatnije reflektuje nivo *SOX2* ekspresije u astrocitima, jer NT2/D1 ćelije RK tretirane četiri nedelje predstavljaju mešanu populaciju neurona i astrocita (Sandhu, 2002). Pored toga, ovi autori pri kultivisanju neurona nisu detekovali ekspresiju *SOX2*

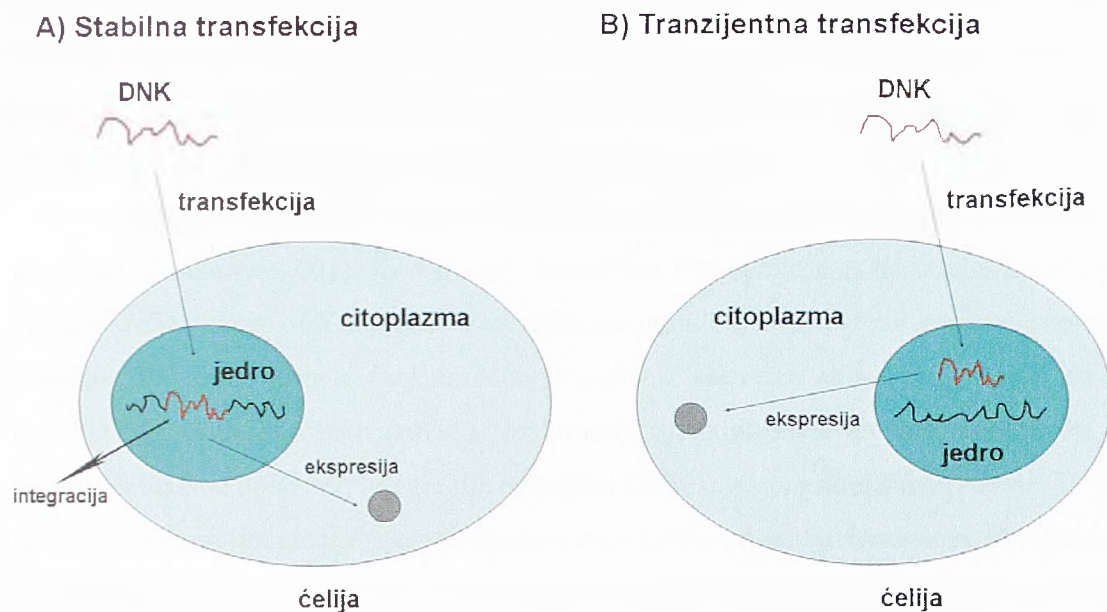
gena iznad nivoa od 0,5% u poređenju sa nivoom ekspresije *SOX2* gena kod nediferenciranih ćelija (Lei, 2005).

1.6. Transfekcije

Uvođenje strane nukleinske kiseline u eukariotske ćelije, u cilju generisanja genetički modifikovanih ćelija, označava se kao transfekcija (Kim i Eberwine, 2010; Stuchbury i Munch, 2010). Ova tehnika je široko primenjena u molekularnoj biologiji i biologiji ćelije (Stuchbury i Munch, 2010). Osnovna namena transfekcija je proučavanje funkcije gena ili genskih produkata preko povećanja ili smanjenja ekspresije gena od interesa, kao i proizvodnja rekombinantnog proteina u ćelijima sisara (Wurm, 2004). Takođe, ova tehnika omogućava i proučavanje transkripcione regulacije i funkcije gena od interesa (Kim i Eberwine, 2010).

Idealan metod bi trebalo da omogućava visoku efikasnost transfekcije, nisku toksičnost za ćelije, da izaziva minimalne efekte na normalne fiziološke procese u ćeliji i da bude jednostavan za primenu i reproducibilan (Kim i Eberwine, 2010). Postoji nekoliko metoda transfekcija koji se mogu podeliti na biološke (posredovane virusom-transdukcija), hemijske (katjonski polimeri, kalcijum fosfat, katjonski lipidi) i fizičke (direktno injiciranje, elektroporacija, zračenje laserom, sonoporacija, magnetske nanopartikule) (Kim i Eberwine, 2010), a izbor metoda zavisi od tipa ćelija i namene (Kim i Eberwine, 2010). Na efikasnost transfekcije, pored metoda, utiče i DNK topologija (cirkularna ili linearizovana), gustina ćelija, sastav medijuma i vreme inkubacije. Pokazano je da linearizacija vektora povećava efikasnost transfekcija (Stuchbury i Munch, 2010). Mada gustina ćelija zavisi od tipa ćelija kao i metoda transfekcije, generalno ćelije na dan transfekcije obično postižu 50-80% konfluentnosti. Sastav medijuma zavisi od metoda transfekcije i odnosi se na prisustvo ili odsustvo seruma iz medijuma, dok vreme inkubacije zavisi od metoda transfekcije i tipa ćelija.

U zavisnosti od toga da li se gen od interesa ugrađuje u genom domaćina razlikuju se dva tipa transfekcija: tranzijentna i stabilna transfekcija (Slika 8) (Kim i Eberwine, 2010; Stuchbury i Munch, 2010).



Slika 8. **Stabilna i tranzijentna transfekcija.** A) strana DNK se ugrađuje u genom domaćina i replikuje zajedno sa DNK domaćina; B) strana DNK se ne ugrađuje u genom domaćina (preuzeto od (Kim i Eberwine, 2010)).

1.6.1. Tranzijentna transfekcija

Kod tranzijentne transfekcije gen od interesa se ne ugrađuje u genom domaćina i ne replikuje, što uslovljava da se tranzijentno transfektovani materijal gubi tokom vremena usled degradacije enzimima ćelije domaćina i deoba ćelija (Slika 8) (Kim i Eberwine, 2010; Stuchbury i Munch, 2010). Ovaj tip transfekcija predstavlja veoma korisno oruđe ukoliko nije neophodno da se funkcija gena od interesa analizira u dužem vremenskom intervalu (efekat transfekcija je vidljiv od 12 do 72h nakon transfekcija) (Colosimo, 2000; Kim i Eberwine, 2010; Stuchbury i Munch, 2010).

1.6.2. Stabilna transfekcija

Stabilna transfekcija podrazumeva da se gen od interesa ugradi u genom domaćina, odnosno egzogena DNK postaje sastavni deo hromozomalne DNK i replikuje se zajedno sa njom (Slika 8) (Glover, 2005; Kim i Eberwine, 2010; Stuchbury i Munch,

2010). Na efikasnost stabilne transfekcije utiču dva faktora: metoda transfekcije i vektor koji sadrži gen od interesa (www.lonzabio.com). Od tipa vektora zavisi mehanizam integracije, regulacija ekspresije gena od interesa i uslovi za selekciju ćelija koje stabilno ekspimiraju gen od interesa (www.lonzabio.com).

Integracija transgena u genom domaćina može da bude nasumična ili mesto-specifična (Arakawa, 2001). Kod mesto- specifične integracije gen od interesa, oivičen tzv. "lox" (eng. "locus of X-ing over") mestima, se ugrađuje na određeno mesto u genomu domaćina. Pokazano je da se funkcionalne "lox slične" sekvence nalaze i u genomu sisara (Ito, 2011). Rekombinacijom između "lox" mesta prisutnih na vektoru i "lox" mesta u genomu domaćina dolazi do integracije egzogene DNK u genom domaćina (Albert, 1995; Ito, 2011). Nakon integracije, ekspresija gena od interesa zavisi od promotora, kloniranog u vektor uzvodno od gena od interesa, i od mesta integracije gena od interesa (www.lonzabio.com). Izbor promotora zavisi od tipa ćelija (Liew, 2007). Nasumična integracija u genom domaćina može da dovede do integracije transgena u neaktivan heterohromatin što onemogućava ekspresiju gena od interesa (Stewart, 2008). Ćelije koje su stabilno transfektovane u kulturi mogu biti selektovane uz pomoć marker gena, kloniranog unutar vektora korišćenog za transfekciju (Kim i Eberwine, 2010). Marker gen omogućava selekciju stabilno transfektovanih ćelija stvaranjem rezistencije na agens koji netransfektovane ćelije ne mogu metabolisati.

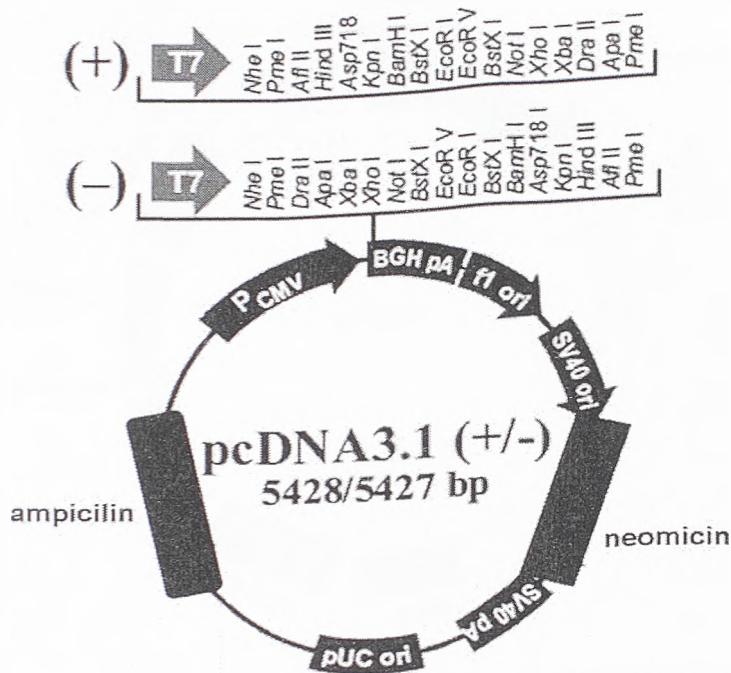
1.7. Ekspresioni vektori kod sisara

Transfer gena od interesa u eukariotsku ćeliju omogućava proučavanje njegove funkcije (Colosimo, 2000). Ekspresioni vektori omogućavaju uvođenje specifičnog gena u eukariotsku ćeliju, transkripciju gena od interesa i proizvodnju proteina (Colosimo, 2000). Njihovom primenom omogućena je sinteza veće količine ovog proteina, promena fenotipa ćelije kao rezultat ekspresije transgena i analiza efekta specifičnih mutacija gena na ćelijskih metabolizam (Colosimo, 2000). U zavisnosti od tipa promotora/enhensera, željenog nivo ekspresije gena od interesa i od tipa transfekcija (stabilna ili tranzijentna) vrši se odabir ekspresionog vektora (Colosimo, 2000). Ekspresioni vektori se dele na virusne i plazmidne (Colosimo, 2000). Virusni vektori su neaktivni virusi u koje je

kloniran gen od interesa, dok plazmidni vektori sadrže prokariotske, eukariotske i virusne sekvence (Colosimo, 2000). Prokariotski elementi plazmidnih vektora olakšavaju propagaciju u bakterijama i održavanje vektora, dok eukariotski i virusni elementi sadrže elemente neophodne za transkripciju i gen za selekciju stabilno transfektovanih ćelija (Colosimo, 2000).

1.7.1. pcDNA3.1 ekspresioni vektor

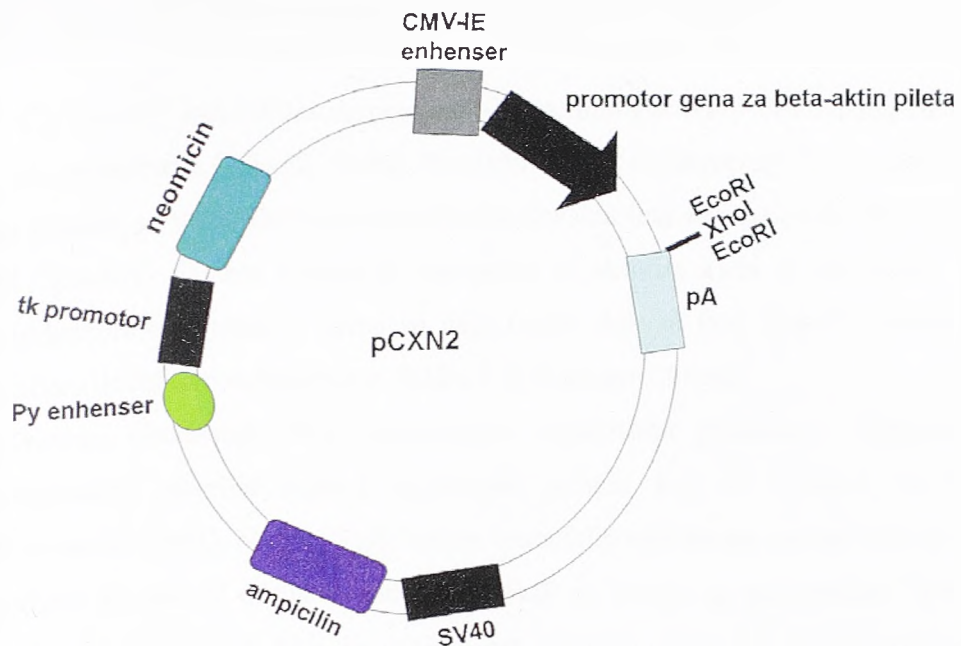
pcDNA3.1 ekspresioni vektor se veoma često koristi za ekspresiju heterolognog gena kod različitih ćelija sisara (Kim, 2002). Pogodan je i za tranzijentnu i za stabilnu transfekciju (www.invitrogen.com). Ovaj ekspresioni vektor sadrži: promotor poreklom od humanog citomegalovirusa (CMV) koji je fuzionisan sa enhenserom ranog gena ovog virusa, polilinkersko mesto (mesto insercije gena od interesa u vektor - eng. "multiple cloning site") i gen za rezistenciju na neomicin (www.invitrogen.com) (Slika 9).



Slika 9. Mapa pcDNA3.1 ekspresionog vektora. Pcmv- promotor; BGH pA- sekvenca za poliadenilaciju gena koji kodira hormona rasta goveda; SV40 ori- promotor poreklom od DNK SV40 virusa i njegov "origin" replikacije; neomicin- gen za neomicinsku rezistenciju; SV40 pA- sekvenca za poliadenilaciju poreklom od SV40 virusa; ampicilin- gen za rezistenciju na ampicilin (preuzeto sa www.invitrogen.com).

1.7.2. pCXN2 ekspresioni vektor

pCXN2 ekspresioni vektor je generisan od strane Niwa-e i saradnika (Slika 10) (Niwa, 1991). Vektor poseduje snažan promotor, označen kao CAG promotor, koji sadrži CMV-IE enhenser sekvencu (enhenser ranog gena CMV virusa) uz promotor gena za β -aktin pileta (Fregien i Davidson, 1986; Miyazaki, 1989). Pored snažnog promotora, vektor sadrži i selektivni marker - gen za neomicinsku rezistenciju sa spontanom mutacijom u kodirajućem regionu što za posledicu ima smanjenje rezistencije ćelija domaćina na G418 (Yenofsky, 1990). Takođe, gen za neomicinsku rezistenciju je pod kontrolom slabog promotora gena za timidin kinazu Herpes simplex virusa (Niwa, 1991). Ove osobine pCXN2 vektora omogućavaju da samo transfektanti koji su ugradili veći broj kopija prežive selekciju u prisustvu visokih koncentracija G418.



Slika 10. pCXN2 ekspresioni vektor. pA- sekvenca za poliadenilaciju gena koji kodira beta- globin zeca; SV40- promotor poreklom od DNK SV40 virusa; neomicin- gen za neomicinsku rezistenciju sa mutacijom; ampicilin- gen za rezistenciju na ampicilin; tk promotor- promotor gena za timidin kinazu Herpes simplex virusa; Py enhenser- enhenser poreklom od DNK polioma virusa (preuzeto od (Niwa, 1991; Xu, 1998)).

1.7.3. Inducibilni ekspresioni sistemi

Inducibilni ekspresioni sistemi omogućavaju kontrolu ekspresije gena od interesa u ćelijama sisara. Pored toga, ekspresija gena od interesa primenom ovih sistema može da bude aktivirana ili utišana u zavisnosti od potrebe istraživanja (Mills, 2001). Kod ovih sistema aktivacija gena od interesa zavisi od prisustva tzv. induktora. Induktori koji su do sada korišćeni za regulaciju ekspresije gena od interesa su joni teških metala, temperaturni šok, antibiotici, steroidni hormoni i IPTG (izopropil beta-D-tiogalaktozid) (Mills, 2001). Do sada je opisano nekoliko inducibilnih sistema, koji su klasifikovani u zavisnosti od tipa induktora korišćenog za regulaciju ekspresionog sistema (Mills, 2001).

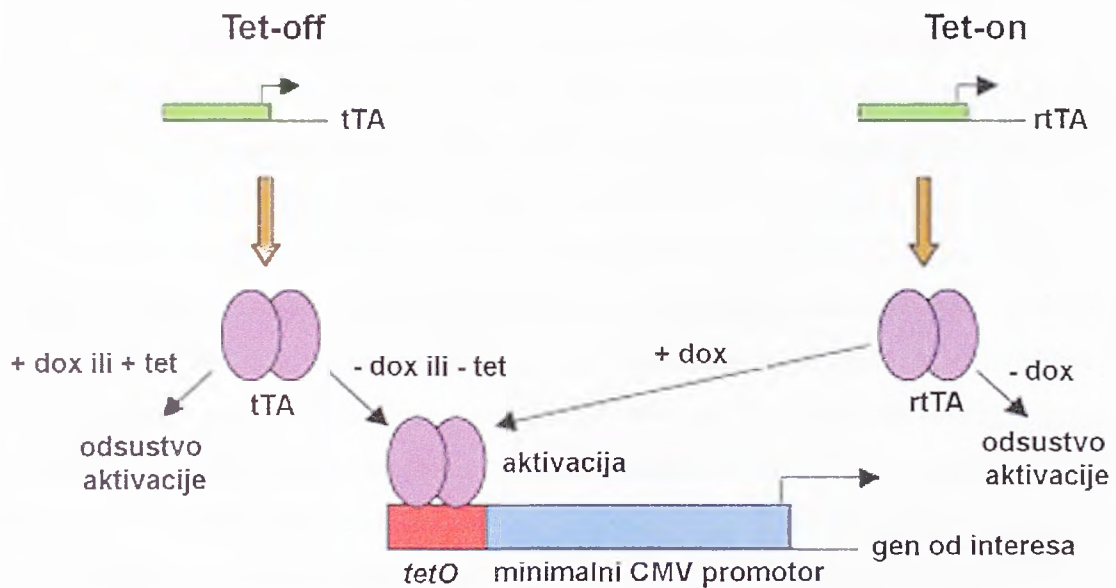
1.7.3.1. "Tet-On/Tet-Off" sistemi (tetraciklin-inducibilni ekspresioni sistemi)

"Tet-On/Tet-Off" inducibilni ekspresioni sistemi omogućavaju striktnu regulaciju ekspresije gena od interesa (Adachi, 2006). Precizna regulacija ekspresije transgena kod ovih sistema postiže se različitim koncentracijama doksiciklina i tetraciklina (Romano, 2004)). Kod "Tet-Off" sistema ekspresija transgena se aktivira kada se tetraciklin ili doksiciklin uklone iz medijuma u kome se gaje ćelije, dok se kod "Tet-On" sistema ekspresija aktivira dodatkom doksiciklina (Slika 11) (Romano, 2004).

Ovi sistemi obuhvataju dve komponente: regulatorni plazmid i "response" plazmid. Regulatorni plazmid kodira regulatorni protein koji se zasniva na Tet represornom proteinu (TetR). Naime, TetR kodira tetraciklin rezistentni operon lociran na Tn10 transpozonu *E. coli*. U odsustvu induktora, TetR se vezuje za tet operator (*tetO*), reprimira aktivnost promotora koji je lociran uz operator i na taj način sprečava transkripciju gena tetraciklin-rezistentnog operona (Nguyen, 1989). Kod "Tet-Off" sistema regulatorni protein predstavlja fuziju prvih 207 amino kiselina TetR za koje je na C-terminalnom kraju vezano 127 amino kiselina VP16 aktivacionog domena Herpes simplex virusa (Triezenberg, 1988). Na ovaj način TetR od transkripcionog represora postaje transkripcioni aktivator i ovaj hibridni protein je označen kao tetraciklinom kontrolisani transaktivator (tTA). tTA je kodiran od strane "Tet-Off" regulatornog plazmida. Kod "Tet-On" sistema regulatorni protein se zasniva na tzv. reverznom TetR (rTetR) i generisan je zamenom 4 amino kiseline kod TetR (Hillen i Berens, 1994; Gossen, 1995). Rezultujući protein, označen kao rTA je kodiran od strane "Tet-On" regulatornog plazmida. Oba regulatorna plazmida sadrže i gen za rezistenciju na antibiotik što omogućava selekciju stabilno transfektovanih ćelija.

"Response" plazmid eksprimira gen od interesa pod kontrolom TRE (eng. "tetracycline-response element"). Postoje dva tipa ovog vektora: pTRE i pTRE-Tight. pTRE vektor sadrži TRE koji se sastoji od 7 direktnih ponovaka od 42 bp koji sadrže *tetO* lociran uzvodno od minimalnog CMV promotora. Odsustvo snažnih enhenserskih elemenata uz CMV promotor omogućava veoma nisku bazalnu ekspresiju gena od interesa u odsustvu vezivanja tTA ili rTA. pTRE-Tight sadrži modifikovani TRE uzvodno od izmenjenog minimalnog CMV promotora. Modifikacija TRE dodatno

redukuje bazalnu ekspresiju u odsustvu vezivanja tTA ili rtTA. Gen od interesa se eksprimira nakon vezivanja regulatornih proteina za TRE. Kod "Tet-Off" sistema tTA se vezuje za TRE i aktivira transkripciju u odsustvu tetraciklina ili doksiciklina. Kod "Tet-On" sistema rtTA se vezuje za TRE i aktivira transkripciju u prisustvu doksiciklina (Slika 11) (Romano, 2004).



Slika 11. "Tet-On" i "Tet-Off" inducibilni ekspresioni sistemi. Kod "Tet-Off" sistema ekspresija gena od interesa se aktivira u odsustvu tetraciklina ili doksiciklina, dok se kod "Tet-On" sistema ekspresija aktivira dodatkom doksiciklina. tTA- tetraciklinom kontrolisani transaktivator; rtTA- reverzni tTA; dox- doksiciklin; tet- tetraciklin; CMV-promotor poreklom od citomegalovirusa; *tetO*- tet operator (preuzeto od (Romano, 2004)).

2. CILJ RADA

Prethodna istraživanja su ukazala na značaj SOX2 transkripcionog faktora tokom embriogeneze kičmenjaka (Rizzino, 2008). Ovaj transkripcioni faktor predstavlja univerzalni marker pluripotentnih matičnih ćelija koji reguliše održavanje pluripotentnosti i diferencijaciju ovih ćelija (Graham, 2003). Takođe, podaci iz literature ukazuju da je SOX2 jedan od ključnih regulatora neuralne diferencijacije, kao i da ovaj transkripcioni faktor u različitim ćelijama promoviše ili reprimira ćelijsku proliferaciju (Bylund, 2003; Graham, 2003; Otsubo, 2008; Lang, 2011; Tompkins, 2011). NT2/D1, pluripotentna embrionalna karcinomska ćelijska linija, ispoljava osobine slične osobinama EM ćelija ili veoma ranih neuroepitelijalnih progenitora (Coyle, 2011). Ova ćelijska linija je značajan *in vitro* model sistem za proučavanje faktora koji otpočinju i regulišu neuralnu diferencijaciju jer u prisustvu retinoične kiseline se diferencira u različite tipove ćelija, uključujući i neurone (Pleasure, 1992; Cheung, 1999). Neuroni poreklom od ovih ćelija su korišćeni za transplantacionu terapiju kod povreda mozga, ishemije i neurodegenerativnih bolesti kod laboratorijskih životinja, kao i kod pacijenta sa moždanim udarom (Pleasure, 1992; Younkin, 1993; Hardy, 1994; Squires, 1996; Borlongan, 1998; Hartley, 1999; Guillemain, 2000; Bliss, 2006; Hara, 2008).

Sva dosadašnja saznanja, ukazuju na veliki značaj proučavanja efekta povećane ekspresije *SOX2* gena na održavanje pluripotentnosti, proliferaciju i neuralnu diferencijaciju NT2/D1 ćelija.

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

1. Analiza ekspresije SOX2 proteina tokom neuralne diferencijacije NT2/D1 ćelija
2. Generisanje i karakterizacija NT2/D1 ćelijskih klonova sa povećanom ekspresijom *SOX2* gena primenom različitih ekspresionih sistema
3. Ispitivanje efekta povećane ekspresije *SOX2* gena na sopstvenu ekspresiju, kao i na ekspresiju *OCT4* i *NANOG* gena u NT2/D1 ćelijskim klonovima
4. Ispitivanje proliferativnog kapaciteta NT2/D1 ćelijskih klonova sa povećanom ekspresijom *SOX2* gena
5. Ispitivanje uticaja povećane ekspresije *SOX2* gena na sposobnost NT2/D1 ćelijskih klonova da uđu u program neuralne diferencijacije pod dejstvom retinoične kiseline

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Eksperimentalni materijal

3.1.1. Bakterijski soj korišćen u radu

Soj	Karakteristike -genotip	Referenca
XL1Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F' <i>proAB lacI</i> ^q ZDM15 Tn10 (Tet ^r)]	Stratagene®

3.1.2. Vektori korišćeni u radu

Plazmid	Veličina	Karakteristike	Referenca
pcDNA3.1	5,42 kb	ekspresioni vektor za stabilne i tranzijentne ekspresije u ćelijama sisara; poseduje promotor poreklom od citomegalovirusa i gen za neomicinsku rezistenciju	Invitrogen
pCXN2	4,79 kb	ekspresioni vektor za stabilne i tranzijentne ekspresije u ćelijama sisara; poseduje CAG promotor (sadrži CMV-IE enhenser sekvencu uz promotor gena za β-aktin pileta) i gen za neomicinsku rezistenciju	(Niwa, 1991)
pTRE-Luc	5,2 kb	vektor koji eksprimira gen za luciferazu svica pod kontrolom minimalnog CMV promotora uz koji se uzvodno nalazi TRE (Tet-responsive element)	Clontech Laboratories
pRL-SV40	3,7 kb	interni kontrolni reporter koji kodira "Renilla" luciferazu koja je originalno klonirana iz morskog organizma <i>Renilla reniformis</i>	Promega

3.1.3. Plazmidni konstrukti korišćeni u radu

Konstrukt	Veličina	Karakteristike	Referenca
FbCl2	4,16 kb	sadrži kompletan kodirajući region humanog <i>SOX2</i> gena kloniran u pBSKS+ vektor	(Stevanovic, 1994)
<i>SOX2</i> /pcDNA3.1	6,62 kb	sadrži kompletan kodirajući region humanog <i>SOX2</i> gena kloniran u pcDNA3.1 vektor	ovaj rad
<i>SOX2</i> /pCXN2	6 kb	sadrži kompletan kodirajući region humanog <i>SOX2</i> gena kloniran u pCXN2 vektor	ovaj rad
pCAG-rtTAon-Hyg	8,4 kb	regulatorni plazmid "Tet-On" sistema koji kodira regulatorni protein	(Adachi, 2010)
pTRE-SOX2-neo	4,93 kb	sadrži kompletan kodirajući region humanog <i>SOX2</i> gena kloniran u pTRE-tight-neo vektor	(Adachi, 2010)
FbCl2 EPS	3,51 kb	sadrži 3' deo kodirajućeg regiona humanog <i>SOX2</i> gena bez HMG boksa	(Stevanovic, 1994)

3.1.4. NT2/D1 ćelijska linija

U ovom radu je korišćena komercijalno dostupna permanentna ćelijska linija NT2/D1 poreklom iz humanog embrionalnog teratokarcinoma (American Type Culture collection, Manassas, VA 20108, USA - ATCC br. CRL-1973) (Andrews, 1984a; Andrews, 1984b; Andrews, 1988). NT2/D1 ćelije su gajene u standardnim uslovima, u DMEM-u sa visokim sadržajem glukoze, 10% FBS-a i 2mM L-glutaminom (Gibco BRL) na 37°C i 10% CO₂ (Andrews, 1984b). Za analizu retinoičnom kiselinom inicirane neuralne diferencijacije, NT2/D1 ćelije su tretirane 10 μM all-*trans* retinoičnom kiselinom (Sigma) (Andrews, 1984a), a efekat tretmana je praćen tokom tri nedelje.

3.1.5. Antitela korišćena u radu

U "Western blot" eksperimentima korišćena su sledeća antitela: anti- SOX2 antitelo zeca (Abcam, ab15830), anti- α -tubulin antitelo miša (Calbiochem, CP06), anti-SOX3 antitelo (Santa Cruz, H-135), kao i sekundarna antitela: ECLTM Anti-rabbit IgG konjugovano peroksidazom rena (Amersham) i Anti-mouse Ig konjugovano peroksidazom rena (Amersham).

3.1.6. Oligonukleotidi korišćeni u radu

Oligonukleotidi su u ovom radu korišćeni u PCR i semi-kvantitativnim RT-PCR reakcijama.

Naziv	Sekvenca
T7	5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG-3'
SOX2 R2	5'-GGG ACA TGA TCA GCA TGT ATC T-3'
BGH pA F	5'-CTA ATA AAA TGA GGA AAT TGC-3'
BGH pA R	5'-TCC GCC TCA GAA GCC ATA GA-3'
GAPDH F *	5'-GGA CCT GAC CTG CCG TCT AG-3'
GAPDH R*	5'-CCA CCA CCC TGT TGC TGT AG-3'
F643 SOX2	5'-ACC AGC TCG CAG ACC TAC AT-3'
SOX2 F695	5'-CCC CTG GCA TGG CTC TTG GC-3'
SOX2 R845	5'-TCG GCG CCG GGG AGA TAC AT-3'
GAPDH Man F	5'-GCC TCA AGA TCA TCA GCA ATG C-3'
GAPDH Man R	5'-CCA CGA TAC CAA AGT TGT CAT GG-3'
OCT4 F	5'-GCT TTG AGG CTC TGC AGC TT-3'
OCT4 R	5'-TCT CCA GGT TGC CTC TCA CT-3'
NANOG F	5'-GGT CCC GGT CAA GAA ACA GA-3'
NANOG R	5'-TCT GGA ACC AGG TCT TCA CC-3'
NESTIN F	5'-CCA GCT GCT ACT GGA TC-3'
NESTIN R	5'-AGC CAG AAG GCT CAG CA-3'

NEUROD1 F	5'-CCA AAA AGA AGA AGA TGA CTA AGG-3'
NEUROD1 R	5'-AGC TGT CCA TGG TAC CGT AA-3'
SYP F	5'-CTT CCT GAA CCT GGT GCT CT-3'
SYP R	5'-TAG CCT TGC TGC CCA TAG TC-3'
HYG F	5'-GCT CCA TAC AAG CCA ACC AC-3'
HYG R	5'-CGA AAA GTT CGA CAG CGT CTC-3'
SOX2 F10	5'-CCAAGACGCTCATGAAGAAGGATAAG-3'
qSOX2 R845	5'-TCGGCGCCGGGGAGATACAT-3'

* - oligonukleotidi korišćeni u RT-PCR reakciji opisanoj u Rezultatima poglavlje 4.2.6.2.1. U svim ostalim RT-PCR reakcijama za normalizaciju nivoa ekspresiju korišćeni su oligonukleotidi GAPDH Man F i GAPDH Man R.

3.1.7. Komercijalni kitovi

Za izolovanje FbCl2, FbCl2 EPS, pcDNA3.1+, SOX2/pcDNA3.1 antisens konstrukta i pCXN2 vektora korišćen je Wizard[®]Plus Minipreps DNA Purification Systems (Promega). Plazmidna DNK korišćena za potrebe tranzijentne i stabilne transfekcije je izolovana i prečišćena upotrebom "Endofree plasmid Maxi Kit"-a (Qiagen). Za eluciju digiriranih fragmenata iz gelova od agaroze korišćen je Qiaex II (Qiagen). Obeležavanje probe za "Southern" i "Northern blot" analizu urađeno je primenom "Mega Prime Labeling Kit"-a (Pharmacia). Totalna RNK za potrebe RT-PCR-a i PCR u realnom vremenu je izolovana TRI reagent[®]-om (Ambion). Prečišćavanje totalne RNK od ostataka genomske DNK radeno je "DNA-free[™] Kit"-om (Applied Biosystems-Ambion). RT-PCR reakcije su urađene uz pomoć "KAPA 2G Fast HotStart Ready mix" (KAPA Biosystems). Generisanje stabilnih luminiscetnih signala luciferaze svica i "*Renilla*" luciferaze odrađeno je reporterskim esejom (Dual-Luciferase Reporter Assay System- Promega).

3.2. Eksperimentalne metode

3.2.1. Metode subkloniranja fragmenata DNK u komercijalni vektor

3.2.1.1. Enzimaska reakcija isecanja DNK restrikcionim enzimima

Smeše za digestiju sastojale su se od DNK (konstrukt ili vektor - ~ 5µg), odgovarajućih komercijalnih pufera i restrikcionih enzima koji su dodati u koncentraciji 2U/µg DNK. Ukupna zapremina reakcione smeše iznosila je 50µl. Reakcije su trajale od 3-5h na 37°C.

3.2.1.2. Ligiranje fragmenata DNK

Ligacija je enzimaska reakcija u toku koje dolazi do povezivanja linearnih dvolančanih fragmenata DNK pomoću enzima ligaze. Reakciona smeša u zapremini od 10µl sastojala se od linearizovanog vektora i inserta (u molarnom odnosu 1:5), pufera za ligaciju i 4U ligaze. Svi sastojci su dodati na ledu i reakcija se odvijala preko noći na +16°C.

3.2.2. Elektroforeza DNK na gelu od agaroze

Elektroforeza je rađena na horizontalnim gelovima od agaroze. Kao pufer za elektroforezu i pripremanje gelova korišćen je 1xTAE (0.04M Tris-acetat, 0.002M EDTA pH 8.0). U gel i pufer je dodavan etidijum bromid (EtBr) u finalnoj koncentraciji 0.5µg/ml. Etidijum bromid je fluorescentna boja koja se interkalira u DNK molekule i predstavlja sredstvo za vizualizaciju DNK u gelu od agaroze. Korišćeni su gelovi različitih koncentracija agaroze (0.8, 1 i 2%) u zavisnosti od veličine molekula DNK koje je trebalo razdvojiti.

Uzorci za elektroforezu su nanošeni u rastvoru boje (0.05% Oranž G, 5mM EDTA, 50mM TrisHCl pH 7.5 i 7% glicerol) koja je pripremana kao 6x koncentrovana. Elektroforeza se odvijala pri jačini struje od 50mA i naponu od 100V. Posle elektroforeze gelovi su fotografisani na BioDoc Analyze (Biometra).

3.2.3. Elucija DNK iz gelova od agaroze

Za eluciju digiriranih fragmenata korišćen je komercijalni kit Qiaex II (Qiagen). Po završenoj elektroforezi, deo gela u kome se nalazi željeni fragment DNK je isečen, izmeren i tretiran po proceduri iz kita.

3.2.4. Metode rada sa bakterijama

3.2.4.1. Kultivisanje bakterija

E. coli bakterije su kultivisane u tečnom LB medijumu (1% tripton, 1% NaCl, 0.5% ekstrakt kvasca) ili na čvrstoj LB podlozi (1% tripton, 1% NaCl, 0.5% ekstrakt kvasca i 1.5% bacto-agar). Svi medijumi za kultivisanje su sterilisani autoklaviranjem.

Bakterije su kultivisane na 37°C. I u tečni i u čvrsti medijum dodavan je ampicilin u koncentraciji od 100 µg/ml, izuzev u slučaju gajenja bakterija koje sadrže pTRE-SOX2-neo gde je u medijum dodavan kanamicin u koncentraciji 50 µg/ml.

3.2.4.2. Pripremanje bakterija za elektro-transformaciju

Za elektroporaciju je veoma važno da ćelije budu rastvorene u rastvoru niske jonske jačine tj. u vodi jer soli prisutne u rastvoru povećavaju jačinu električnog polja, što je pogubno po ćelije.

1000 ml LB medijuma je inokulisan 1% inokulumom sveže prekonocne kulture XL1 blue bakterija. Zatim su bakterije gajene na 37°C uz mešanje do postizanja gustine od OD₆₀₀ 0.5-0.7. Rast bakterijske kulture zaustavljen je premešanjem na led i inkubiranjem na ledu u trajanju od 15-30 minuta. Od ovog momenta rad se odvijao na ledu, korišćenjem hladnih rastvora. Bakterije su centrifugirane 15 minuta na 5000 obr./min u hladnom GSA rotoru (Sorvall centrifuga). Nakon toga su bakterijski talozi resuspendovani u 1000 ml hladne vode i centrifugirani 15 minuta na 5000 obr./min u hladnom GSA rotoru (Sorvall centrifuga). Ovaj korak je ponovljen, ali sa 500 ml hladne vode. Zatim su bakterije resuspendovane u 20 ml 10% glicerola (hladnog) i

centrifugirane u hladnom SS34 rotoru 10 minuta na 7000 obr./min. Nakon toga su resuspendovane u 3 ml 10% glicerola i alikvotirane po 50 μ l na suvom ledu. Ovako pripremljene bakterije su čuvane na -70°C i tokom 6 meseci nisu gubile efikasnost transformacije.

3.2.4.3. Elektro-transformacija bakterija

Elektroporacija je veoma efikasan način transformisanja *E. coli*. Efikasnost transformacije ćelija zavisi od jačine polja (jačina polja = voltaža/razmak između elektroda) i trajanja pulsa (RC vremenska konstanta).

Bakterije, pripremljene za elektro-transformaciju, su odmrznute na sobnoj temperaturi, a zatim su prebacivane na led. U njih je zatim dodato 5 μ l ligacione smeše (prethodno precipitirane, 2x "oprane" 70% etanolom i resuspendovane u 10 μ l ddH₂O) i smeša je inkubirana 30 minuta na ledu. Smeša kompetentnih ćelija i DNK prebacivana je u hladne 0.2 cm kivete za elektroporaciju. Uslovi za elektroporaciju na "Gene pulser" aparatu su bili: 25 μ F, 200 Ω i 2.5kV. Po završenoj elektroporaciji u kivetu je dodavan 1ml LB medijuma. Da bi se bakterije oporavile inkubirane su 30 minuta sa mešanjem na 37°C. Zatim je deo transformisane smeše prebačen na selektivnu podlogu. Bakterije su inkubirane preko noći na 37°C.

3.2.5. Metode izolovanja plazmidne DNK

3.2.5.1. Izolovanje plazmidne DNK "Wizard" kitom

Za izolovanje FbCl2, FbCl2 EPS, pcDNA3.1+, SOX2/pcDNA3.1 antisens konstrukta i pCXN2 korišćen je Wizard[®]Plus Minipreps DNA Purification Systems (Promega). Sa čvrste selektivne podloge pojedinačna bakterijska kolonija je zasejana u 5ml tečnog selektivnog medijuma i inkubirana preko noći na 37°C uz mućkanje. U toku daljeg rada bakterije su tretirane po proceduru iz kita.

3.2.5.2. Izolovanje plazmidne DNK "Endofree plasmid Maxi Kit"-om

Plazmidna DNK, za potrebe tranzijentnih i stabilnih transfekcija, je izolovana i prečišćena upotrebom "Endofree plasmid Maxi Kit"-a (Qiagen). 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 za potrebe stabilne i tranzijentne transfekcije, bilo je neophodno da iz izolata budu uklonjeni bakterijski endotoksini. Endotoksini su lipopolisaharidne 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. Plazmidni izolati su čuvani na -20°C do primene u eksperimentima tranzijentne i stabilne transfekcije.

3.2.6. Testiranje NT2/D1 ćelija na rezistenciju na antibiotike

NT2/D1 ćelije gajene u standardnim uslovima (DMEM sa visokim sadržajem glukoze, 10% FBS, 2mM L-glutamin, 37°C, 10% CO₂) su zasejane u Petri šolje prečnika 10 cm da daju 25% konfluentnosti. Ćelijama testiranim na rezistenciju na G418 u medijum je dodat G418 u koncentracijama od 300 µg/ml, 400 µg/ml i 500 µg/ml, a testiranim na rezistenciju na higromicin B u medijum je dodan higromicin B u koncentracijama od 50 µg/ml, 100 µg/ml, 200 µg/ml i 250 µg/ml. Efekat antibiotika na rast ćelija je praćen tokom sedam dana.

3.2.7. Stabilna i tranzijentna transfekcija NT2/D1 ćelija kalcijum - fosfatnom precipitacijom

U eksperimentima stabilne transfekcije 1.5×10^6 ćelija je zasejavano u Petri šolje prečnika 10 cm, dok je u eksperimentima tranzijentne transfekcije 3×10^5 ćelija zasejano u bunarčić mikrotitar ploče sa 6 otvora. Nakon 24 h rasta, ćelije su oprane dva puta HEPES (6.7 mM KCl, 142 mM NaCl, 10mM HEPES) rastvorom i gajene još 2h u svežem medijumu.

Po isteku ovog vremena na ćelije je dodat kalcijum-fosfatni precipitat DNK koji je napravljen na sledeći način: rastvoru DNK u 1 ml 2 x HEBS rastvora (HEPES buffered saline; 274 mM NaCl, 42 mM HEPES, 9.6 mM KCl, 1.5 mM Na_2HPO_4 ; pH 7.15 - 7.30), koji je neprekidno aerisan, nakapavanjem je dodavan 1 ml 250 mM rastvora CaCl_2 . Ovako formiran kalcijum-fosfatni precipitat dodavan je na ćelije i inkubiran 3 - 4h u standardnim uslovima za gajenje NT2/D1 ćelija. Nakon inkubacije precipitati su uklonjeni sa ćelija "pranjem" 2 puta rastvorom HEPES-a. Pri generisanju stabilnih ćelijskih klonova sa integrisanim *SOX2/pcDNA3.1*, *SOX2/pCXN2* ili pCAG-rtTAon-Hyg, ćelije su nakon "pranja" HEPES-om 48h gajene u standardnim uslovima za gajenje NT2/D1 ćelija. Nakon toga ćelije su odvojene od podloge rastvorom tripsina (0.25% tripsin rastvoren u PBS-u) i zasejano je $0,5 \times 10^6$ ćelija u Petri šolje prečnika 10 cm u medijumu u koji je dodat odgovarajući selektivni antibiotik (u slučaju transfekcija sa *SOX2/pcDNA3.1* u medijum je dodat G418 u koncentraciji od 400 $\mu\text{g/ml}$; u slučaju transfekcija sa *SOX2/pCXN2* G418 u koncentracijama od 400 $\mu\text{g/ml}$, 500 $\mu\text{g/ml}$ i 600 $\mu\text{g/ml}$, dok je u slučaju transfekcija sa pCAG-rtTAon-Hyg u medijum dodat higromicin u koncentracijama od 50 $\mu\text{g/ml}$ i 100 $\mu\text{g/ml}$ higromicina B). Ćelije su u antibiotiku gajene tri nedelje. Kada su kolonije postale vidljive okom, svaka ćelijska kolonija je prebačena u jedan bunarčić mikrotitar ploče sa 96 otvora na jedan od sledećih načina:

1) U na vrhu zakrivljenu pasterovu pipetu usisano je malo medijuma; zatim je pasterova pipeta postavljena na koloniju i medijum je ispuštan i usisavan u pipetu. Na ovaj način pojedinačna kolonija je mehaničkim putem odvojena od podloge. Kolonija je zatim prebačena u jedan bunarčić mikrotitar ploče sa 96 otvora (metod korišćen kod transfekcija sa *SOX2/pcDNA3.1*, *SOX2/pCXN2* i pCAG-rtTAon-Hyg).

2) Filter papir je uronjen u rastvor tripsina, a zatim je tim papirom ostvaren kontakt sa ćelijskom kolonijom i nakon toga je papir uronjen u jedan bunarčić mikrotitar ploče sa 96 otvora (metod korišćen kod transfekcija sa *SOX2/pcDNA3.1*).

3) u nastavak je sipano 3 μ l rastvora tripsina; zatim je tripsin ispuštan i usisavan u nastavak; nakon toga je ćelijska kolonija, tripsinom odvojena od podloge, prebačena u jedan bunarčić mikrotitar ploče sa 96 otvora (metod korišćen kod transfekcija sa *SOX2/pcDNA3.1*).

Ćelije su u bunarčićima gajene do dostizanja visoke konfluentnosti, a nakon toga su subkultivisane u sudove veće površine.

U eksperimentima stabilnih transfekcija, NT2/D1 ćelije su transfektovane sa 10 μ g *SOX2/pcDNA3.1*, *SOX2/pCXN2* ili pCAG-rtTAon-Hyg linearizovanog konstrukta. Nakon linearizacije odgovarajućim restrikcionim enzimom, konstrukt je precipitiran i rastvoren u 10 μ l 1x TE pufera (10 mM Tris HCl /1 mM EDTA).

U eksperimentima tranzijentne transfekcije, NT2/D1 ćelijski klonovi sa integrisanim regulatornim plazmidom pCAG-rtTAon-Hyg su transfektovani sa 4 μ g pTRE-Luc i 50 ng pRL-SV40 konstrukata ili 4 μ g pTRE-SOX2-neo konstrukta; nakon transfekcija ćelije su "oprane" 2x HEPES-om i zatim 48h gajene u standardnim uslovima za gajenje NT2/D1 ćelija u prisustvu higromicina B koncentracija 50 μ g/ml i 100 μ g/ml, kao i u prisustvu ili odsustvu doksiciklina koncentracija 100, 250, 500 i 1000 ng/ml.

3.2.8. Izolacija genomske DNK

Genomska DNK je izolovana iz NT2/D1 ćelija, NT2/D1 ćelijskih klonova stabilno transfektovanih *SOX2/pcDNA3.1* konstruktom (označenih kao B3, B4, B5, C1, C2, C4, F2, F3, F4, F5, G2, G3, H2, H3, H4, I2, I3, I4 i I5), kao i NT2/D1 ćelijskih klonova stabilno transfektovanih regulatornim plazmidom pCAG-rtTAon-Hyg (označenih kao A5, A6, B2, B7, B12, C1, C2, C4, C5, E2, E10, E11, F7, F11, F12, G5, G6, H9, I2, I5 i I7). Izolacija je rađena po metodi opisanoj od strane Favaloro i saradnika (Favaloro, 1980). Ukratko, 1×10^7 ćelija je tripsinizovano, resuspendovano u 1 ml 1xPBS pufera (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl₂, 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄) i centrifugirano 20 sekundi na 13000 obr./min. Nakon toga, talog je resuspendovan u 300 μ l TSM/NP40

pufera (140 mM NaCl, 10 mM Tris pH 7,4, 1,5 mM MgCl₂, 0,5% NP40), inkubiran na ledu 3 minuta i centrifugiran 20 sekundi na 13000 obr./min. Nakon centrifugiranja, supernatant je iskorišćen za izolaciju totalne RNK, a talog za izolaciju genomske DNK. Talog je resuspendovan u 1 ml "nuclei dropping buffer"-a (75 mM NaCl, 24 mM EDTA), prebačen u tubu od 15 ml koja je sadržavala 4 ml "nuclei dropping buffer"-a i proteinazu K (finalna koncentracija 0,2 mg/ml). Zatim je dodat SDS (finalna koncentracija 0,5%) i ćelije su lizirane preko noći na 37°C uz mešanje. Nakon lize, dodata je ista zapremina fenola (5 ml) u lizirane nukleuse i usledilo je mešanje 1-2 h. Nakon centrifugiranja 5 minuta na 5000 obr./min, vodena faza je prebačena u novu tubu i dodata je ista zapremina smeše hloroform: izoamil alkohol (24:1); usledilo je mešanje 30 minuta. Nakon toga, usledilo je centrifugiranje 5 min na 5000 obr./min; vodena faza je prebačena u novu tubu i dodata je jedna desetina zapremine 3 M natrijum acetata i jedna zapremina izopropanola. Nakon mešanja, genomska DNK je izdvojena uz pomoć zatopljene staklene kapilare. Zatim je DNK resuspendovana u 3 ml TE pufera preko noći (10 mM Tris HCl, 1 mM EDTA) i nakon toga ponovo precipitirana dodavanjem polovine zapremine 7,5 M amonijum acetata i dve zapremine etanola; uz pomoć zatopljene staklene kapilare izdvojena je DNK i resuspendovna u 500 µl TE pufera.

Za merenje koncentracije izolovane genomske DNK korišćen je NanoVue aparat verzija 4282 V1.7.3. Ovaj aparat meri ukupnu koncentraciju nukleotida u rastvoru.

3.2.9. PCR detekcija insercije konstrukta u genom domaćina

Preliminarna identifikacija ćelijskih klonova koji sadrže integrisan konstrukt u genomu (*SOX2*/pcDNA3.1 ili pCAG-rtTAon-Hyg) urađena je PCR analizom korišćenjem vektor specifičnog oligonukleotida T7 i oligonukleotida specifičnog za *SOX2* gen (*SOX2* R2) pri detekciji insercije *SOX2*/pcDNA3.1, odnosno korišćenjem oligonukleotida specifičnih za higromicinsku kasetu regulatornog plazmida pri detekciji insercije pCAG-rtTAon-Hyg regulatornog plazmida.

Kao matrica korišćena je genomska DNK izolovana iz NT2/D1 ćelija i NT2/D1 ćelijskih klonova. Reakciona smeša pri preliminarnoj identifikaciji ćelijskih klonova koji sadrže integrisan *SOX2*/pcDNA3.1 konstrukt je bila sastavljena od 100 ng genomske

DNK, 1x ThermoPol pufera (200 mM Tris-HCl pH 8,8, 100 mM amonijum sulfata, 100 mM KCl, 1% Triton X-100, 1 mg/ml BSA, 20 mM MgSO₄) (New England Biolabs), 100 pmol T7 i R2 prajmera, 0,5 µl dNTPmix (40 mM), 3U Vent polimeraze. Reakciona smeša pri preliminarnoj identifikaciji ćelijskih klonova koji sadrže integrisan pCAG-rtTAon-Hyg konstrukt je bila sastavljena od 100 ng genomske DNK, 10 pmol oligonukleotida HYG F i HYG R, 10 µl 2x "KAPA 2G Fast HotStart Ready mix" –a (Kapa Biosystems) i ddH₂O do 20 µl.

U reakciji su korišćene sledeće kontrole: PCR smeša bez DNK matrice (negativna kontrola), kao i PCR smeša u kojoj je kao matrica za umnožavanje korišćena genomska DNK iz netransfektovanih ćelija.

Profil PCR reakcije pri preliminarnoj identifikaciji ćelijskih klonova koji sadrže integrisan *SOX2*/pcDNA3.1 konstrukt u genomu bio je:

1. Početna denaturacija 98°C 5 min (smeša je sadržavala matricu i ddH₂O), 72°C 3 min (ostatak PCR smeše je dodat u reakciju)
2. 35 ciklusa umnožavanja:
 - a) denaturacija 96°C 1 min
 - b) renaturacija 57°C 1 min
 - c) elongacija 72°C 1 min
3. završna elongacija 72°C 10 min

Profil PCR reakcije pri preliminarnoj identifikaciji ćelijskih klonova koji sadrže integrisan pCAG-rtTAon-Hyg konstrukt u genomu bio je:

1. Početna denaturacija 98°C 5 min (smeša je sadržavala matricu i ddH₂O), 72°C 1 min (ostatak PCR smeše je dodat u reakciju)
2. 35 ciklusa umnožavanja:
 - a) denaturacija 95°C 15 sekundi
 - b) renaturacija 63°C 15 sekundi
 - c) elongacija 72°C 15 sekundi
3. završna elongacija 72°C 1 min

3.2.10. "Southern blot" analiza

3.2.10.1. Generisanje probe za "Southern blot" analizu

U cilju potvrđivanja integracije *SOX2*/pcDNA3.1 konstrukta u genom NT2/D1 ćelijskih klonova, urađena je "Southern blot" analiza. *SOX2* proba za "Southern blot" je generisana na dva načina: digestijom FbCl2 EPS konstrukta restrikcionim enzimima *EcoRI* i *PstI* (u cilju potvrđivanja integracije konstrukt u genom B4, B5, C2, F5 i G3 ćelijskih klonova) i PCR-om (u cilju potvrđivanja integracije konstrukta u genom F2, F3, H2, I3, I4 ćelijskih klonova). FbCl2EPS konstrukt sadrži 3' deo kodirajućeg regiona humanog *SOX2* gena bez HMG boksa, veličine 550 bp. Prilikom generisanja probe PCR-om kao matrica je korišćena genomska DNK izolovana iz NT2/D1 ćelija. PCR reakcija je pored matrice, sadržavala 10 pmol oligonukleotida *SOX2* F10 i q*SOX2* R845, 10 µl 2x "KAPA 2G Fast HotStart Ready mix" –a (Kapa Biosystems) i ddH₂O do 20 µl.

Profil PCR reakcije je bio:

1. Početna denaturacija 98°C 5 min (smeša je sadržavala matricu i ddH₂O), 72°C 3 min
(ostatak PCR reakcije je dodat u reakciju)
2. 35 ciklusa umnožavanja:
 1. denaturacija 15 sekundi 95°C
 2. renaturacija 15 sekundi 62°C
 3. elongacija 15 sekundi 72°C
3. završna sinteza 1 minut 72°C

Proba generisana PCR-om je veličine 499 bp i obuhvata 3' deo kodirajućeg regiona humanog *SOX2* gena.

3.2.10.2. Obeležavanje probe za "Southern" i "Northern blot" analize

Obeležavanje probe se zasniva na metodi opisanoj od strane Feinberg i Vogelstein-a (Feinberg i Vogelstein, 1983). Naime, u reakciji obeležavanja probe heksanukleotidi ili nanomerni prajmeri nasumično vezani za denaturisanu DNK služe kao osnova od koje kreće DNK sinteza. Ovi kompleksi (prajmer - DNK) predstavljaju

substrate za "Klenow" fragment (proteolitički produkt *E. coli* DNK polimeraze I koji poseduju sposobnost polimerizacije i 3'-5' egzonukleaznu aktivnost, ali ne i 5'-3' egzonukleaznu aktivnost). Ugradnjom radioaktivnih nukleotida sintetiše se DNK koja je radioaktivno obeležena. *SOX2* proba je obeležena primenom Mega Prime Labeling Kit-a. Ukratko, 60 ng *SOX2* PCR produkta ili fragmenta generisanog digestijom FbcI2 EPS konstrukta je zajedno sa 5 µl prajmera i ddH₂O do 50 µl denaturisano na 95-100°C. Nakon denaturacije i kratkog centrifugiranja u reakciju je dodato 10 µl 10x pufera (TrisHCl pH 7,5, 2- merkaptoetanol, MgCl₂), 4 µl svakog od neobebeženih nukleotida (dATP, dGTP, dTTP), 5 µl [α -³²P] dCTP i 1 µl "Klenow" fragmenta. Smeša je inkubirana 30 minuta na 37°C, a nakon toga reakcija obeležavanja je stopirana dodavanjem 5 µl 0,2M EDTA. Neugrađeni nukleotidi su uklonjeni iz reakcije propuštanjem reakcione smeše kroz G 50 kolonicu (GE Healthcare).

3.2.10.3. Transfer DNK na membranu

Genomska DNK (22 µg) izolovana iz NT2/D1 ćelijskih klonova, kod kojih je PCR-om detektovana integracija *SOX2*/pcDNA3.1 konstrukta u genom, je obrađena sa 22 µl *Eco*RI restrikcionog enzima (10U/µl). *Eco*RI je odabran zbog toga što se specifične sekvence koje predstavljaju mesta delovanja ovog restrikcionog enzima često nalaze u genomu. Pored toga, u *SOX2* sekvenci ne postoji restrikciono mesto za ovaj enzim. Nakon restrikcione analize i elektroforeze u 1% gelu od agaroze, usledilo je bojenje gela EtBr. Kako bi se uklonio nevezani EtBr, usledila je elektroforeza 30 minuta pri voltaži od 50 V. Zatim je gel uronjen u 0,25 M HCl u trajanju od 15 minuta, denaturacioni rastvor (1,5 M NaCl, 0,5 M NaOH) u trajanju od 30 minuta uz mešanje i finalno u neutralizacioni rastvor (1,5 M NaCl, 0,5 M TrisHCl pH 7,2, 0,001 M EDTA) u trajanju od 2x 15 minuta uz mešanje. Nakon toga, usledio je kapilarni transfer uzoraka na SensiBlot™ Plus Nylon Membrane (Fermentas). Po završenom transferu, membrana je "oprana" u 2x SSC- u. Usledila je fiksacija, odnosno membrana je osušena, inkubirana 30 minuta na 80°C i izložena UV u trajanju od 1 minut.

3.2.10.4. Hibridizacija sa obeleženom probom

Pre hibridizacije membrana je inkubirana u hibridizacionom puferu (2x SSC, 7% SDS, 0,5% kazein) bez DNK probe 30 minuta na 60°C. Proba za "Southern blot" analizu je denaturisana 5 minuta na 95°C. Hibridizacija se odvijala preko noći na 65°C u hibridizacionom puferu koji je sadržavao denaturisanu probu.

Nakon hibridizacije usledila su "pranja": 2 "pranja" po 15 minuta na sobnoj temperaturi u rastvoru 2x SSC/0,1% SDS, a nakon toga 2 "pranja" po 15 minuta na 60°C u rastvoru 2x SSC/0,1% SDS. Membrana je zatim zatopljena u PVC foliju i eksponirana.

3.2.11. Izolacija totalne RNK

3.2.11.1. Izolacija totalne RNK po metodi objavljenoj od strane Favaloro i saradnika

Totalna RNK je izolovana iz NT2/D1 ćelija, kao i iz NT2/D1 ćelijskih klonova sa integrisanim *SOX2/pcDNA3.1* konstruktom (označenih kao B4, B5, C2). Pored toga, totalna RNK je izolovana iz NT2/D1 ćelija i F5 i G3 ćelijskih klonova tretiranih dva, četiri, sedam, četrnaest i dvadeset i jedan dan RK. Izolovana RNK je korišćena za "Northern blot" analizu ili semi-kvantitativnu RT-PCR analizu. Izolacija je rađena po metodi opisanoj od strane Favaloro i saradnika (Favaloro, 1980). Ukratko, 1×10^7 ćelija je tripsinizovano, resuspendovano u 1 ml 1xPBS pufera (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl₂, 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄) i centrifugirano 20 sekundi na 13000 obr./min. Nakon toga, talog je resuspendovan u 300 µl TSM/NP40 pufera (140 mM NaCl, 10 mM Tris pH 7,4, 1,5 mM MgCl₂, 0,5% NP40), inkubiran na ledu 3 minuta i centrifugiran 20 sekundi na 13000 obr./min. Nakon centrifugiranja, supernatant je iskorišćen za izolaciju totalne RNK. U supernatant je dodato 300 µl TSE+S pufera (10 mM Tris PH 7,4, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA) i 600 µl smeše fenol/hloroform/izoamilalkohol (50% fenol/50% hloroform: izoamilalkohol (24:1)). Usledilo je centrifugiranje 5 minuta na 5000 obr./min. Nakon centrifugiranja, gornja faza je prebačena u novu tubu i postupak ekstrakcije smešom fenol/hloroform/izoamilalkohol je ponavljan sve dok gornja faza nije bila bistra. Nakon završene ekstrakcije, izdvojena je gornja faza koja je sadržala totalnu RNK i

usledila je precipitacija dodavanjem 1/20 zapremine 3 M NaCl i 2 zapremine etanola. Nakon inkubacije od 30 minuta na suvom ledu, usledilo je centrifugiranje 30 min na 13000 obr./min na +4°C. Supernatant je posle centrifugiranja odstranjen, a talog je "opran" 70% etanolom. Nakon centrifugiranja 15 minuta na 13000 obr./min na +4°C, odstranjen je supernatant, talog je osušen i resuspendovan u 20 µl ddH₂O.

Za merenje koncentracije izolovane totalne RNK korišćen je NanoVue aparat verzija 4282 V1.7.3.

Provera kvaliteta izolovane RNK rađena je na 1% gelu od agaroze.

3.2.11.2. Izolacija totalne RNK primenom "TRI reagent"-a

Primenom ovog reagensa totalna RNK je izolovana iz NT2/D1 ćelija, NT2/D1 ćelijskih klonova sa integrisanim *SOX2/pcDNA3.1* konstruktom (označenih kao F2, F5, G3), kao i NT2/D1 ćelijskih klonova sa integrisanim regulatornim plazmidom pCAG-rtTAon-Hyg (označenih kao E2, H9, I7). Takođe, totalna RNK je izolovana i iz E2, H9 i I7 ćelijskih klonova tranzijentno transfektovanim sa pTRE-SOX2-neo, neindukovanih i indukovanih doksiciklinom, kao i netretiranih i tretiranih RK. Izolacija je rađena iz jednog bunarčića mikrotitar ploče sa 6 otvora i totalna RNK, izolovana primenom TRI reagent-a, je korišćena u RT-PCR-u i PCR u realnom vremenu. Pri izolaciji korišćeno je uputstvo proizvođača. TRI reagent je rastvor fenola i guanin-izotiocijanata. Nakon dodavanja 500 µl reagensa u bunarčića mikrotitar ploče sa 6 otvora pokupljeni su lizati. Usledila je inkubacija homogenata 5 minuta na sobnoj temperaturi (ova inkubacija omogućava kompletnu disocijaciju nukleoproteinskih kompleksa). Po završetku inkubacije u homogenat je dodato 100 µl hloroforma i usledila je inkubacija od 10 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon toga, smeša je centrifugirana 15 minuta na 12000g na +4°C. Dodavanjem hloroforma i centrifugiranjem izdvajaju se vodena i organska faza. U vodenoj fazi se nalazi RNK. RNK se precipitira izopropanolom (250 µl). Nakon inkubacije u trajanju od 7,5 minuta i centrifugiranja 10 minuta na 12000g na +4°C, dobijeni talog RNK je "opran" 75% etanolom, kratko osušen na sobnoj temperaturi i rastvoren u 50 µl ddH₂O.

Za merenje koncentracije izolovane RNK korišćen je NanoVue aparat verzija 4282 V1.7.3.

Provera kvaliteta izolovane RNK rađena je na 1% gelu od agaroze.

3.2.12. "Northern blot" analiza

Uzorci totalne RNK su razdvojeni na denaturišućem 1% gelu od agaroze (1% agarozu, 20mM MOPS, 1M formaldehid). Pufer za elektroforezu je sadržavao 20 mM MOPS i 1M formaldehid. Po razdvajanju usledio je kapilarni transfer uzoraka na SensiBlot™ Plus Nylon Membrane (Fermentas). Nakon završenog transfera, membrana je "oprana" u 2x SSC- u. Usledila je fiksacija, odnosno membrana je osušena, inkubirana 30 minuta na 80°C i izložena UV u trajanju od 1 minut.

Pre hibridizacije membrana je inkubirana u hibridizacionom puferu (2x SSC, 7% SDS, 0,5% kazein) bez DNK probe 30 minuta na 60°C. Proba za "Northern blot" analizu (generisana i obeležena na načine opisane u odeljcima 3.2.10.1. i 3.2.10.2.) je denaturisana 5 minuta na 95°C. Hibridizacija se odvijala preko noći na 65°C u hibridizacionom puferu koji je sadržavao denaturisanu probu.

Nakon hibridizacije usledila su "pranja": 2 "pranja" po 15 minuta na sobnoj temperaturi u rastvoru 2x SSC/0,1% SDS, a nakon toga 2 "pranja" po 15 minuta na 60°C u rastvoru 2x SSC/0,1% SDS. Membrana je zatim zatopljena u PVC foliju i eksponirana.

3.2.13. Oslobođanje totalne RNK od ostataka genomske DNK

U izolovanoj totalnoj RNK mogu se naći ostaci genomske DNK koji mogu da dovedu do pogrešne interpretacije rezultata. Kako bi se izolovana RNK oslobodila tragova DNK korišćen je DNA-free™ kit. Naime, DNKaza I iz ovog kita uklanja DNK iz uzoraka totalne RNK do nivoa koji nije moguće detektovati rutinskim PCR-om. Ovaj enzim je glikoprotein sa endonukleaznom aktivnošću koji hidrolizuje fosfodiesterne veze dvolančane i jednolančane DNK. DNKaza I i divalentni katjoni (magnezijum i kalcijum- katalizuju degradaciju RNK) se uklanjaju uz pomoć DNKaza I inaktivišućeg reagensa. Pri oslobađanju totalne RNK od ostataka genomske DNK primenjeno je

uputstvo proizvođača. 10 µg totalne RNK je tretirano sa 2U DNKaze I u prisustvu 1x DNKaza I pufera (10 mM Tris-HCl pH 7,5, 2,5 mM MgCl₂, 0,5 mM CaCl₂) i u zapremini od 50 µl. Reakcija se odvijala 30 minuta na 37°C. Po završenoj inkubaciji u smešu je dodat resuspendovani DNKaza I inaktivacioni reagens. Nakon inkubacije u trajanju od 2 minuta, usledilo je centrifugiranje na 10000g 1,5 minuta i supernatant koji je sadržao RNK je prebačen u novu tubu.

3.2.14. Sinteza komplementarne DNK (cDNK) - reverzna transkripcija

Reverzna transkripcija na izolovanoj totalnoj RNK, prečišćenoj od ostataka genomske DNK, urađena je u prisustvu MuLV reverzne transkriptaze (Applied Biosystems), koja koristi jednolančanu RNK kao matricu za sintezu cDNK. 1 µg totalne RNK je preveden u cDNK u prisustvu 5 mM MgCl₂ (Fermentas), 1X Gold PCR pufera (500 mM kalijum hlorid, 150 mM Tris-HCl pH 8,05) (Applied Biosystems), 4 mM dNTP miksa (svaki 1 mM) (Pharmacia), 50 U MuLV reverzne transkriptaze (Applied Biosystems), 10 U RNKaznog inhibitora i 2,5 µM prajmera (Random hexamers, Applied Biosystems). Reakcija reverzne transkripcije se odvijala 10 minuta na 23°C, zatim 15 minuta na 42°C, 5 minuta na 99°C i 5 minuta na 5°C.

3.2.15. Semi-kvantitativni reverzna transkripcija PCR (RT-PCR)

Semi- kvantitativni RT-PCR omogućava analizu ekspresije gena od interesa. Generisane cDNK su korišćene kao matrice u semi-kvantitativnoj RT-PCR reakciji. U RT-PCR reakcijama korišćeni su oligonukleotidi specifični za sekvencu veštačkog poli A signala vektora, egzogenog *SOX2*, ukupnog *SOX2* (endogeni i egzogeni), *OCT4*, *NANOG*; *nestin*, *neuroD1*, sinaptofizin i *GAPDH*. Za umnožavanje egzogenog *SOX2* gena "forward" oligonukleotid je bio komplementaran *SOX2* kodirajućoj sekvenci, a reverzni oligonukleotid je bio komplementaran veštačkom 3'UTR lociranom na pcDNA3.1 vektoru; korišćenjem ovih oligonukleotida omogućeno je umnožavanje isključivo transkripta koji vodi poreklo od *SOX2*/pcDNA3.1 konstrukta. Oligonukleotidi koji omogućavaju umnožavanje ukupnog *SOX2* gena su komplementarni sekvenci

kodirajućeg regiona *SOX2* gena. U cilju normalizacije nivoa ekspresije, odnosno kao kontrola unete cDNK u reakciju, urađen je RT-PCR sa oligonukleotidima specifičnim za konstitutivno eksprimiran *GAPDH* gen. Pored cDNK, RT-PCR reakcija se sastojala od 10 pmol odgovarajućih oligonukleotida, 10 µl 2x "KAPA 2G Fast HotStart Ready mix" – a (Kapa Biosystems) i ddH₂O do 20 µl.

Profil PCR reakcije je bio:

4. početna denaturacija 2 minuta 95°C
5. 35 ciklusa umnožavanja:
 - a. denaturacija 15 sekundi 95°C
 - b. renaturacija 15 sekundi 60°C
 - c. elongacija 15 sekundi 72°C
6. završna sinteza 1 minut 72°C

25 i 30 ciklusa umnožavanja iz PCR reakcija vađeni su alikvoti od 5 µl i dobijeni PCR produkti su razdvojeni na 2% gelu od agaroze.

3.2.16. PCR u realnom vremenu

PCR u realnom vremenu je PCR tehnika koja omogućava amplifikaciju i istovremenu kvantifikaciju DNK molekula od interesa. U ovom radu za PCR u realnom vremenu korišćen je "SYBR Green PCR master mix". SYBR Green je boja koja se vezuje za dvočlanu DNK i nakon ekscitacije emituje fluorescentni signal određene talasne dužine. Naime, kako se PCR produkti akumuliraju, intenzitet fluorescentnog signala se povećava, odnosno količina fluorescencije je proporcionalna količini PCR produkta.

PCR u realnom vremenu u ovom radu je korišćen za kvantifikaciju ekspresije ukupnog *SOX2* gena kod NT2/D1 ćelija, kao i kod F2, F5 i G3 ćelijskih klonova. Uzorci cDNK su generisani na način opisan u odeljku 3.2.14. Nakon toga napravljena su razblaženja cDNK 1:4. Ovi razblaženi cDNK uzorci su korišćeni kao matrice za PCR reakcije koje su sadržavale oligonukleotide (*SOX2F695* i *SOX2R845*) koji omogućavaju detekciju i endogenog i egzogenog *SOX2* gena. Takođe, razblaženi cDNK uzorci su korišćeni kao matrice u PCR reakcijama koje su sadržavale oligonukleotide specifične za

GAPDH (*GAPDH* Man R i *GAPDH* Man F) gen koji je korišćen kao referentni gen (sekvence oligonukleotida date su u odeljku 3.1.6.). Reakcije su izvođene u zapremini od 20 μ l i sadržavale su 10 pmol odgovarajućih oligonukleotida i 1x SYBER Green PCR master mix (Applied Biosystems) i 1 μ l razblažene cDNK. PCR u realnom vremenu je izvođen na aparatu ABI Prism 7500 Sequence Detection System (Applied Biosystems).

Profil PCR reakcije je bio:

50°C 2 minuta

95°C 10 minuta

40 Ciklusa: 95°C 15 sekundi

60°C 1 minut

Svaka PCR reakcija je rađena u triplikatu. Rezultati su analizirani primenom 7500 System softver (Applied Biosystems) programa i predstavljeni su kao 2^{-dCt} , gde je dCt razlika između Ct vrednosti *SOX2* i referentnog gena.

3.2.17. "Western blot" analiza

3.2.17.1. Izolacija ukupnih ćelijskih proteina

U cilju analize ekspresije *SOX2* proteina tokom tretmana NT2/D1 ćelija RK, izolovani su ukupni ćelijski proteini iz netretiranih, kao i dva, četiri, sedam, četrnaest i dvadeset jedan dan tretiranih NT2/D1 ćelija. Takođe, ukupni ćelijski proteini su izolovani iz F5 i G3 ćelijskih klonova (netretiranih, kao i dva i četiri dana tretiranih RK) u cilju analize ekspresije *SOX2* i *SOX3* proteina.

Ukupni ćelijski proteini su izolovani na sledeći način. Ćelije su odvojene od podloge tripsinom, resuspendovane u medijumu i centrifugirane 5 minuta 1300 obr./min. Nakon toga, ćelije su resuspendovane u 1xPBS-u, odvojen je jedan alikvot ćelija za brojanje, a ostatak je ponovo centrifugirane 5 minuta 1300 obr./min. Zatim, talog ćelija je resuspendovan u puferu za lizu (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40, koktel proteinaznih inhibitora) (1 ml pufera za lizu je korišćeno za 1×10^7 ćelija) i inkubiran na ledu 30 minuta. Ćelijski lizati su potom centrifugirani u mikrofugi 15

minuta na 11700 obr./min. Dobijeni supernatanti su prebacivani u nove tube i čuvani na -80°C do upotrebe.

3.2.17.2. Merenje koncentracije proteina po Bradfordu

Koncentracija proteina je merena Bradford metodom. Ova metoda se zasniva na kolorimetrijskom određivanju nepoznate koncentracije proteina u uzorku na osnovu standardne krive dobijene merenjem apsorbance standarda poznate koncentracije. Standardi za merenje koncentracije su generisani rastvaranjem BSA ("bovine serum albumin") u ddH₂O u sledećim koncentracijama: 1, 2, 4, 6, 8, 10 µg/ml. Uzorci su pripremljeni tako što je 1 µl ukupnog ćelijskog lizata rastvoren u 799 µl ddH₂O; nakon čega je dodano 200 µl "BioRad Protein Assay Dye" reagensa. Apsorbancija je merena na spektrofotometru na talasnoj dužini od 595 nm (Bradford, 1976).

3.2.17.3. Analiza ukupnih ćelijskih proteina "Western blot" analizom

"Western blot" analiza se koristi za određivanje količine proteina u ćeliji. Ovom analizom može da se detektuje jedan protein u smeši proteina primenom antitela specifičnog za protein od interesa.

Poliakrilamidna gel elektroforeza (PAGE) je široko korišćena tehnika za razdvajanje proteina. Najčešće korišćenu metodu razvio je Laemmli (Laemmli, 1970) koristeći denaturišući (SDS) diskontinuirani metod. Ova metoda se zasniva na sposobnosti SDS (natrijum dodecil sulfat) i β- merkaptetanola da denaturišu proteine, odnosno disosuju proteine na podjedinice i spare ih sa negativnim nabojem. Ovo omogućava proteinima da putuju u električnom polju i da se razdvoje na osnovu mase/veličine. Laemmli-ev sistem koristi pufere različitih pH vrednosti i sastava kako bi generisao voltažni gradijent i razliku u pH između gela za nanošenje i gela za razdvajanje. 4% akrilamidni gel za nanošenje (pH 6,8) je nanesen na 10% akrilamidni gel za razdvajanje (pH 8,8). Gel za nanošenje ima velike pore i služi da rasporedi proteine (veći mogu da sustignu manje) na vrh gela za razdvajanje koji ima manje pore. Po ulasku

u gel za razdvajanje, proteini se raspoređuju po relativnoj molekularnoj težini (veći putuju sporije i oni će biti pri vrhu gela, dok manji brže putuju).

Uzorci proteina su rastvoreni u odnosu 1:2 sa Laemmli puferom (60 mM TrisHCl pH 6,8, 10% glicerol, 2% SDS, 5% β - merkaptoetanol, 0,01% bromfenol plavo), denaturisani 5 minuta na 95°C, a zatim inkubirani na ledu 5 minuta. β - merkaptoetanol redukuje disulfidne veze, a SDS denaturiše proteine. Laemmli pufer sadrži i boju brom fenol plavu koja omogućava detekciju putovanja uzorka i glicerol koji povećava gustinu uzorka tako da se uzorci smeštaju na dno bunarčića.

Elektroforeza se odvijala u prisustvu pufera (28,75 mM Tris, 0,19 M glicin, 0,1 % SDS) pri sledećim uslovima: 160 V, 20 mA u trajanju od 2-3 sata.

Nakon što su proteini razdvojeni elektroforezom usledio je elektrotransfer sa gela na ImmobilonTM (PVDF) membranu (Milipore) primenom "Whatman Biometra Fastblot" aparata po uputstvu proizvođača. Za elektrotransfer su korišćene sledeće komponente:

- anodni pufer I (300 mM TrisHCl pH 10,4, 20% metanol)
- anodni pufer II (25 mM TrisHCl pH 10, 4, 20% metanol)
- katodni pufer (25 mM TrisHCl pH 9,4, 20% metanol, 0,3% glicin)

Nakon završenog transfera urađena je vizualizacija "PonceauS" bojom. Nakon odbojavanja membrane metanolom, usledila je blokada membrane u 10% nemasnom mleku rastvorenom u TBST-u (10 mM Tris pH 8, 150 mM NaCl, 0,05% Tween 20) 1 sat na sobnoj temperaturi u cilju blokade nespecifičnog vezivanja. Nakon blokade usledila je inkubacija preko noći na +4°C sa primarnim antitelom (razblaženje 1: 5000 za SOX3 i tubulin, odnosno 1: 2500 za SOX2). Primarna antitela se vezuju za proteine na membrani i formiraju kompleks protein - antitelo. Nakon inkubacije sa primarnim antitelima, usledilo je "pranje" sa TBST 3x po 15 minuta i inkubacija sa sekundarnim antitelima (razblaženje 1: 10000) u trajanju od 1 sata. Sekundarna antitela su antitela – enzim kompleks koji se vezuje za primarna antitela; enzimi u ovom kompleksu služe za vizualizaciju. Nakon inkubacije sa sekundarnim antitelima, usledilo je pranje TBST-om i vizualizacija ECL sistemom (Milipore) po uputstvu proizvođača.

3.2.18. MTT test

MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolium bromid, tetrazol) se u mitohondrijama živih ćelija redukuje u ljubičasti formazan. Ovaj proces se odvija samo ukoliko su reduktaze mitohondrija aktivne, tako da se konverzija direktno može povezati sa brojem vijabilnih (živih) ćelija (Slater, 1963; Alley, 1988; van de Loosdrecht, 1994). Povećanje broja ćelija rezultuje povećanjem količine MTT formazana i povećanjem apsorbance.

Oko 50000 ćelija je zasejano u bunarčić mikrotitar ploče sa 96 otvora. Nakon zasejavanja, ćelije su gajene u medijumu preko noći. Zatim je medijum odstranjen, a ćelije su inkubirane 2 sata na 37°C u MTT rastvoru finalne koncentracije 0,5 mg/ml (MTT je rastvoren u medijumu za gajenje ćelija). Po isteku inkubacije, MTT rastvor je uklonjen, ćelije su lizirane u DMSO-u (dimetil sulfoksid). Apsorbanca je merena u "microplate reader"-u na 620 nm. Eksperiment je urađen u triplikatu i ponovljen 12 puta. Broj vijabilnih ćelija je određen kod NT2/D1 ćelija, kao i kod ćelijskih klonova F5 i G3.

3.2.19. Analiza faza ćelijskog ciklusa fluorescentnom protočnom citometrijom

DNK sadržaj ćelije može da bude kvantitativno izmeren protočnom citometrijom. Kada se fluorescentna boja doda u suspenziju permeabilizovanih ćelija ili nukleusa, ova boja se vezuje za DNK. Ćelije ili nukleusi inkorporiraju količinu boje proporcionalnu količini DNK. U protočnom citometru emitovani fluorescentni signal se prevodi u električni puls sa amplitudom proporcionalnoj totalnoj emisiji fluorescencije iz jedne ćelije. Kako detektovana merenja nisu direktni odraz sadržaja DNK, referentne ćelije sa različitim količinama DNK bi trebalo da budu uključene u analizu u cilju identifikacije pozicije ćelija sa normalnom diploidnom količinom DNK.

Protočna citometrija omogućava identifikaciju distribucije ćelija po različitim fazama ćelijskog ciklusa. Kako se sadržaj DNK duplicira tokom S faze ćelijskog ciklusa, relativna distribucija ćelija u G₀, G₁, S, G₂ i M fazi može biti određena zbog toga što je fluorescencija ćelija u G₂/M fazi dva puta veća u poređenju sa fluorescencijom ćelija u G₀/G₁ fazi.

NT2/D1 ćelije, kao i F5 i G3 ćelijski klonovi su odvojeni od podloge tripsinom, "oprani" 2x PBS-om i fiksirani 70% etanolom 2 sata na + 4°C. Zatim su ćelije "oprane" PBS-om, inkubirane sa RNKazom (50µg/ml) 15 minuta na 37°C i obojene propidijum jodidom (40µg/ml) 30 minuta na 37°C u mraku. Crvena fluorescencija je analizirana na FACSCalibur protočnom citometru (BD Biosciences). Distribucija ćelija po fazama ćelijskog ciklusa je određena upotrebom softvera "CellQuest Pro" (BD Biosciences). Eksperiment je urađen tri puta.

Sinhronizacija ćelijskog ciklusa je ostvarena "izgladnjivanjem" ćelija ("serum starvation" esej), odnosno gajenjem ćelija u odsustvu seruma. Naime, 6 petri šolja prečnika 6 cm je zasejano sa $1,17 \times 10^6$ NT2/D1 ćelijama, kao i sa F5 i G3 ćelijskim klonovima. Ćelije su gajene bez seruma 24h. Po isteku 24h, ćelijama je dodat serum i na svakih dva sata jedna petri šolja je iskorišćena za bojenje ćelija propidijum jodidom u cilju određivanja distribucije ćelija po fazama ćelijskog ciklusa.

3.2.20. "Wound scratch" test

"Wound scratch" test se koristi za određivanje migracione sposobnosti *in vitro*, kao i invazivnosti ćelija. NT2/D1 ćelije i F5 i G3 ćelijski klonovi su gajeni do dostizanja konfluentnosti, a onda je iglom napravljena pukotina koju su ponovo popunjavale ćelije. Na svakih dva sata formirana pukotina je fotografisana, odnosno analizirano je da li ćelije popunjavaju nastali prazan prostor i kojom brzinom.

3.2.21. Kvantifikacija luminiscentnih signala luciferaza primenom "Dual-Luciferase Reporter Assay" sistema

"Dual-Luciferase Reporter Assay" sistem omogućava istovremeno merenje ekspresije dva nezavisna reporterska enzima. Kod ovog sistema, aktivnosti luciferaze svica i "Renilla" luciferaze se mere uzastopno unutar istog uzorka. Najpre se meri aktivnost luciferaze svica dodavanjem reagensa označenog kao LAR II ("Luciferase Assay Reagent II"). LAR II omogućava generisanje stabilnog luminiscentnog signala. Nakon kvantifikovanja luminiscencije luciferaze svica, meri se aktivnost "Renilla"

luciferaze dodavanjem reagensa označenog kao "Stop&Glo®" koji dovodi do gašenja signala luciferaze svica i aktiviranja "*Renilla*" luciferaze.

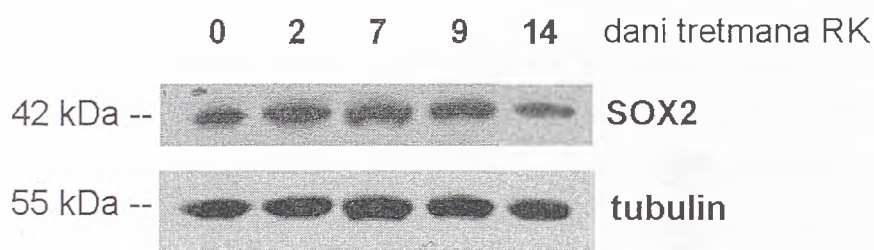
NT2/D1 ćelijski klonovi sa stabilno integrisanim regulatornim plazmidom pCAG-rtTAon-Hyg nakon kotransfekcija sa luciferazom svica i "*Renilla*" luciferazom su analizirani primenom "Dual-Luciferase Reporter Assay" sistema po uputstvu proizvođača. Ukratko, transfektovane ćelije, indukovane ili neindukovane doksiciklinom, su 48h nakon transfekcija "oprane" 1x PBS-om i lizirane dodavanjem tzv. pasivnog pufera za lizu (eng. "Passive Lysis Buffer"). Zatim su lizirane ćelije odvojene od podloge, prebačene u tubu, inkubirane na ledu 30 minuta i centrifugirane 30 sekundi u mikrofugi na 13000 obr./min. 10 µl lizata je prebačeno u novu tubu i usledilo je merenje luminiscentnih signala. Najpre je u tubu dodato 50 µl LAR II i izmeren je luminiscentni signal luciferaze svica. Zatim je u tubu dodato 50 µl "Stop&Glo®" reagensa (20 µl 50x "Stop&Glo®" substrata u 1 ml "Stop&Glo®" pufera) i usledilo je merenje luminiscentnog signala "*Renilla*" luciferaze.

4. REZULTATI

Literaturni podaci ukazuju na veoma važnu ulogu SOX2 transkripcionog faktora u regulaciji ekspresije gena neophodnih za samo-obnavljanje i održavanje pluripotencnosti matičnih ćelija, kao i ulogu u procesu neuralne diferencijacije. Pored toga, pokazano je da ovaj transkripcioni faktor smanjuje ili povećava ćelijsku proliferaciju u zavisnosti od ćelijskog konteksta. NT2/D1 ćelije se u prisustvu retinoične kiseline diferenciraju u različite tipove ćelija, uključujući i zrele neurone, tako da ova ćelijska linija predstavlja značajan *in vitro* sistem za proučavanje faktora koji otpočinju i regulišu neuralnu diferencijaciju. Pored toga, rane faze indukcije NT2/D1 ćelija retinoičnom kiselinom praćene su i smanjenjem ekspresije SOX2 gena, tako da ove ćelije predstavljaju i pogodan model sistem za proučavanje regulacije ekspresije humanog SOX2 gena. Imajući u vidu ove podatke, predmet ove teze je bio analiza uticaja povećane ekspresije SOX2 gena na održavanje pluripotencnosti, proliferaciju i neuralnu diferencijaciju NT2/D1 ćelija u cilju daljeg rasvetljavanja uloge ovog gena u navedenim procesima.

4.1. Analiza SOX2 proteina kod NT2/D1 ćelija tretiranih RK

Podaci iz literature pokazuju da se ekspresija *SOX2* iRNK menja tokom ranih faza RK- indukovane neuralne diferencijacije NT2/D1 ćelija (Stevanovic, 2003). Međutim, u literaturi ne postoje podaci o tome da li se ekspresija SOX2 proteina menja tokom ranih faza RK- indukovane neuralne diferencijacije NT2/D1 ćelija. Imajući u vidu navedene podatke, ekspresija SOX2 proteina kod NT2/D1 ćelija analizirana je "Western blot"-om tokom četrnaest dana tretmana RK (Slika 12).



Slika 12. **Analiza SOX2 proteina kod NT2/D1 ćelija tretiranih RK.** Ekspresija proteina je analizirana "Western blot"-om na ukupnim ćelijskim lizatima upotrebom antitela na SOX2 protein (42 kDa) i na α -tubulin (55 kDa). 0, 2, 7, 9, 14 - dani tretmana RK.

Primenom "Western blot" analize nije detektovana značajna razlika u ekspresiji SOX2 proteina između netretiranih NT2/D1 ćelija i NT2/D1 ćelija tretiranih RK tokom četrnaest dana. Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da ekspresija SOX2 proteina nije značajno promenjena tokom ranih faza RK- indukovane neuralne diferencijacije NT2/D1 ćelija.

4.2. Generisanje NT2/D1 ćelijskih klonova sa povećanom ekspresijom *SOX2* gena primenom *SOX2/pcDNA3.1* konstrukta

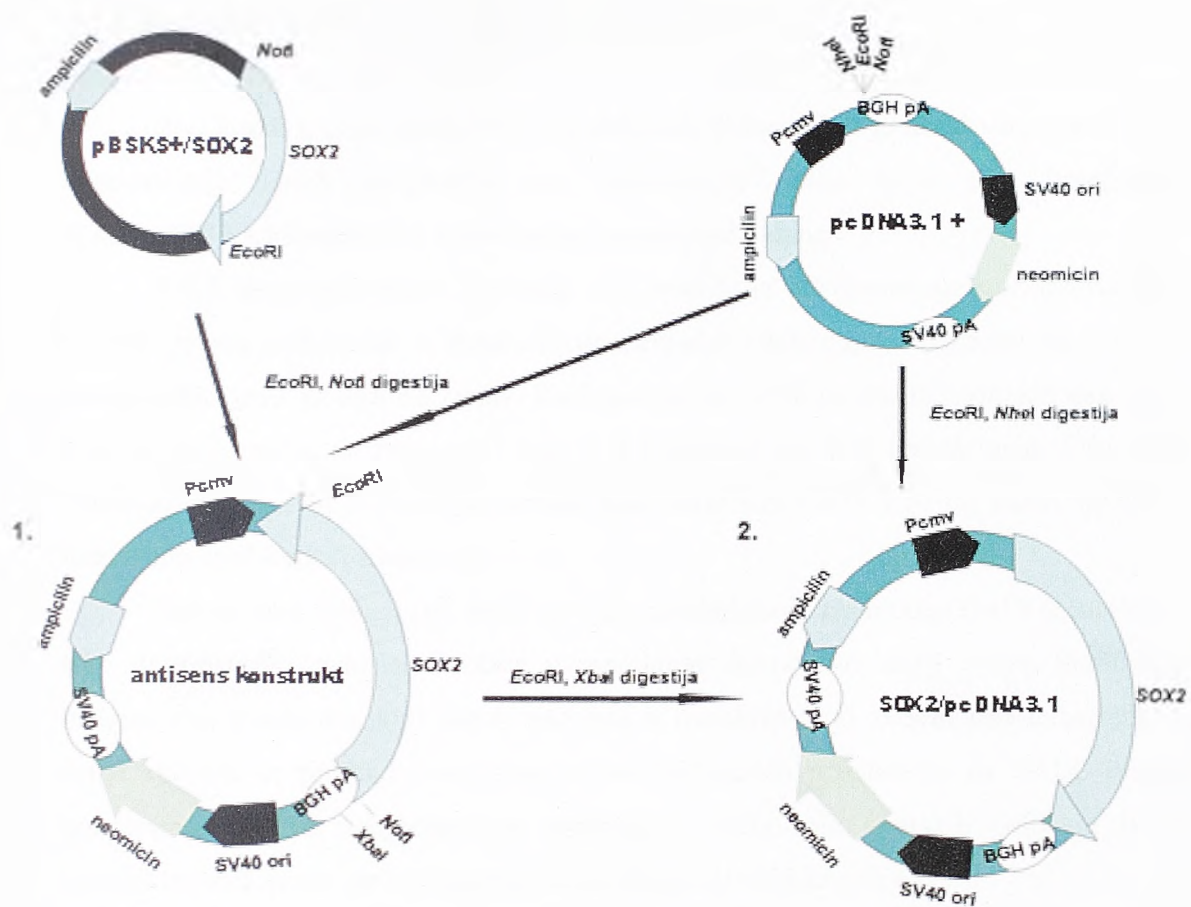
4.2.1. Generisanje *SOX2/pcDNA3.1* konstrukta

Za dobijanje konstrukta koji je omogućio generisanje NT2/D1 ćelijskih klonova sa povećanom ekspresijom humanog *SOX2* gena korišćen je *pcDNA3.1+* ekspresioni

vektor. Pri korišćenju ovog vektora ekspresija *SOX2* gena je bila pod kontrolom CMV promotora.

Strategija kloniranja *SOX2* gena u pcDNA3.1+ ekspresioni vektor (Slika 13) obuhvatala je konstruisanje dva tipa konstrukta. Prvi konstrukt je generisan ligacijom *EcoRI-NotI* fragmenta iz *SOX2* cDNK klona, koji je sadržavao kompletan kodirajući region humanog *SOX2* gena veličine približno 1,2 kb (Stevanovic), u *EcoRI-NotI* mesta pcDNA3.1+ vektora. U ovom konstrukt (antisens konstrukt) otvoreni okvir čitanja (ORF) *SOX2* gena svojim 3' krajem orijentisan je ka CMV promotoru pcDNA3.1+ vektora.

Drugi konstrukt je dobijen ligacijom *EcoRI-XbaI* fragmenta antisens konstrukta u *EcoRI-NheI* mesta pcDNA3.1+ ekspresionog vektora. Na taj način 5' kraj kodirajućeg regiona *SOX2* gena kloniran je nizvodno od CMV promotora. Ovaj konstrukt je korišćen za generisanje NT2/D1 ćelijskih klonova sa povećanom ekspresijom *SOX2* gena.



Slika 13. Shematski prikaz strategije kloniranja. 1. Konstrukt pBluescript II KS+/SOX2 i vektor pcDNA3.1+ su digerirani *EcoRI-NotI* restrikcijom. Nakon elucije, fragment koji sadrži kodirajući region SOX2 gena i linearizovani pcDNA3.1+ su ligirani čime je generisan antisense konstrukt. 2. Antisense konstrukt je obrađen restrikcijom *EcoRI-XbaI*, a pcDNA3.1+ vektor *EcoRI i NheI* enzimima. *XbaI* i *NheI* nakon restrikcione obrade daju komplementarne krajeve (izošizomeri). Nakon elucije i ligacije fragmenata dobijen je konstrukt SOX2/pcDNA3.1. Pcmv- promotor poreklom od citomegalovirusa; SOX2- kodirajući region humanog SOX2 gena; BGH pA- sekvenca za poliadenilaciju gena za hormona rasta goveda; SV40 ori- SV40 promotor i njegov "origin" replikacije; neomicin- gen za neomicinsku rezistenciju; SV40 pA- sekvenca za poliadenilaciju iz SV40 virusa; ampicilin- gen za rezistenciju na ampicilin.

4.2.2. Testiranje NT2/D1 ćelija na rezistenciju na G418

Prvi korak u generisanju NT2/D1 ćelijskih klonova bio je utvrđivanje optimalne koncentracije G418 neophodne za eliminisanje ćelija koje nisu integrisale *SOX2/pcDNA3.1* konstrukt u vremenskom periodu od 7 dana.

G418, aminoglikozidni antibiotik koji proizvodi *Micromonospora rhodorangea*, blokira sintezu polipeptida u eukariotskim ćelijama inhibicijom elongacije tako što se ireverzibilno veže za 80S ribosome. Rezistencija na G418 se postiže pomoću *neo* gena (gen za rezistenciju na neomicin) koji je lokalizovan na Tn5 transpozonu. Ovaj gen kodira aminoglikozid 3'-fosfotransferazu koja inaktivira G418 i na taj način sprečava interakciju antibiotika i ribozoma.

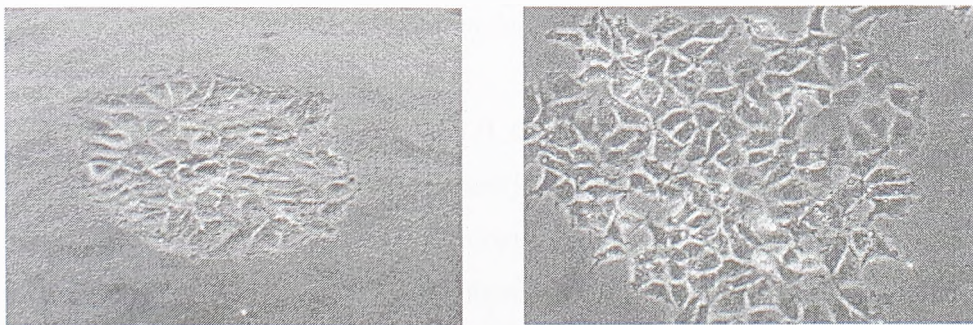
Eukariotske ćelije ne poseduju gen za metabolisanje antibiotika G418 (geneticin), tako da prisustvo ovog antibiotika u medijumu dovodi do smrti ćelija. Stabilnom integracijom konstrukta koji sadrži *neo* gen u transkripciono aktivni deo eukariotskih ćelija sintetiše se produkt ovog gena kojim ćelije stiču rezistenciju na G418. Radne koncentracije G418 neophodne za selekciju i održavanje sisarskih ćelijskih linija transfektovanih sa *neo* genom variraju u zavisnosti od ćelijskog tipa.

U cilju određivanja optimalne koncentracije, NT2/D1 ćelije su zasejane tako da daju 25% konfluentnosti jer antibiotik postiže najbolje efekte kada se ćelije intenzivno dele. Testirane su koncentracije G418 od 300 µg/ml, 400 µg/ml i 500 µg/ml. Sve tri koncentracije su dovodile do smrti ćelija, pri čemu je najveća koncentracija bila i najletalnija. Za selekciju stabilnih transfektanata odabrana je koncentracija od 400 µg/ml jer je ona posle 7 dana dovela do eliminisanja 95% ćelija. Koncentracija od 400 µg/ml je i ranije korišćena u eksperimentima selekcije NT2/D1 ćelija koje su integrisale u genom konstrukt koji sadrži gen za Bcl-2 ili HFH2 (Hromas, 1999; Wang, 1999; Ozdener, 2007).

4.2.3. Generisanje stabilnih NT2/D1 ćelijskih klonova korišćenjem SOX2/pcDNA3.1 konstrukta

Nakon utvrđivanja optimalne koncentracije G418, usledilo je generisanje stabilnih klonova. U tu svrhu, *SOX2/pcDNA3.1* konstrukt je linearizovan *BgIII* restrikcionim enzimom. Linearizacija konstrukta povećava šansu da se konstrukt ugradi u genom ćelija domaćina bez narušavanja gena od interesa i elemenata neophodnih za ekspresiju u sisarskim ćelijama. *BgIII* enzim je odabran zbog toga što ima jedinstveno mesto delovanja unutar konstrukta. Pored toga, mesto delovanja ovog enzima se nalazi uzvodno od CMV promotora, tako da digestija ovim enzimom ne narušava kritične regulatorne elemente konstrukta i region koji sadrži kodirajući deo *SOX2* gena. Nakon linearizacije, usledila je transfekcija NT2/D1 ćelija *SOX2/pcDNA3.1* konstruktom.

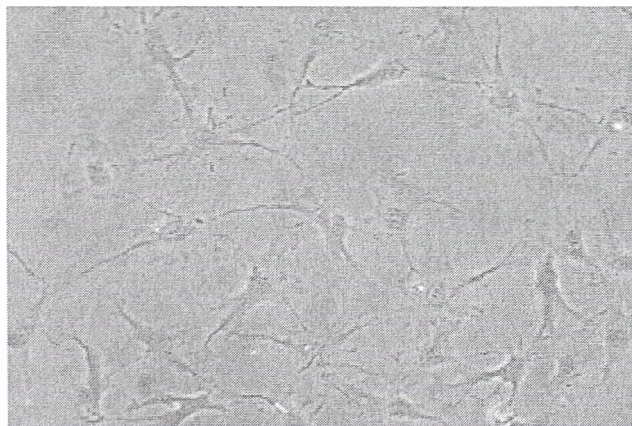
Posle transfekcije, usledio je proces selekcije stabilno transfektovanih NT2/D1 ćelija u prisustvu G418. Nakon tri nedelje, pojedinačne kolonije (ćelijski klonovi) su bili vidljivi golim okom (Slika 14). Ove kolonije vode poreklo od pojedinačnih transfektovanih ćelija koje su rezistentne na G418 i koje su prošle kroz veći broj deoba. Rezistencija na G418 ukazuje da ove NT2/D1 ćelije poseduju *SOX2/pcDNA3.1* konstrukt integrisan u genom. Porelelno sa transfekcijama NT2/D1 ćelija konstruktom, ove ćelije su tretirane i kalcijum fosfatnim precipitatom koji nije sadržavao DNK ("mock" transfektovane ćelije). Nakon nedelju dana gajenja "mock" transfektovanih ćelija u medijumu sa G418 nije bilo preživelih ćelija.



Slika 14. **Pojedinačne kolonije NT2/D1 ćelija.** Kolonije vode poreklo od pojedinačnih ćelija stabilno transfektovanih *SOX2/pcDNA3.1* konstruktom.

Kolonije vidljive golim okom su dalje propagirane u kulturi, tako što je svaka pojedinačna kolonija prebačena u jedan bunarčić mikrotitar ploče sa 96 otvora. Testirana su tri načina prebacivanja kolonija u bunarčiće (poglavlje Materijal i metode). Samo kolonije koje su prebačene mehanički pomoću zakrivljene pasterove pipete su preživele. Čelije su u bunarčićima gajene do dostizanja visoke konfluentnosti, a nakon toga su subkultivisane u sudove veće površine.

Od ukupno 54 selektovana ćelijska klon, propagiranje u kulturi preživelo je 19 ćelijskih klonova. S druge strane, ćelijski klonovi označeni kao C6, D1, D4, D5, E1 i I1 su u toku kultivisanja spontano diferencirali u ćelije koje po morfologiji podsećaju na neurone (Slika 15); nakon spontane diferencijacije ćelije su gubile proliferativnu sposobnost i nisu preživljavale više od dve nedelje u kulturi.

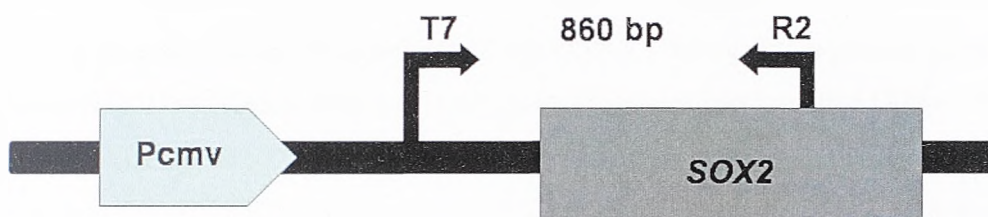


Slika 15. **Spontano diferencirani ćelijski klon.** U toku kultivacije pojedini ćelijski klonovi su diferencirali u ćelije koje po morfologiji podsećaju na neurone.

4.2.4. Analiza insercije konstrukta u genom ćelijskih klonova

Nakon generisanja stabilnih NT2/D1 ćelijskih klonova, usledila je identifikacija ćelijskih klonova kod kojih je došlo do insercije *SOX2*/pcDNA3.1 konstrukta u genom. U tu svrhu urađena je PCR analiza korišćenjem vektor- specifičnog prajmera T7 i *SOX2* specifičnog prajmera R2 (Slika 16). Kombinacijom ovih prajmera moguće je detektovati samo egzogenu kopiju *SOX2* gena integrisanu u genom NT2/D1 ćelija jer se sekvenca za koju se vezuje T7 prajmer nalazi samo u pcDNA3.1+ vektoru. Kao matrice za PCR korišćene su genomske DNK izolovane iz 19 preživelih ćelijskih klonova označenih kao:

B3, B4, B5, C1, C2, C4, F2, F3, F4, F5, G2, G3, H2, H3, H4, I2, I3, I4 i I5. Ukoliko je došlo do integracije konstrukta, nakon PCR amplifikacije korišćenjem T7 i R2 prajmera, očekuje se produkt veličine 860 bp.



Slika 16. Strategija amplifikacije i pozicija prajmera korišćenih za detekciju integrisanog konstrukta primenom PCR-a. T7 prajmer je komplementaran sekvenci pcDNA3.1+ vektora, a R2 prajmer je specifičan za sekvencu *SOX2* gena. Pcmv-promotor poreklom od citomegalovirusa; *SOX2* - kodirajući region *SOX2* gena.

Na Slici 17 prikazani su PCR produkti nakon elektroforeze na 2% gelu od agaroze. Kao kontrole korišćene su vodena kontrola (negativna kontrola) (Slika 17, označeno kao K), kao i PCR reakcija sa genomskom DNK izolovanom iz netransfektovanih NT2/D1 ćelija (Slika 17, označeno kao NT2).



Slika 17. Detekcija insercije *SOX2/pcDNA3.1* konstrukta u ćelijskim klonovima primenom PCR-a. U PCR reakciji korišćeni su prajmeri specifični za integrisanu kopiju *SOX2* gena poreklom iz *SOX2/pcDNA3.1* konstrukta. Kod deset NT2/D1 ćelijskih klonova (B4, B5, C2, F2, F3, F5, G3, H2, I3, I4) detektovan je PCR produkt odgovarajuće veličine. K- negativna kontrola; NT2- NT2/D1 ćelijska linija.

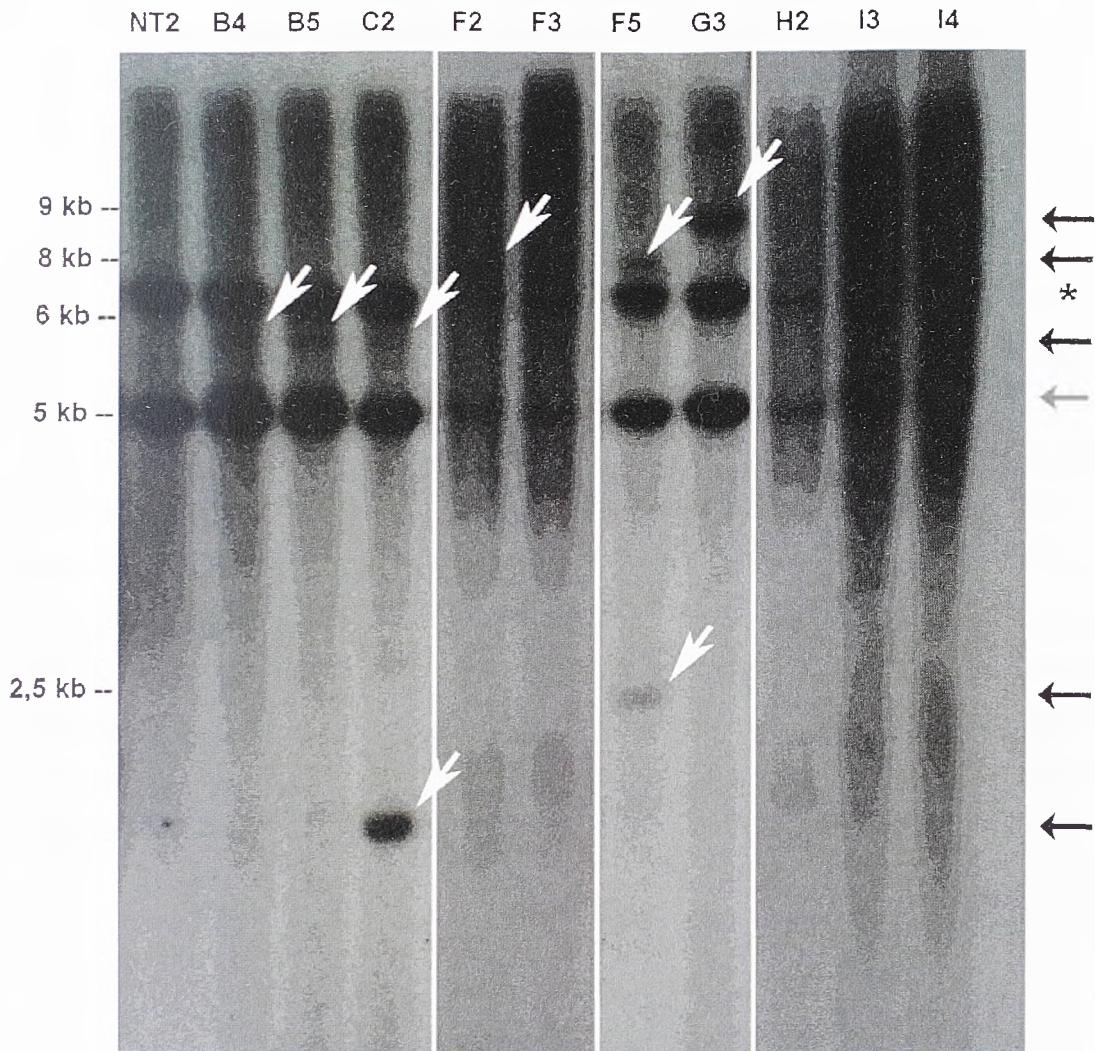
Sa Slike 17 se može videti da je primenom T7 i R2 prajmera PCR produkt odgovarajuće veličine (860 bp) detektovan kod deset ćelijskih klonova, označenih kao B4, B5, C2, F2, F3, F5, G3, H2, I3, I4, što ukazuju da je kod ovih ćelijskih klonova došlo

do integracije *SOX2*/pcDNA3.1 ekspresionog konstrukta u genom i ovi ćelijski klonovi su korišćeni za dalju analizu.

4.2.5. "Southern blot" analiza NT2/D1 ćelijskih klonova

U cilju potvrđivanja integracije *SOX2*/pcDNA3.1 konstrukta u genom deset PCR-pozitivnih NT2/D1 ćelijskih klonova, urađena je "Southern blot" analiza (Slika 18). Kao rezultat hibridizacije sa *SOX2* specifičnom probom kod svih testiranih NT2/D1 ćelijskih klonova, kao i kod NT2/D1 ćelija detektovana je endogena kopija *SOX2* gena (veličina oko 5 kb). "Southern blot" analiza potvrdila je integraciju *SOX2* konstrukta u genom šest ćelijskih klonova (B4, B5, C2, F2, F5, G3) (Slika 18). Dodatno, kod C2 i F5 ćelijskih klonova, *SOX2* specifična proba je hibridizovala i sa fragmentom veličine 2,5 kb (F5 ćelijski klon), odnosno 1,8 kb (ćelijski klon C2). Ovi fragmenti su najverovatnije rezultat integracije fragmentisanog *SOX2*/pcDNA3.1+ konstrukta. Fragmentacija konstrukta može da bude posledica dejstva endogenih endonukleaza kao što je DNKaza I. Kako integracija *SOX2* konstrukta nije potvrđena "Southern blot" analizom, ćelijski klonovi F3, H2, I3 i I4 su isključeni iz dalje analize.

ČELIJSKI KLONOVI



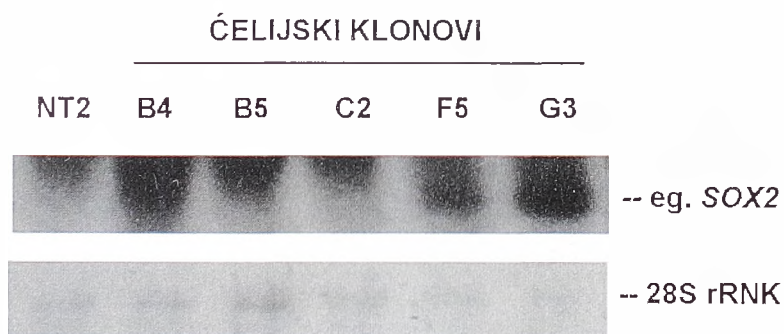
Slika 18. "Southern blot" analiza NT2/D1 ćelijskih klonova upotrebom *SOX2*-specifične probe. Genomska DNK izolovana iz NT2/D1 ćelija i ćelijskih klonova je obrađena *EcoRI* restrikcionim enzimom, prenet na membranu i hibridizovana sa *SOX2* specifičnom probom. Integracija *SOX2*/pcDNA3.1 konstrukta detektovana je kod ćelijskih klonova označenih kao B4, B5, C2, F2, F3, F5, G3. NT2- genomska DNK NT2/D1 ćelija; B4, B5, C2, F2, F3, F5, G3, H2, I3, I4- genomska DNK NT2/D1 ćelijskih klonova; siva strelica- endogena kopija *SOX2* gena; crne strelice- egzogeni *SOX2*; *- fragmenti veličine približno 7 kb su rezultata hibridizacije *SOX2* probe sa fragmentima koji pokazuju visok stepen sličnosti, ali nisu specifični za *SOX2* gen.

4.2.6. Analiza ekspresije egzogenog *SOX2* gena kod stabilnih NT2/D1 ćelijskih klonova

U cilju detektovanja da li ćelijski klonovi, kod kojih je "Southern blot"-om potvrđena integracije *SOX2*/pcDNA3.1 konstrukta u genom, eksprimiraju egzogenu kopiju *SOX2* gena primenjene su "Northern blot" i semi-kvantitativna RT-PCR analize.

4.2.6.1. "Northern blot" analiza ekspresije egzogenog *SOX2* gena

"Northern blot"-om analizirana je ekspresija egzogenog *SOX2* gena kod ćelijskih klonova označenih kao B4, B5, C2, F5 i G3. Kod svih analiziranih ćelijskih klonova, kao i kod NT2/D1 ćelija detektovan je transkript veličine oko 3500 nt koji je rezultat ekspresije endogenog *SOX2* gena. Transkript veličine oko 1200 nt (rezultat ekspresije egzogenog *SOX2* gena) detektovan je kod F5 i G3 ćelijskih klonova, ali ne i kod B4, B5 i C2 ćelijskih klonova (Slika 19). Razlozi za odsustvo ekspresije egzogenog *SOX2* gena kod B4, B5 i C2 ćelijskih klonova, kod kojih je "Southern blot" analiza potvrdila integraciju konstrukta u genom, mogu biti integracija konstrukta u heterohromatin ili utišavanje ekspresije egzogenog *SOX2* gena što je opisano u literaturi kod stabilnih transfektanata EM i EK ćelija (Liew, 2007).



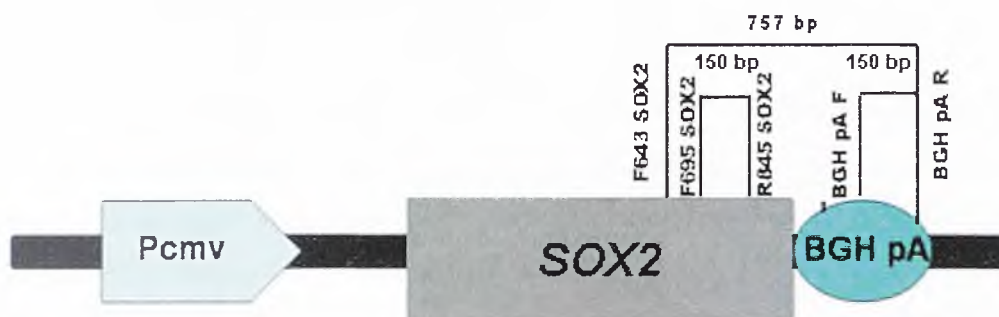
Slika 19. "Northern blot" analiza NT2/D1 ćelijskih klonova upotrebom *SOX2*-specifične probe. Ekspresija egzogenog *SOX2* gena detektovana je kod F5 i G3 ćelijskih klonova.

4.2.6.2. Semi-kvantitativna RT-PCR analiza ekspresije egzogenog *SOX2* gena

Kako je "Northern blot" analiza pokazala da NT2/D1 ćelijski klonovi označeni kao B4, B5 i C2 ne ekspimiraju egzogeni *SOX2* gen, ekspresija egzogenog *SOX2* gena je dalje analizirana semi-kvantitativnim RT-PCR-om kod ćelijskih klonova označenih kao F5 i G3. Takođe semi-kvantitativnim RT-PCR-om analizirana je ekspresija egzogenog *SOX2* gena i kod F2 ćelijskog klona, kod koga je "Southern blot" analiza potvrdila integraciju konstrukta u genom. U tu svrhu, izolati totalne RNK ovih ćelijskih klonova kao i NT2/D1 ćelija, prečišćeni od ostataka DNK, su korišćeni kao matrice za sintezu komplementarne DNK (cDNK). Ove cDNK su korišćene kao matrice za PCR reakciju.

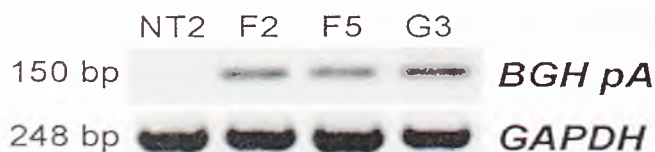
4.2.6.2.1. Analiza ekspresije egzogenog *SOX2* gena korišćenjem oligonukleotida specifičnih za sekvencu veštačkog poli A signala

Prvi korak u utvrđivanju da li F2, F5 i G3 ćelijski klonovi ekspimiraju egzogeni *SOX2* gen bila je semi-kvantitativna RT-PCR analiza korišćenjem oligonukleotida specifičnih za sekvencu veštačkog poli A signala vektora (Slika 20, 21). Naime, pcDNA3.1 ekspresioni vektor poseduje veštački poli A signal (BGH pA) koji omogućava efikasan završetak transkripcije kloniranog gena. Sekvenca za poliadenilaciju gena za hormon rasta goveda (BGH pA) uklonirana je nizvodno od CMV promotora i polilinkera pcDNA3.1 vektora. Kako je BGH pA sekvenca specifična za vektor i ne nalazi se u genomu NT2/D1 ćelija, PCR produkt dobijen primenom oligonukleotida specifičnih za ovu sekvencu, ukazuje na ekspresiju egzogenog *SOX2* gena (Slika 20). Kao rezultat PCR umnožavanja korišćenjem ovih oligonukleotida dobija se produkt veličine 150 bp.



Slika 20. Strategija amplifikacije i pozicija oligonukleotida korišćenih za PCR detekciju ekspresije egzogenog i ukupnog *SOX2* gena. BGH pA F i BGH pA R oligonukleotidi su specifični za sekvencu veštačkog poli A signala pcDNA3.1+ vektora, a F643 *SOX2*, F695 *SOX2* i F845 *SOX2* oligonukleotidi su specifični za sekvencu *SOX2* gena. Pcmv- promotor citomegalovirusa; *SOX2* – kodirajući region humanog *SOX2* gena; BGH pA- sekvenca za poliadenilaciju gena za hormon rasta goveda.

Na Slici 21 su prikazani PCR produkti nakon elektroforeze na 2% gelu od agaroze. PCR produkti odgovarajuće veličine (150 bp) detektovani su kod sva tri analizirana NT2/D1 ćelijska klonova. Kao što se i očekivalo PCR proizvod nije detektovan kada je kao matrica korišćena cDNK izolovana iz netransfektovanih NT2/D1 ćelija jer ove ćelije u svom genomu ne poseduju sekvencu za poliadenilaciju gena za hormon rasta goveda. Detekcija PCR produkta odgovarajuće veličine ukazuje na ekspresiju egzogenog *SOX2* gena kod analiziranih ćelijskih klonova.



Slika 21. Analiza ekspresije egzogenog *SOX2* gena primenom oligonukleotida specifičnih za sekvencu veštačkog poli A signala. U PCR reakciji su korišćeni oligonukleotidi specifični za sekvencu veštačkog poli A signala. Dobijeni PCR produkti su razdvojeni na 2% gelu od agaroze. Kod ćelijskih klonova, ali ne i kod NT2/D1 ćelija, primenom ovih oligonukleotida dobijen je produkt odgovarajuće veličine (150 bp). PCR reakcija sa *GAPDH* specifičnim oligonukleotidima služila je kao kontrola za normalizaciju količine matrice. NT2- NT2/D1 ćelije; F2, F5, G3- NT2/D1 ćelijski klonovi.

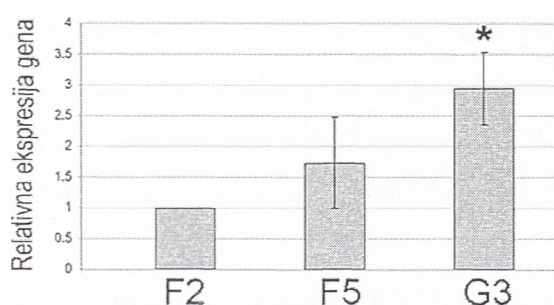
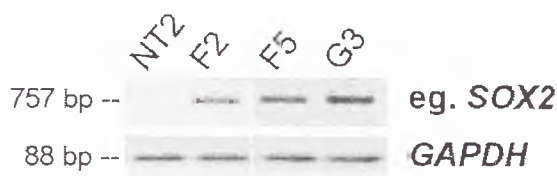
4.2.6.2.2. Analiza ekspresije egzogenog *SOX2* gena primenom oligonukleotida specifičnih za egzogenu kopiju *SOX2* gena

Kako u ćelijama domaćina nakon transfekcije može doći do fragmentacije konstrukta, postoji mogućnost da se u genom domaćina ugradi sekvenca veštačkog poli A signala, ali ne egzogeni *SOX2* gen. U cilju utvrđivanja da li ćelijski klonovi kod kojih je detektovan PCR produkt korišćenjem oligonukleotida specifičnih za sekvencu veštačkog poli A signala, eksprimiraju i egzogenu kopiju *SOX2* gena, primenjena je semi-kvantitativna RT-PCR analiza sa oligonukleotidom specifičnim za *SOX2* kodirajuću sekvencu (F643 *SOX2*) i reverznim oligonukleotidom specifičnim za sekvencu veštačkog poli A signala pcDNA3.1 vektora (BGH pA R) (Slika 20). Ovom kombinacijom oligonukleotida moguće je detektovati isključivo ekspresiju egzogenog *SOX2* gena jer sekvenca koju prepoznaje reverzni oligonukleotid vodi poreklo od veštačkog 3' netranslatirajućeg regiona (UTR). Kao rezultat PCR umnožavanja primenom ovih oligonukleotida dobija se produkt veličine 757 bp.

Nakon PCR umnožavanja produkti su razdvojeni na 2% gelu od agaroze i kod sva tri analizirana ćelijska klonova (F2, F5 i G3) detektovani su PCR produkti odgovarajuće veličine (757 bp) (Slika 22). Kao što se i očekivalo, i ovom kombinacijom oligonukleotida PCR produkt nije detektovan kada je kao matrica korišćena cDNK izolovana iz netransfektovanih NT2/D1 ćelija, jer ove ćelije u svom genomu ne poseduju sekvencu za poliadenilaciju gena za hormon rasta goveda, odnosno u genomu NT2/D1 ćelija ne postoji sekvenca komplementarna reverznom oligonukleotidu.

U cilju kvantifikacije ekspresije egzogenog *SOX2* gena kod analiziranih ćelijskih klonova, urađena je normalizacija nivoa ekspresije na osnovu poređenja sa ekspresijom gena za gliceraldehid 3- fosfat dehidrogenazu (*GAPDH*) (Slika 22). *GAPDH* je konstitutivno eksprimiran gen (Barber, 2005). Konstitutivno eksprimirani geni su geni čiji su produkti neophodni za održavanje osnovnih ćelijskih funkcija i konstitutivno su eksprimirani u svim humanim ćelijama (Eisenberg i Levanon, 2003), odnosno u svim ćelijama očekuje se prisustvo iste količine transkripta ovih gena. Kod analiziranih ćelijskih klonova i NT2/D1 ćelija nakon PCR umnožavanja (korišćenjem *GAPDH*

specifičnih oligonukleotida) i razdvajanja na 2% gelu od agaroze detektovani su PCR produkti odgovarajuće veličine (88 bp).



Slika 22. Analiza ekspresije egzogenog *SOX2* gena u NT2/D1 ćelijskim klonovima. U PCR reakciji su korišćeni oligonukleotidi F643 *SOX2* i BGH pA R koji omogućavaju detekciju ekspresije egzogenog *SOX2* gena. Dobijeni PCR produkti su razdvojeni na 2% gelu od agaroze. Kod ćelijskih klonova, ali ne i kod NT2/D1 ćelija, primenom ovih oligonukleotida dobijen je produkt odgovarajuće veličine (757 bp). PCR reakcija sa *GAPDH* specifičnim oligonukleotidima služila je kao kontrola za normalizaciju količine matrice. Rađena su tri nezavisna eksperimenta od kojih je jedan prikazan. Detektovani PCR produkti su digitalizovani i kvantifikovani uz pomoć ImageJ softvera i normalizovani u odnosu na *GAPDH* vrednosti. Relativna ekspresija gena je izračunata kao stepen povećanja ekspresije u poređenju sa ekspresijom kod F2 ćelijskog klona, kojoj je zadata vrednost 1. Rezultati tri nezavisna eksperimenta su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SD. NT2- NT2/D1 ćelije; F2, F5, G3- NT2/D1 ćelijski klonovi.

Kako PCR produkt nije detektovan kada je kao matrica korišćena cDNK poreklom iz NT2/D1 ćelija, relativna ekspresija egzogenog *SOX2* gena kod ćelijskih klonova izračunata je kao stepen povećanja ekspresije u poređenju sa ekspresijom detektovanom kod F2 ćelijskog klona. Na osnovu relativne kvantifikacije može se zaključiti da ne postoji statistički značajna razlika u ekspresiji egzogenog *SOX2* gena između F2 i F5 ćelijskih klonova, dok G3 ćelijski klon ima približno tri puta veću

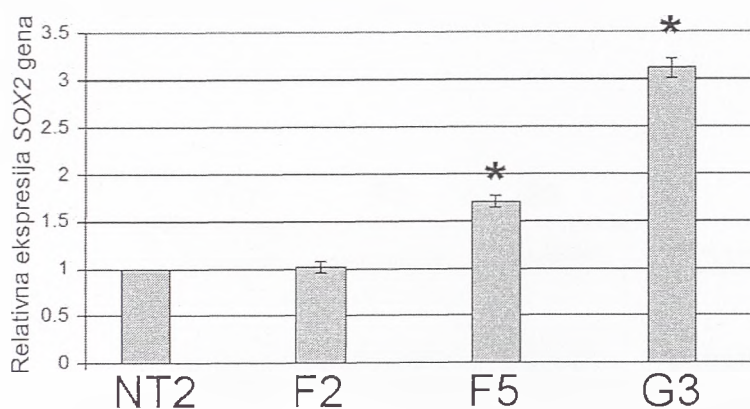
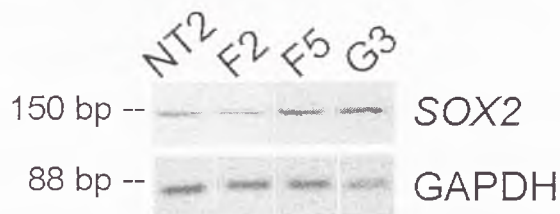
ekspresiju egzogenog *SOX2* gena u poređenju sa ekspresijom detektovanom kod F2 ćelijskog klona (Slika 22).

4.2.7. Analiza ukupne ekspresije *SOX2* gena u NT2/D1 ćelijskim klonovima

Nakon utvrđivanja da F2, F5 i G3 ćelijski klonovi eksprimiraju egzogeni *SOX2* gen, semi-kvantitativnim RT-PCR-om analizirano je da li ovi ćelijski klonovi imaju povećanu ukupnu ekspresiju *SOX2* gena u poređenju sa ekspresijom detektovanom kod NT2/D1 ćelijama. U PCR reakciji korišćeni su oligonukleotidi koji omogućavaju umnožavanje i endogenog i egzogenog *SOX2* gena (oligonukleotidi F695 *SOX2* i F845 *SOX2*- Slika 20). Nakon PCR umnožavanja i razdvajanja na 2% gelu od agaroze kod NT2/D1 ćelija i ćelijskih klonova detektovan je PCR produkt odgovarajuće veličine (150 bp) (Slika 23).

U cilju kvantifikacije ukupne ekspresije *SOX2* gena kod NT2/D1 ćelija i analiziranih ćelijskih klonova, urađena je normalizacija nivoa ekspresije na osnovu *GAPDH* ekspresije (Slika 23). Ukupna ekspresija *SOX2* gena je kod F5 ćelijskog klona povećana oko 1,7 puta, a kod G3 ćelijskog klona oko 3,1 puta u poređenju sa ekspresijom *SOX2* gena kod NT2/D1 ćelija. Pored toga, nije utvrđena statistički značajna razlika u ekspresiji *SOX2* gena između F2 ćelijskog klona i NT2/D1 ćelija. Rezultati dobijeni ovom analizom su u skladu sa rezultatima dobijenim primenom PCR u realnom vremenu (Slika nije prikazana). Imajući u vidu ove podatke, u daljem radu za analizu ekspresije gena korišćena je metoda semi-kvantitativnog RT-PCR-a.

Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da su generisana dva NT2/D1 ćelijska klona F5 i G3 sa povećanom ekspresijom *SOX2* gena i oni su korišćeni u daljim analizama.



Slika 23. **Analiza ukupne ekspresije *SOX2* gena u NT2/D1 ćelijskim klonovima.** U PCR reakciji su korišćeni oligonukleotidi koji omogućavaju detekciju ukupne ekspresije *SOX2* gena. Kod NT2/D1 ćelija i ćelijskih klonova nakon PCR umnožavanja i razdvajanja na 2% gelu od agaroze detektovani su produkti odgovarajuće veličine (150 bp). PCR reakcija sa *GAPDH* specifičnim oligonukleotidima služila je kao kontrola za normalizaciju količine matrice. Rađena su tri nezavisna eksperimenta od kojih je jedan prikazan. Detektovani PCR produkti su digitalizovani i kvantifikovani uz pomoć ImageJ softvera i normalizovani u odnosu na *GAPDH* vrednosti. Relativna ekspresija gena je izračunata kao stepen povećanja ekspresije u poređenju sa ekspresijom u NT2/D1 ćelijama, kojoj je zadata vrednost 1. Rezultati tri nezavisna eksperimenta su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SD. NT2- NT2/D1 ćelije; F2, F5, G3- NT2/D1 ćelijski klonovi.

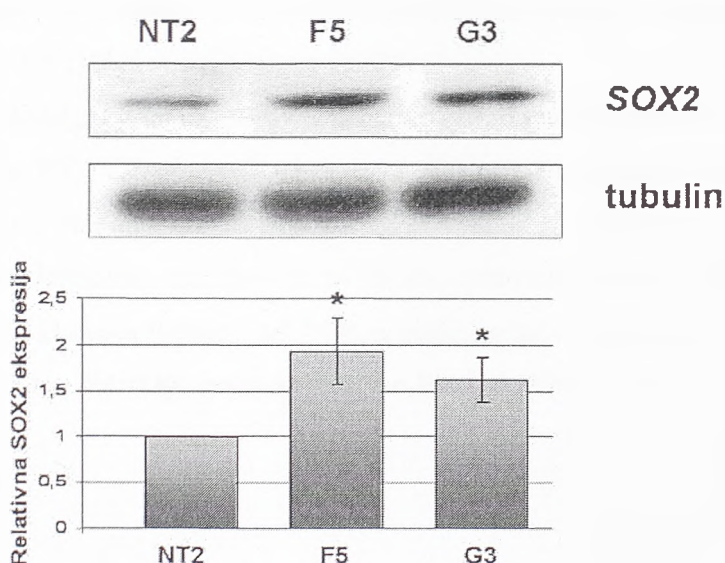
4.2.8. Analiza *SOX2* proteina kod NT2/D1 ćelijskih klonova sa povećanom ekspresijom *SOX2* gena

Sledeći korak u karakterizaciji generisanih stabilnih NT2/D1 ćelijskih klonova je bio utvrđivanje da li NT2/D1 ćelijski klonovi sa povećanom ekspresijom *SOX2* gena imaju i povećanu ekspresiju *SOX2* proteina. Primenjena je "Western blot" analiza (Slika 24) i rezultati ove analize ukazuju da je ukupna ekspresija *SOX2* proteina povećana i kod

F5 (60% povećanje) i kod G3 (40% povećanje) ćelijskog klona u poređenju sa ekspresijom kod izvornih NT2/D1 ćelija (Slika 24).

Pored toga, rezultati "Western blot" analize su potvrdili ekspresiju SOX2 proteina u NT2/D1 ćelijama, što je u saglasnosti sa literaturnim podacima (Lei, 2005).

Na osnovu rezultata "Western blot" analize može se zaključiti da oba ćelijska klona koja sadrže egzogenu kopiju *SOX2* gena imaju i povećanu ekspresiju SOX2 proteina.

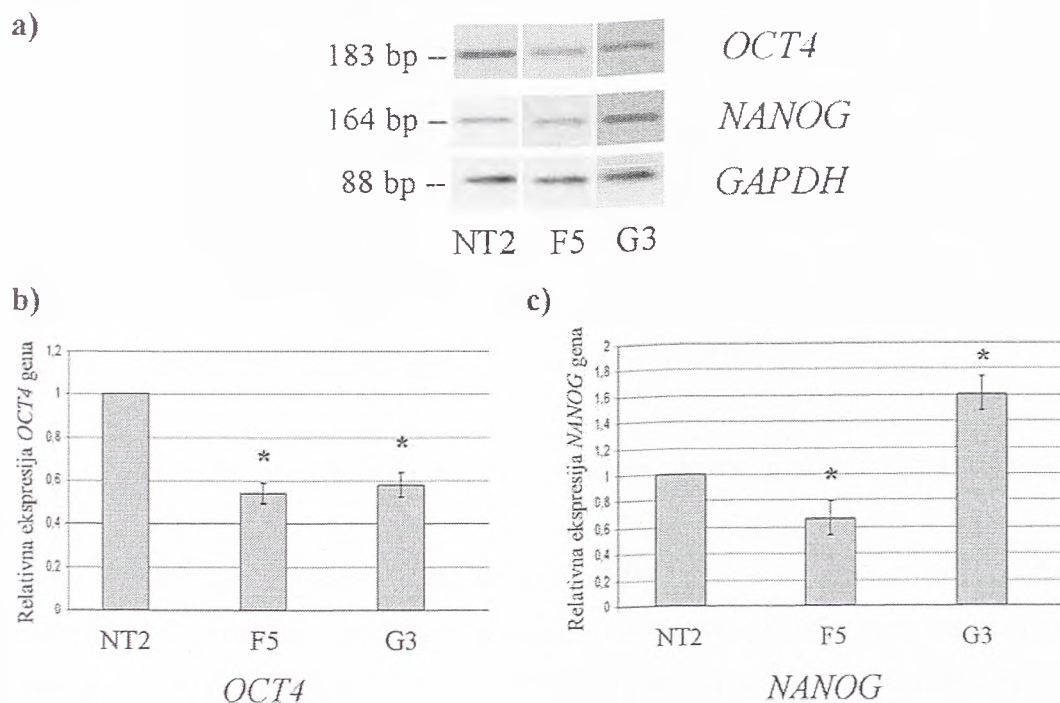


Slika 24. **Analiza ekspresija SOX2 proteina.** Ekspresija proteina je analizirana "Western blot"-om na ukupnim ćelijskim lizatima upotrebom antitela na SOX2 i na α -tubulin. Rađena su tri nezavisna eksperimenta od kojih je jedan prikazan. Imunoblotovi su digitalizovani, kvantifikovani uz pomoć ImageQuant verzija 5.2 softvera i normalizovani na vrednosti tubulina. Količina SOX2 proteina je preračunata u odnosu na stepen ekspresije detektovane kod NT2/D1 ćelija kojoj je zadata vrednost 1. Rezultati tri nezavisna eksperimenta su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SEM. NT2- NT2/D1 ćelije; F5, G3- NT2/D1 ćelijski klonovi.

4.2.9. Analiza ekspresije markera pluripotentnosti (*OCT4*, *NANOG*) kod F5 i G3 ćelijskih klonova

Nakon generisanja dva stabilna NT2/D1 ćelijska klona F5 i G3 sa povećanom ekspresijom *SOX2* gena analizirano je da li povećana ekspresija *SOX2* gena kod ovih ćelijskih klonova moduliše ekspresiju *OCT4* i *NANOG*-a. Podaci iz literature ukazuju da tranzijentno povećana ekspresija *Sox2* gena kod embrionalnih karcinomskih F9 ćelija miša dovodi do smanjenja endogene ekspresije *Oct4* i *Nanog* gena, kao i do smanjenja aktivnosti promotora ova dva gena (Boer, 2007). Pored toga, Adachi i saradnici su pokazali da povećana ekspresija *SOX2* gena u humanim embrionalnim matičnim ćelijama smanjuje ekspresiju *OCT4* i *NANOG*-a (Adachi, 2010).

U cilju utvrđivanja nivoa ekspresije ova dva markera pluripotentnosti, primenjena je semi-kvantitativna RT-PCR analiza korišćenjem oligonukleotida specifičnih za *OCT4*, odnosno *NANOG* gen. Nakon PCR umnožavanja, produkti su razdvojeni na 2% gelu od agaroze. Sa oligonukleotidima specifičnim za *OCT4*, odnosno *NANOG*, i kod NT2/D1 ćelija i kod ćelijskih klonova dobijeni su PCR produkti odgovarajućih veličina (*OCT4*-produkt veličine 183 bp; *NANOG*-produkt veličine 164 bp) (Slika 25a).



Slika 25. Analiza ekspresije *OCT4* i *NANOG* gena u NT2/D1 ćelijskim klonovima. U PCR reakcijama su korišćeni oligonukleotidi koji omogućavaju detekciju *OCT4* i *NANOG* gena. Kod NT2/D1 ćelija i ćelijskih klonova nakon PCR umnožavanja i razdvajanja na 2% gelu od agaroze detektovani su produkti odgovarajućih veličina (*OCT4*- 183 bp; *NANOG*- 164 bp). PCR reakcija sa *GAPDH* specifičnim oligonukleotidima služila je kao kontrola za normalizaciju količine matrice. Radena su tri nezavisna eksperimenta od kojih je jedan prikazan. Detektovani PCR produkti su digitalizovani i kvantifikovani uz pomoć ImageJ softvera i normalizovani u odnosu na *GAPDH* vrednosti. Relativna ekspresija gena je izračunata kao stepen promene ekspresije u poređenju sa ekspresijom u NT2/D1 ćelijama, kojoj je zadata vrednost 1. Rezultati tri nezavisna eksperimenta su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SD. NT2- NT2/D1 ćelije; F5, G3- NT2/D1 ćelijski klonovi.

U cilju kvantifikacije ekspresije *OCT4* i *NANOG* gena kod NT2/D1 ćelija i analiziranih ćelijskih klonova, urađena je normalizacija nivoa ekspresije u poređenju sa ekspresijom *GAPDH* gena (Slika 25). Detektovano je statistički značajno smanjenje ekspresije *OCT4* gena (približno 2 puta) kod oba ispitivana ćelijska klona u poređenju sa

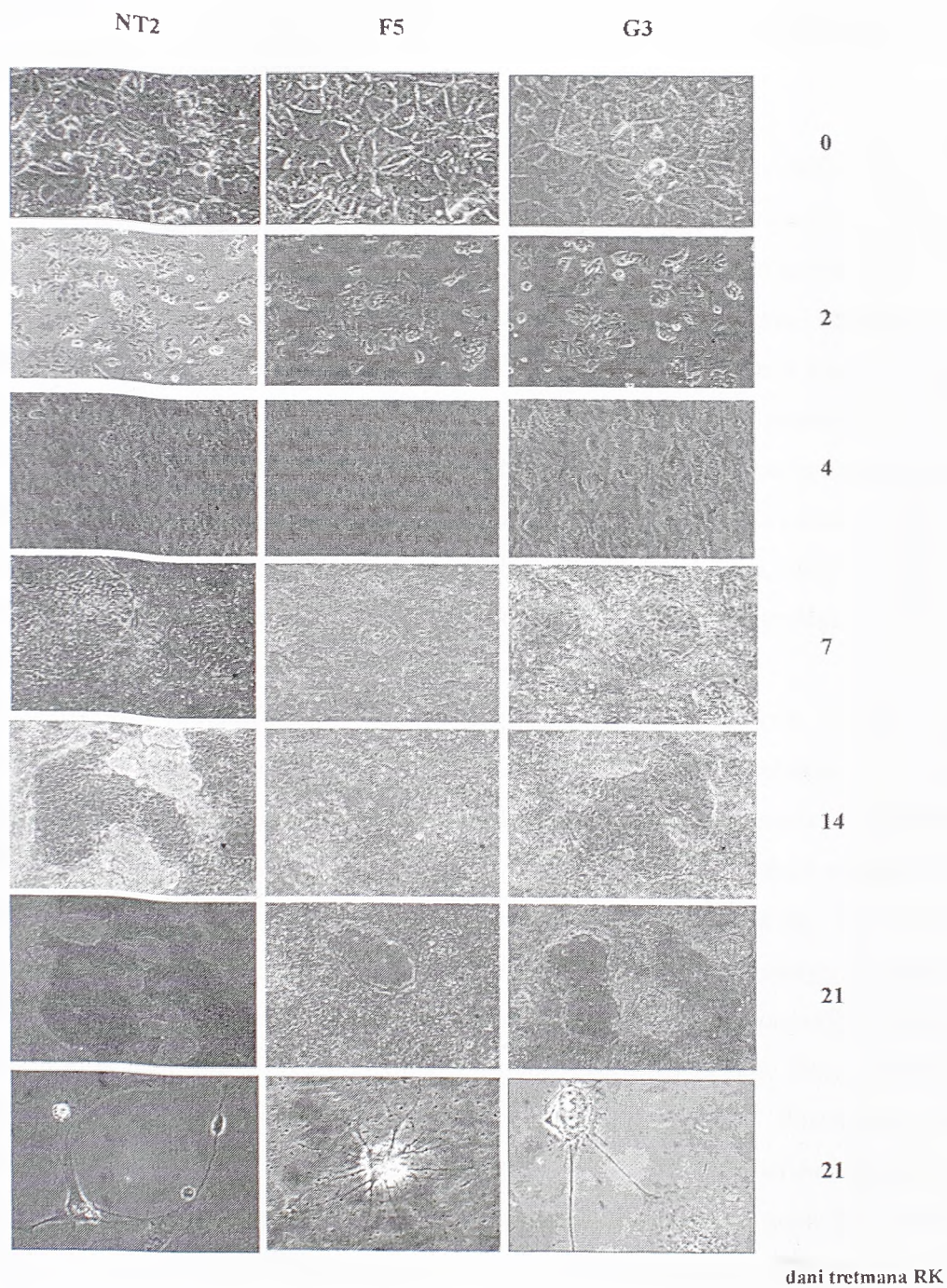
ekspresijom ovog gena kod NT2/D1 ćelijama (Slika 25b). Ekspresija *NANOG* gena je bila smanjena za jednu trećinu kod F5 ćelijskog klona, odnosno povećana oko 1,6 puta kod G3 ćelijskog klona u poređenju sa ekspresijom detektovanom kod NT2/D1 ćelija (Slika 25c).

Dobijeni rezultati ukazuju da promene u ukupnoj ekspresiji *SOX2* gena (povećanje od 1,7 i 3,1 puta) utiču na ekspresiju ključnih markera pluripotentnosti, *OCT4* i *NANOG*-a.

4.2.10. Povećana ekspresija *SOX2* gena i neuralna diferencijacija

4.2.10.1. Diferencijacija stabilnih NT2/D1 ćelijskih klonova u prisustvu retinoične kiseline

Nakon utvrđivanja da povećana ekspresija *SOX2* gena utiče na ekspresiju markera pluripotentnosti, analiziran je efekat povećane ekspresije *SOX2* gena na neuralnu diferencijaciju NT2/D1 ćelijskih klonova. NT2/D1 ćelije u prisustvu retinoične kiseline (RK) diferenciraju u različite tipove ćelija uključujući i terminalno diferencirane neurone i astrocite (Andrews, 1984a; Pleasure i Lee, 1993; Sandhu, 2002). Sposobnost diferencijacije F5 i G3 ćelijskih klonova je praćena tokom tri nedelje tretmana RK (Slika 26). Vizuelnim posmatranjem se može uočiti da NT2/D1 ćelije i oba ćelijska klona formiraju visoko konfluentne fokuse. Međutim u toku tretmana kod ćelijskih klonova, kao i kod NT2/D1 ćelija, mala frakcija ćelija menja morfologiju i formiraju se ćelije koje po morfologiji podsećaju na neurone (Slika 26). Fokusi ćelija promenjene morfologije uočavaju se sedmog dana tretmana RK kod NT2/D1 ćelija i G3 ćelijskog klona, odnosno četrnaestog dana kod F5 ćelijskog klona (Slika 26). Dvadeset prvog dana tretmana RK broj fokusa sa ćelijama promenjene morfologije je najveći kod NT2/D1 ćelija, a najmanji kod F5 ćelijskog klona. Na osnovu vizuelnog posmatranja može se zaključiti da ćelijski klonovi sa povećanom ekspresijom *SOX2* gena zadržavaju sposobnost diferencijacije u prisustvu RK.

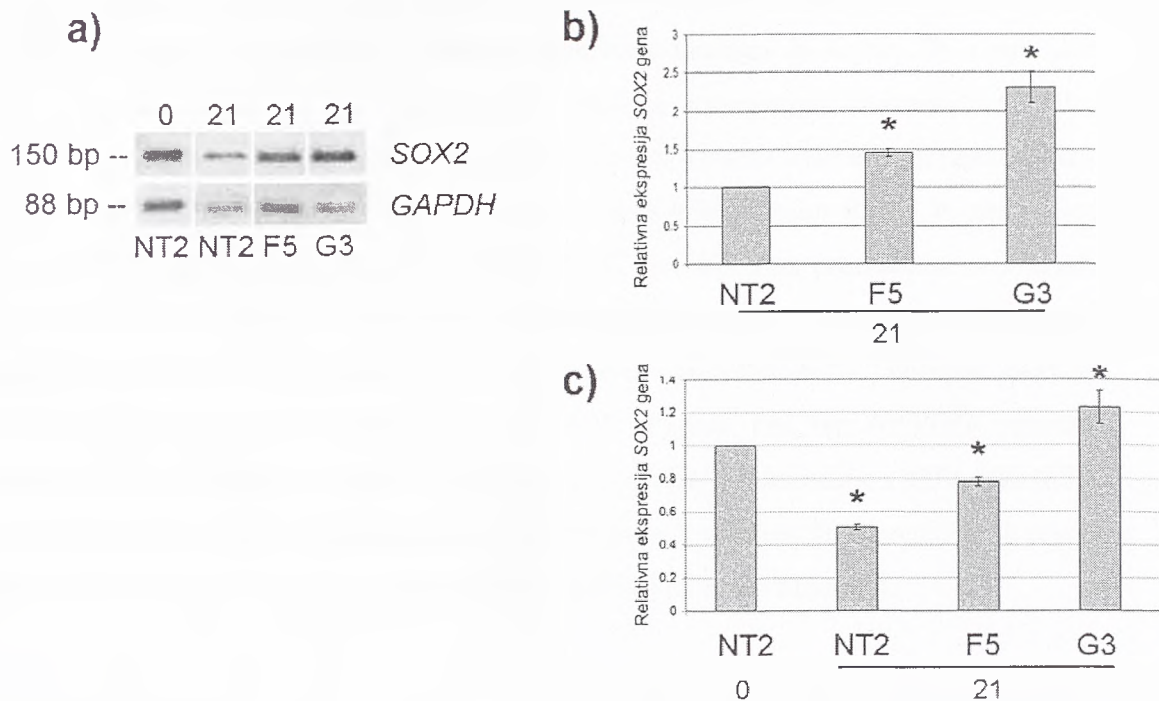


Slika 26. Diferencijacija NT2/D1 ćelijskih klonova u prisustvu RK. NT2/D1 ćelije i NT2/D1 ćelijski klonovi su posmatrani invertnim Olympus IMT2 mikroskopom tokom dvadeset jednog dana tretmana RK pod uveličanjem od 10x. U toku tretmana mala frakcija ćelija se diferencirala u ćelije koje po morfologiji podsećaju na neurone.

4.2.10.2. Analiza ekspresija *SOX2* gena kod NT2/D1 ćelijskih klonova tokom tri nedelje tretmana retinoičnom kiselinom

Kako je vizuelnim posmatranjem uočeno da NT2/D1 ćelijski klonovi sa povećanom ekspresijom *SOX2* gena zadržavaju sposobnost diferencijacije u prisustvu RK, sledeći korak je bio utvrđivanje da li F5 i G3 ćelijski klonovi održavaju ekspresiju *SOX2* gena tokom tretmana RK u trajanju od tri nedelje. Naime, literaturni podaci ukazuju da se ekspresija *SOX2* gena kod NT2/D1 ćelija smanjuje u toku tretmana RK (Stevanovic, 2003). U cilju analize ekspresije *SOX2* gena, primenjena je semi-kvantitativna RT-PCR analiza korišćenjem oligonukleotida koji omogućavaju detekciju ukupne ekspresije *SOX2* gena. Nakon umnožavanja, PCR produkti su razdvojeni na 2% gelu od agaroze i sa *SOX2* specifičnim oligonukleotidima, koji omogućavaju umnožavanje i egzogenog i endogenog *SOX2* gena, dobijen je produkt odgovarajuće veličine (150 bp) (Slike 27a).

U cilju kvantifikacije ukupne ekspresije *SOX2* gena kod NT2/D1 ćelija i analiziranih ćelijskih klonova, urađena je normalizacija nivoa ekspresije u poređenju sa ekspresijom *GAPDH* gena. Na osnovu relativne kvantifikacije može se zaključiti da ćelijski klonovi zadržavaju povećanu ekspresiju *SOX2* gena i nakon dvadeset jednog dana tretmana RK. Naime, ekspresija *SOX2* gena je bila povećana oko 1,4 puta kod F5 ćelijskog klona, odnosno 2,3 puta kod G3 ćelijskog klona, u poređenju sa ekspresijom kod tretiranih NT2/D1 ćelija (Slika 27b). Kao što se i očekivalo, ekspresija *SOX2* gena je bila 2 puta manja kod NT2/D1 ćelija tretiranih tokom tri nedelje RK u poređenju sa ekspresijom detektovanom kod netretiranih ćelija (Slika 27c). Pored toga, ukupna ekspresija *SOX2* gena kod G3 ćelijskog klona tretiranog tokom tri nedelje RK je bila povećana približno 1,3 puta u poređenju sa ekspresijom *SOX2* gena kod netretiranih NT2/D1 ćelija. Ovi rezultati ukazuju na to da ćelijski klonovi ulaze u diferencijaciju čak i u prisustvu povećane ekspresije *SOX2* gena.

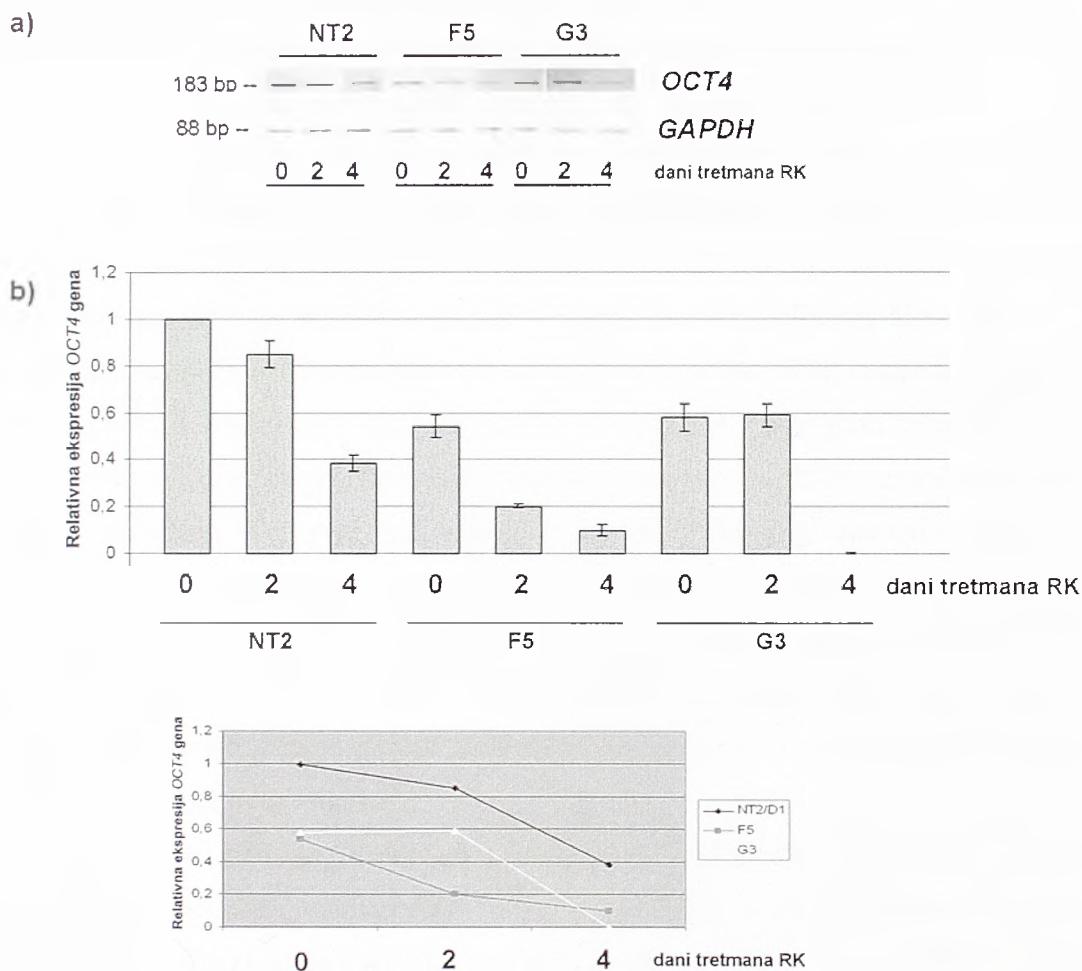


Slika 27. Analiza ukupne ekspresije *SOX2* gena tokom tretmana RK u trajanju od tri nedelje. U PCR reakciji su korišćeni oligonukleotidi koji omogućavaju detekciju i egzogenog i endogenog *SOX2* gena. Kod NT2/D1 ćelija i ćelijskih klonova, tretiranih i netretiranih RK tokom tri nedelje, nakon PCR umnožavanja i razdvajanja na 2% gelu od agaroze detektovani su produkti odgovarajuće veličine (150 bp). PCR reakcija sa *GAPDH* specifičnim oligonukleotidima služila je kao kontrola za normalizaciju količine matrice. Rađena su tri nezavisna eksperimenta od kojih je jedan prikazan. Detektovani PCR produkti su digitalizovani i kvantifikovani uz pomoć ImageJ softvera i normalizovani u odnosu na *GAPDH* vrednosti. Relativna ekspresija gena je izračunata kao stepen promene ekspresije u poređenju sa ekspresijom u NT2/D1 ćelijama tretiranim RK tokom tri nedelje (b) ili u poređenju sa ekspresijom u netretiranim NT2/D1 ćelijama (c), kojima je zadata vrednost 1. Rezultati tri nezavisna eksperimenta su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SD. NT2- NT2/D1 ćelije; F5, G3- NT2/D1 ćelijski klonovi; 0- bez tretmana RK; 21- tretman RK u trajanju od 3 nedelje.

4.2.11. Analiza ekspresija *OCT4* i *NANOG* gena u ćelijskim klonovima F5 i G3 tokom tretmana RK

Kako je prethodnim eksperimentima pokazano da NT2/D1 ćelijski klonovi sa povećanom ekspresijom *SOX2* gena ulaze u diferencijaciju u prisustvu RK, pristupilo se

analizi ekspresije markera pluripotentnosti (*OCT4* i *NANOG*) kod F5 i G3 ćelijskih klonova tretiranih četiri dana RK. Podaci iz literature ukazuju da su rane faze neuralne diferencijacije NT2/D1 ćelija tretiranih RK praćene smanjenjem ekspresije *OCT4* i *NANOG* gena (Deb-Rinker, 2005). Ekspresija ova dva ključna markera pluripotentnosti kod F5 i G3 ćelijskih klonova analizirana je semi-kvantitativnim RT-PCR-om tokom tretmana RK u trajanju od četiri dana. Nakon PCR umnožavanja, produkti su razdvojeni na 2% gelu od agaroze. Sa oligonukleotidima specifičnim za *OCT4*, odnosno *NANOG*, i kod NT2/D1 ćelija i kod ćelijskih klonova (tretiranih i netretiranih RK) dobijeni su PCR produkti odgovarajućih veličina (*OCT4*- produkt veličine 183 bp; *NANOG*- produkt veličine 164 bp) (Slika 28 i Slika 29). U cilju kvantifikacije ekspresije *OCT4* i *NANOG* gena kod NT2/D1 ćelija i analiziranih ćelijskih klonova, urađena je normalizacija nivoa ekspresije u poređenju sa ekspresijom *GAPDH* gena (Slika 28 i Slika 29).



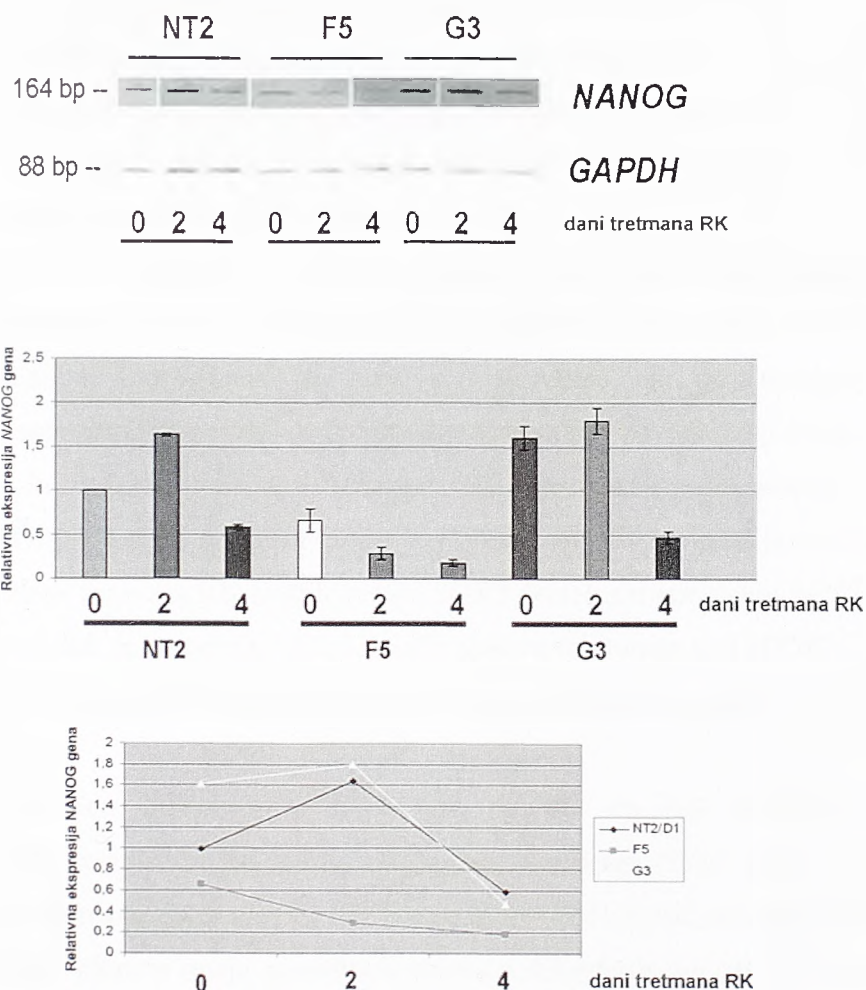
Slika 28. Analiza ekspresije *OCT4* gena kod NT2/D1 ćelijskih klonova sa povećanom ekspresijom *SOX2* gena tokom ranih faza neuralne diferencijacije indukovane tretmanom RK. U PCR reakciji su korišćeni oligonukleotidi koji omogućavaju detekciju *OCT4* gena. Kod NT2/D1 ćelija i ćelijskih klonova (tretiranih i netretiranih RK) nakon PCR umnožavanja i razdvajanja na 2% gelu od agaroze detektovan je produkt odgovarajućih veličina (183 bp). PCR reakcija sa *GAPDH* specifičnim oligonukleotidima služila je kao kontrola za normalizaciju količine matrice. Rađena su tri nezavisna eksperimenta od kojih je jedan prikazan. Detektovani PCR produkti su digitalizovani i kvantifikovani uz pomoć ImageJ softvera i normalizovani u odnosu na *GAPDH* vrednosti. Relativna ekspresija gena je izračunata kao stepen promene ekspresije u poređenju sa ekspresijom u netretiranim NT2/D1 ćelijama, kojoj je zadata vrednost 1. Rezultati tri nezavisna eksperimenta su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SD. NT2-NT2/D1 ćelije; F5, G3- NT2/D1 ćelijski klonovi; 0, 2, 4- dani tretmana RK.

Rezultati relativne kvantifikacije ukazuju da se ekspresija *OCT4* gena (Slika 28) smanjuje kod NT2/D1 ćelija i analiziranih ćelijskih klonova tokom tretmana RK, što je u saglasnosti sa podacima iz literature. Drugog dana tretmana RK kod NT2/D1 ćelija dolazi do blagog smanjenja ekspresije *OCT4* gena (smanjenje ekspresije za 15%), da bi četvrtog dana tretmana ekspresija bila drastično smanjena i iznosila približno 40% vrednosti detektovane kod netretiranih ćelija. Dva dana RK-om tretirani ćelijski klonovi se međusobno razlikuju po ekspresiji *OCT4* gena. Kod F5 ćelijskog klona dolazi do drastičnog smanjenja ekspresije *OCT4* gena (smanjenje za oko 60%), a kod G3 ćelijskog klona ne postoji statistički značajna razlika u ekspresiji ovog gena u poređenju sa netretiranim ćelijama. Nakon drastičnog smanjenja ekspresije *OCT4* gena drugog dana tretmana, ekspresija ovog gena nastavlja da se smanjuje i četvrtog dana tretmana kod F5 ćelijskog klona i iznosi 18% vrednosti detektovane kod netretiranih ćelija. Kod G3 ćelijskog klona četvrtog dana tretmana dolazi do drastičnog smanjenja ekspresije *OCT4* gena. Pored toga, na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da ćelijski klonovi četvrtog dana imaju znatno manju ekspresiju *OCT4* gena u poređenju sa NT2/D1 ćelijama četiri dana tretiranim RK.

Na osnovu podataka dobijenih relativnom kvantifikacijom ekspresije *NANOG* gena u toku četiri dana tretmana RK može se zaključiti da se ekspresija ovog gena smanjuje kod NT2/D1 ćelija i NT2/D1 ćelijskih klonova u toku tretmana (Slika 29). Kod NT2/D1 ćelija drugog dana tretmana dolazi do povećanja ekspresije *NANOG*-a (60% povećanje), a zatim četvrtog dana dolazi do smanjenja ekspresije na približno 60% vrednosti detektovane kod netretiranih ćelija. Kod F5 ćelijskog klona ekspresija *NANOG*-a drugog dana tretmana se smanjuje na približno 50% vrednosti detektovane kod netretiranih ćelija, dok se četvrtog dana tretmana ekspresija *NANOG* gena smanjuje na 26% vrednosti detektovane kod netretiranih ćelija. Kod G3 ćelijskog klona, kao i u slučaju ekspresije *OCT4* gena, ne postoji statistički značajna razlika u ekspresiji *NANOG* gena između netretiranih ćelija i ćelija tretiranih dva dana RK, dok se četvrtog dana tretmana ekspresija smanjuje na približno 30% vrednosti detektovane kod netretiranih ćelija.

Detektovano smanjenje ekspresije ključnih markera pluripotentnosti pod dejstvom RK kod ćelijskih klonova sa povećanom ekspresijom *SOX2* gena dodatno

potvrđuje da ćelijski klonovi imaju sposobnost da uđu u diferencijaciju čak i u prisustvu povećane ekspresije *SOX2* gena.



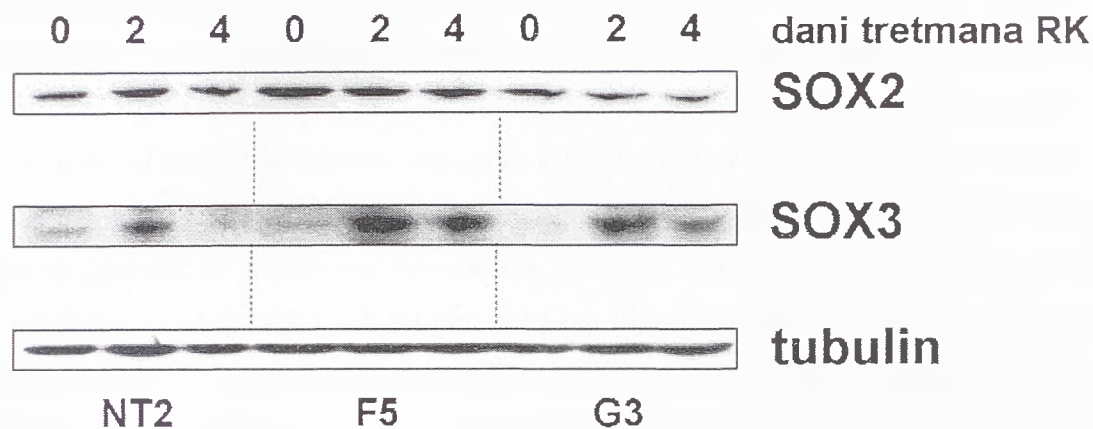
Slika 29. Analiza ekspresije *NANOG* gena kod NT2/D1 ćelijskih klonova sa povećanom ekspresijom *SOX2* gena tokom ranih faza neuralne diferencijacije indukovane tretmanom RK. U PCR reakciji su korišćeni oligonukleotidi koji omogućavaju detekciju *NANOG* gena. Kod NT2/D1 ćelija i ćelijskih klonova (tretiranih i netretiranih RK) nakon PCR umnožavanja i razdvajanja na 2% gelu od agaroze detektovan je produkt odgovarajućih veličina (164 bp). PCR reakcija sa *GAPDH* specifičnim oligonukleotida služila je kao kontrola za normalizaciju količine matrice. Rađena su tri nezavisna eksperimenta od kojih je jedan prikazan. Detektovani PCR produkti su digitalizovani i kvantifikovani uz pomoć ImageJ softvera i normalizovani u odnosu na *GAPDH* vrednosti. Relativna ekspresija gena je izračunata kao stepen promene ekspresije u poređenju sa ekspresijom u netretiranim NT2/D1 ćelijama, kojoj je zadata vrednost 1. Rezultati tri nezavisna eksperimenta su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SD. NT2- NT2/D1 ćelije; F5, G3- NT2/D1 ćelijski klonovi; 0, 2, 4- dani tretmana RK.

4.2.12. Analiza *SOX2* i *SOX3* proteina kod F5 i G3 ćelijskih klonova u toku tretmana RK

Imajući u vidu literaturne podatke koji ukazuju da je RK- indukovana neuronalna diferencijacija NT2/D1 ćelija praćena smanjenjem ekspresije *SOX2* i povećanjem ekspresije *SOX3* gena tokom ranih faza indukcije (Stevanovic, 2003), sledeći korak u istraživanju je bila analiza ekspresije *SOX2* i *SOX3* proteina kod F5 i G3 ćelijskih klonova tokom četiri dana tretmana RK (Slika 30).

Nivo proteina u ćelijama je određen "Western blot" analizom. Primenjenom analizom detektovano je da se nivo *SOX2* proteina kod NT2/D1 ćelija i NT2/D1 ćelijskih klonova sa povećanom ekspresijom *SOX2* gena ne menja tokom četiri dana tretmana RK. Za razliku od ekspresije *SOX2* proteina, dva dana tretmana RK dovode do porasta nivoa *SOX3* proteina, da bi nakon četiri dana tretmana došlo do smanjenja ekspresije *SOX3* proteina kod NT2/D1 ćelija i ćelijskih klonova. Pored toga, detektovano je da ćelijski klonovi drugog dana tretmana RK poseduju više *SOX3* proteina u poređenju sa NT2/D1 ćelijama. Dodatno, dok je ekspresija *SOX3* protein gotovo inhibirana kod NT2/D1 ćelija nakon četiri dana tretmana RK, značajne količine ovog proteina su i dalje detektovane kod ćelijskih klonova.

Imajući u vidu literaturne podatke koji ukazuju da kod NT2/D1 ćelija indukovanih na diferencijaciju RK dolazi do porasta ekspresije *SOX3* gena četrdeset osam sati nakon tretmana (Stevanovic, 2003), na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da ćelijski klonovi imaju sposobnost ulaska u diferencijaciju čak i u prisustvu povećane ekspresije *SOX2* gena.



Slika 30. Analiza SOX2 i SOX3 proteina kod NT2/D1 ćelijskih klonova tokom ranih faza indukcije RK. Ekspresija proteina je detektovana "Western blot" analizom na ukupnim ćelijskim lizatima upotrebom antitela na SOX2 (42 kDa), SOX3 (45 kDa) i α -tubulin (55 kDa). Ekspresija SOX2 proteina se ne menja tokom četiri dana tretmana RK, dok ekspresija SOX3 proteina raste nakon dva dana tretmana RK, a onda četvrtog dana tretmana opada. Rađena su tri nezavisna eksperimenta od kojih je jedan prikazan. NT2-NT2/D1 ćelije; F5, G3- NT2/D1 ćelijski klonovi; 0, 2, 4- dani tretmana RK.

4.2.13. Analiza ekspresije markera tri faze neuralne diferencijacije NT2/D1 ćelija kod F5 i G3 ćelijskih klonova u toku tretmana RK

Kako je analiza ekspresije *OCT4*, *NANOG* i *SOX3* gena, kao i vizuelno posmatranje F5 i G3 ćelijskih klonova ukazalo da ćelijski klonovi poseduju sposobnost ulaska u diferencijaciju, analizirana je ekspresija markera neuralne diferencijacije tokom tri nedelje tretmana RK. Przyborski i saradnici su pokazali da se RK-indukovana diferencijacija NT2/D1 ćelija u neurone može da podeli u tri faze (Przyborski, 2000). U toku prve faze koja se dešava tokom prve nedelje diferencijacije dolazi do nagomilavanja *nestin-a*, markera neuroprogenitora. U toku druge faze, ekspresija *nestin* gena se smanjuje i aktivira se ekspresija *neuroD1* gena, dok je porast ekspresija gena za sinaptofizin, markera zrelih neuralnih ćelija, detektovan tokom treće faze diferencijacije (Przyborski, 2000). U ovom radu posebna pažnja je bila usmerena na ekspresiju markera druge i treće faze u cilju dobijanja informacija ne samo o sposobnosti ulaska u neuralnu diferencijaciju ćelijskih klonova sa povećanom ekspresijom *SOX2* gena, već i o mogućnosti njihovog

ulaska u terminalne faze neuralne diferencijacije. Kod F5 i G3 ćelijskih klonova ekspresije *nestin* gena, markera prve faze neuralne diferencijacije, analizirana je tokom četiri dana tretmana RK semi- kvantitativnim RT-PCR-om, dok je ekspresija *neuroD1* gena i gena za sinaptofizin analizirana semi- kvantitativnim RT-PCR-om tokom tretmana RK u trajanju od tri nedelje. Nakon PCR umnožavanja, produkti su razdvojeni na 2% gelu od agaroze. Sa prajmerima specifičnim za *nestin*, odnosno *neuroD1* gen i gen za sinaptofizin, i kod NT2/D1 ćelija i kod ćelijskih klonova (tretiranih i netretiranih RK) dobijeni su PCR produkti odgovarajućih veličina (*nestin*- produkt veličine 311 bp; *neuroD1*- produkt veličine 453 bp; sinaptofizin- produkt veličine 276 bp). U cilju kvantifikacije ekspresije markera neuralne diferencijacije kod NT2/D1 ćelija i analiziranih ćelijskih klonova, urađena je normalizacija nivoa ekspresije u poređenju sa ekspresijom *GAPDH* gena.

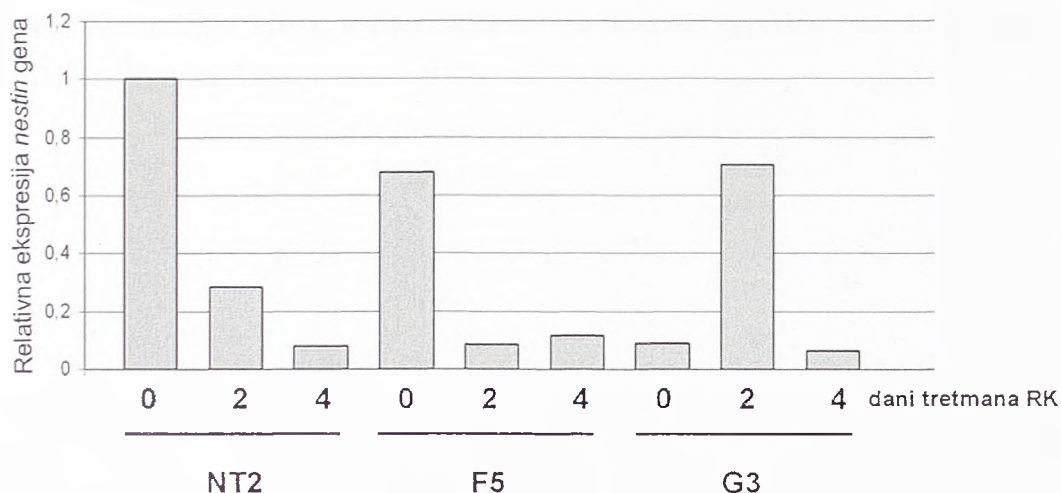
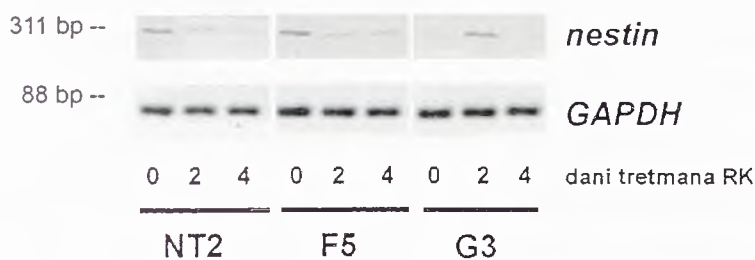
4.2.13.1. Analiza ekspresije *nestin* gena

Imajući u vidu literaturne podatke da je ekspresija *nestin*-a indukovana u ranim fazama neuralne diferencijacije (Przyborski, 2000), ekspresija ovog markera analizirana je kod NT2/D1 ćelija i ćelijskih klonova tokom četiri dana tretmana RK. Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da je *nestin*, marker prve faze neuralne diferencijacije, ekspimiran i kod netretiranih ćelija. Pored toga, ekspresija ovog markera kod netretiranih ćelijskih klonova je smanjena u poređenju sa ekspresijom detektovanom kod netretiranih NT2/D1 ćelija (Slika 31).

Kod NT2/D1 ćelija ekspresija *nestin* gena se smanjuje tokom tretmana RK.

Kod F5 ćelijskog klona ekspresija *nestin* gena je smanjena drugog dana tretmana RK u poređenju sa ekspresijom detektovanom kod netretiranog F5 ćelijskog klona, a zatim je detektovan porast ekspresije četvrtog dana tretmana u poređenju sa ekspresijom detektovanom drugog dana tretmana.

Kod G3 ćelijskog klona detektovane su fluktuacije u ekspresiji *nestin* gena. Porast ekspresije detektovan je drugog dana tretmana RK, a četvrtog dana tretmana je detektovano smanjenje ekspresije.

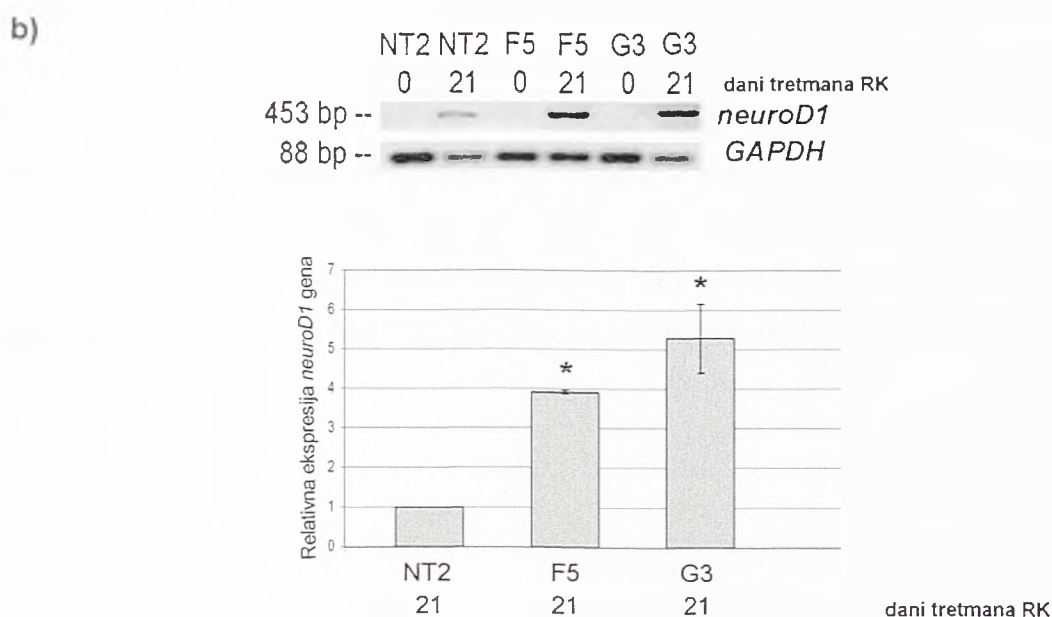
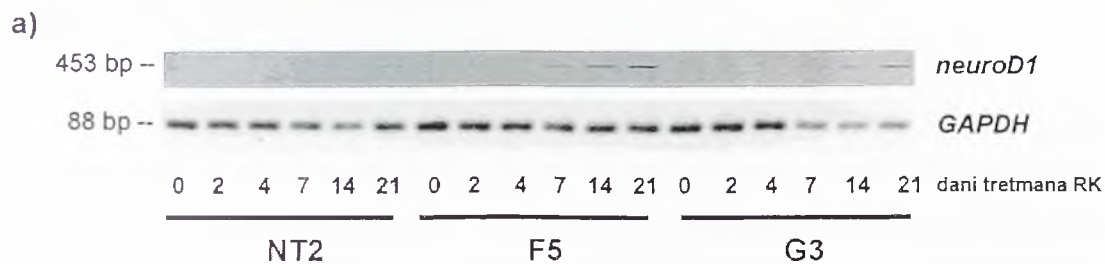


Slika 31. Analiza ekspresije *nestin* gena kod F5 i G3 ćelijskih klonova tokom tretmana RK. U PCR reakciji su korišćeni oligonukleotidi specifični za *nestin* gena. Kod NT2/D1 ćelija i ćelijskih klonova (tretiranih i netretiranih RK) nakon PCR umnožavanja i razdvajanja na 2% gelu od agaroze detektovan je produkt odgovarajućih veličina (311 bp). PCR reakcija sa *GAPDH* specifičnim oligonukleotidima služila je kao kontrola za normalizaciju količine matrice. Detektovani PCR produkti su digitalizovani i kvantifikovani uz pomoć ImageJ softvera i normalizovani u odnosu na *GAPDH* vrednosti. Relativna ekspresija gena je izračunata kao stepen promene ekspresije u poređenju sa ekspresijom u netretiranim NT2/D1 ćelijama, kojoj je zadata vrednost 1. NT2- NT2/D1 ćelije; F5, G3- NT2/D1 ćelijski klonovi; 0, 2, 4- dani tretmana RK.

4.2.13.2. Analiza ekspresije *neuroD1* gena

Ekspresija markera druge faze neuralne diferencijacije (*neuroD1*) detektovana je od sedmog dana tretmana RK i kod NT2/D1 ćelija i kod F5 i G3 ćelijskih klonova (Slika 32a). Sedmog dana tretmana približno isti nivo ekspresije uočen je kod NT2/D1 ćelija i ćelijskih klonova. Kod NT2/D1 ćelija četrnaestog dana tretmana detektovano je

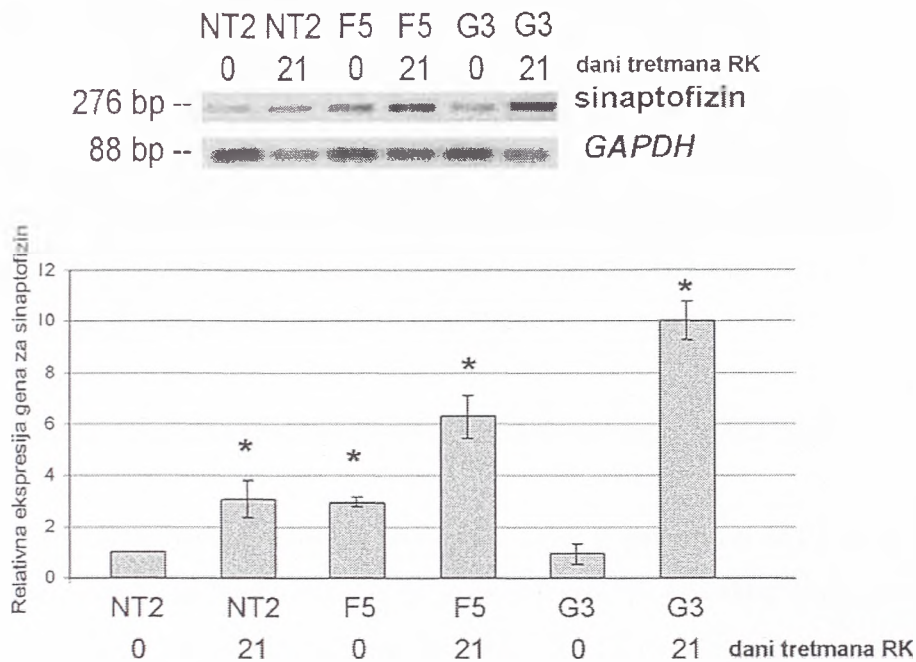
smanjenje ekspresije ovog markera, koje se nastavlja i dvadeset prvog dana (Slika 32a). Kod F5 i G3 ćelijskih klonova porast ekspresije *neuroD1* gena detektovan je četrnaestog dana, da bi najviši nivo ekspresije bio detektovan dvadeset prvog dana (Slika 32a). Relativna kvantifikacija ekspresije *neuroD1* gena urađena je dvadeset prvog dana tretmana imajući u vidu da je u tom periodu detektovan najviši nivo ekspresije ovog markera (Slika 32b). Rezultati relativne kvantifikacije ukazuju da je kod ćelijskih klonova ekspresija *neuroD1* gena povećana približno 3,9 puta (F5 ćelijski klon), odnosno 5,3 puta (G3 ćelijski klon), u poređenju sa ekspresijom detektovanom kod tretiranih NT2/D1 ćelija (Slika 32b).



Slika 32. Analiza ekspresije *neuroD1* gena kod F5 i G3 ćelijskih klonova tokom tretmana RK. U PCR reakciji su korišćeni oligonukleotidi specifični za *neuroD1* gen. Kod NT2/D1 ćelija i ćelijskih klonova (tretiranih i netretiranih RK) nakon PCR umnožavanja i razdvajanja na 2% gelu od agaroze detektovan je produkt odgovarajuće veličine (453 bp). PCR reakcija sa *GAPDH* specifičnim oligonukleotidima služila je kao kontrola za normalizaciju količine matrice. a) Ekspresija *neuroD1* tokom tretmana RK u trajanju od tri nedelje; b) Relativna kvantifikacija *neuroD1* ekspresije nakon dvadeset jednog dana tretmana RK. Rađena su tri nezavisna eksperimenta od kojih je jedan prikazan. Detektovani PCR produkti su digitalizovani i kvantifikovani uz pomoć ImageJ softvera i normalizovani u odnosu na *GAPDH* vrednosti. Relativna ekspresija gena je izračunata kao stepen promene ekspresije u poređenju sa ekspresijom u tretiranim NT2/D1 ćelijama, kojoj je zadata vrednost 1. Rezultati tri nezavisna eksperimenta su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SD. NT2- NT2/D1 ćelije; F5, G3- NT2/D1 ćelijski klonovi; 0, 2, 4, 7, 14, 21- dani tretmana RK.

4.2.13.3. Analiza ekspresije gena za sinaptofizin

Ekspresija gena za sinaptofizin, markera treće faze neuralne diferencijacije, analizirana je kod NT2/D1 ćelija i ćelijskih klonova nakon tri nedelje tretmana RK. Ekspresija ovog neuralnog markera je detektovana i kod netretiranih ćelija, ali tokom tretmana RK dolazi do naglog skoka ekspresije gena za sinaptofizin. Na osnovu relativne kvantifikacije ekspresije gena za sinaptofizin nakon dvadeset jednog dana tretmana RK, može se zaključiti da je ekspresija ovog markera kod izvornih NT2/D1 ćelija povećana 3 puta, a kod ćelijskih klonova 6,3 puta (F5 ćelijski klon), odnosno 10 puta (G3 ćelijski klon), u poređenju sa ekspresijom detektovanom kod izvornih netretiranih NT2/D1 ćelija. Pored toga, kod ćelijskih klonova tretiranih tri nedelje RK, ekspresija gena za sinaptofizin je povećana 2 puta (F5 ćelijski klon), odnosno 3,2 puta (G3 ćelijski klon) u poređenju sa ekspresijom detektovanom kod NT2/D1 ćelija tretiranih tri nedelje RK (Slika 33).



Slika 33. Analiza ekspresije gena za sinaptofizin kod F5 i G3 ćelijskih klonova tokom tretmana RK. U PCR reakciji su korišćeni oligonukleotidi specifični za gen za sinaptofizin. Kod NT2/D1 ćelija i ćelijskih klonova (tretiranih i netretiranih RK) nakon PCR umnožavanja i razdvajanja na 2% gelu od agaroze detektovan je produkt odgovarajućih veličina (276 bp). PCR reakcija sa *GAPDH* specifičnim oligonukleotidima služila je kao kontrola za normalizaciju količine matrice. Rađena su tri nezavisna eksperimenta od kojih je jedan prikazan. Detektovani PCR produkti su digitalizovani i kvantifikovani uz pomoć ImageJ softvera i normalizovani u odnosu na *GAPDH* vrednosti. Relativna ekspresija gena je izračunata kao stepen promene ekspresije u poređenju sa ekspresijom u netretiranim NT2/D1 ćelijama, kojoj je zadata vrednost 1. Rezultati tri nezavisna eksperimenta su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SD. NT2-NT2/D1 ćelije; F5, G3- NT2/D1 ćelijski klonovi; 0, 21- dani tretmana RK.

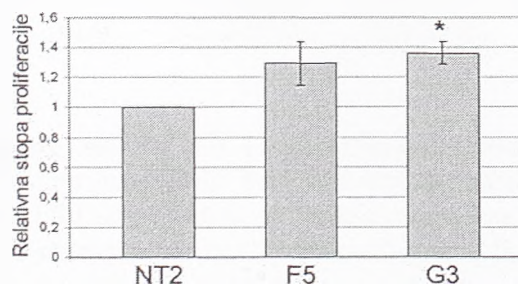
Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da F5 i G3 ćelijski klonovi pod dejstvom RK ulaze u program neuralne diferencijacije. Pored toga, detektovano je da je ekspresija markera druge i treće faze neuralne diferencijacije povišena kod ćelijskih klonova u poređenju sa ekspresijom detektovanom kod tretiranih NT2/D1 ćelija.

4.2.14. Analiza proliferativnog kapaciteta F5 i G3 ćelijskih klonova

Nakon analize ekspresije markera pluripotentnosti i markera neuralne diferencijacije kod F5 i G3 ćelijskih klonova, sledeći korak u istraživanju je bio analiza proliferativni kapacitet ovih ćelijskih klonova imajući u vidu prethodna istraživanja koja su pokazala da *SOX2* promoviše (Taranova, 2006; Card, 2008; Lang, 2011; Tompkins, 2011) ili inhibira ćelijsku proliferaciju (Otsubo, 2008).

4.2.14.1. Stopa rasta ćelijskih klonova sa povećanom ekspresijom *SOX2* gena

Proliferativni kapacitet ćelijskih klonova testiran je primenom MTT testa (Slika 34). Primenom ovog testa detektovano je da je stopa rasta G3 ćelijskog klona povećana približno 1,3 puta u poređenju sa stopom rasta NT2/D1 ćelija. Pored toga, nije detektovana statistički značajna razlika u stopi rasta između F5 ćelijskog klona i NT2/D1 ćelija.

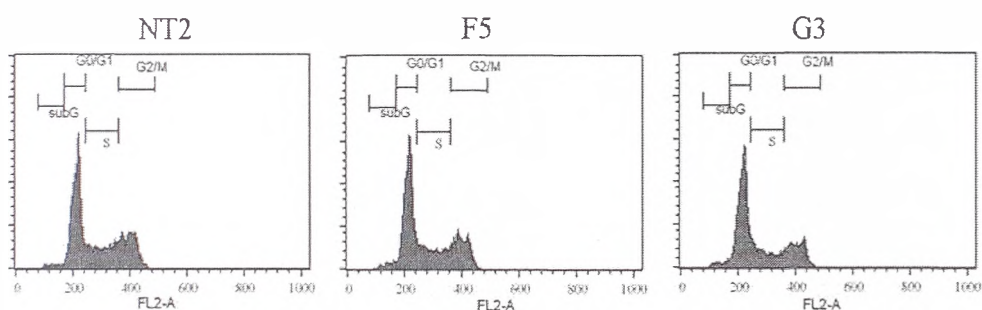


Slika 34. **Analiza proliferativnog kapaciteta F5 i G3 ćelijskih klonova.** Proliferativni kapacitet ćelijskih klonova testiran je MTT testom. Rezultati dvanaest nezavisna eksperimenta su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SEM. NT2- NT2/D1 ćelije; F5, G3- NT2/D1 ćelijski klonovi.

4.2.14.2. Analiza distribucije ćelija po fazama ćelijskog ciklusa kod F5 i G3 ćelijskih klonova

Kako su prethodna istraživanja pokazala da promene u ekspresiji *SOX2* gena mogu da utiču na distribuciju ćelija po fazama ćelijskog ciklusa (Boyer, 2005; Chen,

2008; Otsubo, 2008), analiziran je uticaj povećane ekspresije *SOX2* gena na progresiju kroz ćelijski ciklus. U tu svrhu primenjena je fluorescentna protočna citometrija bojenjem jedara ćelija propidijum jodidom (Slika 35). Ovom analizom je pokazano da relativna distribucija ćelija po fazama ćelijskog ciklusa nije izmenjena kod ćelijskih klonova sa povećanom ekspresijom *SOX2* gena, u odnosu na izvorne NT2/D1 ćelije. Pored toga primenom fluorescentne protočne citometrije kod ćelijskih klonova nije detektovana značajna populacija ćelija koje su ušle u proces apoptoze.



	subG	G0/G1	S	G2/M
NT2	1.18±0.13	50.09±2.13	24.72±1.07	24.63±1.93
F5	1.99±0.39	52.53±0.44	24.01±2.09	21.97±1.63
G3	2.08±0.79	52.86±5.18	22.47±2.06	23.11±5.31

Slika 35. **Analiza ćelijskog ciklusa F5 i G3 ćelijskih klonova.** Ćelijski ciklus je analiziran protočnom citometrijom. Relativna distribucija ćelija po fazama ćelijskog ciklusa nije izmenjena kod F5 i G3 ćelijskih klonova u odnosu na izvorne NT2/D1 ćelije. Kod ćelijskih klonova nije detektovana značajna populacija ćelija koje su ušle u proces apoptoze. Urađena su tri nezavisna eksperimenta od kojih je jedan prikazan. NT2-NT2/D1 ćelije; F5, G3- NT2/D1 ćelijski klonovi.

U cilju što preciznijeg proučavanja ćelijskog ciklusa, NT2/D1 ćelije i ćelijski klonovi su sinhronizovani u kulturi. Naime, ćelije u kulturi su asinhronizovane, odnosno unutar jedne populacije mogu se naći ćelije u različitim fazama ćelijskog ciklusa. Korišćenje asinhronizovanih ćelija može da utiče na interpretaciju rezultata o distribuciji ćelija po fazama ćelijskog ciklusa. Sinhronizacija ćelijskog ciklusa je ostvarena izgladnjivanjem ćelija ("serum starvation" esej), odnosno gajenjem ćelija u odsustvu seruma (Slika 36). Ovaj esej omogućava da se ćelije koje su bile u različitim fazama ćelijskog ciklusa zaustave u G0/G1 fazi. Nakon dodavanja seruma u medijum ćelije

nastavljaju sa deobom pri čemu se najveći procenat ćelija u početnom trenutku proučavanja nalazi u istoj fazi ćelijskog ciklusa. Nakon dodavanja seruma, distribucija ćelija po fazama ćelijskog ciklusa analizirana je u toku 30 sati protočnom citometrijom (Slika 36). Rezultati dobijeni na sinhronizovanim ćelijama su potvrdili da ne postoji statistički značajna razlika u relativnoj distribuciji ćelija po fazama ćelijskog ciklusa između ćelijskih klonova sa povećanom ekspresijom *SOX2* gena i izvornih NT2/D1 ćelija.

	subG	G0/G1	S	G2/M
0	3.89±3.41	58.26±0.30	21.56±1.20	19.67±3.30
	F5	55.80±1.36	21.99±0.40	21.74±2.08
	G3	56.95±3.52	18.91±1.27	23.75±2.39

	subG	G0/G1	S	G2/M
2	2.79±0.91	56.65±1.50	19.91±1.20	22.88±0.52
	F5	54.07±2.39	19.80±0.83	25.41±1.30
	G3	57.05±1.73	16.95±0.52	26.20±1.19

	subG	G0/G1	S	G2/M
4	4.94±1.10	51.88±1.55	26.76±0.81	20.45±0.62
	F5	51.32±0.71	23.30±0.77	26.34±0.28
	G3	54.43±1.47	21.76±9.59	24.23±1.53

	subG	G0/G1	S	G2/M
6	3.96±0.18	50.28±0.98	27.83±2.21	22.32±0.67
	F5	51.22±3.68	26.22±1.13	23.57±6.18
	G3	53.99±0.88	23.93±0.05	22.01±1.99

	subG	G0/G1	S	G2/M
8	2.73±0.61	43.30±0.86	24.18±1.27	32.60±0.77
	F5	47.00±1.17	20.04±0.09	33.37±1.74
	G3	50.49±1.21	18.03±0.25	31.17±1.22

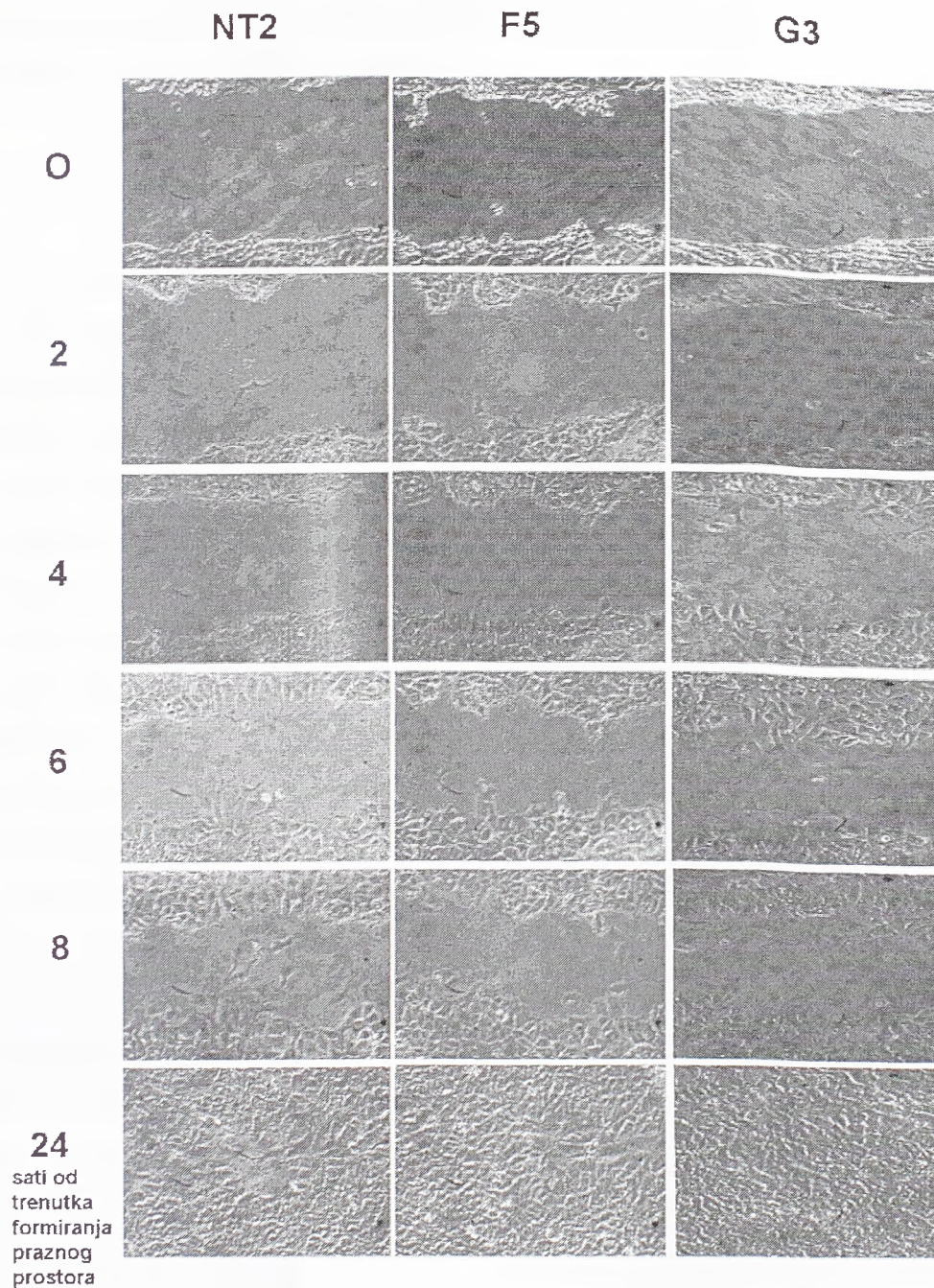
	subG	G0/G1	S	G2/M
30	2.5±1.17	49.04±2.31	21.82±4.31	28.99±2.09
	F5	46.32±3.13	25.16±4.01	29.47±8.04
	G3	44.24±3.57	25.30±0.40	30.78±3.95

sati od
dodavanja
seruma
u medijum

Slika 36. Analiza ćelijskog ciklusa "izgladnjivanjem" ćelija ("serum starvation" esej) i primenom protočne citometrije. Relativna distribucija ćelija po fazama ćelijskog ciklusa proučavana je kod sinhronizovanih NT2/D1 ćelija i F5 i G3 ćelijskih klonova protočnom citometrijom. NT2- NT2/D1 ćelije; F5, G3- NT2/D1 ćelijski klonovi; 0, 2, 4, 6, 8, 30- predstavljaju sate od dodavanja seruma u medijum.

4.2.15. Analiza migracije i invazivnosti F5 i G3 ćelijskih klonova

Pored stope rasta i ćelijskog ciklusa F5 i G3 ćelijskih klonova, analizirana je i sposobnost migracije i ćelijska invazivnost ovih ćelijskih klonova. Sposobnost migracije i ćelijska invazivnost NT2/D1 ćelijskih klonova sa povećanom ekspresijom *SOX2* gena proučavana je primenom testa koji se zasniva na tome da se konfluentnoj kulturi ćelija na jednom mestu iglom ili nastavkom uklone ćelije, a nakon toga se posmatra kojom brzinom i na koji način se ovaj prazan prostor popunjava ćelijama ("wound scratch" test) (Slika 37). Popunjavanje praznog prostora ćelijama je praćeno u periodu od 24h. Prvi znaci popunjavanja praznog prostora vidljivi su nakon četiri sata od uklanjanja ćelija. Pored toga, detektovano je da G3 ćelijski klon mnogo efikasnije prolifериše i migrira u prazan prostor, odnosno nakon 24h prazan prostor je u potpunosti bio ispunjen ćelijama samo kod ovog ćelijskog klona. Primenom ovog testa zapažena je i razlika u ćelijskoj invazivnosti kod NT2/D1 ćelija i ćelijskih klonova. Za razliku od NT2/D1 ćelija i G3 ćelijskog klona kod kojih pojedinačne ćelije ulaze u prazan prostor, kod F5 ćelijskog klona nisu detektovane pojedinačne ćelije u praznom prostoru. Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da su NT2/D1 ćelijski klonovi sa povećanom ekspresijom *SOX2* gena zadržali sposobnost migracije i invazivnost, kao i da G3 ćelijski klon sa povećanom stopom rasta efikasnije popunjava prazan prostor u poređenju sa NT2/D1 ćelijama i F5 ćelijskim klonom.



Slika 37. Migraciona sposobnost i invazivnost F5 i G3 ćelijskih klonova. Migraciona sposobnost i invazivnost ćelijskih klonova je analizirana "wound scratch" testom. NT2/D1 ćelije i ćelijski klonovi su posmatrani invertnim Olympus IMT2 mikroskopom tokom 24h pod uveličanjem od 10x. NT2- NT2/D1 ćelije; F5, G3- NT2/D1 ćelijski klonovi; 0, 2, 4, 6, 8, 24- predstavljaju sate od trenutka formiranja praznog prostora.

4.3. Generisanje NT2/D1 ćelijskih klonova sa povećanom ekspresijom *SOX2* gena primenom *SOX2/pCXN2* konstrukta

4.3.1. Generisanje *SOX2/pCXN2* konstrukta

Kako su korišćenjem *SOX2/pcDNA3.1* konstrukta generisana dva stabilna ćelijska klona kod kojih je ekspresija *SOX2* gena bila maksimalno povećana oko 3 puta u odnosu na ekspresiju detektovanu kod izvornih NT2/D1 ćelija, pristupilo se generisanju ekspresionog konstrukta koji bi omogućio dobijanje više stabilnih ćelijskih klonova sa visokom ekspresijom *SOX2* gena. U tu svrhu, generisan je ekspresioni konstrukt u kome je kompletan kodirajući region humanog *SOX2* gena kloniran u *pCXN2* ekspresioni vektor. Kod ovog vektor transkripcija kloniranog gena je pod kontrolom snažnog promotora gena za β -aktin pileta uz koji se nalazi CMV-IE enhenser što omogućava veoma efikasnu transkripciju egzogenog gena. Transkripcija selektivnog markera (*neo* gena- gena za neomicinsku rezistenciju) *pCXN2* vektora je pod kontrolom slabog promotora gena za timidin kinazu Herpes simplex virusa. Pored toga *neo* gen sadrži mutaciju koja smanjuje rezistenciju na G418; mutacija i slab promotor doprinose tome da će samo ćelijski klonovi koji sadrže veliki broj kopija konstrukta preživeti visoke koncentracije G418.

SOX2/pCXN2 konstrukt je generisan ligacijom *XhoI* fragmenta *SOX2/pcDNA3.1* konstrukta, koji je sadržavao kompletan kodirajući region humanog *SOX2* gena, u *XhoI* mesto *pCXN2* vektora. Digestijom je selektovan *SOX2/pCXN2* konstrukt kod koga je otvoreni okvir čitanja (ORF) *SOX2* gena svojim 5' krajem orijentisan ka promotoru gena za β -aktin pileta i ovaj konstrukt je korišćen u eksperimentima stabilne transfekcije u cilju generisanja NT2/D1 ćelijskih klonova sa povećanom ekspresijom *SOX2* gena.

4.3.2. Generisanje NT2/D1 ćelijskih klonova korišćenjem *SOX2/pCXN2* konstrukta

Nakon generisanja *SOX2/pCXN2* konstrukta, pristupilo se stabilnim transfekcijama. U tu svrhu, *SOX2/pCXN2* konstrukt je linearizovan *HindIII* restrikcijom

enzimom čiji se jedinstveno mesto delovanja nalazi nizvodno od veštačkog poli A signala gena za β - globin.

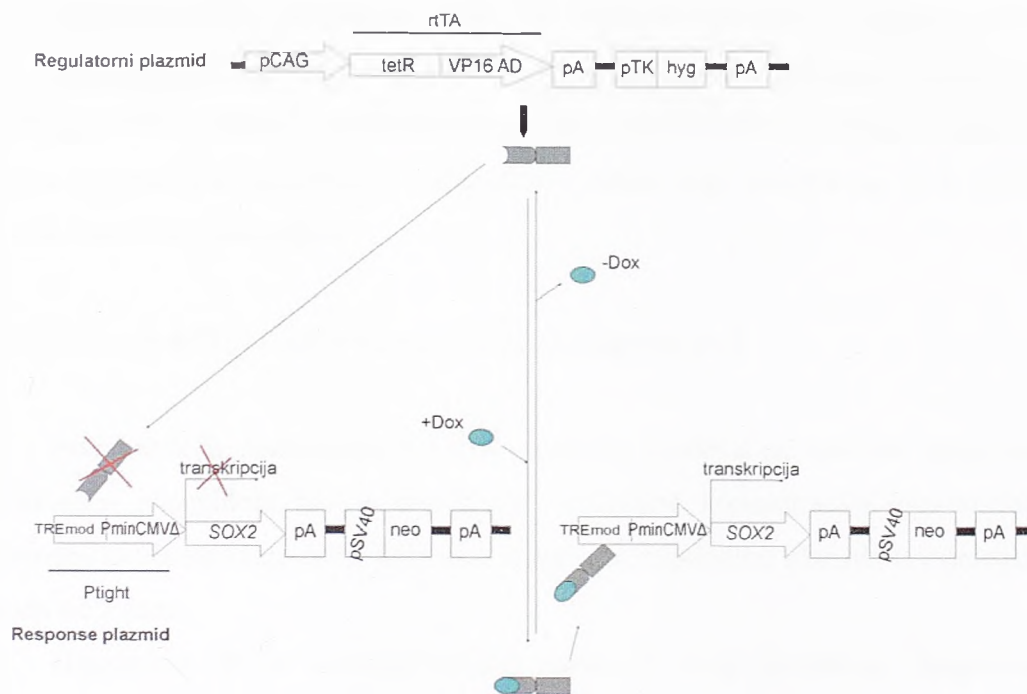
Posle transfekcije, usledio je proces selekcije transfektovanih NT2/D1 ćelija u prisustvu G418 u koncentracijama od 400 $\mu\text{g/ml}$, 500 $\mu\text{g/ml}$ i 600 $\mu\text{g/ml}$. Nakon tri nedelje, detektovane su dve pojedinačne ćelijske kolonije (ćelijska klon) koja su rasla pod selekcijom u prisustvu 500 $\mu\text{g/ml}$ G418. Kolonije vidljive golim okom su prebačene mehanički pomoću zakrivljene pasterove pipete u bunarčić mikrotitar ploče sa 96 otvora. Nakon prebacivanja i daljeg gajenja, ćelije su jedno vreme stagnirale sa rastom, a nakon toga došlo je do smrti ćelija, tako da pri korišćenju *SOX2/pCXN2* konstrukta nije generisan nijedan ćelijski klon sa povećanom ekspresijom *SOX2* gena. Kako je pCXN2 ekspresioni vektor konstruisan tako da samo ćelijski klonovi koji sadrže veliki broj kopija konstrukta prežive visoke koncentracije G418, jedan od potencijalnih razloga za nemogućnost generisanja stabilnih ćelijskih klonova može biti slaba efikasnost transfekcije. Drugi potencijalni razlog nemogućnosti generisanja ćelijskih klonova može biti visok nivo ekspresije *SOX2* gena imajući u vidu literaturne podatke koji ukazuju da povećanje nivoa *SOX2* gena četiri puta iznad njegovog endogenog nivoa dovodi do masovne ćelijske smrti (Kopp, 2008; Tonge i Andrews, 2010).

4.4. NT2/D1 ćelijski klonovi sa povećanom ekspresijom *SOX2* gena generisani primenom inducibilnog "Tet-on" sistema

U cilju generisanja ćelijskih klonova kod kojih je ekspresija *SOX2* gena precizno regulisana pristupilo se upotrebi inducibilnog "Tet-on" sistema. Naime, kod ovog sistema dodavanje doksiciklina aktivira ekspresiju gena od interesa, a nivo ekspresije je regulisan na dozno-zavisan način različitim koncentracijama doksiciklina. Dve glavne komponente ovog sistema su regulatorni plazmid sa koga se eksprimira regulatorni protein i "response" plazmid unutar koga je kloniran gen od interesa. Kod "response" plazmida ekspresija gena od interesa je pod kontrolom tetraciklin-zavisnog elementa (TRE). U prisustvu doksiciklina, regulatorni protein se veže za TRE i aktivira transkripciju egzogenog gena.

4.4.1. Regulatorni i "response" plazmid korišćeni za generisanje NT2/D1 ćelijskih klonova sa povećanom ekspresijom SOX2 gena

"Tet-on" sistem korišćen u radu generisan je od strane Adachi-ja i saradnika i obuhvatao je regulatorni plazmid pCAG-rtTAon-Hyg i „response“ plazmid pTRE-SOX2-neo (Slika 38) (Adachi, 2010).



Slika 38. Generisanje regulatornog i "response" plazmida "Tet-on" sistema. pCAG-rtTAOn-hyg regulatorni plazmid ekspresira reverzni tetraciklin- kontrolisani transaktivator (rtTA) pod kontrolom CAG promotora. Ovaj regulatorni plazmid poseduje i gen za rezistenciju na higromicin. pTRE-SOX2-neo "response" plazmid ekspresira SOX2 pod kontrolom tetraciklin-zavisnog elementa (eng. "tetracycline-response element (TRE)) i poseduje gen za rezistenciju na neomicin. Ptight (Tet-zavisan promotor) sadrži modifikovani TRE (TREmod) uzvodno od izmenjenog minimalnog promotora citomegalovirusa (PminCMVD). Transkripcija SOX2 gena se aktivira vezivanjem rtTA za TREmod u prisustvu doksiciklina. pCAG- CAG promotor; tetR- tet represor; VP16 AD- negativno naelektrisan C- terminalni aktivacioni domen VP16 proteina Herpes simplex virusa; pA- poliadenilacioni signal; pTK- promotor gena za timidin kinazu Herpes simplex virusa; hyg- gen za rezistenciju na higromicin; Dox- doksiciklin; pSV40- promotor SV40 virusa; neo- gen za rezistenciju na neomicin; SOX2- kodirajući region humanog SOX2 gena (preuzeto od (Adachi, 2010)).

Regulatorni plazmid pCAG-rtTAOn-hyg generisan je tako što su CAG promotor i reverzni tetraciklin- kontrolisani transaktivator (rtTA) iz pTet-On vektora klonirani u pTK-Hyg vektor. Ovaj plazmid sadrži i gen za rezistenciju na higromicin B što omogućava selekciju ćelija kod kojih je regulatorni plazmid integrisan u genom. "Response" plazmid je generisan insercijom kodirajućeg region humanog *SOX2* gena u pTRE-Tight vektor. Pored kodirajućeg regiona *SOX2* gena, "response" plazmid sadrži gen za rezistenciju na neomicin pod kontrolom promotora SV40 virusa (Adachi, 2010).

Generisanju inducibilnih NT2/D1 ćelijskih klonova sa povećanom ekspresijom *SOX2* gena obuhvatalo je dva koraka: uspostavljanje NT2/D1 ćelijskih klonova sa stabilno integrisanim regulatornim plazmidom i nakon toga transfekciju ovih ćelijskih klonova "response" plazmidom.

4.4.2. Testiranje NT2/D1 ćelija na rezistenciju na higromicin B

Prvi korak u generisanju NT2/D1 ćelijskih klonova sa stabilno integrisanim regulatornim plazmidom bio je utvrđivanje optimalne koncentracije higromicina B neophodne za eliminisanje ćelija koje nisu integrisale regulatorni plazmid u vremenskom periodu od 7 dana.

Higromicin B je aminoglikozidni antibiotik kog proizvodi *Streptomyces hygroscopicus*. Ovaj antibiotik ubija bakterije, gljive i ćelije viših eukariota tako što inhibira sintezu proteina (Cabanas, 1978; Singh, 1979).

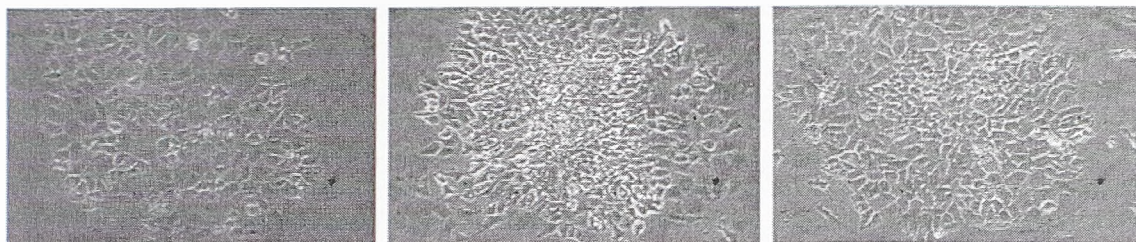
Ćelije eukariota ne poseduju gen za rezistenciju na higromicin B, tako da prisustvo ovog antibiotika u medijumu dovodi do smrti ćelija. Stabilnom integracijom konstrukta koji sadrži *hph* (gen za higromicin B fosfotransferazu) gen u transkripciono aktivni deo ćelija eukariota sintetiše se produkt ovog gena kojim ćelije stiču rezistenciju na higromicin B. Ovaj antibiotik služi kao selektivni marker u eksperimentima stabilne transfekcije omogućavajući selekciju, odnosno preživljavanje samo onih ćelija koje su transfekcijom ugradile konstrukt u svoj genom. Optimalne koncentracije higromicina B neophodne za selekciju i održavanje ćelijskih linija sisara transfektovanih sa konstruktom koji sadrži *hph* gen variraju od 50 do 1000 µg/ml (www.invivogen.com) (Santerre, 1984).

U cilju određivanja optimalne koncentracije, NT2/D1 ćelije su zasejane tako da daju 25% konfluentnosti jer antibiotik postiže najbolje efekte kada se ćelije intenzivno dele. Testirane su koncentracije higromicina B od 50 µg/ml, 100 µg/ml, 200 µg/ml i 250 µg/ml. Sve četiri koncentracije su dovodile do smrti ćelija. Za selekciju stabilnih transfektanata odabrana su koncentracije od 50 µg/ml i 100 µg/ml jer su ove koncentracije bile dovoljne da dovedu do eliminisanja svih ćelija u vremenskom periodu od 7 dana. Koncentracija od 100 µg/ml je i ranije korišćena u eksperimentima selekcije NT2/D1 ćelija koje su integrisale u genom konstrukt koji sadrži gen za CLN3 (Puranam, 1999).

4.4.3. Generisanje NT2/D1 ćelijskih klonova sa stabilno integrisanim regulatornim plazmidom

Nakon utvrđivanja optimalne koncentracije higromicina B, usledilo je generisanje NT2/D1 ćelijskih klonova sa stabilno integrisanim regulatornim plazmidom. Ovi ćelijski klonovi su generisani na četiri načina: korišćenjem linearizovanog plazmida i selekcije u prisustvu 50 µg/ml i 100 µg/ml higromicina B, kao i korišćenjem cirkularnog plazmida i selekcije u prisustvu 50 µg/ml i 100 µg/ml higromicina B. Cirkularni i linearizovani regulatorni plazmidi su korišćeni kako bi se utvrdilo da li linearizacija plazmida utiče na efikasnost generisanja stabilnih transfektanata. Naime, u literaturi postoje podaci da linearizacija plazmida povećava efikasnost dobijanja stabilnih transfektanata (Stuchbury i Munch, 2010). S druge strane, Liew i saradnici nisu primetili značajnu razliku u efikasnosti transfekcija pri korišćenju linearizovanog plazmida u poređenju sa korišćenjem cirkularnog plazmida (Liew, 2007). Za linearizaciju regulatornog plazmida korišćen je *HpaI* restrikcioni enzim koji ima jedinstveno mesto delovanja u regulatornom plazmidu i to mesto delovanja se nalazi uzvodno od veštačkog poli A signala.

Posle transfekcije, usledio je proces selekcije stabilno transfektovanih NT2/D1 ćelija u prisustvu 50 µg/ml, odnosno 100 µg/ml higromicina B. Nakon tri nedelje, pojedinačne kolonije (ćelijski klonovi) su bili vidljivi golim okom kod sva četiri načina generisanja NT2/D1 ćelijskih klonova sa stabilno integrisanim regulatornim plazmidom (Slika 39).



Slika 39. **Pojedinačne kolonije NT2/D1 ćelija.** Kolonije vode poreklo od pojedinačnih NT2/D1 ćelija stabilno transfektovanih regulatornim plazmidom pCAG-rtTAon-Hyg.

Pri korišćenju linearizovanog plazmida generisano je 68 kolonija, a pri korišćenju cirkularnog plazmida 13 kolonija. Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da linearizacija plazmida povećava efikasnost generisanja stabilnih ćelijskih klonova. Porelno sa transfekcijama NT2/D1 ćelija regulatornim plazmidom, ove ćelije su tretirane i kalcijum fosfatnim precipitatom koji nije sadržavao DNK ("mock" transfektovane ćelije). Nakon nedelju dana gajenja "mock" transfektovanih ćelija u medijumu sa 50 µg/ml, odnosno 100 µg/ml higromicina B nije bilo preživelih ćelija.

Kolonije vidljive golim okom su dalje propagirane u kulturi, tako što je svaka pojedinačna kolonija prebacivana mehanički pomoću zakrivljene pasterove pipete u jedan bunarčić mikrotitar ploče sa 96 otvora. Ćelije su u bunarčićima gajene do dostizanja visoke konfluentnosti, a nakon toga su subkultivisane u sudove veće površine. Kultivisanje je preživelo 21 od ukupno 68 pojedinačnih kolonija.

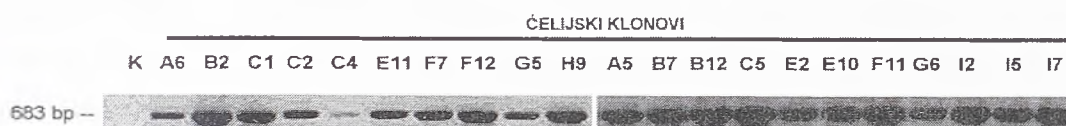
4.4.4. PCR detekcija insercije regulatornog plazmida u genom NT2/D1 ćelija

Po završenom generisanju usledila je identifikacija onih ćelijskih klonova kod kojih je došlo do insercije regulatornog plazmida u genom NT2/D1 ćelija. U tu svrhu urađena je PCR analiza korišćenjem oligonukleotida specifičnih za higromicinsku kasetu regulatornog plazmida. Ova kaseta sadrži gen za rezistenciju na higromicin B. Kako se gen za rezistenciju na higromicin ne nalazi u genomu NT2/D1 ćelija, nakon PCR umnožavanja (upotrebom oligonukleotida specifičnih za higromicinsku kasetu) dobiće se PCR produkt samo kada se kao matrica koristi genomska DNK izolovana iz onih

NT2/D1 ćelijskih klonova kod kojih je došlo do insercije regulatornog plazmida u genom.

Kao PCR matrice korišćene su genomske DNK izolovane iz 21 NT2/D1 ćelijskog klona pri čemu su ćelijski klonovi bili označeni kao: A5, A6, B2, B7, B12, C1, C2, C4, C5, E2, E10, E11, F7, F11, F12, G5, G6, H9, I2, I5 i I7.

Nakon PCR umnožavanja, produkti su razdvojeni na 1% gelu od agaroze. Korišćenjem oligonukleotida specifičnih za higromicinsku kasetu kod svih analiziranih ćelijskih klonova dobijen je produkt odgovarajuće veličine (683 bp) (Slika 40).



Slika 40. **Detekcija insercije pCAG-rtTAon-Hyg konstrukta u genom ćelijskih klonova primenom PCR-a.** U PCR reakciji su korišćeni oligonukleotidi specifični za higromicinsku kasetu. Nakon PCR umnožavanja i razdvajanja na 1% gelu od agaroze kod svih analiziranih ćelijskih klonova detektovan je PCR produkt odgovarajuće dužine (683 bp). K- kontrola.

Dobijeni podaci ukazuju da je kod svih analiziranih ćelijskih klonova došlo do integracije regulatornog plazmida u genom. Za dalju analizu odabrano je 14 ćelijskih klonova podeljenih u četiri grupe (Tabela 3).

Načini generisanja ćelijskih klonova	Oznaka ćelijskog klona
transfekcija linearizovanim regulatornim plazmidom i selekcija u prisustvu 100 µg/ml higromicina B	A5, A6, B2, C1, C2, C5, I2, I5
transfekcija linearizovanim regulatornim plazmidom i selekcija u prisustvu 50 µg/ml higromicina B	G6, E2
transfekcija cirkularnim regulatornim plazmidom i selekcija u prisustvu 100 µg/ml higromicina B	B12, I7
transfekcija cirkularnim regulatornim plazmidom i selekcija u prisustvu 50 µg/ml higromicina B	E11, H9

Tabela 3. **NT2/D1 ćelijski klonovi sa stabilno integrisanim regulatornim plazmidom.** U Tabeli su prikazani ćelijski klonovi odabrani za dalju analizu, kao i načini njihovog generisanja.

4.4.5. Testiranje ćelijskih klonova sa stabilno integrisanim regulatornim plazmidom primenom reporter eseja

Nakon detektovanja integracije regulatornog plazmida u genom ćelijskih klonova usledila je identifikacija onih ćelijskih klonova koji omogućavaju veoma nisku bazalnu ekspresiju gena od interesa bez prisustva doksiciklina i visoku inducibilnost u prisustvu doksiciklina. Pretraživanje 14 odabranih ćelijskih klonova je izvršeno tranzijentnom transfekcijom korišćenjem pTRE-Luc reporter plazmida. Ovaj reporter plazmid eksprimira gen za luciferazu (luciferaza svica) pod kontrolom promotora koji sadrži tetraciklin- zavisani element (TRE). Za normalizaciju efikasnosti transfekcije korišćen je pRL-SV40 konstrukt koji eksprimira gen za "Renilla" luciferazu, odnosno ovaj konstrukt je korišćen za normalizaciju ekspresije gena za luciferazu svica. Nakon transfekcija i gajenja ćelija u prisustvu ili odsustvu doksiciklina, ćelijski lizati su korišćeni za kvantifikaciju luminiscentnih signala ove dve vrste luciferaza primenom reporterskog eseja (Dual-Luciferase Reporter Assay System) (Promega). Odnos aktivnosti ove dve luciferaze odražava aktivnost Tet-zavisnog promotora. U Tabeli 4 je prikazan odnos aktivnosti luciferaze svica i "Renilla" luciferaze kod ćelijskih klonova sa stabilno integrisanim regulatornim plazmidom nakon gajenja u medijumu sa doksiciklinom koncentracije 500 ng/ml, odnosno 1 µg/ml.

ćelijski klon	koncentracije doksiciklina	odnos aktivnosti dve luciferaze
A5		
	bez doksiciklina	0,02
	500 ng/ml	0,0378
	1 µg/ml	0,0305
A6		
	bez doksiciklina	0,0094
	500 ng/ml	0,0069
	1 µg/ml	0,0084
B2		
	bez doksiciklina	0,0040
	500 ng/ml	0,1724
	1 µg/ml	0,3264

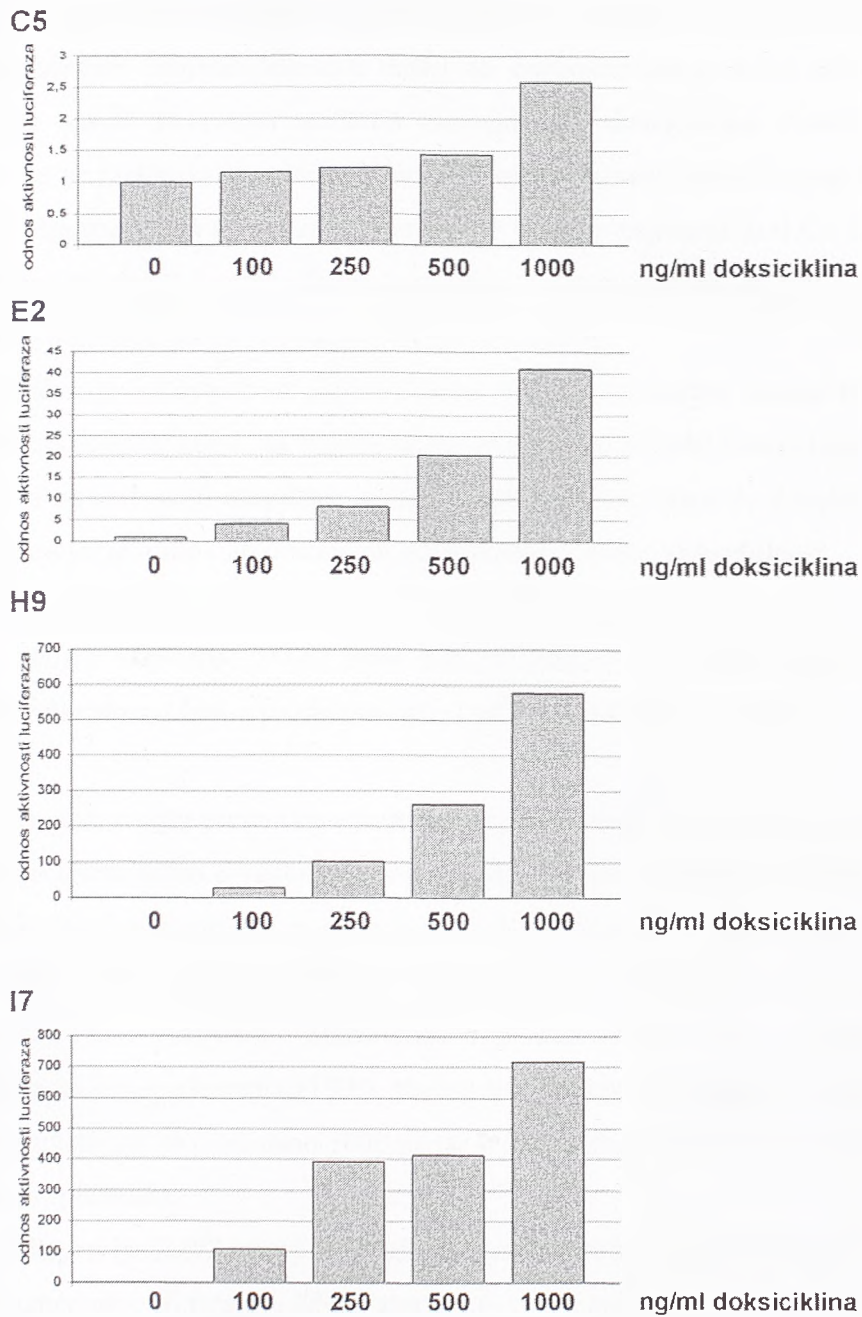
B12		
	bez doksiciklina	0,0576
	500 ng/ml	0,0699
	1 µg/ml	0,0672
C1		
	bez doksiciklina	0,7219
	500 ng/ml	0,0023
	1 µg/ml	0,0022
C5		
	bez doksiciklina	0,0464
	500 ng/ml	0,0853
	1 µg/ml	0,0966
E2		
	bez doksiciklina	0,0042
	500 ng/ml	0,0943
	1 µg/ml	0,1944
E11		
	bez doksiciklina	0,0309
	500 ng/ml	0,0248
	1 µg/ml	0,0276
H9		
	bez doksiciklina	0,0050
	500 ng/ml	1,7752
	1 µg/ml	2,8031
I2		
	bez doksiciklina	0,0051
	500 ng/ml	0,0067
	1 µg/ml	0,0079
I5		
	bez doksiciklina	0,0036
	500 ng/ml	0,0048
	1 µg/ml	0,0060
I7		
	bez doksiciklina	0,0217
	500 ng/ml	7,8072
	1 µg/ml	6,2001

Tabela 4. Odnos aktivnosti luciferaze svica i "*Renilla*" luciferaze kod ćelijskih klonova sa stabilno integrisanim regulatornim plazmidom. Kod ćelijskih klonova označenih kao B2, C5, E2, H9 i I7 odnos aktivnosti luciferaza se dozno-zavisno povećao nakon dodatka različitih koncentracija doksiciklina što je obeleženo sivom bojom.

Na osnovu dobijenih rezultata (Tabeli 4) može se zaključiti da se odnos aktivnosti dve luciferaze, koji odražava aktivnost Tet-zavisnog promotora, znatno povećao kod ćelijskih klonova označenih kao B2, C5, E2, H9 i I7. Kod B2, C5, E2 i H9 ćelijskih klonova korišćenjem koncentracije doksiciklina od 1 µg/ml detektovane su više vrednosti za odnos aktivnosti luciferaza u poređenju sa vrednostima detektovanim pri koncentraciji od 500 ng/ml. Koncentracija od 1 µg/ml dovela je do povećanja odnosa aktivnosti luciferaza oko 80 puta (B2 ćelijski klon), 2 puta (C5 ćelijski klon), 46 puta (E2 ćelijski klon) i 560 puta (H9 ćelijski klon) u poređenju sa vrednostima detektovanim kod ćelijskih klonova koji nisu gajeni u prisustvu doksiciklina. Kod I7 ćelijskog klona korišćenjem doksiciklina koncentracija 500 ng/ml detektovane su više vrednosti za odnos aktivnosti luciferaza (povećanje oko 360 puta) u poređenju vrednostima dobijenim pri koncentraciji doksiciklina od 1 µg/ml (povećanje oko 280 puta). Za dalju detaljniju analizu odabrani su ćelijski klonovi označeni kao C5, E2, H9 i I7. U prvom testiranju ćelijskih klonova sa stabilno integrisanim regulatornim plazmidom korišćene su koncentracije doksiciklina od 500 ng/ml i 1 µg/ml. U cilju što detaljnijeg proučavanja inducibilnosti odabranih ćelijskih klonova, ova četiri ćelijska klona su analizirana primenom reporterskog eseja (Dual-Luciferase Reporter Assay System) nakon tranzijentne kotransfekcije pTRE-Luc reporter plazmidom i pRL-SV40 konstruktom i gajenja u medijumu sa doksiciklinom koncentracije 100, 250, 500 i 1000 ng/ml (Tabela 5, Slika 41).

ćelijski klon	koncentracije doksiciklina	odnos aktivnosti dve luciferaze
C5		
	bez doksiciklina	0,0141
	100 ng/ml	0,0165
	250 ng/ml	0,0174
	500 ng/ml	0,0202
	1000 ng/ml	0,0364
E2		
	bez doksiciklina	0,0058
	100 ng/ml	0,0239
	250 ng/ml	0,0482
	500 ng/ml	0,1188
	1000 ng/ml	0,2381
H9		
	bez doksiciklina	0,0082
	100 ng/ml	0,2291
	250 ng/ml	0,8352
	500 ng/ml	2,1556
	1000 ng/ml	4,7332
I7		
	bez doksiciklina	0,0067
	100 ng/ml	0,7429
	250 ng/ml	2,6355
	500 ng/ml	2,7767
	1000 ng/ml	4,8127

Tabela 5. Odnos aktivnosti luciferaze svica i "*Renilla*" luciferaze kod ćelijskih klonova sa stabilno integrisanim regulatornim plazmidom. Kod ćelijskih klonova označenih kao C5, E2, H9 i I7 odnos aktivnosti luciferaza se dozno-zavisno povećao nakon dodatka različitih koncentracija doksiciklina.



Slika 41. Odnos aktivnosti luciferaze svica i "Renilla" luciferaze kod ćelijskih klonova sa stabilno integrisanim regulatornim plazmidom. Relativna kvantifikacija odnosa aktivnosti luciferaza za svaki ćelijski klon je izračunata kao stepen povećanja odnosa aktivnosti luciferaza u poređenju sa odnosom aktivnosti luciferaza detektovanim kod ćelija koje nisu indukovane doksiciklinom, kojem je zadata vrednost 1. Nakon dodavanja različitih koncentracija doksiciklina došlo je do dozno-zavisnog skoka odnosa aktivnosti luciferaza.

Na osnovu rezultata prikazanih u Tabeli 5 i na Slici 41 može se zaključiti da je kod analiziranih ćelijskih klonova došlo do dozno-zavisnog skoka odnosa aktivnosti luciferaza nakon dodavanja različitih koncentracija doksiciklina. Pored toga, ćelijski klonovi su se razlikovali po inducibilnosti. Naime, najveća inducibilnost detektovana je kod I7 ćelijskog klona (povećanje od oko 700 puta), a najmanja kod C5 ćelijskog klona (povećanje od oko 2,5 puta). Zatim, koncentracije doksiciklina od 500 i 1000 ng/ml su dovele do najvećeg skoka odnosa aktivnosti luciferaza.

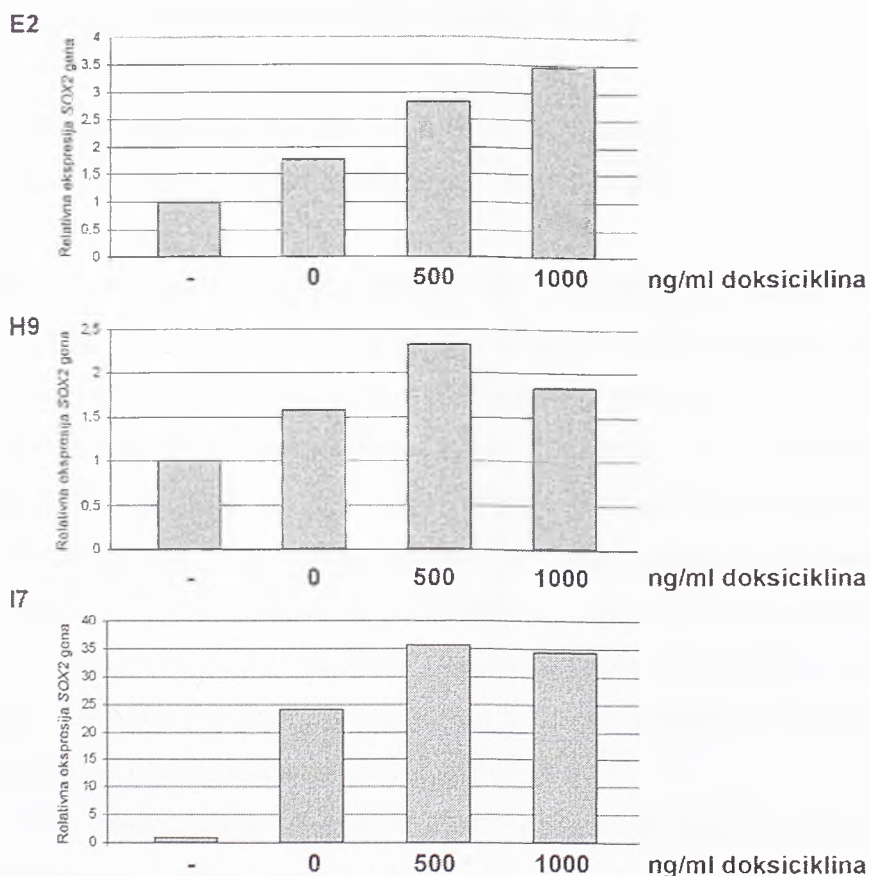
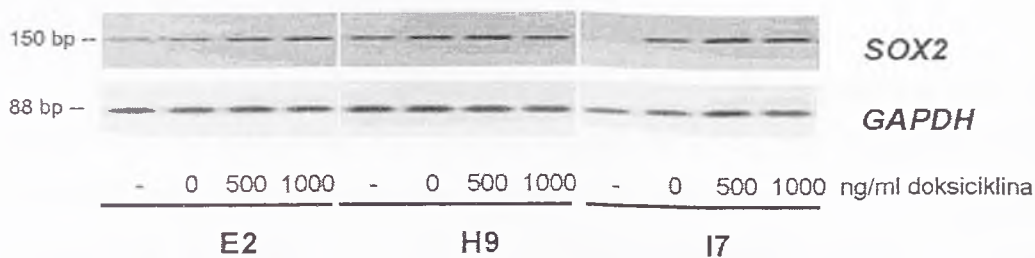
Kako je inducibilnost C5 ćelijskog klona bila znatno manja u poređenju sa preostala tri ćelijska klona, za dalju analizu odabrani su ćelijski klonovi označeni kao E2, H9 i I7, a za aktivaciju ekspresije gena odabrane su koncentracije doksiciklina od 500 i 1000 ng/ml jer je njihovom primenom detektovana najveća inducibilnost.

4.4.6. Analiza ekspresije SOX2 gena kod NT2/D1 ćelijskih klonova sa integrisanim regulatornim plazmidom transfektovanih sa pTRE-SOX2-neo "response" plazmidom

Imajući u vidu prethodne rezultate koji su pokazali da je najveća inducibilnost pri dodavanju doksiciklina detektovana kod ćelijskih klonova označenih kao E2, H9 i I7, ovi ćelijski klonovi su korišćena za generisanje ćelijskih klonova sa povećanom ekspresijom *SOX2* gena. U tu svrhu E2, H9 i I7 ćelijski klonovi su tranzijentno transfektovani sa pTRE-SOX2-neo "response" plazmidom koji eksprimira *SOX2* gen pod kontrolom tetraciklin-zavisnog elementa (TRE). Nakon transfekcije u medijum je dodat doksiciklin u koncentraciji od 500, odnosno 1000 ng/ml u cilju indukovanja ekspresije *SOX2* gena sa "response" plazmida.

Ekspresija *SOX2* gena je analizirana semi-kvantitativnim RT-PCR-om (Slika 42). cDNK generisane od totalnih RNK izolovanih iz netransfektovanih i transfektovanih E2, H9 i I7 ćelijskih klonova, neindukovanih i indukovanih doksiciklinom, korišćene su kao matrice u PCR reakciji sa *SOX2* specifičnim oligonukleotidima. Nakon PCR umnožavanja, produkti su razdvojeni na 2% gelu od agaroze. Korišćenjem *SOX2* specifičnih oligonukleotida kod transfektovanih i netransfektovanih ćelijskih klonova, indukovanih i neindukovanih doksiciklinom, detektovan je produkt odgovarajuće veličine (150 bp) (Slika 42).

U cilju kvantifikacije ukupne ekspresije *SOX2* gena kod inducibilnih NT2/D1 ćelijskih klonova (transfektovanih i netransfektovanih), urađena je normalizacija nivoa ekspresije na osnovu poređenja sa ekspresijom *GAPDH* gena. Na osnovu relativne kvantifikacije može se zaključiti da je kod analiziranih ćelijskih klonova ekspresija *SOX2* gena povećana nakon transfekcije i indukcije doksiciklinom. Pored toga, kao što se i očekivalo imajući u vidu podatke iz literature, kod transfektovanih ćelijskih klonova detektovano je povećanje ekspresije gena od interesa i bez prisustva doksiciklina (Slika 42, označeno sa 0) (Rubinchik, 2005; Sipo, 2006). U odsustvu doksiciklina, ekspresija gena od interesa je bila povećana oko 1,9 puta (E2 ćelijski klon), 1,54 puta (H9 ćelijski klon) i 24 puta (I7 ćelijski klon). Dodatak doksiciklina znatno povećava ekspresiju gena od interesa kod svih analiziranih transfektovanih ćelijskih klonova. Kod E2 ćelijskog klona primećen je dozno- zavisani efekat, odnosno pri koncentraciji doksiciklina od 500 ng/ml detektovano je povećanje ekspresije *SOX2* gena oko 2,7 puta, a pri koncentraciji doksiciklina od 1 µg/ml detektovano je povećanje oko 3,5 puta u poređenju sa ekspresijom *SOX2* gena kod netransfektovanih ćelija (Slika 42). Kod H9 i I7 ćelijskih klonova značajnije povećanje ekspresije *SOX2* gena detektovano je pri korišćenju 500 ng/ml doksiciklina (povećanje oko 2,3 puta kod H9 ćelijskog klona, odnosno oko 35 puta kod I7 ćelijskog klona u odnosu na ekspresiju detektovanu kod netransfektovanih ćelija) u poređenju sa ekspresijom detektovanom pri korišćenju 1 µg/ml doksiciklina (povećanje oko 1,8 puta kod H9 ćelijskog klona, odnosno oko 34 puta kod I7 ćelijskog klona u odnosu na ekspresiju detektovanu kod netransfektovanih ćelija) (Slika 42). Rezultati dobijeni kod H9 i I7 ćelijskih klonova ukazuju na dostizanje "platoa" ekspresije *SOX2* gena pri koncentraciji od 500 ng/ml doksiciklina kod ovih ćelijskih klonova.



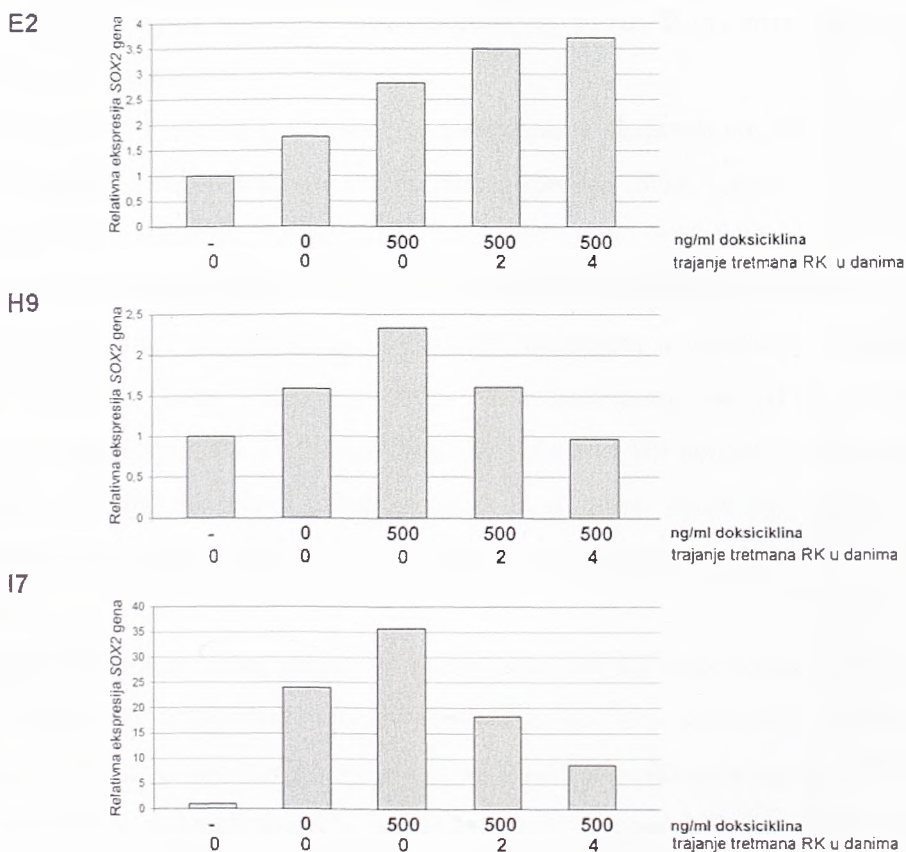
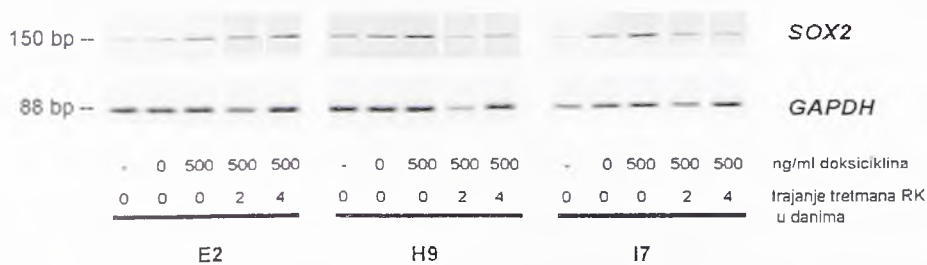
Slika 42. Analiza ekspresije *SOX2* gena kod NT2/D1 ćelijskih klonova sa integrisanim regulatornim plazmidom transfektovanih sa "response" plazmidom pTRE-SOX2-neo. U PCR reakciji su korišćeni oligonukleotidi koji omogućavaju detekciju ukupne ekspresije *SOX2* gena. Kod NT2/D1 ćelijskih klonova (transfektovanih i netransfektovanih sa pTRE-SOX2-neo) nakon PCR umnožavanja i razdvajanja na 2% gelu od agaroze detektovan je produkt odgovarajućih veličina (150 bp). PCR reakcija sa *GAPDH* specifičnim oligonukleotidima služila je kao kontrola za normalizaciju količine matrice. Detektovani PCR produkti su digitalizovani i kvantifikovani uz pomoć ImageJ softvera i normalizovani u odnosu na *GAPDH* vrednosti. Relativna ekspresija gena je izračunata kao stepen povećanja ekspresije u poređenju sa ekspresijom u NT2/D1 ćelijskim klonovima koji nisu transfektovani sa pTRE-SOX2-neo, kojoj je zadata vrednost 1. Netransfektovani ćelijski klonovi, neindukovani doksiciklinom su označeni kao -; transfektovani ćelijski klonovi neindukovani doksiciklinom su označeni kao 0.

Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da su generisana tri NT2/D1 ćelijska klonova sa inducibilno povećanom ekspresijom *SOX2* gena. Kako je kod H9 i I7 ćelijskih klonova povećanje ekspresije *SOX2* gena bilo najznačajnije pri koncentraciji od 500 ng/ml doksiciklina, u daljem radu za indukciju ekspresije *SOX2* gena sa "response" plazmida korišćena je koncentracija doksiciklina od 500 ng/ml.

4.4.7. Analiza ekspresije SOX2 gena kod ćelijskih klonova sa inducibilno povećanom ekspresijom SOX2 gena nakon tretmana retinoičnom kiselinom

Nakon generisanja ćelijskih klonova sa inducibilno povećanom ekspresijom *SOX2* gena, sledeći korak u radu je bila analiza ekspresije *SOX2* gena kod ovih ćelijskih klonova u toku tretmana RK, imajući u vidu literaturne podatke o smanjenju ekspresije *SOX2* gena kod NT2/D1 ćelija nakon dva dana tretmana RK (Stevanovic, 2003). Ekspresija *SOX2* gena kod E2, H9 i I7 ćelijskih klonova sa inducibilno povećanom ekspresijom *SOX2* gena je analizirana tokom četiri dana tretmana RK primenom semi-kvantitativnog RT-PCR-a. Nakon PCR umnožavanja, produkti su razdvojeni na 2% gelu od agaroze. Primenom *SOX2* specifičnih oligonukleotida kod E2, H9 i I7 ćelijskih klonova sa inducibilno povećanom ekspresijom *SOX2* gena, tretiranih i netretiranih RK, dobijen je produkt odgovarajuće veličine (150 bp) (Slika 43).

U cilju kvantifikacije ekspresije *SOX2* gena urađena je normalizacija nivoa ekspresije u odnosu na ekspresiju *GAPDH* gena.



Slika 43. Analiza ekspresije *SOX2* gena kod NT2/D1 ćelijskih klonova sa inducibilno povećanom ekspresijom *SOX2* gena tokom tretmana RK. U PCR reakciji su korišćeni oligonukleotidi koji omogućavaju detekciju ukupne ekspresije *SOX2* gena. Nakon PCR umnožavanja i razdvajanja na 2% gelu od agaroze detektovan je produkt odgovarajućih veličina (150 bp). PCR reakcija sa *GAPDH* specifičnim oligonukleotidima služila je kao kontrola za normalizaciju količine matrice. Detektovani PCR produkti su digitalizovani i kvantifikovani uz pomoć ImageJ softvera i normalizovani u odnosu na *GAPDH* vrednosti. Relativna ekspresija gena je izračunata kao stepen povećanja ekspresije u poređenju sa ekspresijom u NT2/D1 ćelijskim klonovima koji nisu transfektovani sa pTRE-SOX2-neo, kojoj je zadata vrednost 1. 0, 2, 4- trajanje tretmana RK izraženo u danima. Netransfektovani ćelijski klonovi, neindukovani doksiciklinom su označeni kao -; transfektovani ćelijski klonovi neindukovani doksiciklinom su označeni kao 0.

Na osnovu relativne kvantifikacije može se zaključiti da kod E2 ćelijskog klona sa povećanom ekspresijom *SOX2* gena tretman RK ne dovodi do smanjenja ukupne ekspresije *SOX2* gena. Naime, kod E2 ćelijskog klona je drugog i četvrtog dana tretmana, u prisustvu doksiciklina, detektovano dalje povećanje ekspresije *SOX2* gena (drugi dan tretmana RK- povećanje ekspresije *SOX2* gena oko 3,5 puta; četvrti dan tretmana- povećanje ekspresije *SOX2* gena oko 3,7 puta u poređenju sa ekspresijom detektovanom kod E2 ćelijskog klona koji nije transfektovan sa pTRE-SOX2-neo, nije indukovano doksiciklinom i nije tretirano RK) (Slika 43).

Kod H9 i I7 ćelijskih klonova sa povećanom ekspresijom *SOX2* gena tokom tretmana RK-om detektovano je smanjenje ekspresije *SOX2* gena u poređenju sa ekspresijom detektovanom u odsustvu RK.

Kod H9 ćelijskog klona ekspresija *SOX2* gena drugog dana tretmana je bila za oko 30%, a četvrtog dana tretmana za oko 60% smanjena u poređenju sa ekspresijom detektovanom kod ovog ćelijskog klona transfektovanog sa pTRE-SOX2-neo i indukovano doksiciklinom. Četvrtog dana tretmana kod H9 ćelijskog klona ekspresija *SOX2* gena je bila na nivou detektovanom kod ovog ćelijskog klona koji nije transfektovan sa pTRE-SOX2-neo, nije indukovano doksiciklinom i nije tretirano RK (Slika 43).

Kod I7 ćelijskog klona ekspresija *SOX2* gena drugog dana tretmana RK je bila za oko 50% smanjena, a četvrtog dana tretmana za oko 75% smanjena u poređenju sa ekspresijom detektovanom kod ovog ćelijskog klona transfektovanog sa pTRE-SOX2-neo i indukovano doksiciklinom. I pored toga što tretman RK dovodi do smanjenja ekspresije *SOX2* gena, ekspresija ovog gena je bila i dalje povećana u poređenju sa ekspresijom detektovanom kod ovog ćelijskog klona koji nije transfektovan sa pTRE-SOX2-neo, nije indukovano doksiciklinom i nije tretirano RK. Naime, ukupna ekspresija *SOX2* gena kod ovog ćelijskog klona tretiranog dva dana RK je bila povećana približno 18 puta, a četvrtog dana tretmana približno 9 puta u poređenju sa ekspresijom *SOX2* gena detektovanom kod ovog ćelijskog klona koji nije transfektovan sa pTRE-SOX2-neo, nije indukovano doksiciklinom i nije tretirano RK (Slika 43).

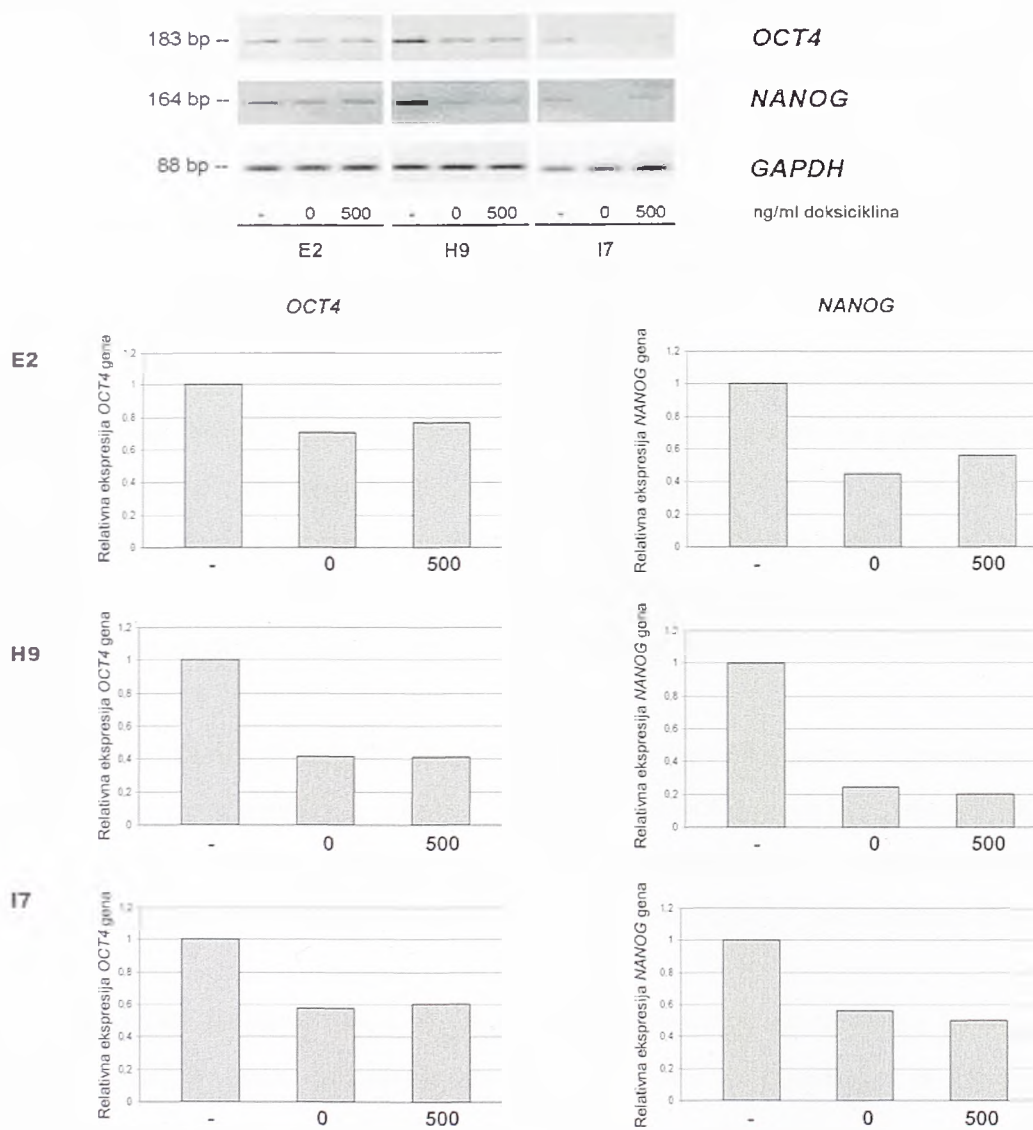
Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da je tretman RK uticao na ekspresiju *SOX2* gena kod E2, H9 i I7 ćelijskih klonova.

4.4.8. Analiza ekspresije markera pluripotentnosti (*OCT4*, *NANOG*) kod NT2/D1 ćelijskih klonova sa inducibilno povećanom ekspresijom *SOX2* gena

Imajući u vidu da literaturni podaci (Boer, 2007; Adachi, 2010), kao i rezultati prikazani u ovom radu koji su dobijeni kod F5 i G3 NT2/D1 ćelijskih klonova ukazuju da povećanje ekspresije *SOX2* gena utiče na ekspresiju ključnih markera pluripotentnosti *OCT4* i *NANOG*-a, analizirano je da li povećana ekspresija *SOX2* gena kod E2, H9 i I7 ćelijskih klonova moduliše ekspresiju *OCT4* i *NANOG*-a. U cilju utvrđivanja nivoa ekspresije ova dva markera pluripotentnosti, primenjena je semi-kvantitativna RT-PCR analiza korišćenjem oligonukleotida specifičnih za *OCT4*, odnosno *NANOG* gen. Nakon PCR umnožavanja, produkti su razdvojeni na 2% gelu od agaroze. Sa oligonukleotidima specifičnim za *OCT4*, odnosno *NANOG* detektovani su PCR produkti odgovarajućih veličina (*OCT4*- produkt veličine 183 bp; *NANOG*- produkt veličine 164 bp) (Slika 44).

U cilju kvantifikacije ekspresije *OCT4* i *NANOG* gena urađena je normalizacija nivoa ekspresije u odnosu na ekspresiju *GAPDH* gena. Kod svih analiziranih ćelijskih klonova detektovano je smanjenje ekspresije *OCT4* i *NANOG* gena. Kod E2 ćelijskog klona detektovano je smanjenje ekspresije *OCT4* gena za približno 20%, kod H9 ćelijskog klona za 60%, a kod I7 ćelijskog klona za 40% u poređenju sa ekspresijom detektovanom kod odgovarajućih ćelijskih klonova koji nisu transfektovani sa pTRE-SOX2-neo i koji nisu indukovani doksiciklinom (Slika 44). Ekspresija *NANOG* gena je bila smanjena za približno 40% (E2 ćelijski klon), 80% (H9 ćelijski klon), odnosno 50% (I7 ćelijski klon) u poređenju sa ekspresijom detektovanom kod ćelijskih klonova koji nisu transfektovani sa pTRE-SOX2-neo i koji nisu indukovani doksiciklinom (Slika 44).

Dobijeni rezultati takođe ukazuju da povećanje ekspresije *SOX2* gena (povećanje od oko 2,3 do 35 puta) utiču na ekspresiju ključnih markera pluripotentnosti, *OCT4* i *NANOG*-a.



Slika 44. Analiza ekspresije *OCT4* i *NANOG* gena kod NT2/D1 ćelijskih klonova sa inducibilno povećanom ekspresijom *SOX2* gena. U PCR reakcijama su korišćeni oligonukleotidi specifični za *OCT4*, odnosno *NANOG* gen. Nakon PCR umnožavanja i razdvajanja na 2% gelu od agaroze detektovani su produkti odgovarajućih veličina (*OCT4*- 183 bp; *NANOG*- 164 bp). Na Slici su prikazani produkti detektovani nakon 25 ciklusa umnožavanja. PCR reakcija sa *GAPDH* specifičnim oligonukleotidima služila je kao kontrola za normalizaciju količine matrice. Detektovani PCR produkti su digitalizovani i kvantifikovani uz pomoć ImageJ softvera i normalizovani u odnosu na *GAPDH* vrednosti. Relativna ekspresija gena je izračunata kao stepen promene ekspresije u poređenju sa ekspresijom u NT2/D1 ćelijskim klonovima koji nisu transfektovani sa pTRE-SOX2-neo, kojoj je zadata vrednost 1. Netransfektovani ćelijski klonovi, neindukovani doksiciklinom su označeni kao -; transfektovani ćelijski klonovi neindukovani doksiciklinom su označeni kao 0.

4.4.9. Ekspresija markera pluripotentnosti (*OCT4*, *NANOG*) kod *NT2/D1* ćelijskih klonova sa inducibilno povećanom ekspresijom *SOX2* gena tokom tretmana retinoičnom kiselinom

Nakon utvrđivanja ekspresije *OCT4* i *NANOG* gena kod ćelijskih klonova sa inducibilno povećanom ekspresijom *SOX2* gena, usledila je analiza ekspresije ovih markera pluripotentnosti tokom tretmana RK. Ekspresija *OCT4* i *NANOG* gena kod E2, H9 i I7 ćelijskih klonova analizirana je tokom četiri dana tretmana RK semi-kvantitativnim RT-PCR-om. Nakon PCR umnožavanja, produkti su razdvojeni na 2% gelu od agaroze. Sa oligonukleotidima specifičnim za *OCT4*, odnosno *NANOG* detektovani su PCR produkti odgovarajućih veličina (*OCT4*- produkt veličine 183 bp; *NANOG*- produkt veličine 164 bp) (Slika 45). U cilju kvantifikacije ekspresije *OCT4* i *NANOG* gena urađena je normalizacija nivoa ekspresije u odnosu na ekspresiju *GAPDH* gena.

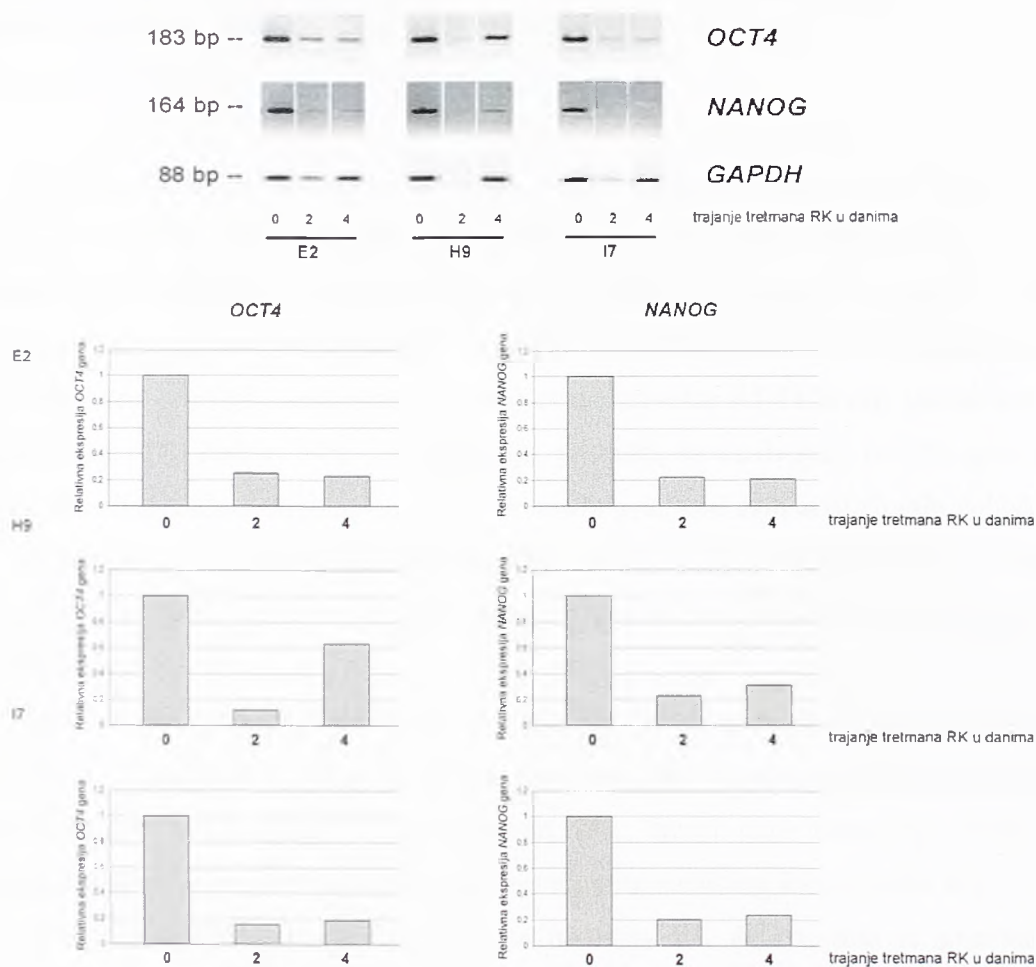
Kod analiziranih ćelijskih klonova sa inducibilno povećanom ekspresijom *SOX2* gena detektovano je smanjenje ekspresije *OCT4* i *NANOG* gena tokom tretmana RK.

Kod E2 ćelijskog klona, ekspresija *OCT4* i *NANOG*-a je smanjena za približno 80% u poređenju sa ekspresijom detektovanom kod ćelija koje nisu tretirane RK (Slika 45).

Kod H9 ćelijskog klona drugog dana tretmana RK detektovano je smanjenje ekspresije *OCT4* gena (smanjenje za približno 90% u poređenju sa ekspresijom detektovanom kod netretiranih ćelija), da bi četvrtog dana tretmana detektovan porast ekspresije oko 5,5 puta u poređenju sa ekspresijom detektovanom kod ćelija tretiranih dva dana RK. Ekspresija *OCT4* gena nakon četiri dana tretmana RK, iako povećana u odnosu na ekspresiju detektovanu drugog dana tretmana, je smanjena za oko 40% u poređenju sa ekspresijom kod netretiranih ćelija (Slika 45). Drugog dana tretmana RK, ekspresija *NANOG* gena kod ovog ćelijskog klona je smanjena za 80% u poređenju sa ekspresijom detektovanom kod netretiranih ćelija. Četvrtog dana tretmana detektovan je porast ekspresije *NANOG* gena oko 1,4 puta u poređenju sa ekspresijom detektovanom drugog dana tretmana.

Kod I7 ćelijskog klona, drugog i četvrtog dana tretmana RK detektovano je smanjenje ekspresije *OCT4* i *NANOG* gena za oko 80% u poređenju sa ekspresijom detektovanom kod netretiranih ćelija (Slika 45).

Detektovano smanjenje ekspresije markera pluripotentnosti pod dejstvom RK kod ćelijskih klonova sa inducibilno povećanom ekspresijom *SOX2* gena ukazuje da i ovi ćelijski klonovi imaju sposobnost da uđu u diferencijaciju čak i u prisustvu povećane ekspresije *SOX2* gena.



Slika 45. Analiza ekspresije *OCT4* i *NANOG* gena kod NT2/D1 ćelijskih klonova sa inducibilno povećanom ekspresijom *SOX2* gena tokom tretmana RK. U PCR reakcijama su korišćeni oligonukleotidi specifični za *OCT4*, odnosno *NANOG* gen. Nakon PCR umnožavanja i razdvajanja na 2% gelu od agaroze detektovani su produkti odgovarajućih veličina (*OCT4*- 183 bp; *NANOG*- 164 bp). Na Slici su prikazani produkti detektovani nakon 30 ciklusa umnožavanja. PCR reakcija sa *GAPDH* specifičnim oligonukleotidima služila je kao kontrola za normalizaciju količine matrice. Detektovani PCR produkti su digitalizovani i kvantifikovani uz pomoć ImageJ softvera i normalizovani u odnosu na *GAPDH* vrednosti. Relativna ekspresija gena je izračunata kao stepen promene ekspresije u poređenju sa ekspresijom u netretiranim NT2/D1 ćelijskim klonovima sa inducibilno povećanom ekspresijom *SOX2* gena, kojoj je zadata vrednost 1. Ćelijski klonovi su gajeni u medijumu sa doksiciklinom koncentracije 500 ng/ml. Transfektovani ćelijski klonovi neindukovani doksiciklinom su označeni kao 0, 0, 2, 4- dani tretmana RK.

4.4.10. Ekspresija markera prve faze neuralne diferencijacije NT2/D1 ćelija kod NT2/D1 ćelijskih klonova sa inducibilno povećanom ekspresijom *SOX2* gena tokom tretmana retinoičnom kiselinom

Kako detektovano smanjenje ekspresije markera pluripotentnosti kod analiziranih NT2/D1 ćelijskih klonova sa iducibilno povećanom ekspresijom *SOX2* gena u toku tretmana RK, ukazuje na diferencijaciju ovih ćelijskih klonova u prisustvu RK, analizirana je ekspresija *nestin* gena kao markera prve faze neuralne diferencijacije. Ekspresija ovog markera analizirana je semi-kvantitativnim RT-PCR-om tokom četiri dana tretmana RK. Nakon PCR umnožavanja, produkti su razdvojeni na 2% gelu od agaroze. Sa oligonukleotidima specifičnim za *nestin* gen, kod svih analiziranih ćelijskih klonova detektovan je PCR produkt odgovarajuće veličine (311 bp) (Slika 46). U cilju kvantifikacije ekspresije urađena je normalizacija nivoa ekspresije u odnosu na ekspresiju *GAPDH* gena.

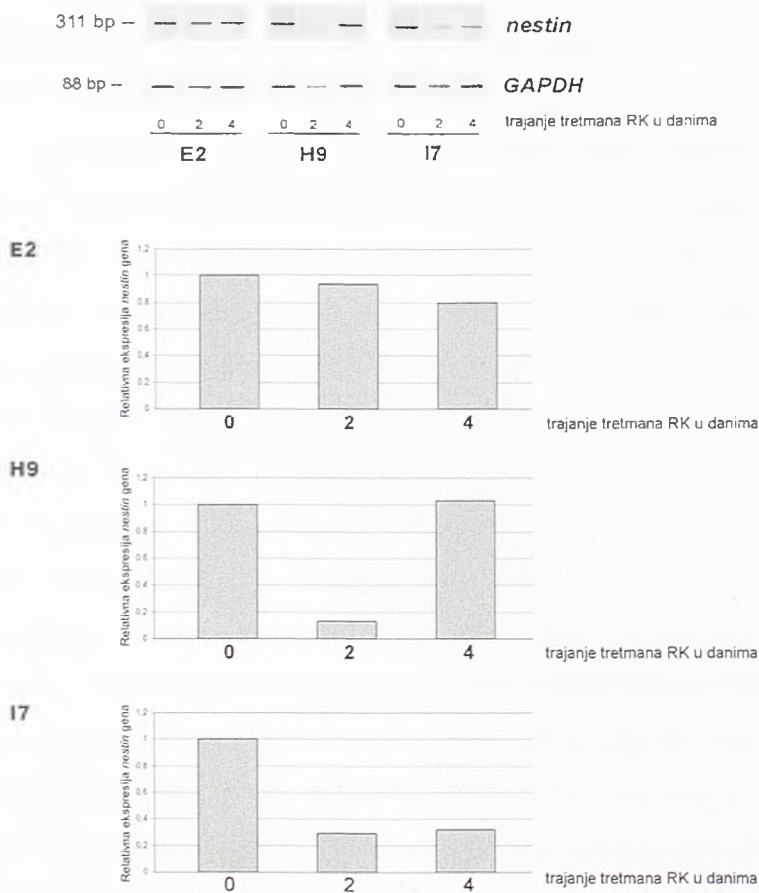
Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da kod E2 ćelijskog klona sa povećanom ekspresijom *SOX2* gena tokom tretmana RK dolazi do blagog smanjenja ekspresije *nestin* gena (drugi dan- smanjenje 7%; četvrti dan- smanjenje 21%) u poređenju sa ekspresijom detektovanom kod netretiranog ćelijskog klona (Slika 46).

Kod H9 ćelijskog klona drugog dana tretmana RK detektovano je smanjenje ekspresije *nestin* gena (smanjenje 87%) u poređenju sa ekspresijom detektovanom kod netretiranih ćelija. Četvrtog dana tretmana detektovan je isti nivo ekspresije kao kod netretiranih ćelija, odnosno došlo je do povećanja ekspresije u poređenju sa ekspresijom detektovanom drugog dana (Slika 46).

Drugog i četvrtog dana tretmana RK, ekspresija *nestin* gena je kod I7 ćelijskog klona smanjena za 70% u poređenju sa ekspresijom detektovanom kod netretiranih ćelija (Slika 46).

Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da kod analiziranih ćelijskih klonova sa inducibilno povećanom ekspresijom *SOX2* gena dolazi do smanjenja ekspresije *nestin* gena drugog dana tretmana RK. Imajući u vidu da su četvrtog dana tretmana detektovane razlike u pogledu ekspresije *nestin* gena kod ćelijskih klonova (kod E2 ćelijskog klona ekspresija *nestin* gena se i dalje smanjuje, kod H9 ćelijskog klona

detektovano je povećanje ekspresije u odnosu na drugi dan, a kod I7 ćelijskog klona nije detektovana promena ekspresije *nestin* gena u poređenju sa ekspresijom detektovanom drugog dana) možemo pretpostaviti da različiti nivoi *SOX2* ekspresije ostvaruju različite efekte na ekspresiju *nestin* gena.



Slika 46. Analiza ekspresije *nestin* gena kod NT2/D1 ćelijskih klonova sa inducibilno povećanom ekspresijom *SOX2* gena tokom tretmana RK. U PCR reakciji su korišćeni oligonukleotidi specifični za *nestin* gen. Nakon PCR umnožavanja i razdvajanja na 2% gelu od agaroze detektovan je produkt odgovarajuće veličine (311 bp). Na Slici su prikazani produkti detektovani nakon 30 ciklusa umnožavanja. PCR reakcija sa *GAPDH* specifičnim oligonukleotidima služila je kao kontrola za normalizaciju količine matrice. Detektovani PCR produkti su digitalizovani i kvantifikovani uz pomoć ImageJ softvera i normalizovani u odnosu na *GAPDH* vrednosti. Relativna ekspresija gena je izračunata kao stepen promene ekspresije u poređenju sa ekspresijom u netretiranim NT2/D1 ćelijskim klonovima sa povećanom ekspresijom *SOX2* gena, kojoj je zadata vrednost 1. Ćelijski klonovi su gajeni u medijumu sa doksiciklinom koncentracije 500 ng/ml. 0, 2, 4-dani tretmana RK. Transfektovani ćelijski klonovi neindukovani doksiciklinom su označeni kao 0.

5. DISKUSIJA

U poslednjih nekoliko godina matične ćelije su u žiži interesovanja zbog potencijalne primene u regenerativnoj medicini i terapiji zamene tkiva. Osobine koje karakterišu ove ćelije su stanje pluripotentnosti i sposobnost samo-obnavljanja (Watt i Driskell, 2010). Podaci iz literature ukazuju da je SOX2 jedan od ključnih regulatora ovih osobina (Lensch, 2006; Mountford, 2008). Ovaj transkripcioni faktor, član *SOX/Sox* familije gena, predstavlja univerzalni marker pluripotentnih matičnih ćelija (Graham, 2003). Takođe, SOX2 ostvaruje značajne uloge tokom embriogeneze kičmenjaka (Papanayotou, 2008). Podaci iz literature, takođe, ukazuju da je SOX2 jedan od ključnih regulatora neuralne diferencijacije, kao i da ovaj transkripcioni faktor u različitim ćelijama promovise ili reprimira ćelijsku proliferaciju (Avilion, 2003; Graham, 2003; Taranova, 2006; Guth i Wegner, 2008; Otsubo, 2008; Lang, 2011; Tompkins, 2011). Ekspresija *Sox2* gena se održava i u neuralnim matičnim/progenitorskim ćelijama tokom adultnog perioda (Miyagi, 2006). U cilju razjašnjavanja mehanizama koji kontrolišu pluripotentnosti i samo-obnavljanje matičnih ćelija, nekoliko studija je bilo usmereno na proučavanje efekata modulacije ekspresije *Sox2* gena u EM i EK ćelijama (Mitsui, 2003; Zhao, 2004; Boer, 2007; Masui, 2007; Kopp, 2008; Adachi, 2010). Rezultati dobijeni ovim proučavanjima su ukazali da promene u *Sox2* ekspresiji dovode do promene u ekspresiji markera pluripotentnosti, masovne smrti ćelija, neuronalne diferencijacije, diferencijacije u trofektoderm ili do diferencijacije u širok spektar tipova ćelija.

Kako generisanje EM ćelija povlači za sobom moralne, pravne i etičke dileme, za proučavanje mehanizama koji kontrolišu održavanje pluripotentnosti i diferencijaciju ćelija koriste se i EK ćelijske linije koje predstavljaju nediferencirane matične ćelije teratokarcinoma (Taketo, 1985). U NT2/D1 embrionalnoj karcinomskoj ćelijskoj liniji, *SOX2* je visoko eksprimiran (Stevanovic, 2003; Lei, 2005), da bi se tokom RK-indukovane neuralne diferencijacije smanjila ekspresija ovog gena (Stevanovic, 2003; Lei, 2005).

Imajući u vidu značaj SOX2 transkripcionog faktora u navedenim procesima, jedan od ciljeva ovog rada je bio generisanje NT2/D1 ćelijskih klonova sa povećanom ekspresijom *SOX2* gena. Nakon generisanja ćelijskih klonova analiziran je uticaj

povećane ekspresije *SOX2* gena na održavanje pluripotentnosti, kao i uticaj na neuralnu diferencijaciju i proliferaciju NT2/D1 ćelijskih klonova.

5.1. Generisanje NT2/D1 ćelijskih klonova sa povećanom ekspresijom *SOX2* gena

U cilju proučavanja uticaja povećane ekspresije *SOX2* gena na održavanje pluripotentnosti, kao i na procese proliferacije i neuralne diferencijacije NT2/D1 ćelija, generisani su NT2/D1 ćelijski klonovi sa povećanom ekspresijom ovog gena.

5.1.1. Generisanje NT2/D1 ćelijskih klonova sa povećanom ekspresijom *SOX2* gena primenom *SOX2/pcDNA3.1* konstrukta

Kako bi se efekat povećane ekspresije *SOX2* gena mogao analizirati i tokom RK-indukovane neuralne diferencijacije NT2/D1 ćelija, ove ćelije su stabilno transfektovane ekspresionim *SOX2/pcDNA3.1* konstruktom. Vektor *pcDNA3.1* je korišćen za generisanje ekspresionog konstrukta jer kod ovog vektora ekspresija gena od interesa je pod kontrolom CMV promotora za koji je pokazano da ispoljava slabu aktivnost u EM i EK ćelijama (Niwa, 1991; Zeng, 2003; Bagchi, 2006; Kim, 2007). Promotor sa slabom aktivnošću je izabran u cilju generisanja ćelijskih klonova sa malim povećanjima ekspresije *SOX2* gena, imajući u vidu podatke iz literature koji ukazuju da povećanje ekspresije *Sox2* gena oko četiri puta iznad endogenog nivoa dovodi do masovne smrti ćelija (Mitsui, 2003; Kopp, 2008; Tonge i Andrews, 2010). Naime, uočeno je da forsirana ekspresija *Sox2* gena u EM ćelijama dovodi do masovnu smrti ćelija (Mitsui, 2003). Zatim, kada je u EM ćelijama miša nivo *SOX2* bio povećan četiri puta ili više iznad endogenog nivoa, detektovna je značajna ćelijska smrt (Kopp, 2008). Sem u slučaju EM ćelija, masovna smrt ćelija detektovana je i pri generisanju NTERA2 ćelijskih klonova koji stabilno ekspimiraju *SOX2* gen (Tonge i Andrews, 2010). Pretpostavlja se da najverovatnije postoje ograničenja u količini *SOX2* proteina koje ćelije mogu da tolerišu (Kopp, 2008).

U literaturi postoje podaci o generisanju stabilnih transfektanata NT2/D1 ćelija upotrebom CMV- baziranog ekspresionih sistema i to za nekoliko gena, kao što su FGF-4 (fibroblast growth factor-4), p27 i FLJ11259/DRAM (Maerz, 1998; Baldassarre, 2000; Kerley-Hamilton, 2007).

Kako pcDNA3.1 vektor sadrži gen za neomicinsku rezistenciju, nakon stabilne transfekcije usledila je selekcija transfektovanih ćelija. U ovom radu, upotrebom CMV- baziranog ekspresionog sistema generisane su pedeset i četiri kolonije koje su bile rezistentne na G-418. Tokom propagacije u kulturi primećeno je umiranje rezistentnih kolonija, tako da je od 54 rezistentne kolonije uspostavljeno 19 ćelijskih klonova, najverovatnije zbog toga što je povećana ekspresija *SOX2* gena indukovala ćelijsku smrt. "Southern blot" analizom integracija *SOX2*/pcDNA3.1 ekspresionog konstrukta potvrđena je kod šest od analiziranih devetnaest NT2/D1 ćelijskih klonova, što ukazuje na postojanje lažno pozitivnih ćelijskih klonova. Generisanje lažno pozitivnih ćelijskih klonova je opisano u literaturi. Naime, pri upotrebi CMV-baziranog GFP ekspresionog sistema generisan je veliki broj stabilnih G-418 rezistentnih EM kolonija miša, od kojih je samo nekoliko bilo pozitivno na zeleni fluorescentni protein (Zeng, 2003). Semi-kvantitativnom RT-PCR analizom ekspresija egzogene kopije *SOX2* gena detektovana je kod tri ćelijska klona označena kao F2, F5 i G3. Mogući razlozi odsustva ekspresije egzogenog *SOX2* gena kod preostala tri ćelijska klona, kod kojih je "Southern blot" analizom detektovana integracija konstrukata, su integracija konstrukta u heterohromatinske, odnosno neaktivne regione hromatina. Takva ugradnja bi mogla dovesti do utišavanja gena, što je ranije opisano u literaturi kod humanih EM i EK ćelija stabilno transfektovanih sa različitim vektorskim sistemima (Liew, 2007). Zatim, semi-kvantitativnom RT-PCR analizom povećana ekspresija *SOX2* gena detektovana je kod dva ćelijska klona označena kao F5 (ekspresija je povećana oko 1,7 puta u odnosu na endogenu ekspresiju) i G3 (ekspresija je povećana oko 3,1 puta u odnosu na endogenu ekspresiju). Detektovano povećanje ekspresije *SOX2* gena od oko 3,1 puta je u skladu sa rezultatima prethodno opisanim u literaturi koji su pokazali da povećana ekspresija *SOX2* gena od 2-4 puta iznad endogenog nivoa u EM ćelijama čoveka, kao i u EM ćelijama miša, utiče na ekspresiju gena uključenih u održavanje pluripotentnosti, kao i na diferencijaciju analiziranih ćelija (Kopp, 2008; Adachi, 2010). Kod F2 ćelijskog klona

nije detektovana povećana ukupna ekspresija *SOX2* gena, i pored detektovane ekspresije egzogene kopije *SOX2* gena, što se može objasniti aktiviranjem povratne sprege. Naime, u literaturi je opisano da povećanje ekspresije *SOX2* gena dovodi do vezivanja SOX2 i OCT4 proteina za promotor *SOX2* gena što za posledicu ima smanjenje *SOX2* transkripcije (Boyer, 2005). Sem na nivo iRNK, povećanje SOX2 ekspresije kod F5 i G3 ćelijskih klonova detektovano je i na proteinskom nivou "Western blot" analizom.

Ekspresija egzogenog *SOX2* gena detektovana je i tokom RK-indukovane neuralne diferencijacije F5 i G3 ćelijskih klonova, što ukazuje da RK ne utiče na aktivnost CMV promotora. Ovi rezultati su u saglasnosti sa podacima iz literature koji ukazuju na aktivnost CMV-baziranog ekspresionog sistema u agregatima EM ćelija tretiranih RK, kao i tokom diferencijacije EM ćelija miša u neuralne prekursore koji eksprimiraju *nestin* gen (Zeng, 2003; Bagchi, 2006).

5.1.2. Generisanje NT2/D1 ćelijskih klonova sa povećanom ekspresijom *SOX2* gena primenom *SOX2/pCXN2* konstrukta

Korišćenjem *SOX2/pcDNA3.1* konstrukta, u generisanim F5 i G3 ćelijskim klonovima postignuto je povećanje ekspresije *SOX2* gena od oko 3 puta u odnosu na ekspresiju detektovanu kod izvornih NT2/D1 ćelija. Imajući u vidu ove rezultate pristupilo se generisanju ekspresionog konstrukta koji bi omogućio dobijanje stabilnih ćelijskih klonova kod kojih bi ekspresija *SOX2* gena bila povećana više od tri puta. Osim toga, cilj istraživanja prikazanih u tezi je bio dobijanje ćelijskih klonova sa različitim nivoima ekspresije *SOX2* gena kako bi se analizirao uticaj malih razlika u ekspresiji *SOX2* gena na ekspresiju markera pluripotentnosti, proliferaciju i neuralnu diferencijaciju NT2/D1 ćelijskih klonova. U tu svrhu, generisan je ekspresioni konstrukt u kome je kompletan kodirajući region humanog *SOX2* gena kloniran u *pCXN2* ekspresioni vektor. Kod *pCXN2* vektora transkripcija gena od interesa je pod kontrolom tzv. CAG promotora koji je dobijen povezivanjem CMV enhenser sekvence i promotora gena za β -aktin pileta (Niwa, 1991). Pored toga, ovaj vektor sadrži i gen za rezistenciju na neomicin sa mutacijom u kodirajućem regionu i njegova transkripcija je pod kontrolom slabog promotora gena za timidin kinazu Herpes simplex virusa, što uslovljava nižu rezistenciju

na G-418. Navedene osobine pCXN2 vektora omogućavaju da samo one transfektovane ćelije koje su ugradile veći broj kopija ekspresionog konstrukta prežive u prisustvu visokih koncentracija G-418 (Niwa, 1991).

U ovom radu primenom *SOX2*/pCXN2 konstrukta nije generisan ni jedan stabilno transfektovan ćelijski klon. Postoji mogućnost da je pod kontrolom snažnog promotora došlo do drastičnog povećanja ekspresije *SOX2* gena, što je indukovalo intenzivnu ćelijsku smrt. Drugi potencijalni razlog može biti niska efikasnost transfekcije što je dovelo do toga da mali broj ćelija bude transfektovan ekspresionim konstruktom. Pored toga, niska efikasnost transfekcije je mogla da dovede do toga da samo mali broj kopija konstrukta uđe u ćeliju. Imajući u vidu da je pCXN2 ekspresioni vektor konstruisan tako da samo ćelijski klonovi koji sadrže veliki broj kopija konstrukta prežive u prisustvu G418, to je još jedan od mogućih razloga zašto nisu generisani vijabilni ćelijski klonovi.

5.1.3. Generisanje NT2/D1 ćelijskih klonova sa povećanom ekspresijom *SOX2* gena primenom inducibilnog "Tet-on" sistema

U cilju generisanja NT2/D1 ćelijskih klonova kod kojih je *SOX2* ekspresija precizno regulisana, korišćen je inducibilni "Tet-on" sistem kod koga je nivo ekspresije gena od interesa dozno-zavisno regulisan različitim koncentracijama doksiciklina. "Tet-on" sistem korišćen u radu sadržavao je regulatorni plazmid pCAG-rtTAOn-hyg sa koga je eksprimiran regulatorni protein i "response" plazmid pTRE-SOX2-neo unutar koga je kloniran humani *SOX2* gen (Adachi, 2010). Ovaj sistem se pokazao efikasnim pri generisanju stabilno transfektovanih EM ćelija čoveka (Adachi, 2010).

Generisanje NT2/D1 ćelijskih klonova sa inducibilno povećanom ekspresijom *SOX2* gena je obuhvatalo dva koraka: stabilnu transfekciju NT2/D1 ćelija regulatornim plazmidom u cilju generisanja ćelijskih klonova koji sadrže integrisan regulatorni plazmid u genom i tranzijentnu transfekciju ovako generisanih ćelijskih klonova pTRE-SOX2-neo plazmidom. Treba istaći da u literaturi postoje podaci o generisanju ćelijskih klonova sa povećanom ekspresijom *SOX2* gena primenom doksiciklinom- indukovanih sistema kod humanih EM ćelija, kao i EM ćelija miša, ali ne i kod EK ćelija (Adachi, 2010; Choi, 2011).

NT2/D1 ćelijski klonovi sa integrisanim regulatornim plazmidom su generisani stabilnom transfekcijom na četiri načina: korišćenjem linearizovanog plazmida i selekcije u prisustvu 50 µg/ml i 100 µg/ml higromicina B, kao i korišćenjem cirkularnog plazmida i selekcije u prisustvu 50 µg/ml i 100 µg/ml higromicina B. Nakon transfekcija i selekcije higromicinom generisano je 68 ćelijskih kolonija pri korišćenju linearizovanog plazmida, kao i 13 ćelijskih kolonija pri korišćenju cirkularnog plazmida. Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa rezultatima dobijenim od strane Stuchbury i saradnika koji su pokazali da linearizacija plazmida povećava efikasnost dobijanja stabilnih transfektanata (Stuchbury i Munch, 2010). Tokom propagacije u kulturi primećeno je umiranje kolonija, tako da je od propagiranih 68 rezistentnih ćelijskih kolonija uspostavljen 21 ćelijski klon. PCR analiza na genomskoj DNK izolovanoj iz uspostavljenih ćelijskih klonova, korišćenjem oligonukleotida specifičnih za higromicinsku kasetu, je ukazala da je do integracije regulatornog plazmida u genom došlo kod svih uspostavljenih ćelijskih klonova. U cilju identifikacije onih ćelijskih klonova koji omogućavaju veoma nisku bazalnu ekspresiju gena od interesa bez prisustva doksiciklina i visoku inducibilnost u prisustvu doksiciklina, 14 odabranih ćelijskih klonova je transfektovano pTRE-Luc reporter plazmidom, kao i konstruktom koji služi za normalizaciju ekspresije gena za luciferazu svica; ćelije su nakon transfekcija gajene u prisustvu ili odsustvu doksiciklina. Primenom reporterskog eseja detektovano je 5 inducibilnih ćelijskih klonova. Tri inducibilna ćelijska klona označena kao E2, H9 i I7 su tranzijentno transfektovana pTRE-SOX2-neo plazmidom i indukovana doksiciklinom. Kod sva tri analizirana ćelijska klona u prisustvu doksiciklina detektovano je povećanje ekspresije *SOX2* gena (kod E2 ćelijskog klona ekspresije *SOX2* gena je bila povećana i do 3,5 puta, kod H9 ćelijskog klona do 2,3 puta, a kod I7 ćelijskog klona do 35 puta u poređenju sa ekspresijom detektovanom kod netransfektovanih ćelijskih klonova). Pored toga, kod analiziranih ćelijskih klonova detektovano je povećanje ekspresije *SOX2* gena i u odsustvu doksiciklina. Dobijeno povećanje ekspresije je u saglasnosti sa podacima iz literature koji ukazuju na visoku bazalnu aktivnosti TRE promotora u odsustvu doksiciklina (Rubinchik, 2005; Sipo, 2006). Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da su generisana tri ćelijska klona sa inducibilno povećanom ekspresijom *SOX2* gena i ova tri ćelijska klona su bila predmet dalje analize.

5.2. Povećana ekspresija *SOX2* gena i morfologija ćelija

Kod stabilnih F5 i G3 ćelijskih klonova nije primećena promena morfologije ćelija u poređenju sa izvornim NT2/D1 ćelijama. Takođe, kod ćelijskih klonova E2, H9 i I7 sa inducibilno povećanom ekspresijom *SOX2* gena nije primećena razlika u morfologiji između doksiciklinom indukovanih i neindukovanih ćelija. Ova zapažanja su u skladu sa prethodno objavljenim rezultatima gde su kao model sistem korišćene F9 EK ćelije. Naime, prilikom tranzijentnog povećanja ekspresije *SOX2* proteina (približno 3 puta iznad endogenog nivoa) kod ovih ćelija nije primećena promena morfologije u poređenju sa izvornim ćelijama (Boer, 2007). Takođe, forsirana ekspresija *Sox2* gena nije promenila morfologiju EM ćelija miša (Zhao, 2004). Pored ovih rezultata, u literaturi je opisano i da povećana ekspresija *Sox2* gena indukuje kod EM ćelija čoveka, kao i EM ćelija miša, pojavu morfologije tipične za diferencirane ćelije (Kopp, 2008; Adachi, 2010). Kako kod NT2/D1 ćelijskih klonova (stabilnih i inducibilnih) nije detektovana promena morfologije, može se pretpostaviti da povećana ekspresija *SOX2* gena kod ovih ćelijskih klonova nije dovela do diferencijacije.

5.3. Povećana ekspresija *SOX2* gena i ekspresija markera pluripotentnosti

SOX2, *OCT4* i *NANOG* se smatraju glavnim regulatorima embriogeneze sisara (Rizzino, 2008). Naime, ovi transkripcioni faktori kontrolišu pluripotentnost EM ćelija aktivirajući gene kritične za samo-obnavljanje i reprimirajući gene koji iniciraju diferencijaciju (Sun, 2006). Pored uticaja na ekspresiju ciljnih gena, *SOX2*, *OCT4* i *NANOG* regulišu i sopstvenu ekspresiju preko pozitivnih povratnih sprega (Boyer, 2005).

5.3.1. Povećana ekspresija *SOX2* gena i ekspresija *OCT4* markera pluripotentnosti

Semi-kvantitativnom RT-PCR analizom kod F5 i G3 ćelijskih klonova sa povećanom ekspresijom *SOX2* gena detektovano je smanjenje ekspresije *OCT4* gena za

približno 50% u poređenju sa ekspresijom detektovanom kod izvornih NT2/D1 ćelija. Takođe, kod E2, H9 i I7 ćelijskih klonova sa inducibilno povećanom ekspresijom *SOX2* gena detektovano je smanjenje ekspresije *OCT4* gena. Ovaj efekat povećane ekspresije *SOX2* gena na ekspresiju *OCT4* gena je bio očekivan, imajući u vidu podatke iz literature. Naime, smanjenje ekspresije *Oct-3/4* gena je detektovano kod F9 EK ćelija sa tranzijentno povećanom ekspresijom *Sox2* gena (Boer, 2007). Takođe, kod EM ćelija čoveka sa povećanom ekspresijom *SOX2* gena detektovano je smanjenje ekspresije *OCT4* gena (Adachi, 2010). Jedan od mogućih načina na koji povećana ekspresija *SOX2* gena dovodi do smanjenja ekspresije *OCT4* gena može se objasniti direktnim vezivanjem *SOX2* transkripcionog faktora za kompozitni *sox-oct* element koji se nalazi u distalnom enhenseru *OCT4* gena. Podaci iz literature ukazuju da je distalni enhenser uključen u transkripcionu aktivnost *OCT4* gena u EM ćelijama i detektovano je direktno vezivanje *SOX2* i *OCT4* za kompozitni *sox-oct* element koji se nalazi u sastavu ovog enhensera (Chew, 2005). Kao potencijalno objašnjenje smanjenja ekspresije *OCT4* gena u prisustvu povećane ekspresije *SOX2* gena u literaturi se navode i indirektni mehanizmi (Boer, 2007; Adachi, 2010). Naime, postoji mogućnost da povećana ekspresija *Sox2* gena dovodi do ekspresije represora koji onda deluju na *Oct-3/4* gen (Boer, 2007). Takođe, moguće je da povećana ekspresija *SOX2* gena indukuje povećanje ekspresije trofektodermalnog markera *CDX2* koji predstavlja negativni regulator koji može dovesti do smanjenja ekspresije *OCT4* gena (Adachi, 2010).

5.3.2. Povećana ekspresija *SOX2* gena i ekspresija *NANOG* markera pluripotentičnosti

Semi-kvantitativnom RT-PCR analizom kod F5 ćelijskog klona detektovano je smanjenje ekspresije *NANOG* gena za trećinu, dok je kod G3 ćelijskog klona ekspresija *NANOG*-a bila povećana približno 1,6 puta u poređenju sa ekspresijom ovog gena kod izvornih NT2/D1 ćelija. Kod E2, H9 i I7 ćelijskih klonova sa inducibilno povećanom ekspresijom *SOX2* gena detektovano je smanjenje ekspresije *NANOG* gena. Detektovano smanjenje ekspresije *NANOG* gena pri povećanoj ekspresiji *SOX2* gena je primećeno i kod F9 EK ćelija (Boer, 2007). Naime, u F9 EK ćelijama tranzijentno transfektovanim sa

ekspresionim vektorom za *Sox2*, detektovano je smanjenje ekspresije *Nanog* gena za oko 50% (Boer, 2007). Takođe, smanjenje ekspresije *NANOG* gena je detektovano i kod EM ćelija čoveka, kao i EM ćelija miša, u uslovima povećane ekspresije *SOX2* gena (Kopp, 2008; Adachi, 2010). Kao i u slučaju *OCT4* gena, jedan od potencijalnih načina na koji povećana ekspresija *SOX2* gena dovodi do smanjenja ekspresije *NANOG* gena može biti posledica direktnog vezivanja *SOX2* transkripcionog faktora za *sox-oct* cis- regulatorni element unutar proksimalnog promotora *NANOG* gena za koji je pokazano da je neophodan za ekspresiju ovog gena (Rodda, 2005). Takođe, u literaturi se kao jedan od načina smanjenja ekspresije *NANOG* gena navodi i mogućnost da povećana ekspresija *SOX2* gena dovodi do ekspresije represora koji onda deluju na *NANOG* gen (Boer, 2007). Pored toga, u literaturi je opisan model po kom povećana ekspresija *SOX2* gena preko *CDX2* dovodi do smanjenja ekspresije *OCT4* gena, a onda smanjena ekspresija *OCT4* gena dovodi do smanjenja ekspresije *NANOG* gena preko *OCT4/NANOG* autoregulatorne sprege (Adachi, 2010). Detektovano povećanje ekspresije *NANOG* gena kod G3 ćelijskog klona može biti u skladu sa podacima da nivo *Nanog*-a varira i reverzibilno se menja (Chambers, 2007; Glauche, 2010). Pored toga, pokazano je da održavanje pluripotentnosti ne zahteva konstantno prisustvo *Nanog*-a (Chambers, 2007; Glauche, 2010). Na osnovu detektovanih razlika u ekspresiji *NANOG* gena kod F5 i G3 ćelijskih klonova sa povećanom ekspresijom *SOX2* gena možemo pretpostaviti da detektovane razlike u ekspresiji ne zavise direktno od nivoa *SOX2*. Drugo moguće objašnjenje detektovanih razlika u ekspresiji *NANOG* gena je da različiti nivoi ekspresije *SOX2* gena mogu smanjiti ili povećati ekspresiju *NANOG* gena.

5.4. Povećana ekspresija *SOX2* gena i proliferacija

Sox2 je eksprimiran u proliferišućim i nediferenciranim neuralnim prekursorima u toku neurogeneze (Lang, 2011). Pored toga, podaci iz literature ukazuju da povećana ekspresija *SOX2* gena stimuliše ili inhibira proliferaciju ćelija u zavisnosti od ćelijskog konteksta (Taranova, 2006; Otsubo, 2008; Lang, 2011; Tompkins, 2011). MTT testom je detektovano da je stopa rasta G3 ćelijskog klona povećana približno 1,3 puta u poređenju sa stopom rasta izvornih NT2/D1 ćelija. Povećanje stope rasta u uslovima povećane

ekspresije *SOX2/Sox2* gena detektovano je i u auditornom nervu nakon povrede, respiratornim epitelijalnim ćelijama i u ćelijama karcinoma dojke (Chen, 2008; Lang, 2011; Tompkins, 2011). Pored toga, nije detektovana statistički značajna razlika u stopi rasta između F5 ćelijskog klona i NT2/D1 ćelija. Rezultati dobijeni kod F5 ćelijskog klona su u saglasnosti sa rezultatima dobijenim kod neuralnih matičnih ćelija sa povećanom ekspresijom *Sox2* gena (Quinlan, 2011). Imajući u vidu da *SOX2* reguliše ekspresiju kinaza (CDC7 i CDC2-CDK1) i ciklina D1 (Boyer, 2005), komponenti neophodnih za progresiju kroz ćelijski ciklus, moguće je da povećana ekspresija *SOX2* gena, preko regulisanja aktivnosti ovih kinaza i ciklina, indukuje povećanje proliferacije G3 ćelijskog klona. Drugi potencijalni mehanizam može biti preko aktiviranja mikro RNK mir-302 što dovodi do utišavanja translacije ciklina D1 i promovisanja smanjenja broja ćelija u G1 fazi i povećanja broja ćelija u S fazi ćelijskog ciklusa (Card, 2008).

U cilju utvrđivanja da li je kod G3 ćelijskog klona povećana stopa rasta rezultat navedenih mehanizama, odnosno posledica uticaja povećane ekspresije *SOX2* gena na progresiju kroz ćelijski ciklus, primenjena je fluorescentna protočna citometrija bojenjem jedara ćelija propidijum jodidom. Rezultati ukazuju da relativna distribucija ćelija po fazama ćelijskog ciklusa nije izmenjena kod ćelijskih klonova sa povećanom ekspresijom *SOX2* gena u poređenju sa relativnom distribucijom kod izvornih NT2/D1 ćelija. Imajući u vidu dobijene rezultate, kao i podatke iz literature, možemo pretpostaviti da je povećana ekspresija *SOX2* gena kod G3 ćelijskog klona indukovala skraćivanje sve četiri faze ćelijskog ciklusa bez promene u relativnoj distribuciji ćelija u G1, S, G2 i M fazi. Ovo je ranije opisano za Jurkat T ćelije sa povećanom ekspresijom *Gfi-1* koje takođe imaju povećanu proliferativnu stopu (Karsunky, 2002).

5.5. Povećana ekspresija *SOX2* gena i neuralna diferencijacija

Podaci iz literature ukazuju da NT2/D1 ćelije u prisustvu retinoične kiseline diferenciraju u različite tipove ćelija, uključujući i terminalno diferencirane neurone i astrocite (Andrews, 1984a; Sandhu, 2002; Bani-Yaghoob, 2006; Coyle, 2011). Jedan od ciljeva ovog rada je bio da se ispita efekat povećane ekspresije *SOX2* gena na neuralnu diferencijaciju NT2/D1 ćelijskih klonova. Imajući u vidu da u literaturi ne postoje podaci

o ekspresiji SOX2 proteina tokom ranih faza neuralne diferencijacije NT2/D1 ćelija, prvi korak u analizi je bio ispitivanje uticaja tretmana RK, u trajanju od dve nedelje, na ekspresiju SOX2 proteina kod izvornih NT2/D1 ćelija. Rezultati prikazani u ovom radu ukazuju da se ekspresija SOX2 proteina ne menja značajno tokom dve nedelje tretmana RK. Sposobnost ulaska stabilnih NT2/D1 ćelijskih klonova sa povećanom ekspresijom *SOX2* gena u neuralnu diferencijaciju ispitivana je tokom tri nedelje tretmana RK. Kako su inducibilni NT2/D1 ćelijski klonovi tranzijentno transfektovani pTRE-SOX2-neo plazmidom, efekti RK kod ovih ćelijskih klonova su ispitivani tokom četiri dana tretmana RK.

5.5.1. Povećana ekspresija *SOX2* gena, tretman RK i morfologija ćelija

Nakon tretmana RK u trajanju od tri nedelje, vizuelnim posmatranjem kod F5 i G3 ćelijskih klonova detektovana je mala populacija ćelija (fokusi) koja morfološki podseća na neurone, što je u saglasnosti sa podacima iz literature koji ukazuju da tokom tretmana RK mali broj ćelija diferencira u neurone (Andrews, 1984a). Prvi vidljivi fokusi ćelija promenjene morfologije vidljivi su sedmog dana tretmana RK kod G3 ćelijskog klona i izvornih NT2/D1 ćelija, dok su kod F5 ćelijskog klona efekti tretmana RK bili vidljivi četrnaestog dana tretmana. Nakon tretmana od tri nedelje broj fokusa ćelija promenjene morfologije bio je najveći kod izvornih ćelija, a najmanji kod F5 ćelijskog klona. Kako su fokusi ćelija promenjene morfologije detektovani i kod izvornih NT2/D1 ćelija, na osnovu vizuelnog posmatranja možemo pretpostaviti da su NT2/D1 ćelijski klonovi sa povećanom ekspresijom *SOX2* gena zadržali sposobnost ulaska u RK-iniciranu neuralnu diferencijaciju. Kod E2, H9 i I7 ćelijskih klonova sa inducibilno povećanom ekspresijom *SOX2* gena nisu detektovane morfološke promenu u toku četiri dana tretmana RK.

5.5.2. Analiza ekspresije *SOX2* gena kod NT2/D1 ćelijskih klonova sa povećanom ekspresijom *SOX2* gena tokom tretmana RK

Pokazano je da konstitutivna ekspresija *Sox2* gena kod neuralnih progenitora dovodi do zadržavanja proliferativne sposobnosti i samo-obnavljanja ovih ćelija, kao i da blokira neuralnu diferencijaciju (Graham, 2003). Takođe, podaci iz literature ukazuju da generisanje neurona od matičnih ćelija zavisi od inhibicije *SOX1-3* ekspresije od strane proneuralnih proteina (Bylund, 2003). Imajući u vidu ove podatke, semi-kvantitativnim RT-PCR-om analizirana je ekspresija *SOX2* gena tokom tretmana RK kod NT2/D1 ćelijskih klonova sa povećanom ekspresijom *SOX2* gena, kao i kod izvornih ćelija. Rezultati ove analize ukazuju da nakon tri nedelje tretmana RK kod NT2/D1 ćelija dolazi do smanjenja ekspresije *SOX2* gena za približno 50%. Ovi rezultati su očekivani imajući u vidu rezultate iz literature gde je takođe opisano smanjenje ekspresije *SOX2* gena za približno 50% nakon tri nedelje tretmana RK (Lei, 2005). U poređenju sa tretiranim izvornim ćelijama, F5 i G3 ćelijski klonovi sa zadržali značajnu ekspresiju *SOX2* gena i nakon tretmana u trajanju od tri nedelje. Ekspresija *SOX2* gena je bila povećana oko 1,4 puta kod F5 ćelijskog klona, odnosno 2,3 puta kod G3 ćelijskog klona, u poređenju sa ekspresijom detektovanom kod tretiranih NT2/D1 ćelija. Interesantno, ukupna ekspresija *SOX2* gena kod G3 ćelijskog klona tretiranog tri nedelje RK je bila povećana približno 1,3 puta u poređenju sa ekspresijom *SOX2* gena kod netretiranih NT2/D1 ćelija. Kako dosadašnji podaci iz literature ukazuju da je potrebno da se ekspresija *SOX2* gena smanji da bi započeo proces neuralne diferencijacije, rezultati dobijeni kod G3 ćelijskog klona tretiranog dvadeset i jedan dan RK po prvi put ukazuju da proces neuralne diferencijacije može da se odvija i u uslovima malih povećanja ekspresije *SOX2* gena.

Semi-kvantitativna RT-PCR analiza ukazuje da četiri dana tretmana RK kod E2 ćelijskog klona nisu dovela do smanjenja ekspresije *SOX2* gena, već je tokom tretmana detektovano dalje povećanje ekspresije. Rezultati dobijeni kod ovog ćelijskog klona nisu očekivani, imajući u vidu podatke iz literature gde je opisano da nakon 48 sati tretmana RK dolazi do smanjenja ekspresije endogenog *SOX2* gena (Stevanovic, 2003). Kod H9 ćelijskog klona tretman RK u trajanju od četiri dana doveo je do smanjenja ekspresije *SOX2* gena do nivoa detektovanog kod ovog ćelijskog klona koji nije transfektovan sa

pTRE-SOX2-neo, nije indukovano doksiciklinom i nije tretirano RK. Kako pTRE-SOX2-neo plazmid nije integrisan u genom, detektovano smanjenje ekspresije *SOX2* gena kod H9 ćelijskog klonova može biti posledica degradacije pTRE-SOX2-neo plazmida ćelijskim enzimima, odnosno može nastati usled neravnomerne distribucije unetog plazmida u ćelije nakon deoba. Naime, u literaturi je opisan gubitak tranzijentno transfektovanog materijala tokom vremena usled degradacije ćelijskim enzimima i deobe ćelija (Stuchbury i Munch, 2010). Kod I7 ćelijskog klonova četiri dana tretmana RK su doveli do smanjenja ekspresije *SOX2* gena, ali je ekspresija ovog gena i dalje bila povećana (približno 18 puta drugog dana, odnosno približno 9 puta četvrtog dana) u poređenju sa ekspresijom detektovanom kod ovog ćelijskog klonova koji nije transfektovan sa pTRE-SOX2-neo, nije indukovano doksiciklinom i nije tretirano RK.

Dalja istraživanja, korišćenjem stabilno transfektovanih NT2/D1 ćelijskih klonova sa inducibilno povećanom ekspresijom *SOX2* gena i njihov tretman RK u trajanju od tri nedelje će pokazati da li i kod ovih ćelijskih klonova dolazi do morfoloških promena u toku tretmana, kao i da li se povećana ekspresija *SOX2* gena održava tokom tretmana RK.

5.5.3. Analiza SOX2 i SOX3 proteina kod F5 i G3 ćelijskih klonova u toku tretmana RK

Podaci iz literature ukazuju da je RK- inicirana diferencijacija NT2/D1 ćelija praćena smanjenjem *SOX2* ekspresije i povećanjem *SOX3* ekspresije tokom ranih faza diferencijacije (Stevanovic, 2003). Imajući u vidu ove podatke, "Western blot"-om je analizirana ekspresija SOX2 i SOX3 proteina kod F5 i G3 ćelijskih klonova, kao i kod izvornih NT2/D1 ćelija. Ekspresija SOX2 proteina nije bila promenjena u toku četiri dana tretmana RK kod F5 i G3 ćelijskih klonova, kao i kod izvornih NT2/D1 ćelija, što je u skladu sa prethodno objavljenim rezultatima koji ukazuju da se ekspresija *SOX2* gena ne menja u toku osam dana tretmana RK (Deb-Rinker, 2005). Kod F5 i G3 ćelijskih klonova, kao i kod NT2/D1 ćelija, drugog dana tretmana RK dolazi do naglog skoka *SOX3* ekspresije, a četvrtog dana do blagog pada ekspresije u odnosu na drugi dan. Dobijeni rezultati su u skladu sa podacima iz literature koji ukazuju da ekspresija *SOX3* gena dostiže svoj maksimum 48 sati nakon tretmana RK, a nakon toga se ekspresija

smanjuje do nivoa koji je iznad onog detektovanog kod nediferenciranih ćelija (Stevanovic, 2003). Interesantno, kod ćelijskih klonova drugog i četvrtog dana tretmana detektovan je viši nivo ekspresije *SOX3* proteina u poređenju sa ekspresijom uočenom kod NT2/D1 ćelija tretiranih dva i četiri dana RK. Dalja istraživanja su neophodna da bi se utvrdilo da li kod RK tretiranih NT2/D1 ćelijskih klonova veći broj ćelija eksprimira *SOX3* gen ili je ekspresija ovog gena povećana na nivou pojedinačnih ćelija.

5.5.4. Analiza ekspresije markera pluripotentnosti kod NT2/D1 ćelijskih klonova sa povećanom ekspresijom *SOX2* gena u toku tretmana RK

Semi-kvantitativnom RT-PCR analizom detektovano je smanjenje ekspresije *OCT4* i *NANOG* gena tokom četiri dana tretmana RK kod F5 i G3 ćelijskih klonova, kao i kod izvornih NT2/D1 ćelija. Takođe, smanjenje ekspresije ovih markera pluripotentnosti tokom četiri dana tretmana RK detektovano je i kod E2, H9 i I7 ćelijskih klonova sa inducibilno povećanom ekspresijom *SOX2* gena. Detektovano smanjenje ekspresije *OCT4* i *NANOG* gena je očekivano imajući u vidu podatke iz literature koji ukazuju da je tretman NT2/D1 ćelija RK praćen smanjenjem ekspresije ovih gena tokom ranih faza diferencijacije (Deb-Rinker, 2005).

Smanjenje ekspresije ključnih markera pluripotentnosti kod NT2/D1 ćelijskih klonova sa povećanom ekspresijom *SOX2* gena ukazuje da su ovi ćelijski klonovi zadržali sposobnost ulaska u diferencijaciju i u uslovima povećane ekspresije *SOX2* gena.

5.5.5. Analiza ekspresije markera neuralne diferencijacije NT2/D1 ćelija kod NT2/D1 ćelijskih klonova sa povećanom ekspresijom *SOX2* gena u toku tretmana RK

U literaturi je opisano da se diferencijacija NT2/D1 ćelija u neurone može podeliti u tri faze (Przyborski, 2000). Za prvu fazu karakteristična je ekspresija *nestin* gena, za drugu *neuroD1* gena, dok je u toku treće faze povećana ekspresija gena za sinaptofizin (Przyborski, 2000). U ovom radu ekspresija markera neuralne diferencijacije analizirana

je tokom tretmana RK kod NT2/D1 ćelijskih klonova sa povećanom ekspresijom *SOX2* gena semi-kvantitativnim RT-PCR-om.

Rezultati dobijeni u ovom radu ukazuju da je ekspresija *nestin* gena tokom četiri dana tretmana RK povećana samo kod G3 ćelijskog klona. Kod ostalih analiziranih ćelijskih klonova sa povećanom ekspresijom *SOX2* gena (stabilnih i inducibilnih), kao i kod izvornih NT2/D1 ćelija nije detektovano povećanje ekspresije *nestin* gena u toku četiri dana tretmana RK. Ovi rezultati mogu da ukažu, sem u slučaju G3 ćelijskog klona, da tokom ranih faza tretmana RK, ćelijski klonovi i izvorne NT2/D1 ćelije nisu u većem broju započele diferencijaciju ka neuroektodermu.

Kako je jedan od ciljeva ovog rada bio analiza kasnijih faza neuralne diferencijacije u uslovima povećane ekspresije *SOX2* gena, ekspresije *neuroD1* gena i gena za sinaptofizin analizirane su kod F5 i G3 ćelijskih klonova i izvornih NT2/D1 ćelija tokom tri nedelje tretmana RK. Ekspresija *neuroD1* gena je detektovana sedmog dana tretmana RK kod F5 i G3 ćelijskih klonova, kao i kod izvornih NT2/D1 ćelija. Detektovano povećanje ekspresije *neuroD1* gena sedmog dana tretmana je u skladu sa prethodno objavljenim rezultatima na NT2/D1 ćelijama tokom tretmana RK (Przyborski, 2000). Interesantno, kod ćelijskih klonova ekspresija ovog neuralnog markera je bila značajno povećana, naročito dvadeset i prvog dana, u poređenju sa ekspresijom detektovanom kod tretiranih izvornih ćelija. Nagli skok ekspresije markera treće faze neuralne diferencijacije, gena za sinaptofizin, detektovan je dvadeset i prvog dana tretmana RK, pri čemu je, kao i u slučaju ekspresije *neuroD1* gena, ekspresija ovog markera bila značajno povećana u ćelijskim klonovima u poređenju sa tretiranim izvornim ćelijama. Detektovana povećanja ekspresije *neuroD1* gena i gena za sinaptofizin kod RK tretiranih F5 i G3 ćelijskih klonova, u poređenju sa ekspresijom ovih markera kod tretiranih NT2/D1 ćelija, mogu da budu posledica toga što je na nivou pojedinačne ćelije došlo do povećanja ekspresije ovih markera kod ćelijskih klonova u poređenju sa izvornim ćelijama. Pored toga detektovano povećanje ekspresije može biti i posledica povećanog broja ćelija koje ekspimiraju ova dva markera kod ćelijskih klonova u poređenju sa izvornim ćelijama. Naime, povećana ekspresija *SOX2* gena može dovesti do usporavanja terminalne neuralne diferencijacije što onda omogućava intermedijarnim ćelijama više vremena za proliferaciju pre nego što terminalno

diferenciraju. Kako je u literaturi opisano da tokom tretmana RK samo 10% NT2/D1 ćelije diferencira u neurone, detektovano povećanje može da ukaže da se u uslovima povećane ekspresije *SOX2* gena u populaciji ćelija tretiranih RK veći broj ćelija diferencirao u neurone.

Dalja istraživanja su neophodna da bi se razjasnilo da li je povećana ekspresija ova dva markera kod ćelijskih klonova sa povećanom ekspresijom *SOX2* gena posledica povećanog broja ćelija koji ekspimiraju *neuroD1* i gen za sinaptofizin, ili povećana ekspresija *SOX2* gena menja ekspresiju ciljnih gena koji onda direktnim ili indirektnim mehanizmima prouzrokuju povećanje ekspresije ova dva neuralna markera na nivou ćelije. Takođe, potrebno je utvrditi da li intermedijarne neuralne ćelije sa povećanom ekspresijom *neuroD1* gena i gena za sinaptofizin imaju veći proliferativni kapacitet i da li NT2/D1 ćelijski klonovi sa konstitutivnom ekspresijom *SOX2* gena imaju mogućnost da formiraju neurosfere i da se terminalno diferenciraju u neurone.

6. ZAKLJUČCI

U ovoj tezi su prikazani rezultati koji doprinose razjašnjavanju uloge *SOX2* gena u održavanju pluripotentnosti, kao i u neuralnoj diferencijaciji i proliferaciji matičnih ćelija. Analiza je obuhvatala generisanje i inicijalnu karakterizaciju NT2/D1 ćelijskih klonova (stabilnih i inducibilnih) sa povećanom ekspresijom *SOX2* gena. Takođe, ispitivana je ekspresija ključnih markera pluripotentnosti kod generisanih NT2/D1 ćelijskih klonova, kao i njihov proliferativni kapacitet. Neuralna diferencijacija NT2/D1 ćelijskih klonova sa povećanom ekspresijom *SOX2* gena proučavana je tokom tri nedelje tretmana RK analizom ekspresije markera neuralne diferencijacije. Rezultati prezentovani u ovom radu su pokazali da povećana ekspresija *SOX2* gena utiče na ekspresiju *OCT4* i *NANOG* gena. Takođe, u uslovima povećane ekspresije *SOX2* gena, približno 3,1 puta u odnosu na endogeni nivo, detektovano je povećanje proliferativnog kapaciteta ćelija. Zatim, povećanje ekspresije *SOX2* gena kod stabilnih NT2/D1 ćelijskih klonova dovodi i do izmenjene ekspresije markera neuralne diferencijacije tokom tri nedelje tretmana RK.

Na osnovu rezultata prikazanih u ovoj tezi mogu se izvesti sledeći zaključci:

1. Stabilnom transfekcijom NT2/D1 ćelija *SOX2*/pcDNA3.1 ekspresionim konstruktom i selekcijom u prisustvu G418 generisano je 19 ćelijskih klonova. Semi-kvantitativnom RT-PCR analizom ekspresija egzogenog *SOX2* gena detektovana je kod tri ćelijska klona (F2, F5, G3), dok je povećanje ukupne ekspresije *SOX2* gena detektovano kod dva NT2/D1 ćelijska klona označena kao F5 i G3. Ukupna ekspresija *SOX2* gena kod F5 ćelijskog klona je bila povećana oko 1,7 puta, a kod G3 ćelijskog klona oko 3,1 puta u poređenju sa ekspresijom ovog gena kod NT2/D1 ćelija. "Western blot" analizom F5 i G3 ćelijskih klonova detektovana je povećana ukupna ekspresija *SOX2* proteina u poređenju sa ekspresijom detektovanom kod izvornih NT2/D1 ćelija.

2. Semi-kvantitativnom RT-PCR analizom kod F5 i G3 ćelijskih klonova detektovano je statistički značajno smanjenje ekspresije *OCT4* gena (približno 2 puta), dok je ekspresija *NANOG* gena bila smanjena za jednu trećinu kod F5 ćelijskog klona, odnosno povećana oko 1,6 puta kod G3 ćelijskog klona u poređenju sa ekspresijom detektovanom kod NT2/D1 ćelija. Dobijeni rezultati ukazuju da promene u ukupnoj ekspresiji *SOX2* gena (povećanje od 1,7, odnosno 3,1 puta) utiču na ekspresiju ključnih markera pluripotentnosti, *OCT4* i *NANOG*-a.

3. Vizuelnim posmatranjem F5 i G3 ćelijskih klonova, kao i izvornih ćelija, tokom tri nedelje tretmana RK uočeno je da mala frakcija ćelija menja morfologiju i formiraju se ćelije koje po morfologiji podsećaju na neurone. Fokusi ćelija promenjene morfologije uočeni se sedmog dana tretmana RK kod NT2/D1 ćelija i G3 ćelijskog klona, odnosno četrnaestog dana kod F5 ćelijskog klona. Nakon tri nedelje tretmana RK broj fokusa sa ćelijama promenjene morfologije je bio najveći kod NT2/D1 ćelija, a najmanji kod F5 ćelijskog klona. Na osnovu vizuelnog posmatranja može se zaključiti da ćelijski klonovi sa povećanom ekspresijom *SOX2* gena zadržavaju sposobnost diferencijacije u prisustvu RK.

4. Rezultati semi-kvantitativnog RT-PCR-a ukazuju da F5 i G3 ćelijski klonovi zadržavaju povećanu ekspresiju *SOX2* gena i nakon tri nedelje tretmana RK. Ekspresija *SOX2* gena je bila povećana oko 1,4 puta kod F5 ćelijskog klona, odnosno 2,3 puta kod G3 ćelijskog klona, u poređenju sa ekspresijom kod tretiranih NT2/D1 ćelija. Ukupna ekspresija *SOX2* gena kod RK tretiranog G3 ćelijskog klona je bila povećana približno 1,3 puta u poređenju sa ekspresijom detektovanom kod netretiranih NT2/D1 ćelija. Ovi rezultati ukazuju na ulazak ćelijskih klonova u diferencijaciju čak i u prisustvu povećane ekspresije *SOX2* gena.

5. Semi-kvantitativnom RT-PCR analizom je detektovano da se ekspresija *OCT4* i *NANOG* gena smanjuje kod F5 i G3 ćelijskih klonova tokom četiri dana tretmana RK što dodatno ukazuje da ćelijski klonovi zadržavaju sposobnost diferencijacije u prisustvu RK.

6. "Western blot" analizom je detektovano da se nivo SOX2 proteina kod F5 i G3 ćelijskih klonova, kao i izvornih NT2/D1 ćelija, ne menja tokom četiri dana tretmana RK. Dva dana tretmana RK su dovela do porasta nivoa SOX3 proteina, da bi nakon četiri dana tretmana ekspresija ovog proteina bila smanjena kod NT2/D1 ćelija i ćelijskih klonova. Ekspresija SOX3 proteina je bila povećana drugog i četvrtog dana tretmana RK kod ćelijskih klonova u poređenju sa ekspresijom ovog proteina kod NT2/D1 ćelija.

7. Semi-kvantitativnom RT-PCR analizom F5 i G3 ćelijskih klonova četiri dana tretiranih RK uočen je porast ekspresije *nestin* gena kod G3 ćelijskog klona. Ekspresija markera druge faze neuralne diferencijacije (*neuroD1*) detektovana je sedmog dana tretmana RK kod F5 i G3 ćelijskih klonova, kao i kod NT2/D1 ćelija. Nakon tri nedelje tretmana, ekspresija *neuroD1* gena kod ćelijskih klonova je bila povećana približno 3,9 puta (F5 ćelijski klon), odnosno 5,3 puta (G3 ćelijski klon) u poređenju sa ekspresijom detektovanom kod tretiranih NT2/D1 ćelija. Kod F5 i G3 ćelijskih klonova tretiranih tri nedelje RK, ekspresija gena za sinaptofizin je povećana 2 puta (F5 ćelijski klon), odnosno 3,2 puta (G3 ćelijski klon) u poređenju sa ekspresijom detektovanom kod NT2/D1 ćelija tretiranih tri nedelje RK. Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da F5 i G3 ćelijski klonovi pod dejstvom RK ulaze u program neuralne diferencijacije.

8. Primenom MTT testa detektovano je da je stopa rasta G3 ćelijskog klona povećana približno 1,3 puta u poređenju sa stopom rasta detektovanom kod NT2/D1 ćelija. Statistički značajna razlika u stopi rasta nije detektovana između F5 ćelijskog klona i NT2/D1 ćelija. Fluorescentnom protočnom citometrijom je pokazano da relativna distribucija ćelija po fazama ćelijskog ciklusa nije izmenjena kod F5 i G3 ćelijskih klonova u odnosu na izvorne NT2/D1 ćelije. "Wound scratch" test je detektovano da su F5 i G3 ćelijski klonovi zadržali sposobnost migracije i invazivnost, kao i da G3 ćelijski klon efikasnije popunjava prazan prostor u poređenju sa NT2/D1 ćelijama i F5 ćelijskim klonom.

9. Stabilnom transfekcijom NT2/D1 ćelija *SOX2/pCXN2* ekspresionim konstruktom i selekcijom u prisustvu G418 nije generisan ćelijski klon sa povećanom ekspresijom

SOX2 gena. Potencijalni razlozi za to su visok nivo ekspresije *SOX2* gena koji je doveo do intenzivne smrti ćelija ili slaba efikasnost transfekcija.

10. NT2/D1 ćelijski klonovi sa inducibilno povećanom ekspresijom *SOX2* gena generisani su primenom inducibilnog "Tet-on" sistema u dva koraka: stabilnom transfekcijom NT2/D1 ćelija regulatornim plazmidom pCAG-rtTAOn-hyg i nakon toga tranzijentnom transfekcijom generisanih ćelijskih klonova korišćenjem "response" plazmida pTRE-SOX2-neo. Utvrđeno je da linearizacija plazmida povećava efikasnost generisanja stabilnih ćelijskih klonova. Nakon stabilne transfekcije uspostavljen je 21 ćelijski klon. PCR analizom identifikovano je da je do integracije regulatornog plazmida došlo kod svih uspostavljenih ćelijskih klonova. Primenom reporterskog eseja inducibilnost je detektovana kod 5 (B2, C5, E2, H9 i I7) od 14 testiranih ćelijskih klonova. Kako je najveća inducibilnost pri dodavanju doksiciklina detektovana kod ćelijskih klonova označenih kao E2, H9 i I7, ova tri ćelijska klona su tranzijentno transfektovana sa pTRE-SOX2-neo. Semi-kvantitativnom RT-PCR analizom kod E2, H9 i I7 ćelijskih klonova u prisustvu doksiciklina detektovano je povećanje ekspresije *SOX2* gena (kod E2 ćelijskog klona ekspresije *SOX2* gena je bila povećana i do 3,5 puta, kod H9 ćelijskog klona do 2,3 puta, a kod I7 ćelijskog klona do 35 puta u poređenju sa ekspresijom detektovanom kod netransfektovanih ćelijskih klonova), što ukazuje da su generisana tri ćelijska klona sa inducibilno povećanom ekspresijom *SOX2* gena.

11. Semi-kvantitativnom RT-PCR analizom kod E2 ćelijskog klona detektovano je povećanje ekspresije *SOX2* gena tokom četiri dana tretmana RK, dok je kod H9 ćelijskog detektovano smanjenje ekspresije *SOX2* gena do nivoa detektovanog kod ovog ćelijskog klona koji nije transfektovan sa pTRE-SOX2-neo, nije indukovano doksiciklinom i nije tretirano RK. Kod I7 ćelijskog klona četiri dana tretmana RK je dovelo do smanjenja ekspresije *SOX2* gena, ali je ekspresija ovog gena i dalje bila povećana u poređenju sa ekspresijom detektovanom kod ovog ćelijskog klona koji nije transfektovan sa pTRE-SOX2-neo, nije indukovano doksiciklinom i nije tretirano RK.

12. Semi-kvantitativnom RT-PCR analizom kod E2, H9 i I7 ćelijskih klonova sa inducibilno povećanom ekspresijom *SOX2* gena detektovano je smanjenje ekspresije *OCT4* i *NANOG* gena. Tokom tretmana RK u trajanju od četiri dana detektovano je dalje smanjenje ekspresije ovih markera pluripotentičnosti što ukazuje da i ovi ćelijski klonovi imaju sposobnost da uđu u diferencijaciju čak i u prisustvu povećane ekspresije *SOX2* gena.

13. Semi-kvantitativnom RT-PCR analizom kod E2, H9 i I7 ćelijskih klonova sa inducibilno povećanom ekspresijom *SOX2* gena tokom četiri dana tretmana nije detektovano povećanje ekspresije *nestin* gena. Ovi rezultati mogu da ukažu da kod ovih ćelijskih klonova sa inducibilno povećanom ekspresijom *SOX2* gena tretman RK ne uvodi ćelije u neuralnu diferencijaciju.

7. LITERATURA

- Adachi K, Kawase E, Yasuchika K, Sumi T, et al. (2006). Establishment of the gene-inducible system in primate embryonic stem cell lines. *Stem Cells*. 24: 2566-2572.
- Adachi K, Suemori H, Yasuda SY, Nakatsuji N, et al. (2010). Role of SOX2 in maintaining pluripotency of human embryonic stem cells. *Genes Cells*. 15: 455-470.
- Alatzoglou KS, Kelberman D, Dattani MT (2009). The role of SOX proteins in normal pituitary development. *J Endocrinol*. 200: 245-258.
- Albert H, Dale EC, Lee E, Ow DW (1995). Site-specific integration of DNA into wild-type and mutant lox sites placed in the plant genome. *Plant J*. 7: 649-659.
- Alley MC, Scudiero DA, Monks A, Hursey ML, et al. (1988). Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. *Cancer Res*. 48: 589-601.
- Andrews PW (1984a). Retinoic acid induces neuronal differentiation of a cloned human embryonal carcinoma cell line in vitro. *Dev Biol*. 103: 285-293.
- Andrews PW (1988). Human teratocarcinomas. *Biochim Biophys Acta*. 948: 17-36.
- Andrews PW (1998). Teratocarcinomas and human embryology: pluripotent human EC cell lines. Review article. *APMIS*. 106: 158-167; discussion 167-158.
- Andrews PW, Damjanov I, Simon D, Banting GS, et al. (1984b). Pluripotent embryonal carcinoma clones derived from the human teratocarcinoma cell line Tera-2. Differentiation in vivo and in vitro. *Lab Invest*. 50: 147-162.
- Arakawa H, Lodygin D, Buerstedde JM (2001). Mutant loxP vectors for selectable marker recycle and conditional knock-outs. *BMC Biotechnol*. 1: 7.
- Austin TW and Lagasse E (2003). Hepatic regeneration from hematopoietic stem cells. *Mech Dev*. 120: 131-135.
- Avilion AA, Nicolis SK, Pevny LH, Perez L, et al. (2003). Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. *Genes Dev*. 17: 126-140.
- Bagchi B, Kumar M, Mani S (2006). CMV promotor activity during ES cell differentiation: potential insight into embryonic stem cell differentiation. *Cell Biol Int*. 30: 505-513.
- Baldassarre G, Boccia A, Bruni P, Sandomenico C, et al. (2000). Retinoic acid induces neuronal differentiation of embryonal carcinoma cells by reducing proteasome-dependent proteolysis of the cyclin-dependent inhibitor p27. *Cell Growth Differ*. 11: 517-526.
- Bani-Yaghoob M, Tremblay RG, Lei JX, Zhang D, et al. (2006). Role of Sox2 in the development of the mouse neocortex. *Dev Biol*. 295: 52-66.
- Barber RD, Harmer DW, Coleman RA, Clark BJ (2005). GAPDH as a housekeeping gene: analysis of GAPDH mRNA expression in a panel of 72 human tissues. *Physiol Genomics*. 21: 389-395.
- Benayoun BA and Veitia RA (2009). A post-translational modification code for transcription factors: sorting through a sea of signals. *Trends Cell Biol*. 19: 189-197.
- Bergsland M, Werme M, Malewicz M, Perlmann T, et al. (2006). The establishment of neuronal properties is controlled by Sox4 and Sox11. *Genes Dev*. 20: 3475-3486.

- Bernard P and Harley VR (2010). Acquisition of SOX transcription factor specificity through protein-protein interaction, modulation of Wnt signalling and post-translational modification. *Int J Biochem Cell Biol.* 42: 400-410.
- Bliss TM, Kelly S, Shah AK, Foo WC, et al. (2006). Transplantation of hNT neurons into the ischemic cortex: cell survival and effect on sensorimotor behavior. *J Neurosci Res.* 83: 1004-1014.
- Boer B, Kopp J, Mallanna S, Desler M, et al. (2007). Elevating the levels of Sox2 in embryonal carcinoma cells and embryonic stem cells inhibits the expression of Sox2:Oct-3/4 target genes. *Nucleic Acids Res.* 35: 1773-1786.
- Borlongan CV, Tajima Y, Trojanowski JQ, Lee VM, et al. (1998). Transplantation of cryopreserved human embryonal carcinoma-derived neurons (NT2N cells) promotes functional recovery in ischemic rats. *Exp Neurol.* 149: 310-321.
- Boyer LA, Lee TI, Cole MF, Johnstone SE, et al. (2005). Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell.* 122: 947-956.
- Bradford MM (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72: 248-254.
- Britsch S, Goerich DE, Riethmacher D, Peirano RI, et al. (2001). The transcription factor Sox10 is a key regulator of peripheral glial development. *Genes Dev.* 15: 66-78.
- Bylund M, Andersson E, Novitsch BG, Muhr J (2003). Vertebrate neurogenesis is counteracted by Sox1-3 activity. *Nat Neurosci.* 6: 1162-1168.
- Cabanas MJ, Vazquez D, Modolell J (1978). Dual interference of hygromycin B with ribosomal translocation and with aminoacyl-tRNA recognition. *Eur J Biochem.* 87: 21-27.
- Card DA, Hebbar PB, Li L, Trotter KW, et al. (2008). Oct4/Sox2-regulated miR-302 targets cyclin D1 in human embryonic stem cells. *Mol Cell Biol.* 28: 6426-6438.
- Chambers I, Silva J, Colby D, Nichols J, et al. (2007). Nanog safeguards pluripotency and mediates germline development. *Nature.* 450: 1230-1234.
- Chen Y, Shi L, Zhang L, Li R, et al. (2008). The molecular mechanism governing the oncogenic potential of SOX2 in breast cancer. *J Biol Chem.* 283: 17969-17978.
- Cheung M and Briscoe J (2003). Neural crest development is regulated by the transcription factor Sox9. *Development.* 130: 5681-5693.
- Cheung WM, Fu WY, Hui WS, Ip NY (1999). Production of human CNS neurons from embryonal carcinoma cells using a cell aggregation method. *Biotechniques.* 26: 946-948, 950-942, 954.
- Chew JL, Loh YH, Zhang W, Chen X, et al. (2005). Reciprocal transcriptional regulation of Pou5f1 and Sox2 via the Oct4/Sox2 complex in embryonic stem cells. *Mol Cell Biol.* 25: 6031-6046.
- Chew LJ and Gallo V (2009). The Yin and Yang of Sox proteins: Activation and repression in development and disease. *J Neurosci Res.* 87: 3277-3287.
- Choi YJ, Son MY, Hasty P (2011). One-step knockin for inducible expression in mouse embryonic stem cells. *Genesis.* 49: 92-97.
- Cole RJ, Edwards RG, Paul J (1966). Cytodifferentiation and embryogenesis in cell colonies and tissue cultures derived from ova and blastocysts of the rabbit. *Dev Biol.* 13: 385-407.

- Colosimo A, Goncz KK, Holmes AR, Kunzelmann K, et al. (2000). Transfer and expression of foreign genes in mammalian cells. *Biotechniques*. 29: 314-318, 320-312, 324 passim.
- Coyle DE, Li J, Baccei M (2011). Regional differentiation of retinoic acid-induced human pluripotent embryonic carcinoma stem cell neurons. *PLoS One*. 6: e16174.
- Deb-Rinker P, Ly D, Jezierski A, Sikorska M, et al. (2005). Sequential DNA methylation of the Nanog and Oct-4 upstream regions in human NT2 cells during neuronal differentiation. *J Biol Chem*. 280: 6257-6260.
- Deng W (2010). Exploiting pluripotency for therapeutic gain. *Panminerva Med*. 52: 167-173.
- Durnaoglu S, Genc S, Genc K (2011). Patient-specific pluripotent stem cells in neurological diseases. *Stem Cells Int*. 2011: 212487.
- Eisenberg E and Levanon EY (2003). Human housekeeping genes are compact. *Trends Genet*. 19: 362-365.
- Eminli S, Utikal J, Arnold K, Jaenisch R, et al. (2008). Reprogramming of neural progenitor cells into induced pluripotent stem cells in the absence of exogenous Sox2 expression. *Stem Cells*. 26: 2467-2474.
- Favaloro J, Treisman R, Kamen R (1980). Transcription maps of polyoma virus-specific RNA: analysis by two-dimensional nuclease S1 gel mapping. *Methods Enzymol*. 65: 718-749.
- Feinberg AP and Vogelstein B (1983). A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem*. 132: 6-13.
- Fenno LE, Ptaszek LM, Cowan CA (2008). Human embryonic stem cells: emerging technologies and practical applications. *Curr Opin Genet Dev*. 18: 324-329.
- Fregien N and Davidson N (1986). Activating elements in the promoter region of the chicken beta-actin gene. *Gene*. 48: 1-11.
- Gage FH (2000). Mammalian neural stem cells. *Science*. 287: 1433-1438.
- Glauche I, Herberg M, Roeder I (2010). Nanog variability and pluripotency regulation of embryonic stem cells--insights from a mathematical model analysis. *PLoS One*. 5: e11238.
- Glover DJ, Lipps HJ, Jans DA (2005). Towards safe, non-viral therapeutic gene expression in humans. *Nat Rev Genet*. 6: 299-310.
- Gossen M, Freundlieb S, Bender G, Muller G, et al. (1995). Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells. *Science*. 268: 1766-1769.
- Graham V, Khudyakov J, Ellis P, Pevny L (2003). SOX2 functions to maintain neural progenitor identity. *Neuron*. 39: 749-765.
- Guillemain I, Alonso G, Patey G, Privat A, et al. (2000). Human NT2 neurons express a large variety of neurotransmission phenotypes in vitro. *J Comp Neurol*. 422: 380-395.
- Guth SI and Wegner M (2008). Having it both ways: Sox protein function between conservation and innovation. *Cell Mol Life Sci*. 65: 3000-3018.
- Hanna J, Wernig M, Markoulaki S, Sun CW, et al. (2007). Treatment of sickle cell anemia mouse model with iPS cells generated from autologous skin. *Science*. 318: 1920-1923.

- Hara K, Yasuhara T, Maki M, Matsukawa N, et al. (2008). Neural progenitor NT2N cell lines from teratocarcinoma for transplantation therapy in stroke. *Prog Neurobiol.* 85: 318-334.
- Hardy M, Younkin D, Tang CM, Pleasure J, et al. (1994). Expression of non-NMDA glutamate receptor channel genes by clonal human neurons. *J Neurochem.* 63: 482-489.
- Harley VR, Lovell-Badge R, Goodfellow PN (1994). Definition of a consensus DNA binding site for SRY. *Nucleic Acids Res.* 22: 1500-1501.
- Hartley RS, Margulis M, Fishman PS, Lee VM, et al. (1999). Functional synapses are formed between human NTera2 (NT2N, hNT) neurons grown on astrocytes. *J Comp Neurol.* 407: 1-10.
- Hawke TJ and Garry DJ (2001). Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology. *J Appl Physiol.* 91: 534-551.
- Hillen W and Berens C (1994). Mechanisms underlying expression of Tn10 encoded tetracycline resistance. *Annu Rev Microbiol.* 48: 345-369.
- Hogan B, Fellous M, Avner P, Jacob F (1977). Isolation of a human teratoma cell line which expresses F9 antigen. *Nature.* 270: 515-518.
- Hong CS and Saint-Jeannet JP (2005). Sox proteins and neural crest development. *Semin Cell Dev Biol.* 16: 694-703.
- Hromas R, Ye H, Spinella M, Dmitrovsky E, et al. (1999). Genesis, a Winged Helix transcriptional repressor, has embryonic expression limited to the neural crest, and stimulates proliferation in vitro in a neural development model. *Cell Tissue Res.* 297: 371-382.
- Ito M, Yamanouchi K, Naito K, Calos MP, et al. (2011). Site-specific integration of transgene targeting an endogenous lox-like site in early mouse embryos. *J Appl Genet.* 52: 89-94.
- Kahan BW and Ephrussi B (1970). Developmental potentialities of clonal in vitro cultures of mouse testicular teratoma. *J Natl Cancer Inst.* 44: 1015-1036.
- Kamachi Y, Iwafuchi M, Okuda Y, Takemoto T, et al. (2009). Evolution of non-coding regulatory sequences involved in the developmental process: reflection of differential employment of paralogous genes as highlighted by Sox2 and group B1 Sox genes. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.* 85: 55-68.
- Kamachi Y, Sockanathan S, Liu Q, Breitman M, et al. (1995). Involvement of SOX proteins in lens-specific activation of crystallin genes. *EMBO J.* 14: 3510-3519.
- Kamachi Y, Uchikawa M, Collignon J, Lovell-Badge R, et al. (1998). Involvement of Sox1, 2 and 3 in the early and subsequent molecular events of lens induction. *Development.* 125: 2521-2532.
- Karsunky H, Mende I, Schmidt T, Moroy T (2002). High levels of the onco-protein Gfi-1 accelerate T-cell proliferation and inhibit activation induced T-cell death in Jurkat T-cells. *Oncogene.* 21: 1571-1579.
- Kerley-Hamilton JS, Pike AM, Hutchinson JA, Freemantle SJ, et al. (2007). The direct p53 target gene, FLJ11259/DRAM, is a member of a novel family of transmembrane proteins. *Biochim Biophys Acta.* 1769: 209-219.
- Kiefer JC (2007). Back to basics: Sox genes. *Dev Dyn.* 236: 2356-2366.

- Kim D, Kim CH, Moon JI, Chung YG, et al. (2009). Generation of human induced pluripotent stem cells by direct delivery of reprogramming proteins. *Cell Stem Cell*. 4: 472-476.
- Kim J, Lo L, Dormand E, Anderson DJ (2003). SOX10 maintains multipotency and inhibits neuronal differentiation of neural crest stem cells. *Neuron*. 38: 17-31.
- Kim JH, Auerbach JM, Rodriguez-Gomez JA, Velasco I, et al. (2002). Dopamine neurons derived from embryonic stem cells function in an animal model of Parkinson's disease. *Nature*. 418: 50-56.
- Kim S, Kim GJ, Miyoshi H, Moon SH, et al. (2007). Efficiency of the elongation factor-1alpha promoter in mammalian embryonic stem cells using lentiviral gene delivery systems. *Stem Cells Dev*. 16: 537-545.
- Kim TK and Eberwine JH (2010). Mammalian cell transfection: the present and the future. *Anal Bioanal Chem*. 397: 3173-3178.
- Kishi M, Mizuseki K, Sasai N, Yamazaki H, et al. (2000). Requirement of Sox2-mediated signaling for differentiation of early Xenopus neuroectoderm. *Development*. 127: 791-800.
- Kleinsmith LJ and Pierce GB, Jr. (1964). Multipotentiality of Single Embryonal Carcinoma Cells. *Cancer Res*. 24: 1544-1551.
- Kondoh H and Kamachi Y (2010). SOX-partner code for cell specification: Regulatory target selection and underlying molecular mechanisms. *Int J Biochem Cell Biol*. 42: 391-399.
- Kopp JL, Ormsbee BD, Desler M, Rizzino A (2008). Small increases in the level of Sox2 trigger the differentiation of mouse embryonic stem cells. *Stem Cells*. 26: 903-911.
- Kuhlbrodt K, Herbarth B, Sock E, Hermans-Borgmeyer I, et al. (1998a). Sox10, a novel transcriptional modulator in glial cells. *J Neurosci*. 18: 237-250.
- Kuhlbrodt K, Schmidt C, Sock E, Pingault V, et al. (1998b). Functional analysis of Sox10 mutations found in human Waardenburg-Hirschsprung patients. *J Biol Chem*. 273: 23033-23038.
- Laemmli UK (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227: 680-685.
- Lang H, Li M, Kilpatrick LA, Zhu J, et al. (2011). Sox2 up-regulation and glial cell proliferation following degeneration of spiral ganglion neurons in the adult mouse inner ear. *J Assoc Res Otolaryngol*. 12: 151-171.
- Laudet V, Stehelin D, Clevers H (1993). Ancestry and diversity of the HMG box superfamily. *Nucleic Acids Res*. 21: 2493-2501.
- Lee JE, Hollenberg SM, Snider L, Turner DL, et al. (1995). Conversion of Xenopus ectoderm into neurons by NeuroD, a basic helix-loop-helix protein. *Science*. 268: 836-844.
- Lefebvre V, Dumitriu B, Penzo-Mendez A, Han Y, et al. (2007). Control of cell fate and differentiation by Sry-related high-mobility-group box (Sox) transcription factors. *Int J Biochem Cell Biol*. 39: 2195-2214.
- Lei JX, Liu QY, Sodja C, LeBlanc J, et al. (2005). S/MAR-binding properties of Sox2 and its involvement in apoptosis of human NT2 neural precursors. *Cell Death Differ*. 12: 1368-1377.

- Lensch MW, Daheron L, Schlaeger TM (2006). Pluripotent stem cells and their niches. *Stem Cell Rev.* 2: 185-201.
- Leypoldt F, Lewerenz J, Methner A (2001). Identification of genes up-regulated by retinoic-acid-induced differentiation of the human neuronal precursor cell line NTERA-2 cl.D1. *J Neurochem.* 76: 806-814.
- Liew CG, Draper JS, Walsh J, Moore H, et al. (2007). Transient and stable transgene expression in human embryonic stem cells. *Stem Cells.* 25: 1521-1528.
- Long KB and Hornick JL (2009). SOX2 is highly expressed in squamous cell carcinomas of the gastrointestinal tract. *Hum Pathol.* 40: 1768-1773.
- Maden M (2002). Retinoid signalling in the development of the central nervous system. *Nat Rev Neurosci.* 3: 843-853.
- Maerz WJ, Baselga J, Reuter VE, Mellado B, et al. (1998). FGF4 dissociates anti-tumorigenic from differentiation signals of retinoic acid in human embryonal carcinomas. *Oncogene.* 17: 761-767.
- Maka M, Stolt CC, Wegner M (2005). Identification of Sox8 as a modifier gene in a mouse model of Hirschsprung disease reveals underlying molecular defect. *Dev Biol.* 277: 155-169.
- Malki S, Boizet-Bonhoure B, Poulat F (2010). Shuttling of SOX proteins. *Int J Biochem Cell Biol.* 42: 411-416.
- Masui S (2010). Pluripotency maintenance mechanism of embryonic stem cells and reprogramming. *Int J Hematol.* 91: 360-372.
- Masui S, Nakatake Y, Toyooka Y, Shimosato D, et al. (2007). Pluripotency governed by Sox2 via regulation of Oct3/4 expression in mouse embryonic stem cells. *Nat Cell Biol.* 9: 625-635.
- Milivojević M NG, Kovačević-Grujičić N, Krstić A, Mojsin M, Drakulić D, Stevanović M (2010). Involvement of ubiquitous and TALE transcription factors, as well as liganded RXR α in the regulation of human SOX2 gene expression in NT2/D1 embryonal carcinoma cell line. *Arch Biol Sci, Belgrade.* 62: 199-210.
- Mills AA (2001). Changing colors in mice: an inducible system that delivers. *Genes Dev.* 15: 1461-1467.
- Mitsui K, Tokuzawa Y, Itoh H, Segawa K, et al. (2003). The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell.* 113: 631-642.
- Miyagi S, Kato H, Okuda A (2009). Role of SoxB1 transcription factors in development. *Cell Mol Life Sci.* 66: 3675-3684.
- Miyagi S, Nishimoto M, Saito T, Ninomiya M, et al. (2006). The Sox2 regulatory region 2 functions as a neural stem cell-specific enhancer in the telencephalon. *J Biol Chem.* 281: 13374-13381.
- Miyazaki J, Takaki S, Araki K, Tashiro F, et al. (1989). Expression vector system based on the chicken beta-actin promoter directs efficient production of interleukin-5. *Gene.* 79: 269-277.
- Morshead CM (2004). Adult neural stem cells: attempting to solve the identity crisis. *Dev Neurosci.* 26: 93-100.
- Mountford JC (2008). Human embryonic stem cells: origins, characteristics and potential for regenerative therapy. *Transfus Med.* 18: 1-12.

- Newsome PN, Hussain MA, Theise ND (2004). Hepatic oval cells: helping redefine a paradigm in stem cell biology. *Curr Top Dev Biol.* 61: 1-28.
- Nguyen TN, Phan QG, Duong LP, Bertrand KP, et al. (1989). Effects of carriage and expression of the Tn10 tetracycline-resistance operon on the fitness of *Escherichia coli* K12. *Mol Biol Evol.* 6: 213-225.
- Niwa H, Yamamura K, Miyazaki J (1991). Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector. *Gene.* 108: 193-199.
- Okubo T, Pevny LH, Hogan BL (2006). Sox2 is required for development of taste bud sensory cells. *Genes Dev.* 20: 2654-2659.
- Otsubo T, Akiyama Y, Yanagihara K, Yuasa Y (2008). SOX2 is frequently downregulated in gastric cancers and inhibits cell growth through cell-cycle arrest and apoptosis. *Br J Cancer.* 98: 824-831.
- Ozdener H (2007). Inducible functional expression of Bcl-2 in human astrocytes derived from NTERA-2 cells. *J Neurosci Methods.* 159: 8-18.
- Pan G and Thomson JA (2007). Nanog and transcriptional networks in embryonic stem cell pluripotency. *Cell Res.* 17: 42-49.
- Papanayotou C, Mey A, Birot AM, Saka Y, et al. (2008). A mechanism regulating the onset of Sox2 expression in the embryonic neural plate. *PLoS Biol.* 6: e2.
- Paquet-Durand F and Bicker G (2007). Human model neurons in studies of brain cell damage and neural repair. *Curr Mol Med.* 7: 541-554.
- Pevny L and Placzek M (2005). SOX genes and neural progenitor identity. *Curr Opin Neurobiol.* 15: 7-13.
- Pevny LH and Lovell-Badge R (1997). Sox genes find their feet. *Curr Opin Genet Dev.* 7: 338-344.
- Pleasure SJ and Lee VM (1993). NTERA 2 cells: a human cell line which displays characteristics expected of a human committed neuronal progenitor cell. *J Neurosci Res.* 35: 585-602.
- Pleasure SJ, Page C, Lee VM (1992). Pure, postmitotic, polarized human neurons derived from NTERA 2 cells provide a system for expressing exogenous proteins in terminally differentiated neurons. *J Neurosci.* 12: 1802-1815.
- Polanco JC and Koopman P (2007). Sry and the hesitant beginnings of male development. *Dev Biol.* 302: 13-24.
- Prior HM and Walter MA (1996). SOX genes: architects of development. *Mol Med.* 2: 405-412.
- Przyborski SA, Morton IE, Wood A, Andrews PW (2000). Developmental regulation of neurogenesis in the pluripotent human embryonal carcinoma cell line NTERA-2. *Eur J Neurosci.* 12: 3521-3528.
- Puranam KL, Guo WX, Qian WH, Nikbakht K, et al. (1999). CLN3 defines a novel antiapoptotic pathway operative in neurodegeneration and mediated by ceramide. *Mol Genet Metab.* 66: 294-308.
- Quinlan N (2011). Regulation of Reactive-Astrocyte Derived Neural Stem/Progenitor Cells by the Sox2 Transcription Factor. University of Vermont
- Rizzino A (2008). Transcription factors that behave as master regulators during mammalian embryogenesis function as molecular rheostats. *Biochem J.* 411: e5-7.

- Rizzino A (2009). Sox2 and Oct-3/4: a versatile pair of master regulators that orchestrate the self-renewal and pluripotency of embryonic stem cells. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med.* 1: 228-236.
- Rodda DJ, Chew JL, Lim LH, Loh YH, et al. (2005). Transcriptional regulation of nanog by OCT4 and SOX2. *J Biol Chem.* 280: 24731-24737.
- Romano G (2004). Systems for regulated or tissue-specific gene expression. *Drug News Perspect.* 17: 85-90.
- Rubinchik S, Woraratanadharm J, Yu H, Dong JY (2005). New complex Ad vectors incorporating both rtTA and tTS deliver tightly regulated transgene expression both in vitro and in vivo. *Gene Ther.* 12: 504-511.
- Sandberg M, Kallstrom M, Muhr J (2005). Sox21 promotes the progression of vertebrate neurogenesis. *Nat Neurosci.* 8: 995-1001.
- Sandhu JK, Sikorska M, Walker PR (2002). Characterization of astrocytes derived from human NTERA-2/D1 embryonal carcinoma cells. *J Neurosci Res.* 68: 604-614.
- Santerre RF, Allen NE, Hobbs JN, Jr., Rao RN, et al. (1984). Expression of prokaryotic genes for hygromycin B and G418 resistance as dominant-selection markers in mouse L cells. *Gene.* 30: 147-156.
- Schepers GE, Teasdale RD, Koopman P (2002). Twenty pairs of sox: extent, homology, and nomenclature of the mouse and human sox transcription factor gene families. *Dev Cell.* 3: 167-170.
- Schilham MW, Oosterwegel MA, Moerer P, Ya J, et al. (1996). Defects in cardiac outflow tract formation and pro-B-lymphocyte expansion in mice lacking Sox-4. *Nature.* 380: 711-714.
- Sell S (2004) Stem Cells Handbook: Humana Press.
- Simoes PD and Ramos T (2007). Human pluripotent embryonal carcinoma NTERA2 cl.D1 cells maintain their typical morphology in an angiomyogenic medium. *J Negat Results Biomed.* 6: 5.
- Singh A, Ursic D, Davies J (1979). Phenotypic suppression and misreading *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature.* 277: 146-148.
- Sipo I, Hurtado Pico A, Wang X, Eberle J, et al. (2006). An improved Tet-On regulatable FasL-adenovirus vector system for lung cancer therapy. *J Mol Med (Berl).* 84: 215-225.
- Slater TF, Sawyer B, Strauli U (1963). Studies on Succinate-Tetrazolium Reductase Systems. Iii. Points of Coupling of Four Different Tetrazolium Salts. *Biochim Biophys Acta.* 77: 383-393.
- Spitzer NC (2006). Electrical activity in early neuronal development. *Nature.* 444: 707-712.
- Squires PE, Wakeman JA, Chapman H, Kumpf S, et al. (1996). Regulation of intracellular Ca²⁺ in response to muscarinic and glutamate receptor agonists during the differentiation of NTERA2 human embryonal carcinoma cells into neurons. *Eur J Neurosci.* 8: 783-793.
- Stadtfeld M, Brennand K, Hochedlinger K (2008). Reprogramming of pancreatic beta cells into induced pluripotent stem cells. *Curr Biol.* 18: 890-894.
- Stevanovic M (2003). Modulation of SOX2 and SOX3 gene expression during differentiation of human neuronal precursor cell line NTERA2. *Mol Biol Rep.* 30: 127-132.

- Stevanovic M, Zuffardi O, Collignon J, Lovell-Badge R, et al. (1994). The cDNA sequence and chromosomal location of the human SOX2 gene. *Mamm Genome*. 5: 640-642.
- Stewart R, Yang C, Anyfantis G, Przyborski S, et al. (2008). Silencing of the expression of pluripotent driven-reporter genes stably transfected into human pluripotent cells. *Regen Med*. 3: 505-522.
- Stolt CC, Lommes P, Friedrich RP, Wegner M (2004). Transcription factors Sox8 and Sox10 perform non-equivalent roles during oligodendrocyte development despite functional redundancy. *Development*. 131: 2349-2358.
- Stolt CC, Lommes P, Sock E, Chaboissier MC, et al. (2003). The Sox9 transcription factor determines glial fate choice in the developing spinal cord. *Genes Dev*. 17: 1677-1689.
- Stolt CC, Rehberg S, Ader M, Lommes P, et al. (2002). Terminal differentiation of myelin-forming oligodendrocytes depends on the transcription factor Sox10. *Genes Dev*. 16: 165-170.
- Stolt CC, Schlierf A, Lommes P, Hillgartner S, et al. (2006). SoxD proteins influence multiple stages of oligodendrocyte development and modulate SoxE protein function. *Dev Cell*. 11: 697-709.
- Stolt CC, Schmitt S, Lommes P, Sock E, et al. (2005). Impact of transcription factor Sox8 on oligodendrocyte specification in the mouse embryonic spinal cord. *Dev Biol*. 281: 309-317.
- Stuchbury G and Munch G (2010). Optimizing the generation of stable neuronal cell lines via pre-transfection restriction enzyme digestion of plasmid DNA. *Cytotechnology*. 62: 189-194.
- Sudbeck P and 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: 27848-27852.
- Sudhof TC, Lottspeich F, Greengard P, Mehl E, et al. (1987). A synaptic vesicle protein with a novel cytoplasmic domain and four transmembrane regions. *Science*. 238: 1142-1144.
- Sun Y, Li H, Yang H, Rao MS, et al. (2006). Mechanisms controlling embryonic stem cell self-renewal and differentiation. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*. 16: 211-231.
- Taketo M, Gilboa E, Sherman MI (1985). Isolation of embryonal carcinoma cell lines that express integrated recombinant genes flanked by the Moloney murine leukemia virus long terminal repeat. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 82: 2422-2426.
- Taranova OV, Magness ST, Fagan BM, Wu Y, et al. (2006). SOX2 is a dose-dependent regulator of retinal neural progenitor competence. *Genes Dev*. 20: 1187-1202.
- Taylor KM and Labonne C (2005). SoxE factors function equivalently during neural crest and inner ear development and their activity is regulated by SUMOylation. *Dev Cell*. 9: 593-603.
- Tompkins DH, Besnard V, Lange AW, Keiser AR, et al. (2011). Sox2 activates cell proliferation and differentiation in the respiratory epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 45: 101-110.
- Tonge PD and Andrews PW (2010). Retinoic acid directs neuronal differentiation of human pluripotent stem cell lines in a non-cell-autonomous manner. *Differentiation*. 80: 20-30.

- Triezenberg SJ, Kingsbury RC, McKnight SL (1988). Functional dissection of VP16, the trans-activator of herpes simplex virus immediate early gene expression. *Genes Dev.* 2: 718-729.
- 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: 103-120.
- Utikal J, Maherali N, Kulalert W, Hochedlinger K (2009). Sox2 is dispensable for the reprogramming of melanocytes and melanoma cells into induced pluripotent stem cells. *J Cell Sci.* 122: 3502-3510.
- van de Loosdrecht AA, Beelen RH, Ossenkoppele GJ, Broekhoven MG, et al. (1994). A tetrazolium-based colorimetric MTT assay to quantitate human monocyte mediated cytotoxicity against leukemic cells from cell lines and patients with acute myeloid leukemia. *J Immunol Methods.* 174: 311-320.
- Verfaillie C (2009). Pluripotent stem cells. *Transfus Clin Biol.* 16: 65-69.
- Wang S, Rosengren LE, Franlund M, Hamberger A, et al. (1999). Bcl-2 expression regulates cell sensitivity to S100beta-mediated apoptosis. *Brain Res Mol Brain Res.* 70: 167-176.
- Watt FM and Driskell RR (2010). The therapeutic potential of stem cells. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 365: 155-163.
- Wegner M (1999). From head to toes: the multiple facets of Sox proteins. *Nucleic Acids Res.* 27: 1409-1420.
- Wegner M (2010). All purpose Sox: The many roles of Sox proteins in gene expression. *Int J Biochem Cell Biol.* 42: 381-390.
- Wegner M and Stolt CC (2005). From stem cells to neurons and glia: a Soxist's view of neural development. *Trends Neurosci.* 28: 583-588.
- Wernig M, Zhao JP, Pruszak J, Hedlund E, et al. (2008). Neurons derived from reprogrammed fibroblasts functionally integrate into the fetal brain and improve symptoms of rats with Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105: 5856-5861.
- Wurm FM (2004). Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. *Nat Biotechnol.* 22: 1393-1398.
- Xu N, Papagiannakopoulos T, Pan G, Thomson JA, et al. (2009). MicroRNA-145 regulates OCT4, SOX2, and KLF4 and represses pluripotency in human embryonic stem cells. *Cell.* 137: 647-658.
- Xu W, Coll JL, Adamson ED (1998). Rescue of the mutant phenotype by reexpression of full-length vinculin in null F9 cells; effects on cell locomotion by domain deleted vinculin. *J Cell Sci.* 111 (Pt 11): 1535-1544.
- Yenofsky RL, Fine M, Pellow JW (1990). A mutant neomycin phosphotransferase II gene reduces the resistance of transformants to antibiotic selection pressure. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 87: 3435-3439.
- Young RA (2011). Control of the embryonic stem cell state. *Cell.* 144: 940-954.
- Younkin DP, Tang CM, Hardy M, Reddy UR, et al. (1993). Inducible expression of neuronal glutamate receptor channels in the NT2 human cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90: 2174-2178.

- Zeng X, Chen J, Sanchez JF, Coggiano M, et al. (2003). Stable expression of hrGFP by mouse embryonic stem cells: promoter activity in the undifferentiated state and during dopaminergic neural differentiation. *Stem Cells*. 21: 647-653.
- Zhang C, Basta T, Klymkowsky MW (2005). SOX7 and SOX18 are essential for cardiogenesis in *Xenopus*. *Dev Dyn*. 234: 878-891.
- Zhao S, Nichols J, Smith AG, Li M (2004). SoxB transcription factors specify neuroectodermal lineage choice in ES cells. *Mol Cell Neurosci*. 27: 332-342.



M



РД 21592



300169426

COBISS e