

UNIVERZITET U BEOGRADU
BIOLOŠKI FAKULTET

Jelena D. Marjanović

**ANALIZA ULOGE GENA SOX1 I SOX3 U
PROMOVISANJU MALIGNOG FENOTIPA
ĆELIJA GLIOBLASTOMA**

doktorska disertacija

Beograd, 2019

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF BIOLOGY

Jelena D. Marjanović

**ANALYSIS OF THE ROLE OF *SOX1* AND
SOX3 GENES IN PROMOTION OF
MALIGNANT PHENOTYPE OF
GLIOBLASTOMA CELLS**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2019

MENTORI:

dr Danijela Drakulić, naučni saradnik, Univerzitet u Beogradu - Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo

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

KOMISIJA:

dr Danijela Drakulić, naučni saradnik, Univerzitet u Beogradu - Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo

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

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

Datum odbrane _____

Zahvalnica

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

Ovom prilikom se zahvaljujem svom mentoru Dr Danijeli Drakulić na razumevanju koje je uvek imala za mene, svim savetima i sugestijama, kao i beskrajnoj pomoći prilikom izrade ove disertacije.

Zahvaljujem se akademiku Mileni Stevanović na ukazanom poverenju i prilici da svoju doktorsku disertaciju realizujem u Laboratoriji za humanu molekularnu genetiku pod njenim mentorstvom. Zahvaljujem se i na spremnosti da svoje znanje i iskustvo podeli sa mnom.

Profesoru Goranu Brajuškoviću se zahvaljujem što je prihvatio da bude član komisije i pomogne u kritičkoj analizi i oceni ove disertacije.

Veliku zahvalnost dugujem svim kolegama iz Laboratorije: mojim voljenim sestrama Dani i Vlandi, mom prvom mentoru i osobi uz koju sam zavolela ovaj posao Mariji (jednom mentor uvek mentor), mom magu za mikroskop i photoshop Švirtlici, mom tangerosu Isi, mojoj brižnoj i uvek ubrzanoj Miki, mom najboljem dostavljaču slavonske hrane Danijeli, mom najomiljenijem matorcu Kiki, mom idolu numero uno Grujici, mojoj najružičastijoj plavuši Đuri i mom biciklisti Slobi! Hvala vam za svaki savet, pomoć, pevanje, razgibavanje, smejanje, lapsuse, nadimke, svaku skuvanu kafu, svaki podeljeni ručak i svu emociju koju ste mi poklonili. Hvala vam neizmerno i što ste me trpeli, to je trebalo izdržati.

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

*I na kraju, oni koji su uvek prvi – moji mama, tata, bratić, Buta i Ljilja.
Vi ste uporište moje snage, tvrđava moje sigurnosti, moja krila, sklonište i
spokoj. Bez vas ništa od ovoga ne bi bilo moguće.*

Analiza uloge gena *SOX1* i *SOX3* u promovisanju malignog fenotipa ćelija glioblastoma

Sažetak:

Glioblastom, glioma tumor gradusa IV, je najčešći maligni tumor mozga kod odraslih i jedan od najsmrtonosnijih tipova tumora. I pored agresivne terapije koja obuhvata hirurško uklanjanje tumora, radio- i hemio-terapiju, prosečno preživljavanje bolesnika sa ovim tipom tumora je oko 15 meseci. Glioblastom (GBM), pored tumorskih ćelija, sadrži i populaciju samo-obnavljajućih tumor-inicirajućih matičnih ćelija (matične ćelije glioblastoma) koje se smatraju odgovornim za nastanak, progresiju, metastaziranje i rezistenciju na terapiju.

Geni *SOXB1* podgrupe (*SOX1*, *SOX2* i *SOX3*) kodiraju regulatorne proteine koji imaju značajne uloge u mnogim procesima u toku razvića, kao što su održavanje pluripotentnosti matičnih ćelija i održavanje populacije neuralnih progenitora u pluripotentnom i proliferišućem stanju. Ovi geni imaju i značajne funkcije u procesu karcinogeneze. Ekspresija gena ove podgrupe detektovana je u GBM. Funkcija gena *SOX2* je dobro proučena kod ovog tipa tumora; pokazano je da ovaj gen promoviše maligni potencijal ćelija GBM i neophodan je za održavanje tumorogenog potencijala matičnih ćelija glioblastoma. Za razliku od gena *SOX2*, uloga gena *SOX1* i *SOX3* u ćelijama GBM još uvek nije dovoljno istražena. Stoga, u okviru ove doktorske disertacije analizirana je uloga ovih gena u ćelijama glioblastoma.

Dobijeni rezultati pokazuju da ćelijske linije GBM eksprimiraju gen *SOX1*. Pored toga, u uslovima utišane ekspresije proteina *SOX1* detektovano je smanjenje proliferativnog kapaciteta, vijabilnosti i migratornog potencijala U251 ćelija GBM, kao i povećanje broja ovih ćelija u senescenciji. Nakon dediferencijacije ćelijskih linija GBM detektovano je povećanje ekspresije gena *SOX1* u poređenju sa ekspresijom uočenom u njihovim parentalnim ćelijama. Nivo ekspresije gena *SOX1* povećan je u kulturama matičnih ćelija glioblastoma u poređenju sa ekspresijom ovog gena u imortalizovanim U87 i U251 ćelijama; pri diferencijaciji ovih kultura uočeno je smanjenje ekspresije gena *SOX1*. Utišavanje ekspresije gena *SOX1* u GNS166 kulturi matičnih ćelija GBM dovodi do smanjenja proliferativnog kapaciteta i vijabilnosti ovih ćelija.

Rezultati dobijeni u ovoj disertaciji pokazuju da ćelijske linije GBM i GBM tumori ekspimiraju gen *SOX3*. Ekspresija gena *SOX3* povećana je kod većine uzoraka GBM tumora u odnosu na ekspresiju detektovanu u netumorskom moždanom tkivu. Nivo ekspresije ovog gena ne korelira sa preživljavanjem obolelih. U uslovima povećane ekspresije proteina SOX3 uočeno je povećanje proliferativnog kapaciteta, vijabilnosti, migratornog i invazivnog potencijala ćelija GBM. Povećanje ekspresija proteina SOX3 ne utiče na aktivnost WNT signalnog puta, povećava aktivnost Hedgehog signalnog puta i ima inhibitorni efekat na proces autofagije u ćelijama GBM. Radioterapija γ zračenjem ne dovodi do promene ekspresije gena *SOX3* u ćelijama GBM, dok efekat temozolomida na ekspresiju ovog gena zavisi od koncentracije (doze) temozolomida i tipa ćelija GBM. Detektovano je da je dediferencijacija ćelijskih linija poreklom od GBM praćena povećanjem ekspresije gena *SOX3*, kao i da je nivo ekspresije ovog gena povećan u kulturama matičnih ćelija glioblastoma u poređenju sa ekspresijom u imortalizovanim U87 i U251 ćelijama GBM. Pri diferencijaciji ovih kultura uočeno je smanjenje ekspresije gena *SOX3*.

Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da geni *SOX1* i *SOX3* promovišu maligni fenotip ćelija GBM, kao i da visoka ekspresija ova dva gena korelira sa nediferenciranim stanjem matičnih ćelija GBM, što ukazuje na potencijalnu ulogu gena *SOX1* i *SOX3* u održavanju populacije matičnih ćelija glioblastoma.

Jedna od perspektivnih strategija u lečenju malignih bolesti je diferencijaciona terapija koja ima za cilj diferencijaciju ćelija tumora što vodi ka smanjenju njihovog malignog potencijala. Stoga, u okviru ove disertacije analiziran je i efekat *all-trans* retinoične kiseline (RK), jednog od najčešće primenjivanih agensa u diferencijacionoj terapiji, na osobine U251 ćelija GBM. Rezultati ove analize su pokazali da RK smanjuje vijabilnost, menja način migracije i dovodi do promene morfologije ćelija GBM, ali ne indukuje neuralnu diferencijaciju ovih ćelija. Takođe, efekat RK na sposobnost adhezije U251 ćelija GBM za komponente ekstraćelijskog matriksa zavisi od primenjene koncentracije ovog agensa. Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da su potrebna dodatna istraživanja pre potencijalne primene RK u terapiji GBM.

Ključne reči: glioblastom, SOX1, SOX3, matične ćelije glioblastoma, maligni fenotip, diferencijaciona terapija, retinoična kiselina

Naučna oblast: Biologija

Uža naučna oblast: Molekularna biologija

Analysis of the role of *SOX1* and *SOX3* genes in promotion of malignant phenotype of glioblastoma cells

Abstract:

Glioblastoma (GBM), a grade IV of glioma, is the most common adult brain tumor and one of deadliest cancers. Despite aggressive treatment, including surgical resection, chemotherapy and radiation, the median survival of patients with glioblastoma is 15 months. A growing body of evidence indicates that GBM contains a population of self-renewing tumor-initiating cells (glioblastoma stem cells - GSCs) that drive tumor initiation, propagation, metastasis and therapy resistance.

SOXB1 genes (*SOX1*, *SOX2* and *SOX3*) encode transcription regulators with important roles in embryonic development and carcinogenesis. Literature data revealed that *SOXB1* genes are expressed in GBM tumor samples. The role of one member of this group, *SOX2* gene, is well documented in GBM. It was shown that *SOX2* gene promotes malignant potential of GBM cells and it is mandatory for maintenance of tumorigenicity of GSCs. Since the function of *SOX1* and *SOX3* genes in GBM still remains to be established, the aim of this thesis was to analyze the role of these genes in GBM.

Obtained results demonstrated that all analyzed GBM cell lines express *SOX1*. Downregulation of this gene expression decreases proliferation, viability and migration, and induces senescence of U251 cells. Furthermore, dedifferentiation of GBM cells is accompanied by increase of *SOX1* level compared to that in parental cells. Expression of this gene was significantly increased in patient-derived GSC cultures compared to that in U87 and U251 cells; downregulation of *SOX1* gene expression was seen upon differentiation of GSCs. In addition, knock-down of this gene expression reduced proliferation and viability of GSCs.

Results obtained in this thesis reveal *SOX3* expression in GBM cell lines and tumor tissue; the expression of this gene was elevated in the most of analyzed GBM samples compared to expression levels detected in non-tumoral brain tissues. A high *SOX3* expression was not associated with the overall survival of GBM patients. Ectopic overexpression of this gene increased proliferation, viability, migration and invasion of GBM cells. Moreover, it was found that *SOX3* protein overexpression had no influence on

WNT signalling but increased activity of Hedgehog signaling pathway and decreased autophagy in GBM cells. Radiotherapy had no impact on *SOX3* expression in GBM cells, while effect of temozolomide is dose- and cell type-specific. Dedifferentiation of GBM cells was accompanied by increase of *SOX3* level compared to that in parental cells and expression of this gene was increased in patient-derived GSC cultures compared to that in U87 and U251 cells. Moreover, the expression of *SOX3* was decreased upon differentiation of GSC cultures.

Overall, it could be concluded that *SOX1* and *SOX3* genes promote malignant phenotype of GBM cells and that a high-level of expression of these genes is associated with undifferentiated state of GBM cells and it is important for maintaining of GSCs.

One of the new therapeutic approaches for treating cancer is differentiation therapy which aims to differentiate cancer cells in order to suppress their malignant potential. Therefore, the one of the aims of this thesis was to analyze the effects of all-trans retinoic acid (ATRA), the prototype of a differentiation therapy agent, on features of human glioblastoma U251 cells. Obtained results demonstrated that ATRA treatment reduced viability, affected the mode of migration and induced morphological changes of U251 cells. The effect of ATRA on the cell-matrix adhesion capability of U251 cells was dose-dependent. However, this agent had no impact on neural differentiation of GBM cells. Based on obtained results it could be concluded that further studies are warranted before ATRA could be considered for the treatment of glioblastoma.

Key words: glioblastoma, SOX1, SOX3, glioblastoma stem cells, malignant phenotype, differentiation therapy, retinoic acid

Scientific field: Biology

Scientific subfield: Molecular biology

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Tumori	1
1.1.1. Karcinogeneza	1
1.1.2. Glavne karakteristike malignih ćelija	3
1.1.3. Klasifikacija tumora	8
1.1.4. Tumori centralnog nervnog sistema	9
1.2. Glioma tumori.....	10
1.2.1. Gliomageneza	14
1.2.2. Glioblastom.....	15
1.2.2.1. Klasifikacija glioblastoma.....	16
1.2.2.2. Osnovna obeležja glioblastoma.....	19
1.2.2.2.1. Kanonski WNT signalni put	22
1.2.2.2.2. <i>Hedgehog</i> signalni put.....	24
1.2.2.2.3. Autofagija.....	25
1.2.2.2.4. Hijerarhijska organizacija ćelija glioblastoma	28
1.3. Familija gena <i>SOX/Sox</i>.....	29
1.3.1. Funkcije gena <i>SOX</i>.....	31
1.3.2. Familija gena <i>SOX</i> i karcinogeneza	33
1.3.2.1. Gliomi i geni <i>SOX</i>	36
1.3.3. Gen <i>SOX1</i>.....	39
1.3.4. Gen <i>SOX3</i>.....	40
1.4. Diferencijaciona terapija	42
1.4.1. Primena RK u tretmanu ćelija glioblastoma.....	44
2. CILJEVI RADA	46
3. MATERIJAL I METODE.....	48

3.1. Eksperimentalni materijal	48
3.1.1. Uzorci humanog tumorskog tkiva glioblastoma	48
3.1.2. Ćelijske linije korišćene u radu	48
3.1.3. Ekspresioni vektori i ekspresioni konstrukti korišćeni u radu.....	49
3.1.4. Oligonukleotidi korišćeni u radu.....	51
3.1.5. Antitela korišćena u radu.....	52
3.1.6. Komercijalni kitovi korišćeni u radu	54
3.1.7. Softverski programi korišćeni u radu.....	54
3.2. Eksperimentalne metode.....	55
3.2.1. Kultivisanje ćelija	55
3.2.2. Tretmani U87 i U251 ćelija	55
3.2.3. Dediferencijacija permanentnih ćelijskih linija poreklom od glioblastoma ...	56
3.2.4. Protokol za diferencijaciju NT2/D1 ćelija u astrocite	56
3.2.5. Transdukcija U251 ćelija glioblastoma i GNS166 kultura matičnih ćelija glioblastoma.....	57
3.2.6. Privremena (tranzijentna) transfekcija U87 ćelija LIPOFECTAMINE 2000 reagensom	57
3.2.7. Privremena (tranzijentna) transfekcija U251 ćelija polietilenimin (PEI) “Max” agensom.....	58
3.2.8. Izolacija totalne RNK	58
3.2.9. Oslobođanje totalne RNK od ostataka genomske DNK.....	59
3.2.10. Sinteza komplementarne DNK (cDNK).....	60
3.2.11. Semi-kvantitativni RT-PCR.....	60
3.2.12. Kvantitativni RT-PCR u realnom vremenu (RT-qPCR).....	61
3.2.13. Izolacija ukupnih ćelijskih proteina.....	62
3.2.14. Merenje koncentracije proteina po Bradfordu.....	63
3.2.15. Imunološka detekcija proteina primenom Western blot-a	63
3.2.16. Imunofluorescentna citohemijska analiza	64
3.2.17. Imunohistohemijska analiza	65

3.2.18. Određivanje broja živih ćelija bojenjem "Trypan plavom" bojom	65
3.2.19. MTT test	66
3.2.20. Test zarastanja povrede	67
3.2.21. Test invazivnosti i migratornog potencijala (eng. <i>Transwell assay</i>)	68
3.2.22. Test senescencije.....	68
3.2.23. TOPFlash/FOPFlash luciferazni esej.....	69
3.2.24. Test za ispitivanje sposobnosti adhezije ćelija za komponente ekstraćelijskog matriksa.....	70
3.2.25. Statistička analiza	70
4. REZULTATI.....	71
4.1. Analiza uloge gena <i>SOX1</i> u promovisanju malignog fenotipa ćelija glioblastoma	71
4.1.1. Analiza ekspresije gena <i>SOX1</i> u ćelijskim linijama poreklom od glioblastoma .	71
4.1.2. Uspostavljanje uslova za utišavanje ekspresije gena <i>SOX1</i> u U251 ćelijskoj liniji poreklom od glioblastoma	72
4.1.3. Analiza efekta utišane ekspresije proteina SOX1 na proliferativni kapacitet U251 ćelija	73
4.1.4. Analiza efekta utišane ekspresije proteina SOX1 na vijabilnost U251 ćelija..	74
4.1.5. Analiza efekta utišane ekspresije proteina SOX1 na senescenciju U251 ćelija	76
4.1.6. Analiza efekta utišane ekspresije proteina SOX1 na migratorni potencijal U251 ćelija	79
4.1.7. Analiza ekspresije gena <i>SOX1</i> u matičnim ćelijama glioblastoma.....	81
4.1.8. Uspostavljanje uslova za utišavanje ekspresije gena <i>SOX1</i> u GNS166 kulturi matičnih ćelija GBM.....	84
4.1.9. Analiza efekta utišane ekspresije gena <i>SOX1</i> na proliferativni kapacitet GNS166 kulture matičnih ćelija GBM.....	85
4.1.10. Analiza efekta utišane ekspresije gena <i>SOX1</i> na vijabilnost GNS166 kulture matičnih ćelija GBM.....	87

4.2. Analiza uloge gena <i>SOX3</i> u promovisanju malignog fenotipa ćelija glioblastoma	88
4.2.1. Analiza ekspresije gena/proteina <i>SOX3</i>/SOX3 u tumorskom tkivu glioblastoma	88
4.2.2. Analiza korelacije nivoa ekspresije gena <i>SOX3</i> i preživljavanja bolesnika sa GBM	90
4.2.3. Analiza ekspresije gena <i>SOX3</i> u ćelijskim linijama poreklom od glioblastoma	91
4.2.4. Uporedna analiza ekspresije proteina SOX3 u astrocitima i ćelijama glioblastoma	92
4.2.5. Uspostavljanje uslova za modulaciju ekspresije gena <i>SOX3</i> u U87 i U251 ćelijama glioblastoma	95
4.2.6. Analiza efekta povećane ekspresije proteina SOX3 na proliferativni kapacitet U87 i U251 ćelija	96
4.2.7. Analiza efekta povećane ekspresije proteina SOX3 na vijabilnost U87 i U251 ćelija	98
4.2.8. Analiza efekta povećane ekspresije proteina SOX3 na migratorni potencijal U87 i U251 ćelija	99
4.2.9. Analiza efekta povećane ekspresije proteina SOX3 na invazivni potencijal U87 i U251 ćelija	101
4.2.10. Analiza efekta povećane ekspresije proteina SOX3 na aktivnost kanonskog WNT signalnog puta u U87 i U251 ćelija	102
4.2.11. Analiza efekta povećane ekspresije proteina SOX3 na aktivnost HH signalnog puta u U87 i U251 ćelija	105
4.2.12. Analiza efekta povećane ekspresije proteina SOX3 na proces autofagije u U87 i U251 ćelija	106
4.2.13. Analiza efekta radio- i hemio- terapije na ekspresiju gena <i>SOX3</i> u U87 i U251 ćelijama	109
4.2.14. Analiza ekspresije gena <i>SOX3</i> u matičnim ćelijama glioblastoma	114
4.3. Analiza uticaja retinoične kiseline na karakteristike U251 ćelija glioblastoma	116

4.3.1. Analiza uticaja retinoične kiseline na vijabilnost U251 ćelija	116
4.3.2. Analiza efekta retinoične kiseline na migratorni potencijal U251 ćelija	119
4.3.3. Analiza efekta retinoične kiseline na sposobnost adhezije U251 ćelija za komponente ekstraćelijskog matriksa	121
4.3.4. Analiza efekta retinoične kiseline na neuralnu diferencijaciju U251 ćelija ..	122
5. DISKUSIJA	126
5.1. Analiza uloge gena <i>SOX1</i> u promovisanju malignog fenotipa ćelija glioblastoma	126
5.1.1. Efekat utišane ekspresije gena <i>SOX1</i> na karakteristike ćelija glioblastoma.	127
5.1.2. Efekat utišane ekspresije gena <i>SOX1</i> na karakteristike matičnih ćelija glioblastoma.....	130
5.2. Analiza uloge gena <i>SOX3</i> u promovisanju malignog fenotipa ćelija glioblastoma	132
5.2.1. Ekspresije gena/proteina <i>SOX3/SOX3</i> u tumorskom tkivu glioblastoma i ćelijskim linijama poreklom od glioblastoma	133
5.2.2. Efekat povećane ekspresije gena <i>SOX3</i> na karakteristike ćelija glioblastoma	134
5.2.3. Efekta povećane ekspresije proteina <i>SOX3</i> na aktivnost kanonskog WNT i HH signalnog puta i proces autofagije u ćelijama glioblastoma	136
5.2.4. Efekat radio- i hemio- terapije na ekspresiju gena <i>SOX3</i> u ćelijama GBM..	138
5.2.5. Ekspresija gena <i>SOX3</i> u matičnim ćelijama glioblastoma.....	139
5.3. Efekat tretmana retinoičnom kiselinom na karakteristike U251 ćelija glioblastoma	140
6. ZAKLJUČCI.....	143
7. REFERENCE	145

1. UVOD

1.1. Tumori

Tumori obuhvataju heterogenu grupu oboljenja koja nastaju usled nekontrolisanih promena u osnovnim ćelijskim procesima i koja dovodi do promena u međućelijskim interakcijama [1-3]. Na osnovu potencijala da se prošire na okolna i udaljena tkiva, tumori se dele na benigne i maligne. Tumori koji ostaju lokalizovani na mestu nastanka, ne poseduju invazivna svojstva i koji nemaju sposobnost širenja na okolna i udaljena tkiva nazivaju se benignim tumorima [4]. Ovi tumori su najčešće obavijeni kapsulom od fibroznog vezivnog tkiva, odlikuju se sporim rastom i diferenciranošću ćelija koje ga sačinjavaju, lakše se odstranjuju jer formiraju kompaktnu masu, a posle otklanjanja najčešće ne dolazi do ponovnog javljanja bolesti [4]. Tumori koji imaju sposobnost da se prošire na okolna i udaljena tkiva i koje karakteriše i prisustvo nediferenciranih ćelija nazivaju se malignim tumorima [4]. Ovi tumori se odlikuju ubrzanim rastom, i zbog sposobnosti da prodru do okolnih i udaljenih tkiva, veoma često dolazi do ponovnog javljanja bolesti [4].

Maligne bolesti (eng. *cancer*) predstavljaju jedan od vodećih uzroka smrti, kako u razvijenim tako i u nerazvijenim delovima sveta. Statistički podaci ukazuju da je tokom 2012. godine kod 14.1 miliona ljudi dijagnostikovana maligna bolest, dok je 8.2 miliona bolesnika umrlo od ovog oboljenja širom sveta [5]. Pored toga, literaturni podaci ukazuju na sve veću učestalost malignih bolesti kako zbog rasta populacije i produžavanja životnog veka, tako i zbog genetičke osnove i sve veće izloženosti faktorima rizika kao što su pušenje, prekomerna telesna težina i fizička neaktivnost [5].

1.1.1. Karcinogeneza

Karcinogeneza je proces koji se sastoji od više koraka i koji rezultuje progresivnom transformacijom normalnih ćelija u maligne derivate [6]. Tri osnovne faze ovog procesa su: inicijacija, promocija i progresija [6]. Tokom inicijacije dolazi do spontanijih ili

kancerogenim agensima indukovanih ireverzibilnih promena u genomu [6]. Rezultat inicijacije je autonomni rast izmenjenih ćelija koji ih izdvaja od okolnih, zdravih ćelija. Ukoliko se ćelije koje se nalaze u inicijaciji stimulišu na dalje povećanje proliferativnog kapaciteta one ulaze u fazu promocije [6]. Ova faza karcinogeneze odlikuje se klonalnom ekspanzijom ćelija koje su prošle kroz fazu inicijacije, što dovodi do nastanka uočljive tumorske mase koja može biti benigna ili premaligna [7]. Treća i poslednja faza karcinogeneze podrazumeva progresiju iz premalignog u maligni tip tumora. Molekularni mehanizmi koji se nalaze u osnovi ove faze su i dalje nedovoljno ispitani ali se smatra da promene u genomu, koje uključuju mutacije i aberacije hromozoma, doprinose nastanku ove faze karcinogeneze [6]. Naime, proliferacijom ćelija koje su prošle kroz fazu inicijacije dolazi do povećanja tumora; tokom rasta tumora u tumorskim ćelijama mogu da se dogode dodatne promene u genomu što ima za rezultat povećanje heterogenosti populacije ćelija tumora [6]. Tokom ove faze tumorske ćelije karakteriše povećani invazivni potencijal, razvijena sposobnost metastaziranja i promene biohemijskih, metaboličkih i morfoloških karakteristika [7].

Od 1950. godine pa do danas opisano je nekoliko teorija o nastanku malignih bolesti, ali ni jedna od njih ne objašnjava u potpunosti proces karcinogeneze.

Zastupnici embrionalne teorije smatraju da su maligne bolesti embrionalnog porekla, odnosno da embrionalne ćelije koje zaostanu u adultnim tkivima ili ćelije koje podsećaju na gamete mogu da budu aktivirane u adultnom dobu i da dovedu do nastanka tumora [8]. U prilog ovoj hipotezi ide podatak da su indukovane pluripotentne matične ćelije (iPMĆ) generisane od somatskih ćelija i da mogu da indukuju pojavu teratoma tumora [8].

Teorija somatskih mutacija posmatra karcinogenezu kao problem kontrole proliferativnog kapaciteta ćelija [9]. Ova teorija bazirana je na premisama da se somatske ćelije nalaze u stanju mirovanja i da maligna bolest nastaje od jedne somatske ćelije u kojoj su se akumulirale mutacije u genima koji kontrolišu proliferaciju ćelija i progresiju kroz ćelijski ciklus [9]. Na osnovu ove teorije maligne bolesti nastaju kao posledica mutacija u genima, međutim ova teorija ne objašnjava mehanizme koji dovode do nastanka ovih bolesti [10]. Suprotno ovoj teorije postoje saznanja koja pokazuju da neki tumori sadrže na

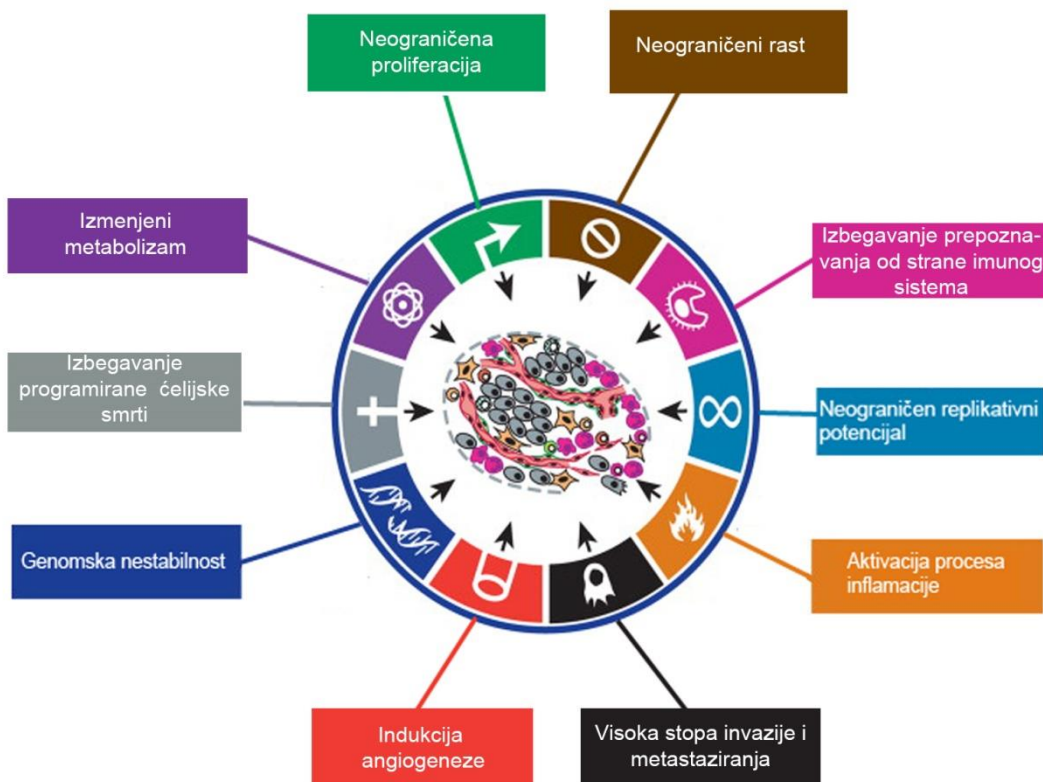
hiljade mutacija u DNK, dok su sa druge strane identifikovani i tumori kod kojih nisu detektovane mutacije [8].

Teorija organizacije tkiva posmatra karcinogenezu kao proces organogeneze koji se ne dešava prema utvrđenom planu [9]. Osnovne premise ove teorije su da je karcinogeneza problem organizacije tkiva i da je proliferacija osnovna odlika svih ćelija [11]. Na osnovu ove teorije maligna bolest nastaje kao rezultat poremećaja komunikacije između ćelija, međutim Teorija organizacije tkiva ne objašnjava kako se to dešava [10].

Teorija matičnih ćelija tumora zasniva se na podacima da veliki broj tipova malignih tumora nastaje transformacijom matičnih i/ili multipotentnih progenitorskih ćelija tokom procesa karcinogeneze [7]. Na osnovu ove teorije mutacije i epigenetički faktori doprinose nastanku heterogenosti malignih tumora [7].

1.1.2. Glavne karakteristike malignih ćelija

U literaturi je opisano više od 100 različitih tipova tumora u okviru kojih se mogu razlikovati podtipovi [12]. I pored velike raznovrsnosti tumora, prema *Hanahan-Wainberg*-ovoj teoriji osnovne karakteristike malignih ćelija su neograničena proliferacija, neograničeni rast, izbegavanje programirane ćelijske smrti, neograničeni replikativni potencijal, indukcija angiogeneze, visoka stopa invazije i metastaziranja, genomska nestabilnost, aktivacija procesa inflamacije, izmenjeni metabolizam i izbegavanje prepoznavanja od strane imunog sistema (Slika 1) [13].



Slika 1. Osnovne karakteristike malignih ćelija (Preuzeto i modifikovano od [13]).

Maligne ćelije mogu da razviju sposobnost neograničene proliferacije autokrinom stimulacijom proliferacije (produkcijom faktora rasta u samim ćelijama i ekspresijom receptora za faktore rasta na površini ćelija), kao i stimulacijom okolnih normalnih ćelija da sintetišu i sekretuju faktore rasta [14, 15]. Takođe, neograničena proliferacija može da nastane kao rezultat povećane ekspresije receptora za faktore rasta na površini malignih ćelija omogućavajući ovim ćelijama da postanu hipersenzitivne na male količine liganada, ili može biti rezultat strukturnih promena receptora koje omogućavaju aktivaciju receptora nezavisnu od vezivanja liganda [13]. Pored toga, do neograničene proliferacije tumorskih ćelija može da dođe i usled konstitutivne aktivacije komponenti signalnih puteva koje se nalaze nizvodno od receptora [13].

Druga značajna osobenost malignih ćelija je neograničen rast. Ključnu ulogu u regulaciji ćelijskog rasta imaju tumor supresorni geni [12]. Mehanizmi koje je tumorska ćelija razvila kako bi se izborila sa inhibicijom ćelijskog rasta zasnivaju se na inhibiciji ekspresije tumor supresornih gena, sintezi neaktivne forme tumor supresora, kao i povećanoj ekspresiji inhibitora tumor supresora [13].

Izbegavanje programirane ćelijske smrti takođe predstavlja jednu od osnovnih karakteristika malignih ćelija. Mehanizam koji malignim ćelijama omogućava izbegavanje programirane ćelijske smrti je najčešće gubitak funkcije univerzalnog tumor supresornog gena *p53*, koji je ključni detektor oštećenja u ćeliji [16]. Pored ovog mehanizma, pokazano je da maligne ćelije mogu da izbegnu programiranu ćelijsku smrt i povećanjem ekspresije anti-apoptotskih regulatora (kao što je Bcl-2) ili faktora uključenih u preživljavanje ćelije (kao što je Igf1/2), kao i smanjenjem ekspresije pro-apoptotskih regulatora (kao što su Bax, Bim, Puma) [17-19].

Neograničen replikativni potencijal je veoma značajna karakteristika malignih ćelija [20]. Smatra se da je za nastanak tumora makroskopskih dimenzija neophodan neograničeni replikativni potencijal malignih ćelija [20]. Pokazano je da je broj deoba kroz koje prolaze normalne ćelije ograničen i da tokom deoba dolazi do skraćivanja dužine telomere koje sadrže heksanukleotidne ponovke [20, 21]. Ove heksanukleotidne ponovke na krajeve hromozoma dodaje enzim telomeraza [21]. U normalnim i neimortalizovanim ćelijama ovaj enzim je gotovo odsutan, dok je u malignim ćelijama detektovan visok nivo ekspresije ovog enzima [20, 21]. Konstantno produžavanje telomerne DNK, aktivnošću enzima telomeraze, omogućava malignim ćelijama rezistenciju na senescenciju i apoptozu [21].

Indukcijom angiogeneze formira se neovaskulatura tumora, koja omogućava tumorskim ćelijama stalni dotok hranljivih materija i kiseonika, kao i odnošenje produkata metabolizma i CO₂ [13]. Tokom embriogeneze razvije vaskularnog sistema uključuje grupisanje endotelijalnih ćelija u krvne sudove (vaskulogeneza), a zatim grananje i širenje novih krvnih sudova iz već formiranih (angiogeneza) [13]. Normalna vaskulatura je nakon formiranja u adultnom periodu uglavnom u stanju mirovanja; izuzeci su fiziološki procesi kao što je zarastanje rana i ženski reproduktivni ciklus kada se angiogeneza prolazno ponovo aktivira [22]. Nasuprot ovome, proces angiogeneze je stalno aktivan tokom

progresije tumora uzrokujući kontinuirano formiranje novih krvnih sudova koji podržavaju progresivni rast neoplastično transformisanog tkiva [22].

Osobenost tumorskih ćelija je i sposobnost invazije u okolno tkivo i metastaziranja u udaljena tkiva [23]. Invaziono-metastatska kaskada podrazumeva seriju događaja koji dovode do širenja tumora i nastanka tumorske mase na drugom mestu u organizmu [23, 24]. Ova kaskada započinje invazijom malignih ćelija u okolno tkivo, zatim sledi ulazak malignih ćelija u obližnje krvne i limfne sudove, transport limfnim i krvnim sistemom, izlazak iz lumena sudova u parenhim udaljenih organa, formiranje mikrometastaza i na kraju rast mikrometastatskih lezija u makroskopske tumore [23, 24].

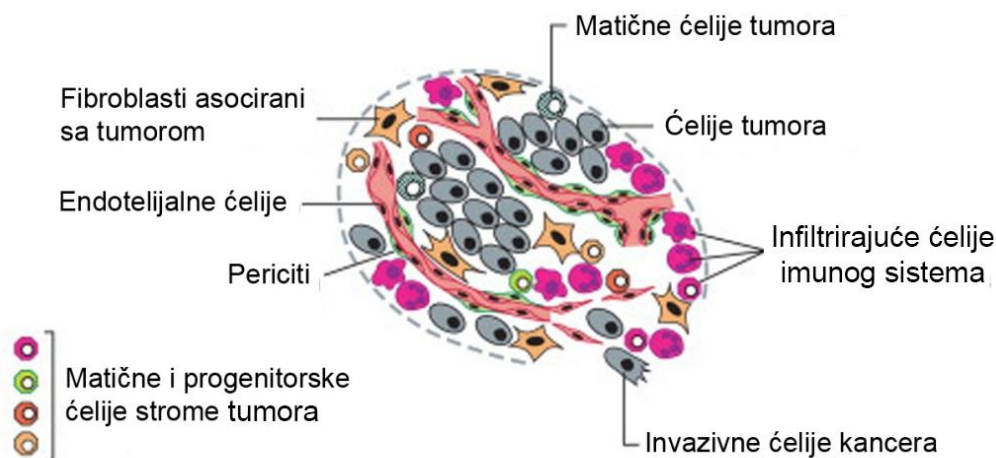
Kod normalnih ćelija održavanje genomske stabilnosti je veoma značajno; mehanizmi uključeni u reparaciju DNK otkrivaju i otklanjaju mutacije održavajući na taj način vrlo nisku stopu spontanih mutacija [13]. S druge strane maligne ćelije odlikuje genomska nestabilnost; ove ćelije se odlikuju povećanom stopom mutacija [25, 26] koju postižu preko povećane osetljivosti na mutagene agense i/ili prestanka pravilnog funkcionisanja jedne ili više komponenti sistema za reparaciju [26-28].

Pokazano je da se tumori odlikuju prisustvom ćelija urođenog i stečenog imuniteta [29, 30]. Iako se smatralo da proces inflamacije služi samo za borbu imunog sistema protiv tumorskih ćelija, dokazano je da inflamacija doprinosi progresiji tumora jer obezbeđuje tumorskoj mikrosredini bioaktivne molekule, uključujući faktore rasta, faktore za preživljavanje i izbegavanje apoptoze, pro-angiogene faktore, kao i ekstracelularne enzime koji olakšavaju angiogenezu, invaziju i metastazu [31-34].

Važna karakteristika malignih ćelija je i izmenjeni metabolizam. Za razliku od normalnih ćelija, maligne ćelije prevashodno koriste glikolizu (aerobna glikoliza) za proizvodnju energije, čak i u prisustvu kiseonika [35]. Pored toga za tumorske ćelije je karakterističan i povećan unos glukoze, povećana ekspresija enzima koji učestvuju u glikolizi, kao i favorizovanje konverzije piruvata u laktat [35]. Osobenost metabolizma malignih ćelija je i sposobnost preuzimanja neophodnih hranljivih materija iz nutrijentima siromašnog okruženja i njihovo korišćenje za održavanja vijabilnosti i stvaranja nove tumorske mase [36].

Važnu karakteristiku malignih ćelija predstavlja i izbegavanje prepoznavanja od strane imunog sistema. Na osnovu teorije označena kao "immunoediting" postoje tri faze (eliminacija, ekvilibrijum i izbegavanje) koje objašnjavaju interekciju između tumora i imunog sistema [37]. Prelaz između ovih faza zavisi od stanja imunog sistema i osobina tumorskih ćelija [37]. Imuni sistem konstantno nadzire ćelija i tkiva i odgovoran je za prepoznavanje i eliminisanje većine tumorskih ćelija u inicijalnoj fazi [37]. Međutim, ukoliko tumorske ćelije ne budu u potpunosti eliminisane, one mogu ući u fazu ekvilibrijuma unutar koje ove ćelije ulaze u stanje mirovanja i rast tumora biva kontrolisan od strane imunog sistema [37]. Različiti mehanizmi, kao što je smanjenje prepoznavanja tumorskih ćelija od strane imunog sistema, povećana rezistentnost na delovanje ćelija imunog sistema i razvoj imunosupresivne tumorske mikrosredine mogu dovesti do prelaska u fazu izbegavanja prepoznavanja od strane imunog sistema [37].

Navedene osobenosti tumorskih ćelija ukazuju da maligni tumor nije grupa relativno homogenih ćelija već predstavlja grupu različitih tipova ćelija koje stupaju u međusobne interakcije i koje kolektivno omogućavaju rast i progresiju tumora (Slika 2) [13]. Pokazano je da tumori sadrže tumorske ćelije, matične ćelije tumora, endotelijalne ćelije i pericite koje učestvuju u formiranju vaskulature tumora, infiltrirajuće ćelije imunog sistema, fibroblaste asociirane sa tumorom i matične i progenitorske ćelije strome tumora [13].



Slika 2. Čelije parenhima i strome tumora. Tumori sadrže različite tipove ćelija koje stupaju u međusobne interakcije i omogućavaju rast i progresiju tumora (Preuzeto i modificirano od [13]).

1.1.3. Klasifikacija tumora

Na osnovu tipa ćelija iz kojih nastaju, tumori se mogu svrstati u sledeće kategorije [38]:

1. Karcinomi – tumori koji vode poreklo od epitelijalnih ćelija
2. Sarkomi – tumori koji vode poreklo od mezenhimalnih ćelija vezivnog tkiva (kostiju, mišića, masnog i vezivnog tkiva)
3. Leukemije, limfomi i mijelomi – tumori koji vode poreklo od hematopoetskih ćelija kostne srži
4. Tumori centralnog nervnog sistema – tumori koji vode poreklo od ćelija embrionalnog neuroektoderma
5. Ostali tipovi tumora – tumori germinativnih ćelija, melanomi (poreklom od melanocita), i neuroendokrini tumori (tumori hipofize, štitne žlezde, pluća, gastrointestinalnog trakta, perifernog nervnog sistema)

Pored ove klasifikacije, tumori se klasifikuju i na osnovu tkiva u kojem nastaju, npr. tumori pluća, dojke i jajnika [38].

1.1.4. Tumori centralnog nervnog sistema

Do sada je identifikovano oko 130 različitih tipova tumora centralnog nervnog sistema (CNS) koji nastaju u različitim delovima ovog sistema [39]. Neoplazije CNS-a obuhvataju tumore mozga, moždanih ovojnica, kičmene moždine, kranijalnih nerava i ostalih delova CNS-a [39]. Ovi tumori predstavljaju najčešći uzrok smrti od malignih bolesti kod dece [40]. Tokom 2012. godine dijagnostifikovano je oko 256 000 novoobolelih sa nekim od tipova tumora CNS, dok je broj preminulih od ovih neoplazija procenjen na 189 000 [40]. Ovi tumori mogu biti maligni i benigni, primarni i sekundarni (metastaze primarnih tumora iz drugih tkiva) ali se podela najčešće zasniva na histopatološkim, morfološkim i molekularnim parametrima [39].

Prema klasifikaciji Svetske zdravstvene organizacije iz 2016. godine (*World Health Organization*, WHO) tumori centralnog nervnog sistema se klasifikuju u sledeće grupe [39]:

1. Difuzne astrocitome i oligodendroglijalne tumore
2. Ostale astrocitome
3. Ependimalne tumore
4. Ostale gliome
5. Tumore horoidnog pleksusa
6. Neuronalne i mešane neuronalno-glijalne tumore
7. Tumore pinealnog regiona
8. Tumore horoidnog pleksusa
9. Embrionalne tumore
10. Tumore kranijalnih i paraspinalnih nerava
11. Meningealne tumore (tumore moždanih ovojnica)
12. Mezenhimalne i nemeningotelijalne tumore
13. Melanocitne tumore
14. Tumore kranijalnih i perifernih nerava
15. Limfome
16. Histiocistične tumore

17. Tumore germinativnih ćelija
18. Tumore područja turskog sedla
19. Metastatske tumore

Najčešći benigni tumor CNS-a je meningiom (53,4% slučajeva), dok je najčešći maligni tumor CNS-a glioblastom (46,1% slučajeva) [41].

Svetska zdravstvena organizacija je na osnovu histoloških kriterijuma uvela klasifikaciju tumora CNS-a i na četiri gradusa [39]:

1. Gradus I (niskogradusni) – ovaj tip tumora je benigni, moguće ga je hirurški ukloniti, najčešće ne rezultuje ponovom pojavom tumora. Ćelije ovog tipa tumora odlikuju se normalnom morfoloijom, slabom mitotskom aktivnošću, kao i niskim invazivnim potencijalom
2. Gradus II (niskogradusni) – ćelije ovog tipa tumora odlikuju se slabijom mitotskom aktivnošću, ali im je sposobnost invazije u okolno tkivo povećana i moguća je progresija u visokogradusne tumore
3. Gradus III (visokogradusni) – ćelije ovog tipa tumora odlikuje povećana mitotska aktivnost i invazivni potencijal, kao i izmenjena morfoloija
4. Gradus IV (visokogradusni) – ćelije ovog tipa tumora imaju izraženu mitotsku aktivnost, slabo su diferencirane, izražen im je invazivni potencijal; najupečatljivija pojava kod tumora ovog gradusa je pojava regiona nekroze i angiogeneze u samom tumoru.

1.2. Glioma tumori

Glioma tumori su najučestaliji primarni tumori mozga koji obuhvataju sve neoplazije koje potiču od ćelija glije tj. od astrocita, oligodendrocita ili endotelijalnih ćelija [42]. Ovi tumori čine 27% svih tumora CNS-a i 80% svih malignih tumora CNS-a [42]. U Sjedinjenim Američkim Državama se na godišnjem nivou dijagnostikuje 6 slučajeva sa glioma tumorima na 100,000 ljudi [42]. Najčešće se javlja kod dece (od rođenja do 8 godine starosti) ili kod odraslih starosti između 50 i 70 godina [43, 44]. Takođe je primećena i mala predominantnost nastanka ove neoplazije kod osoba muškog pola [45].

Pokazano je da predispozicija za nastanak ovog oboljenja može biti povezana sa profesijama u kojima su radnici stalno izloženi delovanju organskih rastvarača ili pesticida [46]. Takođe, uočeno je da infekcija citomegalovirusom može imati ulogu u etiologiji ili progresiji nekih glioma [47].

Osnovne karakteristike glioma tumora su nekontrolisana proliferacija ćelija, izbegavanje ćelijske smrti, genomska nestabilnost i difuzna infiltracija u okolno normalno tkivo [48].

Na osnovu klasifikacije Svetske zdravstvene organizacije iz 2007. godine većina glioma tumora uključuje četiri histološke grupe označene kao endimomi, oligodendrogliomi, oligoastrocitomi i astrocitomi [49]. Svaka od ovih grupa obuhvata i graduse određene na osnovu stepena maligniteta koji se procenjuje na osnovu histoloških osobina i promena u genomu [49]. Svetska zdravstvena organizacija je 2016. godine revidirala klasifikaciju glioma uzimajući u obzir molekularne i genetičke markere karakteristične za određene tipove glioma tumora [50].

Endimomi su glioma tumori koji se sastoje od tumorskih ćelija koje vode poreklo od endimalnih ćelija [51]. Ovi tumori čine oko 1,8% tumora CNS-a [52] i češće se javljaju kod osoba muškog pola [53]. Detektovani su u svim starosnim grupama; češće se javljaju kod dece, dok se kod odraslih javljaju najčešće između 35 i 45 godina starosti [51, 54]. Na osnovu klasifikacije Svetske zdravstvene organizacije iz 2007. godine, razlikuju se tri gradusa endimoma tumora: gradus I koji obuhvata miksopapilarni endimom i subendimom, gradus II koji obuhvata klasične endimome i gradus III koji obuhvata anaplastične endimome [49, 55]. Na osnovu lokacije razlikuju se supratentorijalni i infratentorijalni tumori [55]. Tretman za endimome uključuje hirurško uklanjanje tumora koje je praćeno radioterapijom [51].

Oligodendrogliomi predstavljaju diferencirane, difuzno-infiltrirajuće glioma tumore koji se sastoje od tumorskih ćelija koje vode poreklo od oligodendrocita [56]. Češće se javljaju kod osoba starosti od 40 do 60 godina, mada su detektovani i kod dece [56, 57]. Takođe, prisutniji su među osobama muškog pola [57]. Klasifikuju se u niskogradusne (gradus II) i visokogradusne (gradus III) [39]. Kod 60-90% oligodendroglioma uočena je delecija kratkog kraka hromozoma 1 (1p) i dugog kraka hromozoma 19 (19q) [58, 59].

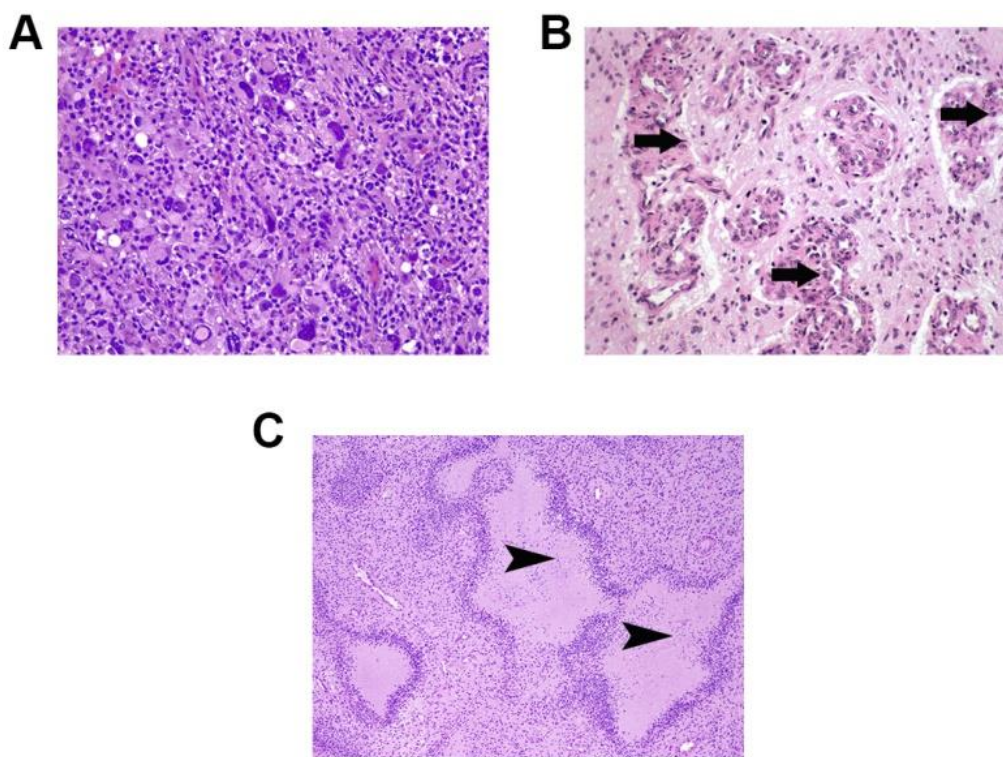
Pokazano je da su tumori sa 1p/19q delecijom mnogo osjetljiviji na radio- i hemio-terapiju [60]. Tretman oligodendroglioma zavisi od gradusa tumora. Ako su klasifikovani kao niskogradni preporučuje se hirurško odstranjivanje tumora, dok se u slučaju visokogradusnih oligodendroglioma preporučuje hirurško odstranjivanje tumora praćeno radio- i/ili hemio- terapijom [59, 60].

Oligoastrocitomi su tumori koji se sastoje od tumorskih ćelija koje vode poreklo od oligodendrocita, endodimalnih ćelija i astrocita [61]. Najčešće se javljaju kod osoba starosti od 30 do 50 godina [62]. Ovi tumori se dele na mešane oligoastrocitome (gradus II) i anaplastične oligoastrocitome (gradus III) [49]. Kod 30-50% oligoastrocitoma detektovana je delecija kratkog kraka hromozoma 1 (1p) i dugog kraka hromozoma 19 (19q), dok su kod 30% ovih tumora uočene mutacije u genu p53 [63]. Na osnovu klasifikacije Svetske zdravstvene organizacije iz 2016. godine oligoastrocitome bi na osnovu molekularnih markera trebalo klasifikovati kao oligodendrogliome ili astrocitome [39].

Astrocitomi su glioma tumori koji se sastoje od tumorskih ćelija koje vode poreklo od astrocita [64]. Ovi tumori predstavljaju najčešću i najletalniju formu intrakranijalnih tumora [64]. Dele se na difuzne infiltrirajuće tumore i tumore ograničenog rasta. U difuzne infiltrirajuće tumore ubrajaju se difuzni astrocitom, anaplastični astrocitom i glioblastom, dok se u tumore ograničenog rasta ubrajaju pilocitični astrocitom, pleomorfni ksantoastrocitom, subependimalni gigantocelularni astrocitom i Turkot sindrom [48, 64]. Difuzni infiltrirajući tumori su maligni. Ovi tumori imaju sposobnost progresije iz nižeg u viši gradus i nakon hirurškog odstanjivanja i primene hemio- i/ili radio-terapije moguće je ponovno javljanje ovih tumora [65]. Astrocitomi obuhvataju glioma tumore i niskog i visokog gradusa [50]. Pilocitični astrocitom i subependimalni gigantocelularni astrocitom su gradusa I, dok je pleomorfni ksantoastrocitom gradusa II. Ovi tumori se obično razvijaju kod dece i mlađih osoba i uglavnom su blagog kliničkog toka [50]. Difuzni astrocitom je gradusa II, anaplastični astrocitom gradusa III, a glioblastom gradusa IV [50]. Bolesnici sa pilocitičnim astrocitomom imaju dobro prognozu jer je tumor moguće otkloniti hirurškom intervencijom, nije potrebna hemio- ili radio-terapija nakon hirurškog odstranjivanja i progresija ovog tumora u anaplastičnu formu izrazito je retka [43, 44]. Difuzni astrocitomi su spororastući tumori, javljaju se u srednjim godinama starosti, češće kod muškaraca,

prosečno preživljavanje bolesnika sa ovim tipom tumora je oko 5 godina i pokazano je da imaju tendenciju progresije u viši gradus [66]. Anaplastični astrocitom se najčešće javlja u petoj i šestoj deceniji života, prosečno preživljavanje bolesnika sa ovim tipom tumora je oko 2-3 godine, progresija u glioblastom je vrlo česta i zlatni standard u lečenju podrazumeva hirurško odstranjivanje tumora koje je praćeno radioterapijom [66].

Glioblastom je najčešći glioma tumor [41], karakteriše ga veliki broj tumorskih ćelija (hipercelularnost), atipična jedra, povećana mitotska aktivnost, kao i zone angiogeneze i nekroze (Slika 3) [65]. Prosečno preživljavanje obolelih sa glioblastoma tumorom je oko 15 meseci [65].

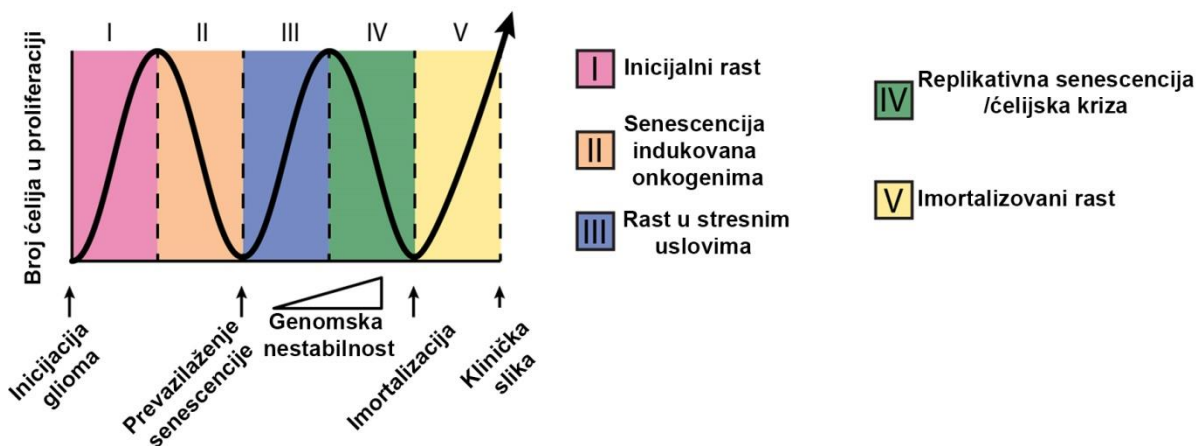


Slika 3. Histološki prikaz glioblastoma nakon bojenja preseka tumora hematoksilin i eozin bojama. Na prikazanim mikrografijama može se uočiti da ove tumore karakteriše: (A) veliki broj tumorskih ćelija, (B) zone angiogeneze (obeležene strelicama) i (C) zone nekroze (obeležene vrhovima strelica). Jedra ćelija obojena su plavom bojom (Preuzeto i modifikovano od <http://neuropathology-web.org/chapter7/chapter7bGliomas.html>).

1.2.1. Gliomogeneza

Glioma tumori u momentu dijagnostikovanja sadrže veliki broj promena u genomu, od izmena u jednom nukleotidu (eng. *SNVs* - *single nucleotide variants*) do strukturnih rearanžmana hromozoma [67]. Izmene genoma mogu imati funkcionalne posledice, kao što su smanjenje ili povećanje nivoa iRNK-a ili izmene iRNK [67].

Gliomogeneza podrazumeva proces nastanka glioma tumora. Barthel i saradnici su predložili model gliomogeneze koji obuhvata pet faza kroz koje ćelije prolaze pre nego što se pojave kliničke manifestacije glioma tumora (Slika 4) [67]. Na osnovu ovog modela faze gliomogeneze, koje se dešavaju jedna za drugom, su označene kao inicijalni rast, senescencija indukovana onkogenima, rast u stresnim uslovima, replikativna senescencija/ćelijska kriza i imortalizovani rast (Slika 4) [67]. Svaka od ovih faza odlikuje se različitim izmenama u genomu i različitim fenotipskim karakteristikama, kao što su razlike u dinamici rasta i evolucionim mehanizmima [67].



Slika 4. Šematski prikaz broja ćelija u proliferaciji kroz faze gliomogeneze (Preuzeto i modifikovano od [67]).

Prva faza (inicijalni rast) dešava se nakon transformacije normalne u pre-tumorsku ćeliju i odlikuje se povećanim proliferativnim kapacitetom transformisanih ćelija. U okviru II faze, kontinuirana ekspresija onkogeni može kod većine tumorskih ćelija dovesti do

zaustavljanja ćelijskog ciklusa što se označava kao senescencija indukovana onkogenima [67]. Tokom I i II faze u nekim od ćelija mogu da se dese promene u genomu koje mogu da dovedu do prevazilaženja senescencije indukovane onkogenima što omogućava ovim ćelijama proliferaciju i u nepovoljnim i stresnim uslovima koji uključuju oštećenja DNK i nepravilnu funkciju telomere [67]. Kontinuirani rast uprkos genomskoj nestabilnosti odlikuje fazu III gliomageneze. U okviru faze IV rast ćelija glioma u nepovoljnim uslovima dovodi do zaustavljanja ćelijskog ciklusa koji se označava kao replikativna senescencija ili u nekim slučajevima dovodi do ćelijske krize koju karakteriše smrt ćelija po tipu apoptoze [67]. Mali broj ćelija u toku ove faze može zadobiti osobine slične matičnim ćelijama koji im omogućava neograničeni imortalizovani rast koji karakteriše fazu V. Tokom faze V matične ćelije glioma asimetričnim deobama formiraju populaciju progenitorskih ćelija tumora ali i diferencirane ćelija glioma [67].

1.2.2. Glioblastom

Glioblastom (GBM) je najčešći maligni tumor mozga kod odraslih i jedan od najsmrtnijih tipova tumora [68]. Ovaj tip tumora čini oko 15-20% svih malignih intrakranijalnih tumora i oko 50-60% svih astrocitoma [39]. Učestalost pojave GBM na svetskom nivou iznosi 3,5 nova slučaja na 100 000 stanovnika godišnje [68]. Učestalost se povećava sa godinama starosti; najčešće se glioblastom dijagnostifikuje kod ljudi starosti između 45-60 godina [64], sa blago povećanom učestalošću kod osoba muškog pola [69].

Jedini potvrđeni faktor rizika za razvoj GBM je izloženost visokim dozama jonizujućeg zračenja [70]. Takođe, nekoliko istraživanja je pokazalo da steroidni hormoni jajnika mogu predstavljati okidač za razvoj GBM [70]. Pored toga, uočeno je da su bolesnici koji su lečeni od akutne limfoidne leukemije podložniji nastanku GBM [70]. Nastanak GBM se ne dovodi u vezu sa pušenjem, ishranom, korišćenjem mobilnih telefona ili elektromagnetnim zračenjem, ozbiljnim povredama glave i izloženosti pesticidima [70]. Sa druge strane, uočeno je da alergijske reakcije i infekcije imaju potencijalno protektivni efekat pri nastanku GBM što može biti posledica aktivacije imunog sistema [70]. Naime, rezultati meta-analize su pokazali da su šanse za nastanak GBM smanjene za oko 40% kod

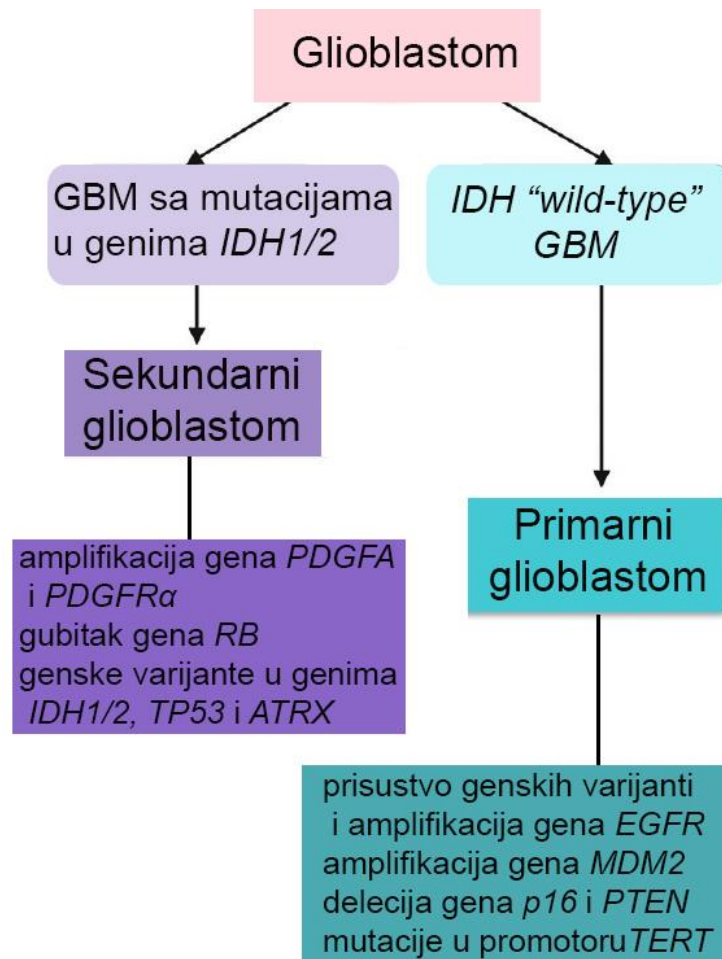
ljudi koji imaju ili su imali alergijske reakcije [71]. Genetska predispozicija za razvoj GBM detektovana je u 5-10% slučajeva [70]. Retke genetičke bolesti, kao što su neurofibromatoza tipa 1 i 2 i tuberozna skleroza su povezane sa povećanom učestalošću pojave GBM [70].

GBM tumori najčešće su lokalizovani u cerebralnim hemisferama pri čemu 95% ovih neoplazija nastaje u supratentorijalnom regionu, a mali procenat u cerebelumu, moždanom stablu i kičmenoj moždini [72].

1.2.2.1. Klasifikacija glioblastoma

Na osnovu klasifikacije Svetske zdravstvene organizacije iz 2016. godine glioblastomi su svrstani u dve kategorije [39] (Slika 5):

1. Glioblastomi kod kojih u genima *IDH1* i *IDH2* (*Isocitrate Dehydrogenase*) nisu detektovane mutacije (tzv. *IDH* "wild-type" GBM). Ova kategorija obuhvata primarne ili *de novo* nastale glioblastome, javlja se u 90% slučajeva GBM i to najčešće kod obolelih starijih od 55 godina
2. Glioblastomi kod kojih su prisutne mutacije u genima *IDH1* i *IDH2* (tzv. GBM sa mutacijama u genima *IDH1/2*). Ova kategorija obuhvata 10% slučajeva GBM i češće se javlja kod mlađih osoba. U okviru ove grupe nalaze se sekundarni glioblastomi koji nastaju progresijom od nižih gradusa.



Slika 5. Klasifikacija glioblastoma na osnovu prisustva ili odsustva mutacija u genima *IDH1/2*. Na osnovu ovog parametra glioblastomi se dela na primarne i sekundarne GBM. Na slici su prikazane i promene na nivou molekula DNK detektovane kod primarnih i sekundarnih GBM tumora.

Geni *IDH1* i *IDH2* kodiraju enzime izocitratnu dehidrogenazu 1 i 2 koje poseduju funkcije u Krebsovom ciklusu [73]. Patogene genske varijante detektovane u ovim genima dovode do smanjenja enzimske aktivnosti izocitratne dehidrogenaze [73].

Na osnovu kliničke prezentacije razlikuju se primarni i sekundarni GBM. Primarni GBM su učestaliji, nastaju *de novo* i karakteristični su za starije bolesnike (iznad 50 godina starosti), dok su sekundarni glioblastomi manje učestali, nastaju progresijom astrocitoma gradusa II i III i uglavnom se razvijaju kod bolesnika mlađih od 45 godina starosti [64, 74]. Pokazano je da postoji povezanost primarnih i sekundarnih GBM sa određenim tipom promena na nivou molekula DNK [70] (Slika 5). Glavno obeležje primarnih GBM je

prisustvo genskih varijanti i amplifikacija gena *EGFR* (*Epidermal growth factor receptor*), amplifikacija gena *MDM2* (*Mouse Double Minute 2*), delecija gena *p16* i *PTEN* (*Phosphatase and tensin homolog*), kao i mutacije u promotoru gena *TERT* (*Telomerase reverse transcriptase*) [70] (Slika 5). Najčešće detektovane promene na nivou DNK molekula kod sekundarnih GBM su amplifikacija gena *PDGFA* (*Platelet-derived growth factor subunit A*) i *PDGFRa* (*Platelet-derived growth factor receptor a*), gubitak gena *RB* (*Retinoblastoma*) i genske varijante u genima *IDH1/2*, *TP53* i *ATRX* (*ATP-dependent helicase*) [70] (Slika 5).

Podaci dobijeni u okviru TCGA (*The Cancer Genome Atlas*) projekta doveli su do molekularne stratifikacije GBM na osnovu promena detektovanih u genomu i izmenjenih signalnih puteva u ćelijama glioblastoma [75]. Identifikovana su četiri molekularna podtipa GBM: proneuralni, mezenhimalni, klasični i neuralni [75, 76]. Proneuralni tumori imaju bolju prognozu, uglavnom su dijagnostifikovani kod mlađih osoba i karakterišu ih amplifikacija, povećana ekspresija i mutacije u genu *PDGFRA*, mutacije u genima *IDH1/IDH2* i *TP53*, ekspresija gena uključenih u neuralnu diferencijaciju (kao što su geni *SOX* familije), kao i aktivacija PI3K (*Phosphatidylinositol-3-kinase*) signalnog puta (Tabela 1) [75]. Pored toga za ovaj podtip tumora karakteristična je i hipermetilacija promotora duž celog genoma (*glioma-CpG island methylator phenotype*) koja je povezana sa prisustvom mutacija u genima *IDH1/2* i smatra se da je ova hipermetilacija razlog bolje prognoze za bolesnike sa ovim podtipom GBM tumora [77, 78]. Mezenhimalni GBM su sa lošijom prognozom, obično se javljaju kod starijih osoba i karakterišu ih gubitak gena *NF1* (*Neurofibromatosis type 1*), mutacije u genima *PTEN* i *NF1*, ekspresija mezenhimalnih markera kao što *CHI3L1* (*Chitinase 3-like 1*) i *MET* (*Mesenchymal-epithelial transition factor*), aktivacija MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) signalnog puta i visok nivo ekspresije gena uključenih u TNF (*Tumor necrosis factor*) i NF-κB (*Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) signalne puteve (Tabela 1) [75]. Klasični glioblastomi su sa lošijom prognozom i karakterišu ih amplifikacija i visok nivo ekspresije gena *EGFR*, delecija gena *PTEN* i *CDKN2A* (*Cyclin dependent kinase inhibitor 2A*), odsustvo mutacija u genu *TP53*, visok nivo ekspresije neuralnog markera/markera matičnih ćelija *NES* (*Nestin*) i aktivacija Shh (*Sonic hedgehog*) i Notch signalnih puteva (Tabela 1)

[76]. Neuralni glioblastom karakteriše ekspresija neuronalnih markera kao što su *NEFL* (*Neurofilament light*), *GABRA1* (*Gamma-Aminobutyric acid type A receptor alpha 1 Subunit*), *SYT1* (*Synaptotagmin 1*) i *SLC12A5* (*Solute carrier family 12 member 5*) (Tabela 1) [76].

Tabela 1. Molekularna stratifikacija GBM na četiri molekularna podtipa

Molekularni podtipovi GBM	Promene detektovane u genomu i signalnim putevima
Proneuralni	<ul style="list-style-type: none"> - amplifikacija, povećana ekspresija i mutacije u genu <i>PDGFRA</i> - mutacije u genima <i>IDH1/IDH2</i> i <i>TP53</i> - ekspresija gena uključenih u neuralnu diferencijaciju - aktivacija PI3K signalnog puta
Mezenhimalni	<ul style="list-style-type: none"> - gubitak gena <i>NF1</i> - mutacije u genima <i>PTEN</i> i <i>NF1</i> -ekspresija mezenhimalnih markera <i>CHI3L1</i> i <i>MET</i> - aktivacija MAPK signalnog puta - visok nivo ekspresije gena uključenih u TNF i NF-κB signalne puteve
Klasični	<ul style="list-style-type: none"> - amplifikacije gena <i>EGFR</i> - delecija gena <i>PTEN</i> i <i>CDKN2A</i> - odsustvo mutacija u genu <i>TP53</i> -visok nivo ekspresije neuralnog markera/markera matičnih ćelija <i>NES</i> -aktivacija Sonic hedgehog i Notch signalnih puteva
Neuralni	<ul style="list-style-type: none"> -ekspresija neuronalnih markera <i>NEFL</i>, <i>GABRA1</i>, <i>SYT1</i> i <i>SLC12A5</i>

Značajna korelacija utvrđena je između primarnih glioblastoma i klasičnog podtipa GBM, kao i sekundarnih glioblastoma i proneuralnog podtipa GBM [69, 79, 80].

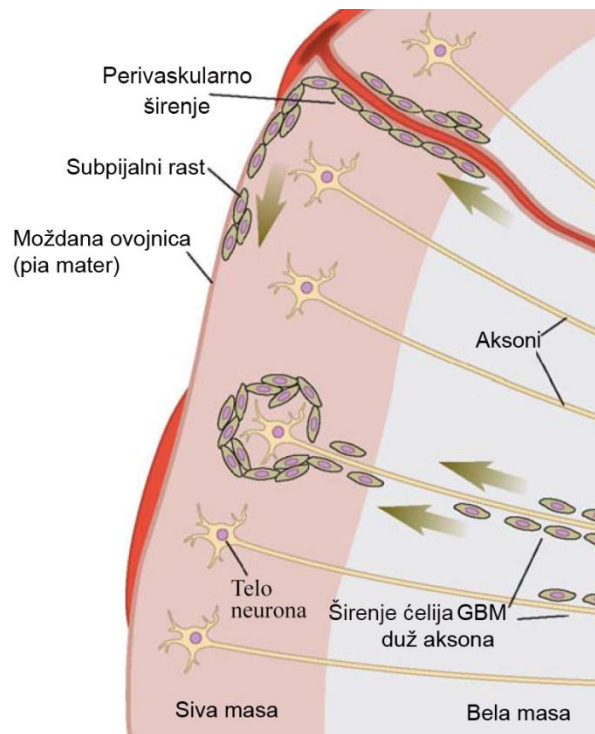
1.2.2.2. Osnovna obeležja glioblastoma

Osnovne karakteristike GBM tumora, pored neograničenog proliferativnog kapaciteta, rasta i replikativnog potencijala, visoke stope invazije i metastaziranja,

indukcije angiogeneze, izmenjenog metabolizma, izbegavanja programirane ćelijske smrti i prepoznavanja od strane imunog sistema su i heterogenost, izražena sposobnost infiltracije u okolno tkivo mozga, kao i rezistencija na radio- i hemio-terapiju [81].

Za GBM je karakteristična inter- i intra-tumorska heterogenost [82]. Detektovano je da su GBM tumori poreklom od različitih bolesnika izuzetno heterogeni (intertumorska heterogenost) [82]. Sa druge strane, uočeno je da se i ćelije unutar jednog tumora razlikuju (intratumorska heterogenost) [82]. Reinartz i saradnici [83] pokazali su da pojedinačni ćelijski klonovi jednog tumora imaju različit genetički identitet i različit odgovor na terapiju. Pored toga, uočeno je da se različiti regioni istog GBM tumora odlikuju specifičnim obrascima ekspresije iRNK na osnovu čega mogu biti klasifikovani u različite molekularne podtipove GBM [84]. Smatra se da su glioblastoma matične ćelije (GMC) odgovorne za intratumorsku heterogenost [85]. Naime, tokom deobe ovih ćelija mogu da se generišu ćelije različitog fenotipa, te samim tim i da se formiraju različite subpopulacije ćelija u okviru jednog tumora [85, 86].

Glioblastomi, kao i svi difuzni glioma tumori, odlikuju se izrazitom infiltracijom u okolni parenhim mozga [87]. Ova karakteristika GBM je, u velikoj meri odgovorna, za ponovu pojavu tumora nakon hirurškog odstranjivanja. Naime, pre hirurškog odstranjivanja tumora, zbog izrazite sposobnosti infiltracije, izvestan broj pojedinačnih ćelija GBM ili malih grupacija ćelija infiltrira u okolno tkivo mozga [87]. Kako savremenim metodama dijagnostike nije moguće detektovati pojedinačne ćelije ili male grupacije ćelija, ove ćelije ne bivaju odstranjene hirurškom intervencijom. Osobenost koja odlikuje ćelije GBM je i način infiltracije [87]. Naime, uočeno je da ove ćelije migriraju duž aksona neurona i bazalne membrane krvnih sudova, dok svi ostali tumori za infiltraciju u okolno tkivo koriste krvni i limfni sistem (Slika 6). Za razliku od ostalih tumorskih ćelija, ćelije GBM vrlo retko prolaze kroz bazalnu membranu krvnih sudova i ulaze u krvne sudove te su metastaze ćelija glioblastoma u druge organe veoma retke [87]. Pored toga, pokazano je da ćelije GBM mogu da se infiltriraju i u udaljeno tkivo mozga (kontralateralnu hemisferu) [87].



Slika 6. Šematski prikaz infiltracije ćelija glioblastoma u tkivo mozga. Čelije GBM migriraju i infiltriraju u okolno tkivo duž bazalne membrane krvnih sudova i aksonskih nastavaka (Preuzeto i modificovano od [87]).

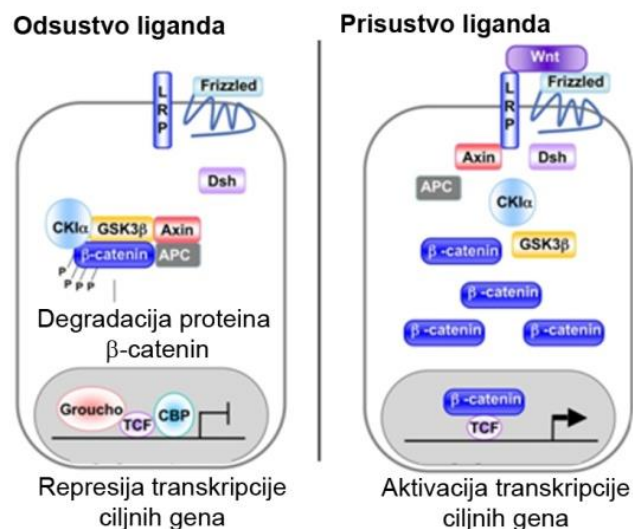
Za glioblastome je karakteristična i rezistencija na radio- i hemio- terapiju [65]. Trenutna standardna terapija ovih tumora podrazumeva hirurško uklanjanje tumora koje je praćeno radio- i hemio- terapijom (korišćenjem alkilirajućeg agensa temozolomida čiji je osnovni mehanizam delovanja preko zaustavljanja ćelijskog ciklusa) [88, 89]. U literaturi se kao potencijalni razlozi rezistencije GBM tumora na terapiju navode heterogenost GBM tumora, plastičnost ćelija, prisustvo matičnih ćelija glioblastoma i izražena sposobnost infiltracije u druge regiona mozga [82, 87].

U patogenezi glioblastoma veliki udeo ima i izmenjena aktivnost signalnih puteva, kao što su kanonski WNT i *Hedgehog* (HH) signalni putevi [90, 91], i autofagija [92-94].

1.2.2.2.1. Kanonski WNT signalni put

WNT signalni put važan je mehanizam transdukcije signala kako tokom embriogeneze tako i u adultnom stadijumu razvića [95]. Ovaj signalni put reguliše procese kao što su proliferacija i diferencijacija ćelija, determinacije telesne ose i sinaptička plastičnost [96]. Kanonski WNT signalni put posredovan je preko proteina β -katenina [95]. Pokazano je da β -katenin ima dvostruku ulogu u ćeliji - povezuje E-kadherin i α -katenin sa aktinskim citoskeletom [97, 98], a kao ključni molekul kanonskog WNT signalnog puta učestvuje u transaktiviranju Tcf (*T-cell factor*)/Lcf (*lymphoid enhancer binding factor*) regulatornih proteina u jedru [95].

U odsustvu WNT liganda, citoplazmatski β -katenin je u okviru velikog proteinskog kompleksa koji se označava kao destruktivni kompleks. U okviru ovog kompleksa β -katenin biva obeležen za proteozomalnu degradaciju [99, 100]. Pored toga, u odsustvu WNT signalizacije Tcf/Lef HMG domenski proteini su u kompleksu sa transkripcionim korepresorima (kao što su Tle/Groucho) vezani za promotere WNT ciljnih gena, te ne dolazi do transkripcije ciljnih gena (Slika 7) [101, 102]. Vezivanjem WNT liganada za transmembranske receptore LPR (*Lipoprotein receptor-related protein*) i *Frizzled* dolazi do inaktivacije destruktivnog kompleksa [103] što za rezultat ima akumulaciju β -katenina u citoplazmi i translociranje ovog proteina u jedro gde interaguju sa Tcf/Lef regulatornim proteinima [95, 104]. Vezujući se za Tcf/Lef kompleks, β -katenin potiskuje ko-represore iz kompleksa vezanog za promotor WNT ciljnih gena i regrutuje ko-aktivatore kao što su histon acetiltransferaze CBP/p300 [105-107]. Rezultat vezivanja β -katenina za Tcf je aktivacija ekspresije ciljnih gena (Slika 7) [95].



Slika 7. Aktivnost WNT signalnog puta u odsustvu i prisustvu liganda. U odsustvu liganda signalni put je neaktivan, protein β -katenin se nalazi u okviru destruktivnog kompleksa i obeležen je za degradaciju. Destruktivni kompleks čine Axin, APC (*Adenomatosis polyposis coli*), PP2A (*Protein phosphatase 2A*), GSK3 β (*Glycogen synthase kinase 3 β*) i CK1 α (*Casein kinase 1 α*). U prisustvu liganda pokreće se signalna kaskada preko proteina Dsh (*Dishevelled*) koja rezultuje translokacijom proteina β -katenin u jedro, vezivanjem β -katenina za TCF (*T-cell factor*) i aktivacijom transkripcije WNT ciljnih gena. Groucho – korepresor transkripcije; CBP –koaktivator transkripcije; LRP i Frizzled – receptori WNT signalnog puta; WNT - ligand (Preuzeto i modifikovano od [108]).

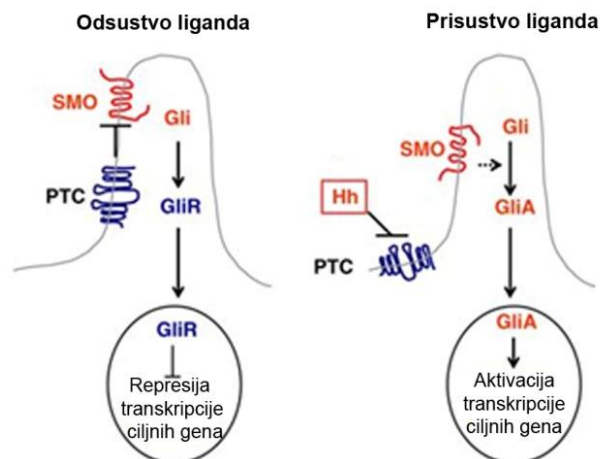
Pokazano je da je aktivacija kanonskog WNT signalnog puta, posredstvom akumulacije β -katenina u jedru, uključena i u proces karcinogeneze kod ljudi [109]. Akumulacija β -katenina u jedru može biti rezultat mutacije u genu koji kodira β -katenin ili genu APC koji kodira tumor supresorni protein, čime je onemogućena degradacija β -katenina [109]. Mutacije u ovim genima su uočene u mnogim tipovima malignih tumora, uključujući i glioblastom, karcinom debelog creva, melanom, hepatocelularni karcinom i karcinom želuca [110-112]. Povećana aktivnost WNT/ β -katenin signalnog puta povezana je sa povećanim malignim potencijalom glioma tumora [113]. Pokazano je da ovaj signalni put ima veoma značajne uloge u procesima, kao što su proliferacija, migracija, invazija i angiogeneza kod glioma tumora čime doprinosi progresiji ovih maligniteta [113]. Takođe, WNT/ β -katenin signalni put je uključen u nastanak glioma tumora; postoji korelacija

između aktivnosti ovog signalnog puta sa gradusom glioma tumora i povećana aktivnost ovog signalnog puta doprinosi lošoj prognozi kod bolesnika sa glioma tumorima [114-116].

1.2.2.2.2. *Hedgehog* signalni put

HH (*Hedgehog*) signalni put je uključen u regulaciju mnogobrojnih fundamentalnih procesa tokom razvića kičmenjaka, kao što su održavanje populacije matičnih ćelija, određivanje sudbine ćelija, proliferacija, apoptoza, migracija i diferencijacija [117]. Takođe, literaturni podaci ukazuju i na značajnu ulogu ovog signalnog puta u postnatalnom periodu gde učestvuje u regulaciji procesa kao što su održavanje homeostaze tkiva, reparacija i regeneracija tkiva nakon povrede [118]. Sa druge strane, sve je više podataka o ulozi HH signalnog puta u nastanku i progresiji tumora [118, 119].

HH signalni put započinje vezivanjem HH liganda za protein PTCH (*Patched*) (Slika 8). Kod vertebrata HH signalni put uključuje tri liganda: *Sonic hedgehog* (SHH), *Indian hedgehog* (IHH) i *Desert hedgehog* (DHH). U odsustvu liganda PTCH inhibira aktivnost proteina SMO (*Smoothed*), čija je aktivacija neophodna za prenos HH signala kroz plazma membranu u ćeliju. Vezivanjem HH liganda inhibira se PTCH, a aktivira SMO koji pokreće signalnu kaskadu u citoplazmi (Slika 8) [120]. Ishod pokretanja ove signalne kaskade zavisi od balansa aktivatorskih i represorskih formi proteina Ci (*Cubitus interruptus*)/GLI (*Glioma-associated oncogene*) (Slika 8). Familija GLI proteina obuhvata tri člana, GLI1, GLI1 i GLI3; GLI1/2 imaju ulogu aktivatora transkripcije ciljnih gena, dok GLI3 funkcioniše kao represor [121]. Pokazano je da je ekspresija gena *GLI1* i *PTCH* direktno zavisna od aktivacije HH signalnog puta zbog čega se ovi geni smatraju ključnim markerima aktivnosti ovog signalnog puta [122].



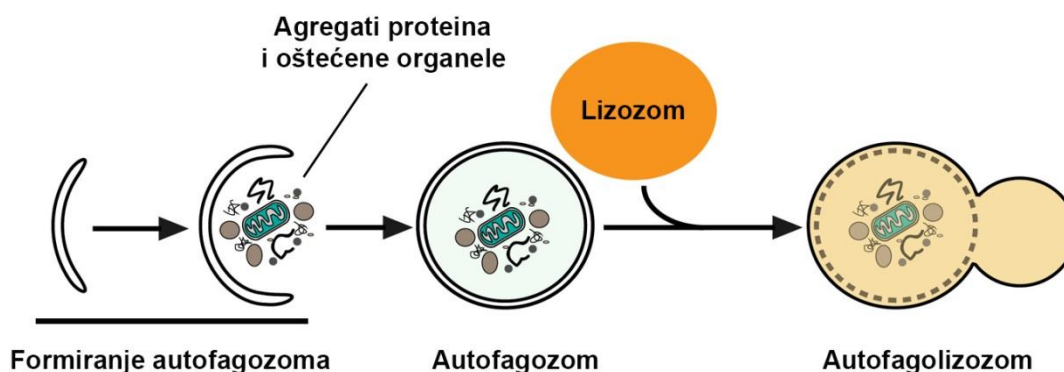
Slika 8. Aktivnost HH signalnog puta u odsustvu i prisustvu liganda. U odsustvu liganda GLI represori transkripcije (GliR) su uglavnom eksprimirani te ne dolazi do transkripcije ciljnih gena. U prisustvu liganda GLI aktivatori transkripcije (GliA) su uglavnom eksprimirani što za rezultat ima aktivaciju ekspresije ciljnih gena. PTC – *Patched*; SMO – *Smoothened*; HH – *Hedgehog* (Preuzeto i modificovano od [123]).

HH signalni put predstavlja jedan od najvažnijih mehanizama transdukcije signala u malignim ćelijama [124]. Povišena aktivnost ovog signalnog puta uočena je u glioblastomu, meduloblastomu, tumorima pluća, prostate, dojke i pankreasa [124]. Takođe, literaturni podaci ukazuju na značaj HH signalnog puta u inicijaciji, održavanju i progresiji GBM [125-128].

1.2.2.2.3. Autofagija

Autofagija je evolutivno očuvan lizosomalni katabolički proces kod eukariota [129]. Ovim procesom selektivno se degraduju agregati proteina, peroksizomi, oštećene mitohondrije, unutarćelijske bakterije i virusi, endoplazmatični retikulum i ribozomi [129]. Pokazano je da je autofagija neophodna za preživljavanje, diferencijaciju, razviće i održavanje homeostaze [129]. U literaturi su opisane 3 forme autofagije - autofagija posredovana šaperonima, mikroautofagija i makroautofagija, koje se razlikuju u odnosu na njihove fiziološke funkcije i način na koji dopremaju sadržaj citoplazme, koji je potrebno

degradovati, do lizozoma [129]. Pri autofagiji posredovanoj šaperonima agregati citoplazmatičnih proteina se selektivno transportuju u lizozom pri čemu ne dolazi do formiranja vezikula niti značajnih promena u membrani lizozoma [130]. Tokom procesa mikroautofagije, komponente citoplazme se transportuju u lizozom direktnom invaginacijom membrane lizozoma [131]. Za proces makroautofagije, najuniverzalnije forme autofagije, karakteristično je formiranje autofagozoma odnosno mali delovi citoplazme se pakuju u dvoslojnu membranu; zatim sledi fuzionisanje autofagozoma sa lizozomom i formiranje autofagolizozoma unutar kojih se degraduju agregati proteina i oštećene organele (Slika 9) [132]. Termin autofagija se najčešće koristi za makroautofagiju.



Slika 9. Shematski prikaz procesa makroautofagije (Preuzeto i modifikovano od [133]).

Uloga autofagije u ćeliji je dvojaka. Sa jedne strane, autofagija predstavlja jedan od mehanizama odgovora ćelije na stres (kao što su gladovanje ćelija, hipoksija, zračenje ćelija i tretman citostaticima) kojim se uklanjaju oštećeni proteini ćelija i organele što omogućava preživljavanje ćelija [129]. Sa druge strane, autofagija je uključena i u programiranu ćelijsku smrt označenu kao autofagna ćelijska smrt. Karakteristično za autofagnu ćelijsku smrt je prisustvo velikog broja autofagozomama i autolizozoma u ćeliji koja umire [134].

Ključni događaj u procesu autofagije predstavlja konverzija proteina LC3 (*Microtubule-associated protein 1 light chain 3*). Ovaj protein se proteolitički obrađuje i na

taj način se generiše solubilna citoplazmatska forma LC3-I koja se zatim konjuguje sa fosfatidilaminom, formirajući LC3-II koji se ugrađuje u membranu autofagozoma [129]. Takođe, značajnu funkciju u procesu autofagije imaju i protein Beclin-1 koji je neophodan za indukciju ovog procesa [135] i protein p62 koji je reporter autofagne aktivnosti u ćeliji. Naime, p62 protein je uključen u isporučivanje ubikvitovanih proteina do proteozoma [136].

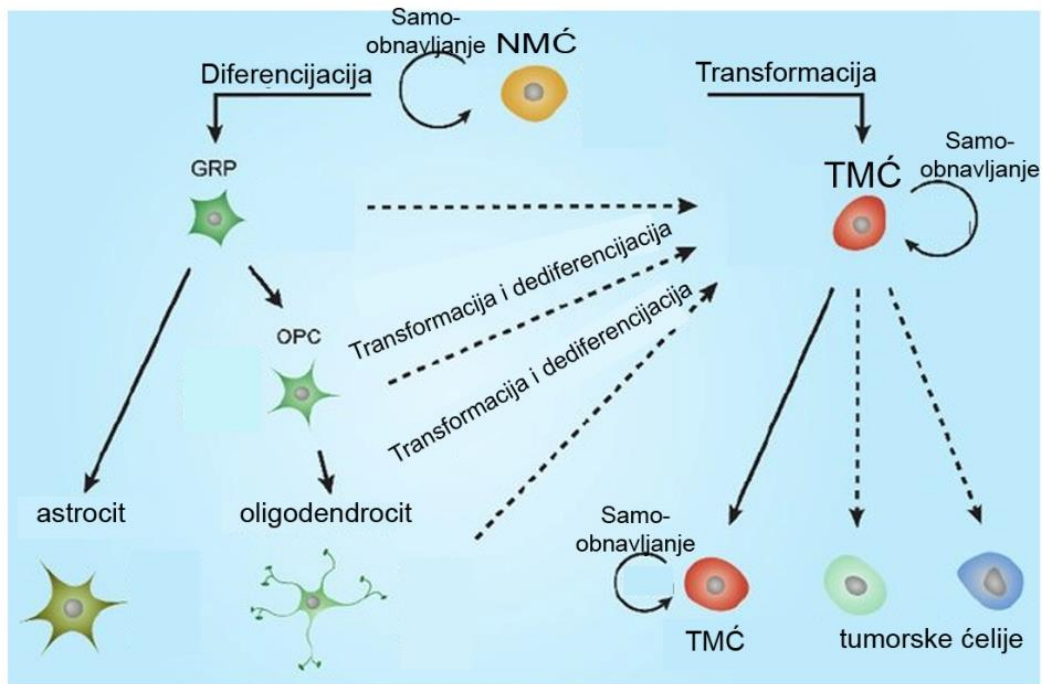
U tumorskim ćelijama autofagija ima dvojaku ulogu, supresorsku i promovišuću [137, 138]. Rezultati istraživanja ukazuju da autofagija supresorsku funkciju u tumorskim ćelijama ostvaruje uklanjanjem oštećenih organela i sprečavanjem akumulacije slobodnih kiseoničnih radikala koji bi prouzrokovali nestabilnost genoma [139]. Sa druge strane, uočeno je da autofagija može da promoviše preživljavanje tumorskih ćelija u uslovima lošeg snabdevanja hranljivim materijama što je česta pojava kod solidnih tumora i metastatskih ćelija malignih tumora [139]. Pored toga, povišena aktivnost autofagije se često uočava kod tumora kao odgovor na terapiju; smatra se da u ovim uslovima autofagija štiti tumorske ćelije od terapijom indukovane apoptoze [139]. Pokazano je da uloga autofagije u malignim tumorima zavisi od tipa ćelija, tipa tumora i faze karcinogeneze [140-144].

Podaci iz literature pokazuju da je progresija nižih gradusa glioma tumora u više graduse praćena smanjenom aktivnošću autofagije [94]. Pored toga, viši gradusi glioma tumora imaju nižu ekspresiju proteina uključenih u proces autofagije u odnosu na niže graduse ovih tumora [93]. Pokazano je da zračenje, kao i tretman temozolomidom indukuje autofagiju u ćelijama glioma [145]. Takođe, rezultati nekoliko studija su pokazali da modulacija procesa autofagije čini tumorske ćelije mozga podložnije smrti indukovanoj radio- i hemio-terapijom [145]. S obzirom da su GBM rezistentni na trenutne terapijske pristupe koji promovišu apoptozu, targetiranje autofagije kao alternativnog mehanizma smrti ćelija je pristup za koji se smatra da ima veliki potencijal za uspešnu terapiju GBM [145].

1.2.2.2.4. Hijerarhijska organizacija ćelija glioblastoma

Podaci iz literature ukazuju da je za glioblastome karakterističan kompleksni hijerarhijski odnos među ćelijama [146]. Hijerarhijski odnos među ćelijama u biološkim sistemima podrazumeva da sve ćelije nekog sistema nisu jednake po značajnosti ili potencijalu; kod hijerarhijskih modela nediferencirane matične ćelije prolaze kroz asimetrične ćelijske deobe; ove deobe omogućavaju održavanje populacije matičnih ćelija i generisanje specijalizovanih progenitora i diferenciranih ćelija [146].

Dominantnu ulogu u hijerarhijskoj organizaciji ćelija glioblastoma imaju matične ćelije glioblastoma (tumor-inicirajuće ćelije) (GMC) [146]. Pokazano je da ove ćelije imaju sposobnost samoobnavljanja, generisanja svih ćelijskih linija tumora (uključujući endotelijum i pericite krvnih sudova), generisanja ksenograft tumora u mozgu imunodeficientnih miševa i sposobnost formiranja neurosfera [146]. Rezultati istraživanja ukazuju da su ove ćelije slične neuralnim matičnim ćelijama i mnogi regulatorni i strukturni proteini koji su neophodni za normalno funkcionisanje populacije neuralnih matičnih i progenitorskih ćelija su markeri i matičnih ćelija glioblastoma, uključujući SOX2, NANOG, OLIG2 (*Oligodendrocyte transcription factor*), NESTIN, MUSASHI1 i BMI1 (*B cell-specific Moloney murine leukemia virus integration site 1*) [147]. Pored toga, podaci iz literature ukazuju da su ove ćelije odgovorne za nastanak, progresiju, metastaziranje i ponovno javljanje GBM tumora, kao i za rezistenciju na radio- i hemio-terapiju [147]. Smatra se da matične ćelije glioblastoma mogu da nastanu transformacijom neuronalnih matičnih ćelija ili de-diferencijacijom normalnih ćelija mozga, kao što su astrociti ili oligodendrociti (Slika 10) [148]. Izolacijom GMC iz glioma visokog gradusa, uočeno je da mogu da se razlikuju dve grupe ovih ćelija – proneuralna i mezenhimalna grupa [148]; proneuralne matične ćelije glioblastoma pokazuju sličnosti sa fetalnim neuralnim matičnim ćelijama, dok mezenhimalne pokazuju sličnosti sa adultnim neuralnim matičnim ćelijama [148].



Slika 10. Poreklo ćelija glioblastoma. Smatra se da matične ćelije glioblastoma mogu da nastanu transformacijom neuralnih matičnih ćelija (NMČ) ili de-diferencijacijom astrocita i oligodendrocita. TMČ – matična ćelija tumora; GRP - glijalni progenitor; OPC - prekursor oligodendrocita (Preuzeto i modifikovano od [149]).

Smatra se da će istraživanja posvećena matičnim ćelijama glioblastoma i hijerarhijskoj organizaciji ćelija glioblastoma doprineti razvoju novih terapijskih pristupa ne samo kod glioblastoma, nego i kod ostalih tumora kod kojih je detektovan hijerarhijski odnos među ćelijama [146].

1.3. Familija gena *SOX/Sox*

Geni *SOX* (*Sry-related HMG-box*) kodiraju proteine SOX koji pripadaju HMG (*High-mobility group*) boks superfamiliji DNK vezujućih proteina [150, 151]. Ovi proteini poseduju ulogu kako regulatornih proteina, tako i arhitektonskih komponenti hromatina (interaguju sa manjim žljebom DNK zavojnice i dovode do savijanja DNK zavojnice)

[152]. HMG boks domen proteina SOX, dužine 79 aminokiselina, omogućava specifično vezivanje za heksamernu DNK sekvencu 5'WWCAA3' (W-A/T) [153, 154].

Devedesetih godina prošlog veka otkriven je prvi član familije gena *SOX*, gen *SRY* mapiran na Y hromozomu [155, 156]. Familija gena *SOX/Sox* kod čoveka i miša broji dvadeset gena *SOX* [157], svrstanih u osam grupa, od A do H (Tabela 2). Članovi grupe B su podeljeni u dve podgrupe, B1 (*SOX1*, *SOX2*, *SOX3*) i B2 (*SOX14*, *SOX21*) [152]. U okviru iste grupe proteini pokazuju visok stepen homologije (70-95%), kako u okviru HMG boks domena tako i izvan njega, dok proteini različitih grupa pokazuju delimičnu homologiju samo u okviru HMG boks domena (>45%) [151, 152].

Tabela 2. Podela gena *SOX*

Grupa	Članovi
<i>SOXA</i>	<i>SRY</i>
<i>SOXB1</i>	<i>SOX1</i> , <i>SOX2</i> , <i>SOX3</i>
<i>SOXB2</i>	<i>SOX14</i> , <i>SOX21</i>
<i>SOXC</i>	<i>SOX4</i> , <i>SOX11</i> , <i>SOX12</i>
<i>SOXD</i>	<i>SOX5</i> , <i>SOX6</i> , <i>SOX13</i>
<i>SOXE</i>	<i>SOX8</i> , <i>SOX9</i> , <i>SOX10</i>
<i>SOXF</i>	<i>SOX7</i> , <i>SOX17</i> , <i>SOX18</i>
<i>SOXG</i>	<i>SOX15</i>
<i>SOXH</i>	<i>SOX30</i>

Većina gena *SOX/Sox* ima od 1 do 3 egzona i jednu varijantu zrele informacione RNK [158-161]. Geni grupe A, B, C i G ne poseduju introne. Za razliku od njih, geni grupe D i H sadrže više egzona i obradom njihovih pre-iRNK mogu nastati različite izoforme SOXD/H proteina [158-161].

SOX proteini poseduju nekoliko funkcionalnih domena: HMG boks domen, transaktivacione, transrepresorske i domene odgovorne za dimerizaciju proteina [152]. HMG boks domen omogućava ostvarivanje funkcija kao što su vezivanje proteina za DNK,

savijanje DNK, interakcije sa drugim proteinima i transport proteina iz citoplazme u jedro i obrnuto. Većina SOX proteina poseduje jedan ili više funkcionalnih domena izvan HMG boksa. Ovi domeni su visoko evolutivno očuvani kod ortologa, kao i kod članova iste grupe, dok je nizak nivo homologije ili odsustvo homologije detektovano između članova različitih grupa [152].

1.3.1. Funkcije gena *SOX*

Geni *SOX* familije regulišu brojne procese kako tokom embriogeneze, tako i u adultnom periodu života [152]. Pokazano je da proteini SOX imaju značajne funkcije u determinaciji pola, održavanju populacije matičnih ćelija, neurogenezi, gliogenezi, razviću nervne kreste, skeletogenezi, hematopoezi, razviću endoderma, kardiogenezi i angiogenezi [152]. Pored toga ovi proteini učestvuju u kontroli homeostaze u adultnim tkivima [157].

Gen *SRY*, član *SOXA* grupe, ima značajne funkcije u determinaciji pola i razviću testisa [162]. Pokazano je da kod embriona miša gen *Sry* indukuje diferencijaciju ćelija nedeterminisanih gonada u Sertolijeve ćelije [162].

Geni *SOXB1* podgrupe imaju značajne uloge u mnogim procesima, kao što su neuralna diferencijacija, razviće senzornih plakoda i razviće folikula dlake [163]. Članovi ove grupe su ko-ekspimirani u neuralnom epitelu i ispoljavaju funkcionalnu redundantnost tokom razvića CNS [164, 165]. Pokazano je da ovi geni imaju ulogu u održavanju potencijala i identiteta neuralnih matičnih ćelija i neuralnih progenitora, dok se njihova ekspresija smanjuje pri ulasku neuralnih progenitora u proces diferencijacije [166]. U adultnom periodu geni *SoxB1* su ekspimirani u određenim podtipovima postmitotičkih neurona i smatra se da u ovom periodu geni *SoxB1* kontrolišu neuronalnu diferencijaciju specifičnu za određen podtip neurona i/ili preživljavanje ovih ćelija [167]. Najproučavaniji gen iz ove podgrupe je *SOX2*. Rezultati istraživanja ukazuju da *SOX2* održava populaciju matičnih ćelija u nediferenciranom stanju [163]. Pored toga, ovaj gen je jedan od četiri faktora neophodnih za reprogramiranje somatskih ćelija u indukovane pluripotentne matične ćelije [168]. Takođe, pokazano je da je funkcija proteina SOX2 neophodna za formiranje unutrašnje ćelijske mase embriona [164]. Rezultati istraživanja Weiss i

saradnika ukazuju da je kod miša gen *Sox3*, pored uloge u neuralnoj diferencijaciji, bitan i za normalno razviće oocita, diferencijaciju testisa mužjaka i gametogenezu, ali ne i za determinaciju pola [169].

Članovi SOXB2 podgrupe imaju značajne uloge tokom razvića nervnog sistema [170]. Pokazano je da SOX21, reprimirajući aktivnost *Sox1-3*, učestvuje u kontroli tranzicije od neuralnih progenitora do neurona [167]. Pored toga, gubitak funkcije proteina SOX14 kod embriona pileta rezultuje inhibicijom diferencijacije GABAergičkih neurona u rostralnom talamusu [171]. Takođe, detektovano je da su u dorzalnom srednjem mozgu SOX14 i SOX21 neophodni i dovoljni za indukciju specifikacije GABAergičkih neurona [172].

Geni *SOXC* grupe regulišu procese diferencijacije i organizacije tkiva tokom kasnijih faza razvića [163]. Predominantno su ekspremirani u neuralnim i mezenhimalnim progenitorskim ćelijama [163]. Članovi ove grupe odgovorni su za diferencijaciju neuralnih progenitora u terminalno diferencirane nervne ćelije [173], kao i za razvoj bubrežnog tkiva [174]. Detektovano je da u uslovima povećane ekspresije gena *SOXC* grupe dolazi do aktivacije ekspresije panneuralnih markera, kao što su Tuj1 i MAP2 [167]. Takođe, pokazano je da gubitak funkcije ovih gena dovodi do malformacija raznih organa [163]. Ekspresija gena *Sox4* detektovana je u timusu; pokazano je da SOX4 promovise ekspanziju pro-B limfocita i diferencijaciju T limfocita [175] što ukazuje na ulogu ovog gena u procesu hematopoeze.

Geni *SOXD* grupe imaju značajne funkcije u procesu hondrogeneze [163]. Rezultati istraživanja Smits-a i saradnika ukazuju da nedostatak gena *Sox5* ili gena *Sox6* kod miševa prouzrokuje blage abnormalnosti skeleta, dok miševi kojima nedostaju oba gena umiru sa ozbiljnim, generalizovanim hondrodisplazijama [176]. Pored toga, pokazano je da geni *SoxD* grupe regulišu i razviće oligodendrocita [167]. Sa druge strane, pokazano je da *SOX13* ima značajne funkcije u diferencijaciji T limfocita [177], dok je *Sox6* bitan stimulator eritropoeze [178].

Geni *SOXE* grupe imaju značajne funkcije u neuralnoj diferencijaciji, hondrogenezi i determinaciji pola [163]. Pokazano je da geni ove grupe regulišu diferencijaciju neuralnih matičnih ćelija u ćelije glije [163]. Literaturni podaci ukazuju da diferencijacija i

specifikacija oligodendrocita zavisi od gena *SoxE* grupe [167]. Ekspresija gena *Sox9* detektovana je u glijalnim prekursorima, dok je ekspresija gena *Sox10* detektovana u diferenciranim oligodendrocitima i astrocitima [179-181]. Takođe, ovi geni su uključeni u specifikaciju i održavanje populacije progenitora nervne kreste [167]. Sa druge strane, detektovano je da je gen *SOX9* ključan regulator hondrogeneze i da je uključen u brojne faze tokom formiranja hrskavice [167]; pokazano je da mutacije na jednom alelu ovog gena prouzrokuju karpomeličnu displaziju i autozomalnu XY reverziju pola kod ljudi [182, 183]. Takođe, rezultati istraživanja pokazuju da *SOX9* promoviše diferencijaciju Sertolijevih ćelija [184] i da su *SOX8* i *SOX9* neophodni za održavanje fertiliteta kod muškog pola [185].

Geni *SOXF* grupe poseduju značajne funkcije tokom razvića endoderma, vaskulogenezi, limfangiogenezi, neovaskularizaciji, hematopoezi i razviću folikula dlake [163].

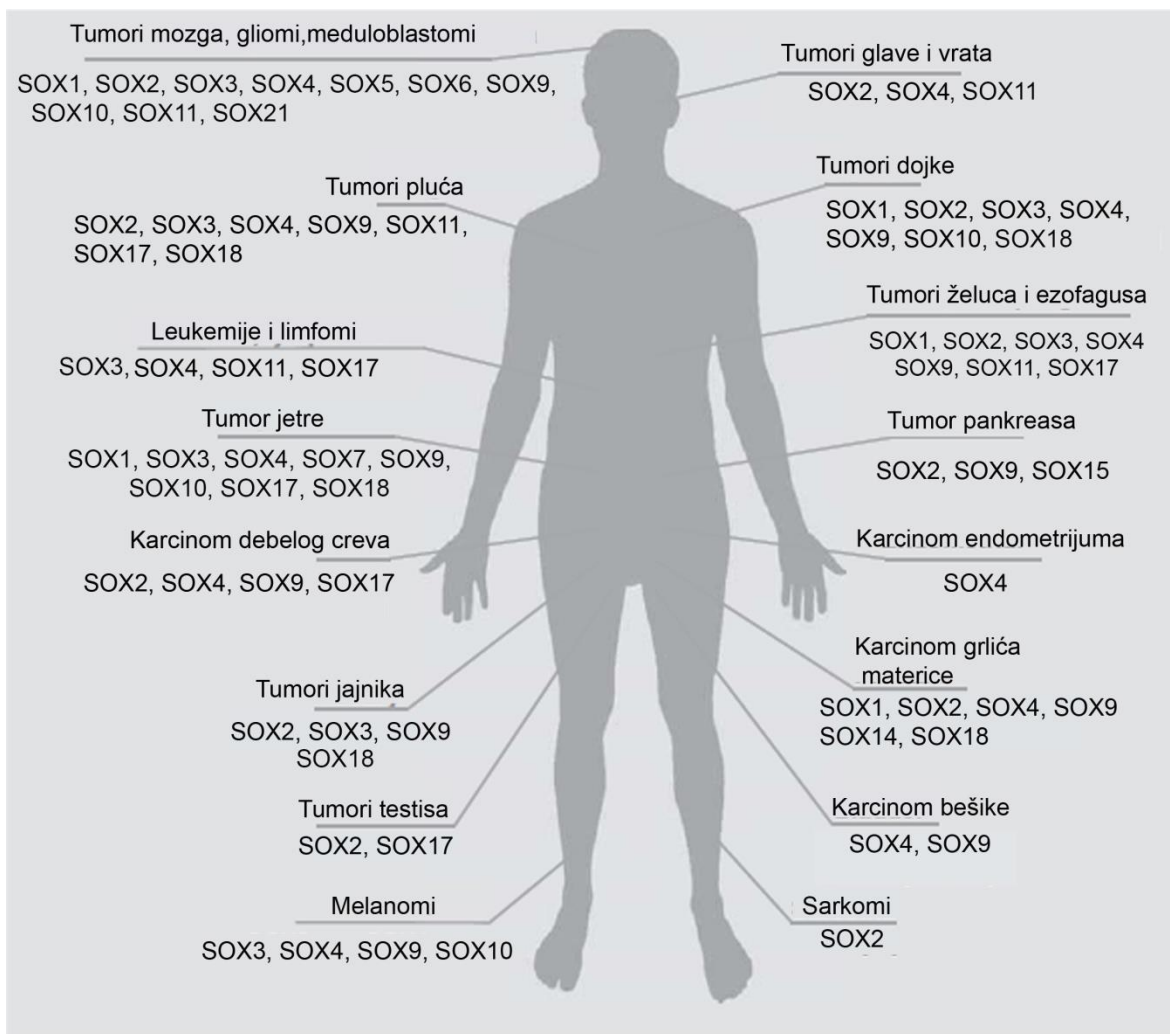
Gen *SOX15*, član *SOXG* grupe, bitan je za razvoj skeletne muskulature. Nedostatak ovog gena dovodi do odsustva regeneracije skeletne muskulature kod miša [163].

Gen *SOX30*, član *SOXH* grupe, ima značajne funkcije u spermatogenezi. Nedostatak ovog gena indukuje sterilitet mužjaka miša [186].

1.3.2. Familija gena *SOX* i karcinogeneza

Literaturni podaci ukazuju da mnogi proteini za koje je pokazano da poseduju značajne uloge u toku embrionalnog razvića imaju bitne funkcije i u procesu karcinogeneze [187]. Sa druge strane, za mnoge proteine za koje je najpre utvrđeno da su ključni za razviće malignih tumora, kasnije je uočeno da imaju značajne uloge u toku embrionalnog razvića [187].

U poslednjih nekoliko godina sve je više podataka da su mutacije u genima *SOX* i disfunkcija proteina *SOX* povezani sa bolestima kod ljudi, uključujući i maligne bolesti [165]. Na Slici 11 shematski su prikazani proteini *SOX* za koje je do sada poznato da poseduju ulogu u malignim tumorima.



Slika 11. Shematski prikaz proteina SOX uključenih u različita maligna oboljenja (Preuzeto i modifikovano iz [187]; funkcija proteina SOX1 i SOX3 u glioblastomu opisana je u ovoj tezi).

Pokazano je da članovi familije gena *SOX* mogu da ostvaruju funkciju onkogeno, tumor supresornog gena, ili obe funkcije u zavisnosti od sastava/tipa ćelija i da mogu da budu aktivirani ili inhibirani preko različitih genetičkih i epigenetičkih mehanizama, uključujući promene u metilaciji DNK, broju kopija DNK, kao i usled promena ekspresije mikro RNK [187-190]. Proteini SOX familije doprinose malignom fenotipu ćelija tumora preko regulacije različitih procesa, kao što su proliferacija, apoptoza, preživljavanje,

invazija, migracija, diferencijacija, održavanje populacije matičnih ćelija tumora, senescencija i angiogeneza [191].

Ekspresija gena *SOXBI* podgrupe detektovana je u glioblastomima [192]. Pored toga, funkcija gena *SOXI* opisana je kod različitih malignih bolesti, kao što je hepatocelularni karcinom i karcinomi grlića materice, želuca, nazofarinksa, dojke i prostate [193-198]. Takođe, pokazano je da gen *SOX2* ostvaruje funkciju onkogeno kod karcinoma skvamoznih ćelija jednjaka i karcinoma pluća [199], dok ima funkciju tumor supresora kod karcinomu želuca [200]. Visok nivo ekspresije gena *SOX2* karakterističan je za matične ćelije tumora kao što su karcinom grlića materice, sarkomi, karcinom dojke, kolorektalni karcinom i glioblastom [201]. Literaturni podaci pokazuju da u uslovima povećane ekspresije gena *SOX2* dolazi do onkogene transformacije transbronhijalnih epitelijalnih ćelija [199, 202]. Takođe, pokazano je i da povišena ekspresija gena *SOX3* indukuje onkogenu transformaciju fibroblasta embriona pileta [203]. Uloga gena *SOX3* opisana je kod karcinoma skvamoznih ćelija jednjaka, epitelijalnog karcinoma jajnika, osteosarkoma, T-ćelijskih limfoma i hepatocelularnog karcinoma [204-208].

Pokazano je da gen *SOX14*, člana *SOXB2* podgrupe, utiče na osobine ćelija karcinoma grlića materice, kao što su proliferativni kapacitet, vijabilnost, ćelijska smrt i invazivni potencijal [209], dok povećana ekspresija gena *SOX21* indukuje apoptozu ćelija glioma [210].

Kada su u pitanju članovi *SOXC* grupe, detektovano je da je ekspresija gena *SOX4* povećana kod akutne leukemije, sitnoćelijskog karcinoma pluća, kolorektalnog karcinoma, karcinoma dojke, dok je ekspresija ovog gena smanjena kod karcinoma jetre i mokraćne bešike [190]. Povećana ekspresije gena *SOX4* u netumorskim ćelijama prostate dovodi do onkogene transformacije ovih ćelija [211]. Povišeni nivo ekspresije gena *SOX11* detektovan je kod nesitnoćelijskog karcinoma pluća [212]. Pokazano je da gena *SOX11* kod karcinoma glave i vrata ima funkciju onkogeno [213], dok kod karcinoma želuca ima ulogu tumor supresora [214].

Visok nivo ekspresije gena *SOX5* i *SOX6*, članova *SOXD* grupe, detektovan je u gliomima [165].

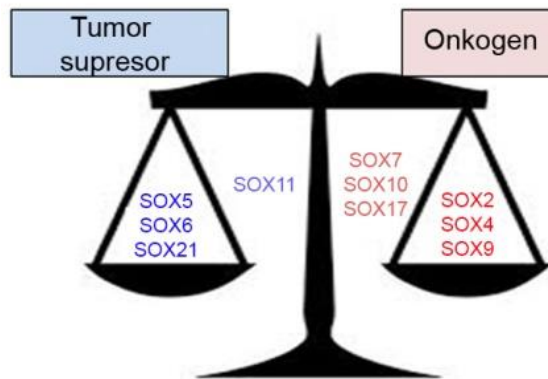
Povećana ekspresija članova *SOXE* grupe (*SOX8*, *SOX9*, *SOX10*) uočena je kod različitih malignih tumora [191]. Povećana ekspresija gena *SOX8* detektovana je kod hepatocelularnog karcinoma [215], dok je povišen nivo ekspresije gena *SOX9* detektovan kod tumora mozga, pankresa, creva, pluća i prostate [216]. Kod glioma i karcinoma pankreasa *SOX9* poseduje funkciju onkogen, dok kod melanoma ima ulogu tumor supresora [217]. Izmenjena ekspresija gena *SOX10* detektovana je kod melanoma [218-220].

Kada su u pitanju članovi *SOXF* grupe, pokazano je da je ekspresija gena *SOX7* smanjena u tumoru pluća, dojke, debelog creva i prostate [221]. Smanjena ekspresija gena *SOX17* detektovana je kod hepatocelularnog karcinoma, kolorektalnog karcinoma i karcinoma jednjaka [222]. Smatra se da *SOX7* i *SOX17* imaju funkciju tumor supresora u različitim tumorima [221, 223]. Povećana ekspresija gena *SOX18* detektovana je kod različitih tumora kao što su nesitnoćelijski karcinom pluća, hepatocelularni karcinom, karcinom jajnika, grlića materice i dojke, i kod ovih tumora povećana ekspresija gena *SOX18* povezana je sa lošijom prognozom [224-227].

Literaturni podaci ukazuju da gen *SOX15*, član *SOXG* grupe, ima ulogu tumor supresora kod karcinoma pankreasa [228].

1.3.2.1. Gliomi i geni *SOX*

Podaci iz literature ukazuju da su brojni članovi familije gena *SOX* eksprimirani u gliomima (Slika 12).



Slika 12. Uloga gena *SOX* u malignim glioma tumorima (Preuzeto i modifikovano od [165]).

Visok nivo ekspresije proteina SOX2 detektovana je u glioblastomima [165]. Pokazano je da je kod bolesnika sa GBM povišena ekspresija ovog proteina povezana sa lošijim preživljavanjem bolesnika [229]. Takođe, visok nivo ekspresije ovog gena detektovan je i u populaciji glioma matičnih ćelija gde je ovaj gen neophodan za održavanje pluripotentnosti, tumorogenog potencijala i proliferativnog kapaciteta ovih ćelija [230, 231]. Studija Suva i saradnika pokazuje da je SOX2, zajedno sa POU3F2, SALL2 i OLIG2, neophodan za potpunu dediferencijaciju (reprogramiranje) ćelija GBM u glioma matične ćelije [232].

Literaturi podaci pokazuju da forsirana ekspresija SOX21, člana SOXB2 podgrupe, inhibira ekspresiju gena *SOX2* i indukuje apoptozu ćelija glioma [210]. Pored toga, uočeno je da SOX21 inhibira progresiju glioma *in vivo* formirajući kompleks sa SOX2 i stimulišući aberantnu diferencijaciju [233]. Ovi rezultati ukazuju na tumor supresorsku ulogu gena SOX21 [165].

Član SOXC grupe, protein SOX4 povišeno je eksprimiran u uzorcima tkiva GBM i rezultati istraživanja ukazuju da je povišena ekspresija ovog proteina povezana sa povećanom aktivnošću TGF- β (tumor growth factor β) [234] signalnog puta za koji je pokazano da je odgovoran za nastanak i progresiju GBM [235]. Takođe, uočeno je da povišena ekspresija gena *SOX4* korelira sa lošijim preživljavanjem obolelih od GBM [236]. Uloga SOX11 u GBM još uvek nije u potpunosti razjašnjena. Dok je povišen nivo

ekspresije ovog proteina detektovan u GBM [237], nizak nivo ekspresije ovog gena korelira sa lošijim preživljavanjem bolesnika sa ovim tipom tumora [238]. U GMĆ nije detektovana ekspresija gena *SOX11*. Sa druge strane, pokazano je da miševi kojima su transplantirane matične ćelije glioblastoma sa ektopičnom ekspresijom ovog gena duže preživljavaju u poređenju sa miševima kojima su transplantirane kontrolne GMĆ [238].

Povećana ekspresija proteina SOX5 i SOX6, članova SOXD grupe, detektovana je u gliomima [239, 240]. Takođe, utvrđena je pozitivna korelacija između prisustva antitela na proteine SOX5 i SOX6 (IgG) u serumu bolesnika sa gliomima i preživljavanja bolesnika [240]. Pokazano je da ektopično povećanje ekspresije gena *SOX5*, *SOX6* i *SOX21* u primarnim ćelijama GBM poreklom od bolesnika uvodi ove ćelije u senescenciju i apoptozu, smanjujući na taj način njihov maligni potencijal [241]. Takođe, ekspresija ova tri gena smanjuje se tokom maligne progresiji glioma tumora u više graduse. Pored toga, detektovano je da smanjenje ekspresije gena *SOX5*, *SOX6* i *SOX21* povećava kapacitet matičnih ćelija subventrikularne zone miša da formiraju glioma tumore kod onkogenom-indukovanog modela tumora mozga miša [241].

Povišena ekspresija gena *SOX9*, pripadnika *SOXE* grupe, uočena je u glioma tumorima. Pokazano je da sa povećavanjem gradusa glioma tumora raste ekspresija ovog gena i gena *SOX10*, drugog člana ove grupe [242]. Pored toga, pokazano je da povećana ekspresija gena *SOX9* korelira sa lošijim preživljavanjem obolelih od GBM [243]. Takođe, uočeno je da je preživljavanje bolesnika kod kojih su detektovani glioma tumori sa povećanom ekspresijom gena *SOX9* kraće u poređenju sa bolesnicima kod kojih su detektovani glioma tumori sa nižom ekspresijom ovog gena [243]. Utišavanje ekspresije gena *SOX9* smanjuje proliferativni kapacitet ćelija glioma tumora, dovodi do zaustavljanja ćelijskog ciklusa u G2/M fazi i povećava apoptozu u ovim ćelijama [243].

Pokazano je da je gen *SOX17*, član *SOXF* grupe, eksprimiran u endotelijalnim ćelijama GBM tumora te se smatra da je ovaj gen uključen u promovisanje procesa angiogeneze u tumorima [244]. Rezultati istraživanja ukazuju da ekspresija ovog gena u krvnim sudovima glioblastoma nije u korelaciji sa preživljavanjem bolesnika sa ovim tipom tumora [245]. Takođe, u krvnim sudovima GBM tumora bolesnika uočena je heterogena ekspresija gena *SOX7*; detektovano je da visok nivo ekspresije ovog gena korelira sa

lošijom prognozom kod bolesnika, kao i sa pojavom malih i razgranatih krvnih sudova unutar tumora [245].

Geni *SOX1* i *SOX3* eksprimirani su u GBM tumorima, međutim njihova uloga u ovom malignitetu još uvek nije dovoljno istražena. Imajući to u vidu, tema ove doktorske disertacije je analiza uloge gena *SOX1* i *SOX3* u ćelijama GBM.

1.3.3. Gen *SOX1*

Gen *SOX1* mapiran je na hromozomu 13 u regionu q34 [246]. Ovaj gen kodira protein dužine 391 aminokiseline koji na svom C-terminalnom domenu poseduje polialaninske nizove i histidin-prolin ponovke [246].

Protein SOX1 ima značajne funkcije u procesu neurogeneze [246, 247]. Naime, pokazano je da je ovaj protein jedan od najranijih markera ćelija koje su se opredelile za formiranje neuroektoderma. Regulatorni protein SOX1 održava neuralne progenitore u nediferenciranom, mitotski aktivnom stanju [248]. Takođe, uočeno je da ektopično povećana ekspresija gena *SOX1* u ćelijama miša dovodi do indukcije neuralne diferencijacije što ukazuju da je protein SOX1 dovoljan faktor za pokretanje procesa neurogeneze [249]. Literaturi podaci ukazuju da je precizno regulisana ekspresija gena *SOX1* u prednjem mozgu ključni faktor diferencijacije postmitotskih GABAnergičkih neurona ventralnog strijatuma [250, 251]. U adultnom periodu ekspresija ovog gena je uočena u populaciji neuralnih matičnih ćelija [252].

Pored uloga u procesu neurogeneze, protein SOX1 poseduje značajnu funkciju i u procesu razvića sočiva oka regulišući ekspresiju γ -kristalina [253, 254].

Podaci iz literature ukazuju da odsustvo ekspresije ovog gena tokom razvića rezultuje pojavom epilepsije [151, 166, 251, 255].

U literaturi su sve prisutniji podaci o ulozi gena *SOX1* u malignim oboljenjima. Visok titar antitela specifičnih za SOX1 detektovan je u serumu bolesnika sa sitnoćelijskim karcinomom pluća [256]. Takođe, pokazano je da je ekspresija gena *SOX1* epigenetički inhibirana kod karcinoma grlića materice i ovarijuma, odnosno uočeno je da je promotor

ovog gena hipermetilovan u ovim karcinomima [257, 258]. Aktivnost ovog gena kao tumor supresornog gena detektovana je kod hepatocelularnog karcinoma, karcinoma grlića materice, nazofaringsa, dojke i želuca [193-197]. Istraživanja ukazuju da protein SOX1 inhibira proliferaciju, invaziju i rast ćelija karcinoma grlića materice [195]. Ekspresija ovog gena je utišana kod karcinoma želuca; ektopično povećanje ekspresije gena *SOX1* dovodi do zaustavljanja proliferacije i do smrti ćelija ovog karcinoma [193]. Takođe, ektopično povećanje ekspresije ovog gena indukuje senescenciju i smanjuje proliferativni kapacitet i migratornu sposobnost ćelija karcinoma nazofaringsa, kao i rast ovog tipa karcinoma [194]. Pored toga, povećana ekspresija gena *SOX1* smanjuje proliferaciju i invazivni potencijal ćelija hepatocelularnog karcinoma, kao i sposobnost formiranja kolonija ćelija i i sam rast tumora *in vivo* [197].

Iako većina doskorašnjih podataka ukazuju na tumor supresorsku aktivnost proteina SOX1, skorašnji podaci ukazuju da gen *SOX1* može ispoljavati i onkogenu aktivnost. Naime, u ćelijama karcinoma prostate koje se odlikuju izraženom sposobnošću da izvrše invaziju, detektovan je visok nivo ekspresije gena *SOX1* u poređenju sa ćelijama ovog tumora koje nemaju sposobnost invazije, kao i parentalnim ćelijama [198].

1.3.4. Gen *SOX3*

Humani gen *SOX3* mapiran je na hromozomu X na dugom kraku u regionu 26-27 i sadrži jedan egzon [259]. Ovaj gen kodira za istoimeni protein koji poseduje N-terminalni domen, HMG domen i C-terminalni domen koji sadrži 4 polialaninska niza [254, 259].

Kao i ostala dva člana SOXB1 podgrupe, protein SOX3 ima važnu ulogu tokom procesa embriogeneze. Pokazano je da je funkcija ovog gena bitna tokom procesa razvića gonada, kao i tokom neurogeneze i razvića kognitivnih funkcija [150, 151, 169, 259]. Smatra se da je gen *SOX3* predak gena *SRY* i da je gen *SRY* nastao tokom rane evolucije sisara mutacijama i gubitkom sekvence gena *SOX3* izvan HMG boks domena, što je dovelo do pojave novog vida determinacije pola kod placentarnih sisara [260, 261]. U prilog ovoj hipotezi govori i činjenica da protein SOX3 deli oko 90% sličnosti u sekvenci HMG domena sa proteinom SRY [183, 261, 262]. Duplikacije gena *SOX3* i ekspanzija

polialaninskog trakta ovog gena prouzrokuje infundibularnu hipoplaziju i hipopituitarizam sa ili bez mentalne retardacije [263, 264]. Pored toga, kod bolesnika sa mutacijama u genu *SOX3* uočena je mentalna retardacija i nizak rast [169]. Pored toga, detektovano je da delecija gena *SOX3* nije letalna za miševe; u uslovima odsustva ekspresije ovog gena detektovano je smanjenje težine testisa, vakuolizacija Sertolijevih ćelija, gubitak germinativnih ćelija i smanjenje broja spermatozoida kod jedinki muškog pola, odnosno atrezija folikula, prisustvo defektnih oocita i značajno smanjenje fertiliteta kod ženki [169]. Na osnovu ovih rezultata može se zaključiti da *SOX3* nije neophodan za determinaciju pola, ali je bitan za normalno razviće oocita, diferencijaciju testisa i gametogenezu [169].

Ekspresija ovog gena uočena je tokom najranijih faza embrionalnog razvića kičmenjaka, kao i tokom formiranja CNS-a [265, 266]. Literaturni podaci ukazuju da je gen *SOX3* jedan od najranijih neuralnih markera koji je uključen u određivanje i održavanje identiteta neuralnih progenitora [265, 267, 268]. Eksperimenti na piletu su pokazali da je protein *SOX3* jedan od ključnih faktora za održavanje neuralnih progenitora u nediferenciranom stanju, smanjujući aktivnost proneuralnih proteina tokom neurogeneze [267]. Ovaj gen, takođe, poseduje značajnu ulogu i u morfogenezi i formiranju hipotalamo-hipofiznog sistema [269]. Uočena je i uloga proteina *SOX3* u razviću i diferencijaciju ćelija sočiva oka kod embriona pileta i miša [254, 270].

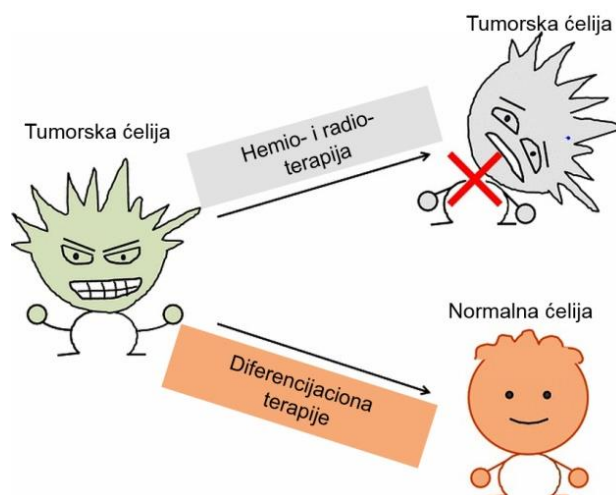
U literaturi su opisana oboljenja i sindromi u čijoj je osnovi narušena ekspresija i/ili funkcija ovog proteina. Kod čoveka, mutacije u genu *SOX3* narušavaju razvoj međumozga, infundibuluma i prednjeg režnja hipofize [263, 264, 271]. Gubitak funkcije proteina *SOX3* (*loss-of-function* mutacije) koja je praćena ekspanzijom polialaninskog trakta dovodi do nedostatka hormona hipofize i smanjenja intelektualnih sposobnosti kod jednog broja nosioca [272, 273]. Hipotalamo-hipofizna osa je *SOX3* dozno-zavisna, što je potvrđeno i kod familija sa duplikacijama Xq26-27 regiona, kod kojih se javljaju hipopituitarizam i mentalna retardacija [274-276]. Takođe, heterozigotne duplikacije gena *SOX3* i/ili regiona koji ga okružuju kod bolesnika sa 46,XX kariotipom povezane su sa formiranjem testisa kod ovih bolesnika [277-279].

Sve je više studija u kojima je pokazana uloga gena *SOX3* i u procesu karcinogeneze. Prvi podaci koji govore o ulozi ovog gena u malignoj transformaciji ćelija

datiraju iz 2000. godine [203]. Naime, Xia i saradnici su pokazali da ektopična ekspresija ovog gena dovodi do onkogene transformacije fibroblasta embriona pileta [203]. Podaci iz literature ukazuju na onkogenu aktivnost proteina SOX3 u različitim tumorima [203-208]. Pokazano je da gen *SOX3* može da ima onkogeni potencijal kod karcinoma skvamoznih ćelija jednjaka, epitelijalnog karcinoma jajnika, osteosarkoma i T-ćelijskih limfoma [205-208]. U tkivu hepatocelularnog karcinoma detektovana je povećana ekspresija *SOX3/SOX3*; visok nivo ekspresije ovog gena je u korelaciji sa progresijom tumora i sa lošijim preživljavanjem kod bolesnika sa ovim tipom tumora [204]. Pored toga kod bolesnika sa ovim tipom tumora, kod kojih je detektovana i visoka ekspresija gena *SOX3*, uočeno je češće ponovno javljanje bolesti u kratkom vremenskom interval [204]. Ektopična ekspresija ovog gena promoviše proliferaciju, migraciju i invaziju i smanjuje apoptozu ćelija karcinoma jajnika [205]. Povišena ekspresija proteina SOX3 povezana je sa održavanjem matičnih ćelija karcinoma endometrija u nediferenciranom stanju [280]. Takođe, utišavanje ekspresije ovog gena smanjuje epitelijalno-mezenhimalnu tranziciju i smanjuje sposobnost invazije matičnih ćelija ovog tumora [280]. Visoka ekspresija proteina SOX3 indukuje metastaziranje skvamoznih ćelija karcinoma jednjaka u limfne čvorove *in vivo* i promoviše limfangiogenezu [281]. Podaci iz literature pokazuju da je gen *SOX3* eksprimiran u glioma tumorima [192, 282] i da smanjenje ekspresije proteina SOX3 dovodi do smanjenja proliferativnog kapaciteta, migratornog i invazivnog potencijala matičnih ćelija glioblastoma i promoviše apoptozu ovih ćelija [282].

1.4. Diferencijaciona terapija

Tradicionalni terapeutski pristup u lečenju malignih bolesti podrazumeva hirurško odstranjivanje tumora koje je praćeno hemio- i/ili radio-terapijom koje uključuju ubijanje tumorskih ćelija (Slika 13) [283]. Za razliku od hemio- i radio-terapije, cilj diferencijacione terapije je reaktivacija endogenih programa diferencijacije u malignim ćelijama što vodi ka maturaciji ćelija tumora i gubitku malignog fenotipa [284].



Slika 13. Šematski prikaz efekta tradicionalne i diferencijacione terapije na sudbinu ćelija tumora (Preuzeto i modificirano od [285]).

Ideja o konverziji malignih ćelija u benigne kao mogućem terapijskom pristupu pojavila se 1961. god kada je uočeno da ćelije teratokarcinoma mogu spontano da se diferenciraju u kulturi [286]. Prva uspješna primena diferencijacione terapije u terapiji malignih bolesti zabeležena je 1983. god kada je *all-trans* retinoična kiselina (eng. *all-trans-retinoic acid* - *ATRA*) (RK) primenjena u tretmanu akutne promijelocitne leukemije [287]. Od sedamdeset godina prošlog veka za nekoliko molekula i agensa, uključujući RK, cAMP, natrijum butirat i citokine, pokazano je da mogu da indukuju terminalnu *ex vivo* diferencijaciju ćelija kod akutne mijeloidne leukemije, kao i ćelija embrionalnih karcinoma ili neuroblastoma [288, 289]. Pokazano je da agensi koji se koriste u diferencijacionoj terapiji imaju manje toksičan efekat na ćelije nego konvencionalni agensi koji se koriste za lečenje tumora [285].

Agens koji se veoma često koristi u diferencijacionoj terapiji je RK [285]. *All-trans*-retinoična kiselina pripada grupi retinoida, prirodnih i sintetičkih jedinjenja koji su važni modulatori različitih bioloških procesa, kao što su proliferacija i diferencijacija [290-292]. Takođe, pokazano je da su retinoidi uključeni u indukciju diferencijacije i inhibiciju rasta kod različitih tipova malignih ćelija [293, 294]. RK je prirodni derivat vitamina A koji reguliše različite procese u ćeliji, uključujući proliferaciju, diferencijaciju i apoptozu određenog broja normalnih i malignih ćelija [295-298]. Pokazano je da ovaj agens ima anti-

tumorske efekte kod akutne promijelocitne leukemije [299, 300], kao i kod karcinoma dojke [301], prostate [302], debelog creva [303] i pankreasa [304]. Primenu ovog agensa za lečenje limfoma T ćelija i akutne promijelocitne leukemije odobrila je FDA (eng. *Food and Drug Administration*) [305]. Sa druge strane, pokazano je da RK može da promoviše maligni potencijal ćelija tumora dojke miša [306].

Postoje brojne prekliničke i kliničke studije koje su u toku ili su završene, a koje se bave proučavanjem efekta RK na različite tumore.

1.4.1. Primena RK u tretmanu ćelija glioblastoma

I pored intenzivne terapije, prosečno preživljane bolesnika kod kojih je dijagnostifikovan glioblastom je oko 15 meseci [65]. Zbog toga je neophodno identifikovati efikasnije terapijske pristupe za lečenje ove maligne bolesti. Neki od novih terapijskih pristupa su usmereni na osnovne karakteristike ćelija glioblastoma, kao što su nekontrolisana proliferacija, migracija, invazija, rezistencija na apoptozu, odsustvo diferencijacije i intenzivna angiogeneza [307-309]. Indukcija diferencijacije malignih ćelija glioma u benigne je u fokusu istraživanja novih pristupa u terapiji glioma [310].

Literaturni podaci ukazuju da RK može da inhibira proliferaciju, migraciju i invaziju ćelija glioblastoma i da indukuje diferencijaciju i apoptozu ovih ćelija [295, 311]. Međutim, odgovor ćelija glioblastoma na RK je različit i pokazano je da zavisi od tipa ćelija glioblastoma, primenjene koncentracije RK i vremena izlaganja [295, 311-313]. Naime, pokazano je da se odgovor ćelijskih linija poreklom od glioblastoma na tretman RK razlikuje od odgovora primarnih kultura; uočeno je da tretman RK dovodi do smanjenja proliferacije i migracije primarnih kultura GBM poreklom od bolesnika, ali ne utiče na iste procese u imortalizovanim ćelijskim linijama glioblastoma koje su dugo propagiraju u kulturi [312]. Pored toga, uočeno je da je efekat RK na migraciju i invaziju ćelijskih linija glioma zavisao od primenjene doze RK [314]. Pokazano je da izlaganje GL-15 ćelija glioblastoma malim koncentracijama RK (0,1-1 μM) povećava proliferativni kapacitet ovih ćelija, dok veće koncentracije RK (5-10 μM) smanjuju proliferativni kapacitet ovih ćelija

[315]. Pored toga, pokazano je da efekat RK na inhibiciju rasta i apoptozu U87 ćelija glioblastoma zavisi od primenjene doze i vremena izlaganja [316].

Imajući u vidu da su rezultati u literaturi o efektu RK na maligne karakteristike ćelija glioblastoma oprečni, u okviru ove doktorske disertacije analiziran je efekat RK na osobine U251 ćelija glioblastoma.

2. CILJEVI RADA

Glioblastom je najčešći maligni tumor mozga kod odraslih i jedan od najagresivnijih tipova tumora sa prosečnim preživljavanjem obolelih oko 15 meseci i pored intenzivne terapije. Zbog toga se intenzivno traga za novim terapijskim pristupima za lečenje obolelih sa ovim tipom tumora. Kako brojni literaturni podaci ukazuju da molekularne karakteristike glioblastoma značajno utiču na ishod terapije, neka od istraživanja novih terapijskih pristupa su usmerena ka identifikaciji molekularnih markera glioblastoma tumora koji bi predstavljali ciljna mesta terapije.

Ekspresija gena *SOXB1* podgrupe (*SOX1*, *SOX2* i *SOX3*) detektovana je u glioblastomima. Ovi geni kodiraju regulatorne proteine koji imaju značajne uloge u mnogim procesima u toku razvića, kao što su održavanje pluripotentnosti matičnih ćelija i održavanje populacije neuralnih progenitora u pluripotentnom i proliferišućem stanju. Sa druge strane, uočeno je da brojni regulatorni proteini koji imaju funkciju u određivanju sudbine ćelija tokom razvića, u kasnijem periodu funkcionišu kao onkogeni aktivirajući rekapitulaciju programa razvića i promovišući populaciju ćelija sličnih matičnim ćelijama [232, 317]. Funkcija gena *SOX2* je dobro proučena kod glioblastoma; pokazano je da ovaj gen promoviše maligni potencijal ćelija glioblastoma i da je neophodan za održavanje pluripotentnosti i tumorogenog potencijala matičnih ćelija glioblastoma [231, 318]. Za razliku od gena *SOX2*, uloga preostala dva člana *SOXB1* podgrupe gena u ćelijama glioblastoma još uvek nije dovoljno istražena i stoga je osnovni cilj ove doktorske disertacije analiza uloga gena *SOX1* i *SOX3* u ćelijama glioblastoma.

Jedna od perspektivnih strategija u terapiji malignih bolesti je tzv. diferencijaciona terapija koja ima za cilj diferencijaciju ćelija tumora što bi vodilo ka smanjenju malignog potencijala ovih ćelija. Imajući u vidu ovaj podatak, jedan od ciljeva ove doktorske disertacije bila je i analiza efekta *all-trans* retinoične kiseline na karakteristike ćelija glioblastoma.

U svrhu proučavanja uloge gena *SOX1* i *SOX3*, kao i efekta tretmana RK-om na karakteristike ćelija glioblastoma definisani su sledeći specifični ciljevi:

1. Analiza ekspresije gena *SOX1* u ćelijskim linijama poreklom od glioblastoma.
2. Utišavanje ekspresije gena *SOX1* u ćelijskoj liniji poreklom od glioblastoma i ispitivanje efekta utišane ekspresije ovog gena na proliferativni kapacitet, vijabilnost, senescenciju i migratorni potencijal ćelija glioblastoma.
3. Analiza ekspresije gena *SOX1* nakon dediferencijacije ćelijskih linija GBM.
4. Analiza ekspresije gena *SOX1* u kulturama matičnih ćelija glioblastoma i nakon njihove diferencijacije.
5. Utišavanje ekspresije gena *SOX1* u kulturi matičnih ćelija glioblastoma i ispitivanje efekta utišane ekspresije ovog gena na proliferativni kapacitet i vijabilnost kulture matičnih ćelija glioblastoma.
6. Analiza ekspresije gena *SOX3* u tumorskom tkivu glioblastoma, astrocitima i ćelijskim linijama poreklom od glioblastoma.
7. Generisanje ćelija glioblastoma sa povećanom ekspresijom gena *SOX3* i ispitivanje efekta povećane ekspresije gena *SOX3* na proliferativni kapacitet, vijabilnost, migratorni i invazivni potencijal ćelija glioblastoma.
8. Ispitivanje efekta povećane ekspresije gena *SOX3* na proces autofagije i aktivnost kanonskog WNT i HH signalnog puta u ovim ćelijama.
9. Ispitivanje uticaja hemio- i radio-terapije na ekspresiju gena *SOX3* u ćelijskim linijama poreklom od glioblastoma.
10. Analiza ekspresije gena *SOX3* nakon dediferencijacije ćelijskih linija poreklom od glioblastoma.
11. Analiza ekspresije gena *SOX3* u kulturama matičnih ćelija glioblastoma i nakon njihove diferencijacije.
12. Analiza efekta *all-trans* RK na morfologija, vijabilnost, migratorni potencijal, sposobnost adhezije za komponente ekstraćelijskog matriksa i neuralnu diferencijaciju U251 ćelija glioblastoma.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Eksperimentalni materijal

3.1.1. Uzorci humanog tumorskog tkiva glioblastoma

U ovoj doktorskoj disertaciji za analizu ekspresije gena *SOX3* korišćeno je 40 uzoraka glioblastoma tumora (27 uzoraka za analizu ekspresije gena *SOX3* i 13 uzoraka za analizu ekspresije proteina SOX3), dva uzorka moždanog tkiva koje okružuje GBM i uzorak normalnog moždanog tkiva. Komercijalno dostupan uzorak normalnog moždanog tkiva obuhvatao je smešu iRNK izolovanih iz različitih regiona mozga 23 osobe različitog pola i starosti (od 23-86 godina starosti) (*Ambion*, Sjedinjene Američke Države).

Svi korišćeni uzorci tumorskog tkiva su histopatološki klasifikovani kao primarni glioblastomi. Takođe, svi bolesnici od kojih je uzorkovano GBM tumorsko tkivo potpisali su saglasnost za učestvovanje u ovoj studiji. Istraživanja sprovedena u okviru ove doktorske disertacije koja predviđaju korišćenje uzoraka GBM tumora bolesnika odobrena su od strane Etičkog odbora Biodonostia instituta i Donostia bolnice (Španija) i od strane Etičkog odbora Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Univerziteta u Beogradu. Pored toga, Etički odbor Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Univerziteta u Beogradu je dao saglasnost za sprovođenje istraživanja koja su predviđena u okviru ove doktorske disertacije.

3.1.2. Čelijske linije korišćene u radu

U ovom radu korišćeno je pet komercijalno dostupnih permanentnih ćelijskih linija poreklom od humanog glioblastoma (U87, U373, U251, A172 i T98) (ATCC® eng. *American Type Culture Collection*, Sjedinjene Američke Države), permanentna ćelijska linija poreklom od humanog embrionalnog teratokarcinoma NT2/D1 (ATCC® eng. *American Type Culture Collection*, Sjedinjene Američke Države) i permanentna ćelijska linija poreklom od humanog embrionalnog bubrega HEK293 (ATCC® eng. *American Type*

Culture Collection, Sjedinjene Američke Države). Takođe, istraživanja sprovedena u okviru ove doktorske disertacije obuhvatala su i korišćenje četiri kulture matičnih ćelija GBM izolovanih iz tumora bolesnika, GB1 i GB2 [319], GNS166 i GNS177 [320] koje su dobijene u saradnji sa dr Ander Matheu (BioDonostia Health Research Institute, Španija).

3.1.3. Ekspresioni vektori i ekspresioni konstrukti korišćeni u radu

U Tabeli 3. navedeni su ekspresioni vektori i ekspresioni konstrukti korišćeni u radu.

Tabela 3. Ekspresioni vektori i konstrukti korišćeni u radu

Plazmid	Veličina	Karakteristike	Referenca
pcDNA3.1	5,42 kb	- eukariotski ekspresioni vektor - poseduje gene za rezistenciju na ampicilin i neomicin, promotor poreklom od citomegalovirusa (CMV) (fuzionisan sa enhenserom ranog gena ovog virusa) uzvodno od polilinkerskog mesta (mesta insercije gena od interesa u vektor - eng. " <i>multiple cloning site</i> ")	Invitrogen®
pcDNA3.1/ <i>SOX3</i>	6,84 kb	- ekspresioni konstrukt koji sadrži kompletan kodirajući region humanog gena <i>SOX3</i>	[321]
pLKO.1	7,05 kb	- eukariotski ekspresioni lentivirusni vektor	Sigma

		- sadrži U6 promotor uzvodno od mesta kloniranja RNK koja formira strukturu oblika ukosnice (eng. <i>short hairpin RNA</i>) (shRNA), kao i gene za rezistenciju na ampicilin i puromicin	
pLKO.1/shSOX1	7,08 kb	- ekspresioni konstrukt koji sadrži shRNA sekvencu specifičnu za humanu SOX1 RNK	Sigma
pMDLg/RRE	8,89 kb	- lentivirusni vektor treće generacije za pakovanje virusa - sadrži HIV-1 gene <i>Pol</i> (kodira revereznu transkriptazu, RNAzu H i integrazu) i <i>Gag</i> (kodira glavni strukturni poliprotein Gag) neophodne za pakovanje virusa, kao i gen za rezistenciju na ampicilin	Addgene
pCMV-VSV-G	6,507 kb	- ekspresioni lentivirusni vektor za pakovanje virusa - kodira G glikoprotein virusa vezikularnog stomatitisa (VSV-G) - neophodan za produkciju virusnih partikula - sadrži gen za rezistenciju na	Addgene

		ampicilin	
pRSV-Rev	4,18 kb	- lentivirusni vektor treće generacije za pakovanje virusa - sadrži gen <i>Rev</i> (kodira transaktivacioni protein koji je neophodan za regulaciju translacije strukturnih proteina kapsida) i gen za rezistenciju na ampicilin	Addgene

3.1.4. Oligonukleotidi korišćeni u radu

U Tabeli 4. navedene su sekvence oligonukleotida korišćenih u eksperimentima semi-kvantitativni reverzna transkripcija PCR (RT-PCR) i PCR u realnom vremenu (RT-qPCR).

Tabela 4. Oligonukleotidi korišćeni u ovom radu

Naziv	Sekvenca	Reference
SOX1 F	5'-GCACCACTACGACTTAGTCCG-3'	[322]
SOX1 R	5'-AGACCTAGATGCCAACAATTGG-3'	[322]
SOX3 F	5'-GACCTGTTCGAGAGAACTCATCA-3'	[323]
SOX3 R	5'-CGGGAAGGGTAGGCTTATCAA-3'	[323]
SOX3 F1	5- CACGGGTCCTCCGGGTTGCGAGGGGCGGACC- 3'	[324]
SOX3 R1	5-TGGGGAACAAGGGTGGACGAGC-3'	[324]
p21 F	5'-GACACCACTGGAGGGTGACT-3'	[322]
p21 R	5'-CAGGTCCACATGGTCTTCCT-3'	[322]

p27 F	5'-GCAACCGACGATTCTTCTAC-3'	[322]
p27 R	5'-CTTCTGAGGCCAGGCTTCTT-3'	[322]
PTCH F	5'-ACCAGAATGGGTCCACGACAA-3'	[325]
PTCH R	5'-AAAGTCTGAGGTGTCCCGCAAG-3'	[325]
GLI1 F	5'-CAGTTATGGGCCAGCCAGAGA-3'	[325]
GLI1 R	5'-TGGCATCCGACAGAGGTGAG-3'	[325]
GLI2 F	5'-AGCAGCAGCAACTGTCTGAGTGA-3'	[325]
GLI2 R	5'-GACCTTGCTGCGCTTGTGAA-3'	[325]
GLI3 F	5'-TCCAACACAGAGGCCTATTCCAG-3'	[325]
GLI3 R	5'-CTCTTGTTGTGCATCGGGTCA-3'	[325]
GFAP F	5'-GCAGAGATGATGGAGCTCAATGACC-3'	[324]
GFAP R	5'-GTTTCATCCTGGAGCTTCTGCCTCA-3'	[324]
GAPDH F	5'-GCCTCAAGATCATCAGCAATGC-3'	[326]
GAPDH R	5'-CCACGATACCAAAGTTGTCATGG-3'	[326]
Nasumični heksanukleotidi	Nepoznata	<i>Applied Biosystems</i>

3.1.5. Antitela korišćena u radu

U Tabeli 5. navedena su primarna antitela korišćena u radu, dok su u Tabeli 6. navedena sekundarna antitela korišćena u radu.

Tabela 5. Primarna antitela korišćena u radu

Primarno antitelo na protein	Životinja u kojoj je proizvedeno	Proizvođač	Razblaženje	Primena
SOX1	Zec	Cell Signaling, SAD	1:250	Western blot
SOX3	Zec	Santa Cruz, SAD	1:500	Western blot
SOX3	Zec	Abcam, Velika	1:200	Imunohistohemija

		Britanija		
β -katenin	Miš	BD Transduction Laboratories, SAD	1:10000	Western blot
LC3	Zec	Cell Signaling, SAD	1:5000	Western blot
P62	Svinja	Progen Biotechnik GmbH, Nemačka	1:2500	Western blot
BECLIN1	Zec	Cell Signaling, SAD	1:2000	Western blot
Ki67	Zec	Abcam,	1:250	Imunocitohemija
pH3	Miš	Abcam	1:1000	Imunocitohemija
GFAP	Zec	DakoCytomation, Nemačka	1:1000	Imunocitohemija
GAPDH	Miš	Abcam, Velika Britanija	1:2500	Western blot
α -TUBULIN	Miš	Calbiochem, DM1A, SAD	1:10000 1:200	Western blot Imunocitohemija

Tabela 6. Sekundarna antitela korišćena u radu

Sekundarna antitela	Proizvođač	Razblaženje	Primena
anti-zečje antitelo konjugovano sa peroksidazom rena	Active Motive, SAD	1:10000	Western blot
anti-mišje antitelo konjugovano sa peroksidazom rena	Active Motive, SAD	1:10000	Western blot
anti-svinjsko antitelo konjugovano sa peroksidazom rena	Novex Life Technologies, SAD	1:10000	Western blot

Alexa Fluor 488-biotinilizovano anti-zečje antitelo	Invitrogen, SAD	1:500	Imunocitohemija
Alexa Fluor 594-biotinilizovano anti-mišje antitelo	Invitrogen, SAD	1:500	Imunocitohemija

3.1.6. Komercijalni kitovi korišćeni u radu

Totalna RNK izolovana je iz ćelija korišćenjem “TRI-Reagent” reagensa (Ambion, SAD). Prečišćevanje totalne RNK od tragova genomske DNK urađeno je primenom DNA-free™ kit (Ambion®, Invitrogen, USA). Za sintezu cDNK je korišćen High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Sjedinjene Američke Države). Reakcija semikvantitativnog RT-PCR-a urađena je pomoću “KAPA 2G Fast HotStart Ready Mix” kita (Byosystems, SAD). Reakcija RT-qPCR urađena je pomoću “Power SYBR Green PCR master mix”-a (Applied Biosystems, SAD). Za izolaciju ekspresionih vektora i konstrukata korišćen je “QIAGEN Plasmid Midi Kit”. Luciferazna aktivnost određena je pomoću kita “Dual-luciferase® Reporter Assay System” (Promega, SAD). Za analizu senescencije korišćen je “Senescence β -Galactosidase Staining Kit” (Cell Signaling, SAD).

3.1.7. Softverski programi korišćeni u radu

Produkti Western blot analize i semikvantitativnog RT-PCR-a su kvantifikovani uz pomoću ImageJ softvera. Statistička obrada podataka urađena je korišćenjem Studentovog *t*-testa i Kruskal-Wallisovog testa, kao i SPSS softvera.

3.2. Eksperimentalne metode

3.2.1. Kultivisanje ćelija

Sve permanentne ćelijske linije gajene su u standardnim uslovima, u DMEM-u (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) sa visokim sadržajem glukoze, 10% FBS-om (*Fetal Bovine Serum*) i 2 mM L-glutaminom (*Gibco*) na 37°C i 10% CO₂.

Kulture matičnih ćelija glioblastoma gajene su u medijumu za kultivaciju neuralnih matičnih ćelija koji je sadržavao DMEM/F12 medijum (*Invitrogen*, SAD) uz dodatak 1% N2 i 2% B27 suplementa (*Fisher*, Nemačka), 40% glukoze (*Sigma*, SAD) i 20 ng/ml faktora rasta b-FGF2 (*Basic fibroblast growth factor*) i EGF (*Epidermal growth factor*) (*Sigma-Aldrich*, SAD) na 37°C i 10% CO₂. Kulture matičnih ćelija glioblastoma diferencirane su u medijumu koji je sadržavao DMEM/F12 medijum (*Invitrogen*, SAD) uz dodatak 1% N2 i 2% B27 suplementa (*Fisher*, Nemačka), 40% glukoze (*Sigma*, SAD) i 1% FBS na 37°C i 10% CO₂.

3.2.2. Tretmani U87 i U251 ćelija

Pri ispitivanju efekta γ zračenja na ekspresiju gena *SOX3* u U87 i U251 ćelijama, ove ćelije su izložene 24 h i 72 h γ zračenju jačine 2 i 4 Gy. Za generisanje γ zraka korišćen je uređaj HWM D-2000 unit (*Siemens*, Nemačka) koji kao izvor γ zračenja koristi izotop cezijuma 137. Brzina doze je iznosila 0,5 Gy/min.

Pri ispitivanju efekta hemioterapije na ekspresiju gena *SOX3* u U87 i U251 ćelijama, ove ćelije su tretirane 72 h temozolomidom (*Sigma*, SAD) koncentracije 50, 100 ili 200 μ M ili DMSO-om (*Sigma*, SAD) (kontrola, DMSO je korišćen za rastvaranje temozolomida).

Pri ispitivanju efekta RK na vijabilnost U251 ćelija, ove ćelije su tretirane 3 i 5 dana RK-om koncentracije 1, 5, 10, 20, 40 i 60 μ M, dok je pri analizi efekta RK na migratorni potencijal, sposobnost adhezije za komponente ekstraćelijskog matriksa, morfologiju i

indukciju neuralne diferencijacije U251 ćelija tretman trajao 5 dana i korišćena je RK koncentracije 10, 20 i 40 μM .

3.2.3. Dediferencijacija permanentnih ćelijskih linija poreklom od glioblastoma

Za dediferencijaciju ćelijskih linija poreklom od GBM korišćen je protokol opisan od strane Garros-Regulez i saradnika [319]. Ukratko, ćelijske linije poreklom od glioblastoma su zasejane u bunariće mikrotitar ploče sa 6 otvora za gajenje ćelija u suspenziji (25000 ćelija je zasejano po bunariću) i kultivisane u medijumu za gajenje neuralnih matičnih ćelija dok nisu formirale onkosfere dijametra većeg od 100 μm ; nakon toga pristupalo se disagregaciji onkosfera na manje agregate ćelija korišćenjem akutaze. Svež medijum dodat je svakog drugog dana.

3.2.4. Protokol za diferencijaciju NT2/D1 ćelija u astrocite

Za diferencijaciju NT2/D1 ćelija u astrocite korišćen je protokol koji su opisali Sandhu i saradnici [327]. Naime, tretman RK (Sigma, SAD) indukuje neuralnu diferencijaciju ovih ćelija. Za potrebe ovog eksperimenta, 13000 ćelija zasejano je po cm^2 u odgovarajuće sudove za gajenje ćelija. Nakon toga ćelije su tretirane četiri nedelje 10 μM RK uz zamenu medijuma na svaka dva do tri dana. Po isteku četiri nedelje, ćelije su pasažirane u odnosu 1:6 i gajene narednih 48 h u medijumu bez RK. Zatim su iz ove mešovite populacije uklonjeni neuroni. Naime, neuroni se odlikuju slabom adhezijom za površinu suda te se mogu izolovati mehaničkim lupkanjem suda u kome se gaje. Nakon mehaničkog lupkanja neuroni su bili u medijumu za gajenje ćelija koji je uklonjen iz suda za gajenje ćelija, dok je ćelijama koje su ostale adherirane za površinu suda u kome se gaje dodat svež medijum za gajenje ćelija koji nije sadržavao RK. Ove adherentne ćelije su se diferencirale u astrocite u medijumu za kultivaciju NT2/D1 ćelija bez prisustva RK tokom naredne četiri nedelje. Svež medijum je dodat na svakih 72 h, dok su ćelije pasažirane u odnosu 1:2 na svakih 7 dana.

3.2.5. Transdukcija U251 ćelija glioblastoma i GNS166 kultura matičnih ćelija glioblastoma

Prvi korak u transdukciji ćelija glioblastoma obuhvatao je generisanje zrelih virusa u HEK293 ćelijama. U tu svrhu $1,2 \times 10^6$ ovih ćelija je zasejano u Petri šolje prečnika 10 cm. Dan posle zasejavanja u Petri šolje, urađena je privremena (tranzijentna) ko-transfekcija HEK293 ćelija ekspresionim vektorima i konstruktima (pMDLg/RRE (2,5 µg), pCMV-VSV-G (1,7 µg), pRSV-Rev (1 µg) i PLKO.1 (10 µg) ili PLKO.1/shSOX1 (10 µg)) korišćenjem PEI "Max" reagensa. Odnos PEI:DNK koji je korišćen pri transfekciji ćelija je iznosio 3:1. Šest sati nakon nakapavanja PEI-DNK kompleksa na ćelije, ćelije su "oprane" 1xPBS-om (*Phosphate-buffered saline*) i dodat im je svež medijum. Tokom narednih 48 h u transfektovanim HEK293 ćelijama generisani su virusi koji su se "oslobađali" iz ćelija u medijum za gajenje ćelija. Medijum za gajenje ćelija koji je sadržavao viruse je nakon 48 h pokupljen se ćelija i filtriran kroz filter koji poseduje pore prečnika 0.2 µm u cilju prečišćavanja virusa od komponenti ćelija. Po završenom filtriranju u filtrat je dodat agens polibren (eng. "Polybrene") (*Sigma*) u finalnoj koncentraciji 8 µg/µl u cilju poboljšavanja efikasnosti penetracije virusa u eukariotsku ćeliju. Ovako formirana smeša nakapavana je na U251 i GNS166 ćelije. Nakon 6 h ćelije su "oprane" u 1xPBS-u i dodat im je svež medijum za gajenje ćelija koji je sadržavao i antibiotik puromicin (0,2 µg/ml) u cilju selekcije transdukovanih ćelija. Ćelije su rasle u medijumu koji je sadržavao puromicin narednih 48 h. Dalji eksperimenti sa transdukovanim ćelijama rađeni su 72 h nakon prestanka selekcije.

3.2.6. Privremena (tranzijentna) transfekcija U87 ćelija LIPOFECTAMINE 2000 reagensom

Dan pre transfekcije ćelije su zasejane u Petri šolje prečnika 3,5 cm (200 000 ćelija po petri šolji) ili u mikrotitar ploče sa 24 bunarića (50 000 ćelija po bunariću). Sledećeg dana, po dostizanju približno 90% konfluentnosti, ćelijama je dodat svež medijum bez seruma. Zatim je pomešano 3 µg DNK sa 200 µl minimalnog OPTI-MEM medijuma bez

seruma (Invitrogen, SAD) (za transfekciju ćelija gajenih u Petri šolji prečnika 3,5 cm), odnosno 0,7 µg DNK sa 100 µl minimalnog OPTI-MEM medijuma bez seruma (za transfekciju ćelija gajenih u bunariću mikrotitar ploče) (tuba 1). U drugu tubu (tuba 2) pomešano je 200 µl minimalnog OPTI-MEM medijuma bez seruma sa 6 µl LIPOFECTAMINE 2000 (za transfekciju ćelija gajenih u Petri šolji prečnika 3,5 cm), odnosno 100 µl minimalnog OPTI-MEM medijuma bez seruma sa 1,5 µl LIPOFECTAMINE 2000 (za transfekciju ćelija gajenih u bunariću mikrotitar ploče). Zatim je pomešan sadržaj tube 1 i tube 2 i usledila je inkubacija smeše na sobnoj temperaturi u trajanja od 20 min u cilju formiranja kompleksa između DNK i lipida. Potom su formirani kompleksi nakapani na ćelije. Po isteku vremenskog perioda od 5 h, ćelije su isprane 1xPBS-om i dodat im je svež medijum.

3.2.7. Privremena (tranzijentna) transfekcija U251 ćelija polietilenimin (PEI) "Max" agensom

Ćelije su dan pre transfekcije zasađene u Petri šolje prečnika 3,5 cm (200 000 ćelija po petri šolji) ili u mikrotitar ploče sa 24 bunarića (50 000 ćelija po bunariću). Sledećeg dana po dostizanju približno 90% konfluentnosti, ćelijama je dodat svež medijum za gajenje ćelija. Za potrebe transfekcije pomešano je 3 µg DNK sa 9 µl polimera PEI "Max" (*Polysciences, Inc*, Sjedinjene Američke Države) pH 7,2 (1 µg/µl) u 200 µl OPTI-MEM medijuma (za transfekciju ćelija gajenih u Petri šolji prečnika 3,5 cm), odnosno 0,7 µg DNK sa 2,1 µl PEI "Max" agensa pH 7,2 (1 µg/µl) u 100 µl OPTI-MEM medijuma (za transfekciju ćelija gajenih u bunariću mikrotitar ploče). U cilju formiranja DNK-PEI kompleksa smeša je inkubirana 15 min na sobnoj temperaturi, a zatim nakapana na ćelije. Nakon 24 h ćelija su "oprane" 1xPBS-om i dodat im je svež medijum.

3.2.8. Izolacija totalne RNK

U okviru ove doktorske disertacije totalna RNK je izolovana iz ćelijskih linija poreklom od GBM, transdukovanih U251 i GNS166 ćelija 72h nakon selekcije

puromicinom, dediferenciranih ćelijskih linija poreklom od GBM, kultura matičnih ćelija GBM, diferenciranih kultura matičnih ćelija GBM, transfektovanih U87 i U251 ćelija 48h nakon transfekcije, U87 i U251 ćelija izloženih zračenju i tretiranih različitim koncentracijama temozolomida i U251 ćelija tretiranih različitim koncentracijama RK. Izolacija totalne RNK urađena je korišćenjem "TRI-Reagent" reagensa prema uputstvu predavača. Ćelije su najpre "oprane" 1xPBS-om, odvojene od površine suda 1x tripsinom i resuspendovane u medijumu za gajenje ćelija. Zatim su ćelije centrifugirane 5 min na 1600 rpm, a talog ćelija je resuspendovan u 1 ml 1x PBS-a. Nakon toga, usledilo je ponovo centrifugiranje ćelija 5 min na 1600 rpm nakon čega je talog ćelija resuspendovan u "TRI-Reagent" reagensu (količina reagensa je zavisila od površini suda u kome su ćelije gajene – 1ml "TRI-Reagent" reagensa je korišćen ukoliko su ćelije bile konfluentne u Petri šolji prečnika 10cm). Potom su ćelijski lizati inkubirani 5 min na sobnoj temperaturi. Po završenom period inkubacije, dodat je hloroform (1/5 zapremine korišćenog "TRI-Reagent" reagensu) i smeša je inkubirana 10 min na sobnoj temperaturi. Posle centrifugiranja u trajanju od 15 min pri brzini od 12000xg na 4°C, u tubi su se izdvojile vodena faza, interfaza i organska faza. Vodena faza u kojoj se nalazila RNK prebačena je u novu tubu, a RNK je precipitirana dodatkom izopropanola (polovina zapremine korišćenog "TRI-Reagent" reagensu). Nakon inkubacije u trajanju od 10 min i centrifugiranje na 12000xg 8 min na 4°C, precipitat RNK je "opran" 75% etanolom (ista zapremina kao i korišćenog "TRI-Reagent" reagensu). Uzorak je centrifugiran na 7500xg, 5 min na sobnoj temperaturi. Nakon kratkog sušenja na sobnoj temperaturi, precipitirana RNK resuspendovana je u 20 µl bidestilovane vode.

Za merenje koncentracije izolovane totalne RNK korišćen je NanoVue aparat, verzija 4282 V1.7.3. Provera kvaliteta izolovane RNK urađena je korišćenjem 1% gela od agaroze.

3.2.9. Oslobođanje totalne RNK od ostataka genomske DNK

DNA-freeTM kit (Ambion®, Invitrogen, USA) korišćen je za uklanjanje tragova genomske DNK iz izolata totalne RNK. Pet mikrograma izolovane totalne RNK tretirano je

30 minuta na 37°C sa 2U enzima DNKaze I (*Deoxyribonuclease*) u prisustvu 1xDNKaza I pufera koji omogućava optimalne uslove za aktivnost ovog enzima. Ukupna zapremina u kojoj je rađena reakcija bila je 25 µl. Po završenoj inkubaciji u reakcionu smešu je dodato 2,5 µl DNKaza I inaktivacionog agensa. Inkubacija reakcione smeše sa inaktivacionim agensom trajala je 2 min na sobnoj temperaturi, a zatim je reakciona smeša centrifugirana 90 sec na 10000xg. Nakon toga je supernatant koji sadrži totalnu RNK prečišćenu od ostataka genomske DNK prebačen u novu mikrotubu.

3.2.10. Sinteza komplementarne DNK (cDNK)

Jedan mikrogram izolovane totalne RNK, prečišćene od tragova genomske DNK, korišćen je kao matrica u reakciji sinteze komplementarne DNK. Za sintezu cDNK korišćen je High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (*Applied Biosystems*, Sjedinjene Američke Države) prema uputstvu proizvođača. Reakciona smeša je pored 1 µg totalne RNK sadržavala i 2 µl nasumičnih heksanukleotida (*10x RT Random primers*) (Tabela 4), 1 µl MuLV reverzne transkriptaze, 1 µl RNKaznog inhibitora, 2 µl 10x RT pufera, 0,8 µl 100 mM dNTP miksa i ddH₂O do 20 µl. Reakcija sinteze cDNK se odvijala u PCR aparatu prema sledećem programu: 10 min na 23°C, 40 min na 42°C, 5 min na 95°C i 5 min na 5°C.

3.2.11. Semi-kvantitativni RT-PCR

U reakcijama semi-kvantitativnog RT-PCR-a kao matrica korišćena je prethodno sintetisana cDNK. KAPA 2G Fast HotStart Ready Mix (*Kapa Biosystems*, USA) je korišćen za umnožavanje DNK fragmenata. Reakciona smeša je pored 50 ng cDNK matrice i 10 µl KAPA 2G Fast HotStart Ready Mix-a, sadržavala i 0,5 pmol/µl odgovarajućeg F (eng. *forward* - F) oligonukleotida, 0,5 pmol/µl odgovarajućeg R (eng. *reverse* - R) oligonukleotida i ddH₂O do 20 µl. U okviru ove doktorske disertacije u reakcijama semi-kvantitativnog RT-PCR-a korišćeni su oligonukleotidi specifični za gene *SOX3* (*SOX3 F1* i *SOX3 R1*), *GFAP* (*GFAP F* i *GFAP R*) i *GAPDH* (*GAPDH F* i *GAPDH R*) (sekvence

korišćenih oligonukleotida date su u Tabeli 4). Ekspresija gena *GAPDH* korišćena je za normalizaciju količine matrice korišćene u reakcijama semi-kvantitativnog RT-PCR-a.

Reakcije polimeraznog umnožavanja DNK fragmenata odvijale su se u PCR aparatu prema sledećem protokolu:

- amplifikacija gena *GFAP* i *GAPDH*: početna denaturacija 2 min na 95°C, a zatim 35 ciklusa umnožavanja (denaturacija 15 sekundi 95°C, renaturacija 15 sekundi 60°C, elongacija 15 sekundi 72°C – alikvoti PCR reakcija su uzimani nakon 30 i 35 ciklusa umnožavanja) i završna sinteza 2 min na 72°C

- amplifikacija gena *SOX3*: početna denaturacija 5 min na 95°C, a zatim 35 ciklusa umnožavanja (denaturacija 30 sekundi 95°C, renaturacija 30 sekundi 68°C, elongacija 30 sekundi 72°C – alikvoti PCR reakcija su uzimani nakon 30 i 35 ciklusa umnožavanja) i završna sinteza 2 min na 72°C. Dobijeni PCR produkti razdvojeni su na 2% gelu od agaroze i vizuelizovani bojenjem etidijum bromidom. Razdvojeni PCR produkti su digitalizovani i kvantifikovani korišćenjem ImageJ softvera, a vrednosti koje su dobijene za PCR produkte gena *SOX3* i *GFAP* normalizovane su u odnosu na vrednosti dobijene za PCR produkte gena *GAPDH* u istom uzorku.

3.2.12. Kvantitativni RT-PCR u realnom vremenu (RT-qPCR)

Tehnika RT-qPCR omogućava amplifikaciju i istovremenu detekciju i kvantifikaciju amplifikovanog produkta u realnom vremenu. U okviru ove doktorske disertacije za RT-qPCR korišćen je Power SYBRTM Green PCR Master mix (*Applied Biosystems*, USA) prema uputstvu proizvođača. Za dvolančanu DNK vezuje se SYBR Green boja koja, nakon ekscitacije, emituje fluorescentni signal. Umnožavanje PCR produkta dovodi do povećanja intenziteta fluorescentnog signala te je intenzitet fluorescencije proporcionalan količini PCR produkta.

Prethodno sintetisani cDNK molekuli korišćeni su kao matrice u RT-qPCR reakcijama. Reakcije su pored cDNK i Power SYBRTM Green PCR Master mix-a, sadržavale i oligonukleotide specifične za gene od interesa i ddH₂O do 10 µl. Isti cDNK uzorci korišćeni su i kao matrice u RT-qPCR reakcijama koje su sadržavale oligonukleotide

specifične za gen *GAPDH* (*GAPDH F* i *GAPDH R*). Ekspresija gena *GAPDH* korišćena je za normalizaciju količine matrice korišćene u RT-qPCR reakcijama. Reakcije su se odvijale u aparatu 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems) prema sledećem protokolu: 50°C 2 minuta; 95°C 10 minuta; 40 ciklusa od 95°C 15 sekundi i 60°C 1 minut. Svaka reakcija je rađena u triplikatu i za svaki uzorak izračunata je srednja vrednost. Pomoću komparativnog algoritma za kvantifikaciju određen je relativni nivo ekspresije analiziranih gena. U formulu $2^{-\Delta\Delta Ct}$ koja omogućava izračunavanje stepena razlike u ekspresiji analiziranog gena između dva uzorka inkorporisana je $\Delta\Delta Ct$ vrednost, koja predstavlja razliku između Ct vrednosti analiziranog gena i Ct vrednosti za gen *GAPDH*. Relativna ekspresija analiziranih gena u ćelijama sa utišanom ekspresijom gena *SOX1* ili povećanom ekspresijom gena *SOX3* je predstavljena kao stepen promene ekspresije tog gena detektovane u relevantnim kontrolnim ćelijama kojoj je dodeljena vrednost 1 ili 100%.

3.2.13. Izolacija ukupnih ćelijskih proteina

U okviru ove doktorske disertacije ukupni ćelijski proteini za potrebe Western blot analize izolovani su iz transdukovanih U251 ćelija 72h nakon selekcije puromicinom i transfektovanih U87 i U251 ćelija 48h nakon transfekcije. Ćelije su odvojene od površine suda u kome se gaje 1x tripsinom, a zatim resuspendovane u medijumu za gajenje ćelija i centrifugirane 5 minuta na 1300 rpm. Nakon toga, supernatant je odliven, a talog ćelija je resuspendovan u 1xPBS-u i centrifugiran 5 minuta na 1300 rpm. Posle centrifugiranja talog ćelija je resuspendovan u puferu za lizu (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40, koktel proteaznih i fosfataznih inhibitora). Lizati ćelija su inkubirani na ledu 30 minuta, a zatim centrifugirani u mikrofugi 15 minuta na 14000 rpm na 4°C. Dobijeni supernatanti, u kome su se nalazili ukupni proteini ćelija, su prebačeni u nove tube i čuvani na -80°C do upotrebe.

3.2.14. Merenje koncentracije proteina po Bradfordu

Merenje koncentracije proteina po Bradfordu zasniva se na kolorimetrijskom određivanju nepoznate koncentracije proteina u uzorku na osnovu standardne krive dobijene merenjem apsorbance standarda poznate koncentracije (Bradford, 1976). Rastvaranjem BSA (*Bovin serum albumin*) u ddH₂O generisani su standardi sledećih koncentracija: 1, 2, 4, 6, 8, 10, 16 i 20 µg/ml. Za potrebe merenja koncentracije uzoraka, 1 µl ukupnog ćelijskog lizata uzorka rastvoren je u 799 µl ddH₂O. Zatim je u standarde i uzorke dodato 200 µl "BioRad Protein Assay Dye" reagensa (*BioRad*) nakon čega je na spektrofotometru izmerena apsorbancija na talasnoj dužini od 595 nm.

3.2.15. Imunološka detekcija proteina primenom Western blot-a

Western blot analiza koristi se za detekciju i određivanje količine proteina od interesa u smeši proteina. Za razdvajanje ukupnih proteina ćelija korišćena je SDS (*Sodium dodecyl sulfate*)-poliakrilamidna gel elektroforeza. Uzorci ukupnih proteina ćelija su pomešani u odnosu 1:2 sa Laemmli puferom (60 mM Tris-HCl pH 6,8, 10% glicerol, 2% SDS, 5% β-merkaptotanol, 0,01% bromfenol plavo), denaturisani 5 minuta na 95°C, a zatim inkubirani na ledu 5 minuta. Nakon elektroforeze u 8, 10 ili 15% poliakrilamidnom gelu, koja je tekla u TANK puferu (25 mM Tris, 190 mM glicin, 0,1% SDS u ddH₂O) pri naponu od 90 V u gelu za koncentrovanje i 160 V u gelu za razdvajanje uzoraka, usledio je elektroforetski polusubi transfer (*Biometra*, Nemačka) proteina iz gela na PVDF (*Polyvinylidene difluoride*) membranu prema uputstvu proizvođača. Posle transfera proteina iz gela na membranu, usledila je inkubacija membrana u 5% nemasnom mleku 1h na sobnoj temperaturi u cilju blokade nespecifičnog vezivanja antitela. Nakon toga, membrane su inkubirane sa primarnim antitelom 1h na sobnoj temperaturi ili preko noći na +4°C. Primarna antitela koja su korišćena i njihova razblaženja prikazana su u Tabeli 5. Posle inkubacije sa primarnim antitelom, membrane su "oprane" 3 x po 10 min i 2 x po 5 min u 1×TBST puferu (10 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl i 0,05% Tween 20), a zatim inkubirane 1h sa odgovarajućim sekundarnim antitelom na sobnoj temperaturi. Sekundarna

antitela koja su korišćena i njihova razblaženja prikazana su u Tabeli 6. Nakon "pranja" 3 x po 10 min i 2 x po 5 min u 1×TBST puferu, signali su vizuelizovani ECL sistemom za detekciju prema uputstvu proizvođača (*Millipore, SAD*).

3.2.16. Imunofluorescentna citohemijska analiza

Imunofluorescentna citohemijska analiza primenjena je kod transdukovanih U251 i GNS166 ćelija 72h nakon selekcije puromicinom, transfektovanih U87 i U251 ćelija 48h nakon transfekcije, astrocita dobijenih diferencijacijom NT2/D1 ćelija i U251 ćelija tretiranih različitom koncentracijom RK. Imunofluorescentna citohemijska analiza se zasniva na sposobnosti primarnih antitela da se vezuju za proteine membrane, citoplazme i jedra nakon čega se formirani kompleksi vizuelizuju korišćenjem sekundarnih antitela konjugovanih sa fluorohromima. Ova metoda omogućava ne samo detekciju ekspresije, već i utvrđivanje lokalizacije proteina u ćelijama.

Za potrebe ovog eksperimenta ćelije su zasejane na pokrovna stakalca (50 000 ćelija po stakalcu) i gajene na njima naredna 24 h. Zatim su ćelije "oprane" 1x PBS-om, fiksirane 4% paraformaldehidom (PFA) 20 min na sobnoj temperaturi i nakon toga "oprane" 1x PBS-om 3x po 10 minuta. Nakon permeabilizacije ćelija 0,2% Tritonom X-100 u PBS-u u trajanju od 10 min, usledilo je blokiranje nespecifičnog vezivanja antitela inkubacijom ćelija u rastvoru koji je sadržavao 10% serum (dobijen od neimunizovanih zdravih koza (*normal goat serum*)), 1% BSA, 0,1% Triton-X-100 u PBS-u u trajanju od 1h na sobnoj temperaturi. Primarna antitela korišćena u ovom istraživanju su razblažena u rastvoru koji je sadržavao 1% BSA i 0,1% PBT (0,1% Triton-X-100 u PBS-u) (odgovarajuća razblaženja su navedena u Tabeli 5). Nakon blokade nespecifičnog vezivanja antitela usledila je inkubacija ćelija sa odgovarajućim razblaženjima primarnih antitela preko noći na 4°C. Zatim su ćelije na pokrovnim stakalcima "oprane" 3 x po 10 min u 0,1% PBT-u i nakon toga inkubirane sa fluorescentno obeleženim sekundarnim antitelima 1h na sobnoj temperaturi (odgovarajuća razblaženja su navedena u Tabeli 6). Posle inkubacije sa fluorescentno obeleženim sekundarnim antitelima ćelije su "oprane" 3 x po 10 min u 0,1% PBT, a zatim su jedra ćelija obojena diaminofenilindolom (DAPI) (*Sigma*) koncentracije

0,1 mg/ml. Nakon toga, korišćenjem "Mowiol" agensa pokrovna stakalca su zalepljena za staklenu pločicu. Za vizuelizaciju rezultata imunofluorescentne citohemijske analize korišćen je TCS SP8 konfokalni mikroskop (*Leica*) i LAS AF-TCS SP8 softver (*Leica Microsystems*).

3.2.17. Imunohistohemijska analiza

Imunohistohemijska analiza primenjena je na presecima tumorskog tkiva glioblastoma. Parafinski preseci su deparafinirani u ksilolu (Zorka Pharma-Hemija, Šabac, Srbija), a zatim rehidrirani u seriji etanola opadajuće koncentracije (100%, 96%, 70%, Zorka Pharma-Hemija, Šabac, Srbija). U cilju demaskiranja antigena preparati su kuvani u citratnom puferu (pH = 6,0). Aktivnost endogene peroksidaze blokirana je 3% vodonikom (H_2O_2), nakon čega su uzorci inkubirani u normalnom serumu zeca (VECTASTAIN Elite ABC HRP Kit - Peroxidase, Rabbit IgG, PK-6101, Vector Laboratories). Preseci su tokom noći inkubirani sa antitelom specifičnim za SOX3 (podaci u Tabeli 5). Nakon toga preseci su inkubirani još sat vremena sa odgovarajućim sekundarnim antitelom (Tabela 6) i tretirani sa ABC-kompleksom (VECTASTAIN Elite ABC HRP Kit - Peroxidase, Rabbit IgG, PK-6101, Vector Laboratories). Između svakog koraka uzorci su ispirani u svežem PBS-u (3 x 5 minuta). Vizuelizacija je izvršena primenom 3,3'-diaminobenzidin hromogena (DAB Peroxidase (HRP) Substrate Kit, SK-4100, Vector Laboratories). Preseci su kontrastirani Majerovim hematoksilinom, dehidrirani u seriji alkohola rastuće koncentracije, provučeni kroz ksilol i pokriveni odgovarajućim lepkom (DPX, 44581, Sigma, St. Louis, MO, USA) i pokrovnim stakalcem.

3.2.18. Određivanje broja živih ćelija bojenjem "Trypan plavom" bojom

U okviru ove doktorske disertacije bojenje "Trypan plavom" bojom korišćeno je za određivanje broja živih U251 ćelija transdukovanih ekspresionim vektorom pLKO.1 i ekspresionim konstruktom pLKO.1/shSOX1 72h nakon selekcije puromicinom i za određivanje broja živih U87 i U251 ćelija transfektovanih ekspresionim vektorom

pcDNA3.1 i ekspresionim konstruktom pcDNA3.1/SOX3 48h nakon transfekcije. Čelije su odvojene od površine suda korišćenjem 1x tripsina i potom resuspendovane u medijumu za gajenje ćelija. Pedeset mikrolitara resuspendovanih ćelija pomešano je sa 50 μ l 0,1% "Trypan plave" boje. Za brojanje ćelija korišćena je Bürker pločica. Mrtve ćelije su posmatranjem pod mikroskopom bile vidljive kao plavo obojene, dok su žive ćelije, u koje boja ne prodire, bile svetle sa zlatnim oreolom.

Broj živih ćelija u 1 ml medijuma preračunat je na osnovu formule: $N = \text{broj živih ćelija} / \text{broj kvadrata u kojima su izbrojane ćelije} \times 2 \times 10000$

3.2.19. MTT test

MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid, tetrazol) test se koristi za određivanje broja vijabilnih ćelija. Ovaj test se zasniva na sposobnosti mitohondrijskih NAD(P)H-zavisnih oksidoreduktaza da u mitohondrijama živih ćelija redukuju MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolijum bromid, tetrazol) u ljubičasti formazan. Merenjem apsorbance ovako obojenog rastvora moguće je odrediti vijabilnost ćelija.

Dvadeset četiri sata nakon transfekcije ekspresionim vektorom pcDNA3.1 ili ekspresionim konstruktom pcDNA3.1/SOX3, transfektovane ćelije su zasejane u bunariće mikrotitar ploče sa 96 otvora (4000 ćelija po bunariću) i gajene preko noći u medijumu za gajenje ćelija. Čelije transdukovane lentivirusnim ekspresionim vektorom pLKO.1 ili ekspresionim konstruktom pLKO.1/shSOX1 su zasejane u bunariće mikrotitar ploče sa 96 otvora (4000 ćelija po bunariću) i gajene naredna 72 h u medijumu za gajenje ćelija. Po isteku 24 h (transfektovane ćelije), odnosno 72 h (transdukovane ćelije), medijum za gajenje ćelija je uklonjen, a ćelije su inkubirane sa MTT rastvorom finalne koncentracije 0,5 mg/ml 1 h na 37°C. Po isteku inkubacije, ćelije su lizirane DMSO-om i na Infinite 200 PRO Microplate Reader-u (Tecan, Austria) merena je apsorbance na talasnoj dužini od 550 nm.

Za potrebe analize vijabilnosti ćelija tretiranih različitim koncentracijama temozolomida, U87 i U251 ćelije su zasejane u bunariće mikrotitar ploče sa 96 otvora

(4000 ćelija po bunariću) i gajene u medijumu sa različitim koncentracijama temozolomida 72h. Po isteku 72 h, uklonjen je medijum, ćelije su inkubirane sa MTT rastvorom (0,5 mg/ml) 1 h na 37°C, lizirane DMSO-om i merena je apsorbanca na Infinite 200 PRO Microplate Reader-u (*Tecan*, Austria) na talasnoj dužini od 550 nm.

Pri analizi efekta različitih koncentracija retinoične kiseline na vijabilnost U251 ćelija, ove ćelije su zasejane u bunariće mikrotitar ploče sa 96 otvora (4000 ćelija po bunariću) i gajene u medijumu sa različitim koncentracijama RK 3 i 5 dana. Po isteku tretmana, uklonjen je medijum, ćelije su inkubirane sa MTT rastvorom (0,5 mg/ml) 1 h na 37°C, lizirane DMSO-om i merena je apsorbanca na Infinite 200 PRO Microplate Reader-u (*Tecan*, Austria) na talasnoj dužini od 550 nm.

3.2.20. Test zarastanja povrede

Test zarastanja povrede (*scratch wound healing assay*) koristi se za analizu migratornog potencijala ćelija *in vitro*. Ovim testom analiziran je migratorni potencijal U251 ćelija transdukovanih ekspresionim vektorom pLKO.1 ili ekspresionim konstruktom pLKO.1/shSOX1, kao i migratorni potencijal U251 ćelija gajenih u medijumu sa različitim koncentracijama RK. Sedamdeset dva sata nakon što su transdukovane ćelija selektovane puromicinom i nakon 5 dana gajenja U251 ćelija u medijumu sa različitim koncentracijama RK, plastičnim nastavkom od 200 µL napravljena je povreda, tj. u jednom delu suda ćelije su mehanički odstranjene. Po formiranju povrede ćelije su "oprane" nekoliko puta medijumom kako bi se uklonile ćelije koje su odlepljene od površine suda za gajenje ćelija. Mesto povrede je fotografisano u momentu nanošenja povrede i nakon 12h upotrebom invertnog mikroskopa DM IL LED (*Leica Microsystems*, Wetzlar, Nemačka). Brzina popunjavanja praznog prostora analizirana je primenom softvera Leica Application Suite V4.8.

3.2.21. Test invazivnosti i migratornog potencijala (eng. *Transwell assay*)

Test invazivnosti i migratornog potencijala (eng. *Transwell assay*) korišćen je za analizu migratornog i invazivnog potencijala U87 i U251 ćelija transfektovanih ekspresionim vektorom pcDNA3.1 ili ekspresionim konstruktom pcDNA3.1/SOX3. Pri analizi migratornog potencijala korišćeni su netretirani inserti za ćelijsku kulturu na čijem dnu se nalazi membrana sa porama veličine 8,0 µm (eng. *Transwell polycarbonate membrane*, Corning, NY, USA) kroz koje ćelije mogu da migriraju. Pri analizi invazivnog potencijala gornja strana membrane inserta bila je obložena matriksom (*Matrigel Basement Membrane Matrix*) (Corning, Njujork, Sjedinjene Američke Države) (koncentracija 1 µg/µl). Inserti su stavljeni u bunariće mikrotitar ploče sa 24 otvora. U bunariće je dodat medijum za gajenje ćelija koji je sadržavao 10% FBS koji je korišćen kao hemoatraktant za ćelije. Za oba navedena eseja 24 h nakon transfekcija 50 000 ćelija zasejano je na gornju stranu membrane inserta u medijumu za gajenje ćelija bez seruma. Nakon 16 h ćelije koje su prošle kroz membranu i koje su se nalazile na donjoj strani membrane su fiksirane i obojene rastvorom kristal violet boje (*crystal violet*) (20% metanol, 2% paraformaldehid, 0,5% kristal violet). Nakon bojenja, gornja površina membrane je nežno obrisana štapićem za uvo da bi se odstranile ćelije koje nisu prošle kroz membranu. Ćelije koje se nalaze na donjoj strani membrane posmatrane su korišćenjem invertnog mikroskopa DM IL LED (*Leica Microsystems*, Wetzlar, Germany) (uveličanje 10x). Prebrojane su ćelije sa tri nasumično odabrana polja na svakoj membrani.

3.2.22. Test senescencije

Za analizu senescencije U251 ćelija nakon utišavanja ekspresije gena *SOX1* korišćen je *Senescence β-Galactosidase Staining Kit (Cell Signaling)* prema uputstvu proizvođača. Ovaj test se zasniva na sposobnosti enzima β-galaktozidaze povezane sa senescencijom (*Senescence Associated β-galactosidase*, SA-β-gal) da na pH=6 katalizuje hidrolizu hromogenog supstrata X-gal-a (*5-bromo-4-hloro-3-indolil-β-D-galaktopiranozid*), što je praćeno pojavom plavog produkta u senescentnim ćelijama.

Za potrebe ovog testa transdukovane U251 ćelije, koje su prethodno izložene selekciji primenom puromicina, zasejane su u bunariće mikrotitar ploče sa 6 otvora (100 000 ćelija po bunariću) i gajene naredna 72 h. Nakon isteka ovog vremena ćelije su fiksirane korišćenjem rastvora za fiksaciju (*Senescence β -Galactosidase Staining Kit*, Cell Signaling), isprane 1 x PBS-om, a zatim im je dodat rastvor za bojenje čija je pH vrednost 6 i koji sadrži X-gal (*Senescence β -Galactosidase Staining Kit*, Cell Signaling). Ćelije su inkubirane u rastvoru za bojenje preko noći u inkubatoru bez CO₂ na 37°C. Nakon toga ćelije su "oprane" 1x PBS-om i posmatrane invertnim mikroskopom DM IL LED (*Leica Microsystems*, Wetzlar, Germany) (20x uveličanje).

3.2.23. TOPFlash/FOPFlash luciferazni esej

Efekat povećane ekspresije gena *SOX3* na aktivnost WNT signalnog puta u U87 i U251 ćelijama analiziran je primenom TOPFlash/FOPFlash luciferaznog eseja. U bunarić mikrotitar ploče sa 24 otvora zasejano je 50 000 U87 ili U251 ćelija. Nakon 24 h ćelije su kotransfektovane plazmidom pRLSV40, ekspresionim vektorom pcDNA3.1 ili ekspresionim konstruktom pcDNA3.1/SOX3 i TOPflash ili FOPflash luciferaznim konstruktom. Plazmid pRL-SV40 korišćen je za normalizaciju efikasnosti transfekcije.

Četrdeset osam sati nakon transfekcije, ćelije su "oprane" dva puta 1x PBS-om i lizirane pomoću pasivnog pufera za lizu (*Passive Lysis Buffer*, PLB) (*Promega*, Sjedinjene Američke Države) u trajanju od 20 min. Lizirane ćelije su zatim resuspendovane, prebačene u tube i inkubirane na ledu 30 minuta. Nakon toga usledilo je centrifugiranje lizata 30 sekundi na 13000 rpm na +4°C. Po završenom centrifugiranju 10 μ l lizata je prebačeno u novu tubu i analizirana je aktivnost luciferaza primenom "Dual-Luciferase Reporter Assay" sistema (*Promega*, USA) prema uputstvu proizvođača. Uz pomoć ovog sistema određuje se aktivnost luciferaze svica i "*Renilla*" luciferaze unutar istog uzorka. Prvo se analizira aktivnost luciferaze svica dodavanjem 50 μ l reagensa LAR II u lizate (*Luciferase Assay Reagent*). LAR II sadrži luciferin koji luciferaza prevodi u oksiluciferin što je praćeno emitovanjem svetlosti. Zatim se meri aktivnost "*Renilla*" luciferaze dodavanjem u reakcionu smešu 50 μ l reagensa "STOP & Glo". Ovaj reagens dovodi do prestanka emisije

luminiscentnog signala dobijenog aktivnošću luciferaze svica. Pored toga, ovaj reagens sadrži celenterazin koji "Renilla" luciferaza prevodi u celenteramid. Kao posledica ovog prevođenja javlja se emisija svetlosti. Količina emitovane svetlosti u obe reakcije proporcionalna je aktivnosti luciferaza.

Za merenje aktivnosti luciferaza korišćen je aparat GloMax 20/20 Luminometer (*Promega*, Sjedinjene Američke Države).

3.2.24. Test za ispitivanje sposobnosti adhezije ćelija za komponente ekstraćelijskog matriksa

Test za ispitivanje sposobnosti adhezije ćelija za komponente ekstraćelijskog matriksa korišćen je za analizu adhezivne sposobnosti U251 ćelija gajenih u medijumu sa različitim koncentracijama RK. Pre samog zasejavanja ćelija, dno bunarića obloženo je proteinima ekstraćelijskog matriksa (*Matrigel Basement Membrane Matrix*) u koncentraciji 0,05 µg/µl. Nakon oblaganja matriksom, dno bunarića je tretirano 1h na 37°C sa 2% BSA (*Sigma*) rastvorenim u DMEM medijumu kako bi se sprečilo nespecifično vezivanje ćelija za dno bunarića. U251 ćelije (50 000 ćelija u DMEM medijumu koji sadrži 0.1% BSA) gajene 5 dana u medijumu sa DMSO-om (kontrola) ili u medijumu sa različitim koncentracijama RK su zasejane u bunariće mikrotitar ploče sa 96 otvora. Nakon inkubacije 30 min na 37°C, bunarići su "isprani" dva puta 1X PBS-om kako bi se uklonile ćelije koje nisu adherirale za dno bunarića. Broj ćelija koje su adherirale za komponente ekstraćelijskog matriksa određen je primenom MTT testa.

3.2.25. Statistička analiza

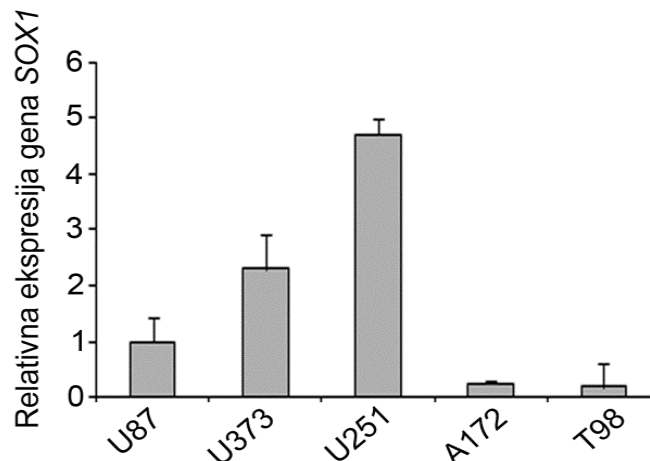
Statistička obrada podataka urađena je korišćenjem Studentovog *t*-testa i SPSS softvera. Svi rezultati prikazani su kao srednja vrednost ± srednja vrednost standardne devijacije (eng. *Standard Deviation* – S.D.). Vrednosti $p \leq 0.05$ su smatrane statistički značajnim i obeležene su zvezdicom (*).

4. REZULTATI

4.1. Analiza uloge gena *SOX1* u promovisanju malignog fenotipa ćelija glioblastoma

4.1.1. Analiza ekspresije gena *SOX1* u ćelijskim linijama poreklom od glioblastoma

Rezultati dosadašnjih naučnih istraživanja pokazali su da je gen *SOX1* eksprimiran u tumorskom tkivu glioblastoma [192]. U cilju ispitivanja potencijalne uloge ovog gena u promovisanju malignog potencijala ćelija GBM prvi korak u istraživanju podrazumevao je analizu ekspresija gena *SOX1* u pet permanentnih ćelijskih linija poreklom od glioblastoma: U87, U373, U251, A172 i T98. Rezultati dobijeni primenom RT-qPCR tehnike pokazuju da svih pet analiziranih ćelijskih linija eksprimira gen *SOX1* (Slika 14). Pored toga, relativno viši nivo ekspresije ovog gena detektovan je u U251 i U373 ćelijama u poređenju sa nivoom ekspresije ovog gena u U87, A172 i T98 ćelijama (Slika 14). Kako je, u poređenju sa ostalim analiziranim ćelijskim linijama, najviši nivo ekspresije gena *SOX1* uočen u U251 ćelijskoj liniji poreklom od glioblastoma (Slika 14) ova permanentna ćelijska linija korišćena je kao model sistem za analizu potencijalne uloge gena *SOX1* u promovisanju malignog fenotipa ćelija glioblastoma.



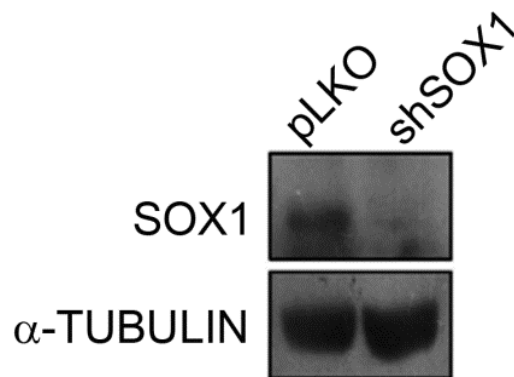
Slika 14. Relativna ekspresije gena *SOX1* u ćelijskim linijama poreklom od glioblastoma. Metodom RT-qPCR analizirana je ekspresija gena *SOX1* u U87, U373, U251, A172 i T98 ćelijskim linijama glioblastoma.

Nivo ekspresije gena *SOX1* u uzorku normalizovan je u odnosu na ekspresiju gena *GAPDH* u istom uzorku. Ekspresija gena *SOX1* u U373, U251, A172 i T98 ćelijama upoređena je sa ekspresijom ovog gena u U87 ćelijama i prikazana je kao stepen promene ekspresije detektovane u U87 ćelijama kojoj je dodeljena vrednost 1. Na grafiku su prikazane srednje vrednosti \pm standardna devijacija (S.D.) iz najmanje tri nezavisna eksperimenta.

4.1.2. Uspostavljanje uslova za utišavanje ekspresije gena *SOX1* u U251 ćelijskoj liniji poreklom od glioblastoma

U cilju izučavanja da li gen *SOX1* poseduje ulogu u promovisanju malignog fenotipa ćelija glioblastoma, sledeći korak u istraživanju podrazumevao je utišavanje ekspresije ovog gena u U251 ćelijama. U tu svrhu U251 ćelije su transdukovane eukariotskim lentivirusnim ekspresionim vektorom pLKO.1 (pLKO) (sadrži mesto kloniranja *short hairpin RNA* - shRNA) ili pLKO.1/sh*SOX1* ekspresionim konstruktom (sadrži shRNA sekvencu specifičnu za humanu *SOX1* RNK - shSOX1). Nakon transdukcije, ekspresija proteina SOX1 u ćelijama analizirana je tehnikom Western blot-a. Rezultati ove analize pokazali su da je ekspresija proteina SOX1 smanjena u U251 ćelijama transdukovanim ekspresionim konstruktom pLKO.1/sh*SOX1* (shSOX1) u poređenju sa ekspresijom ovog proteina detektovanom u ćelijama transdukovanim lentivirusnim ekspresionim vektorom pLKO.1 (pLKO) (Slika 15).

Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da su uspostavljeni uslovi za utišavanje ekspresije proteina SOX1 u U251 ćelijama. U narednim eksperimentima za ispitivanje uticaja smanjenje ekspresije ovog gena na proliferaciju, vijabilnost, senescenciju i migraciju ćelija glioblastoma korišćena je lentivirusna transdukcija U251 ćelija ekspresionim konstruktom pLKO.1/sh*SOX1*.

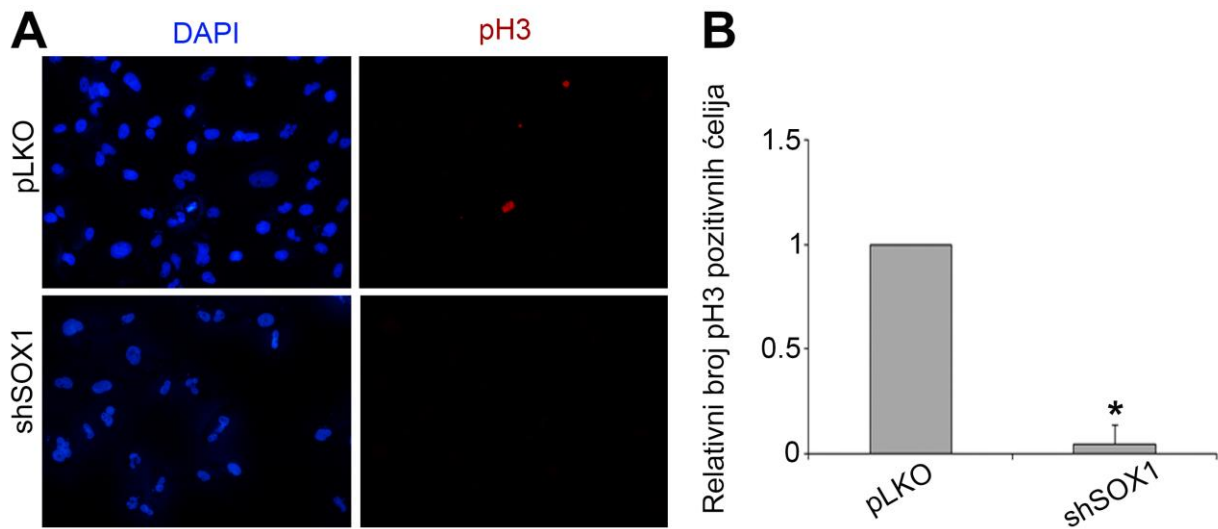


Slika 15. Analiza ekspresije proteina SOX1 u U251 ćelijama transdukovanim ekspresionim vektorom pLKO.1 (pLKO) i ekspresionim konstruktom pLKO.1/shSOX1 (shSOX1) primenom Western blot metode. Ekspresija proteina SOX1 analizirana je u ukupnim proteinima izolovanim iz U251 ćelija transdukovanih ekspresionim vektorom pLKO.1 i ekspresionim konstruktom pLKO.1/shSOX1. Tri nezavisna eksperimenta su urađena i na slici je predstavljen reprezentativni primer Western blot analize. Kao kontrola ujednačenosti nanošenja uzoraka korišćen je α -tubulin.

4.1.3. Analiza efekta utišane ekspresije proteina SOX1 na proliferativni kapacitet U251 ćelija

Jedna od osnovnih karakteristika maligno transformisanih ćelija je neograničena i neregulisana sposobnost deobe što za posledicu ima uvećanje tumorske mase [1, 2]. Imajući u vidu navedene literaturne podatke, sledeći korak u istraživanju podrazumevao je ispitivanje uticaja smanjenje ekspresije proteina SOX1 na proliferativni kapacitet U251 ćelija.

Proliferativni kapacitet kontrolnih U251 ćelija (pLKO) (ćelije transdukovane ekspresionim vektorom pLKO.1) i U251 ćelija sa utišanom ekspresijom proteina SOX1 (shSOX1) (ćelije transfektovane ekspresionim konstruktom pLKO.1/shSOX1) proučavan je imunocitohemijskom analizom ekspresije markera ćelija u mitozu, fosforilisane forme histona H3 (pH3). Analizom ekspresije proteina pH3 uočeno je da nakon transdukcije U251 ćelija ekspresionim konstruktom pLKO.1/shSOX1 (shSOX1) dolazi do smanjenja broja ćelija koje ekspimiraju ovaj protein za oko 90% u poređenju sa brojem kontrolnih ćelija (pLKO) koje ekspimiraju ovaj marker (Slika 16).



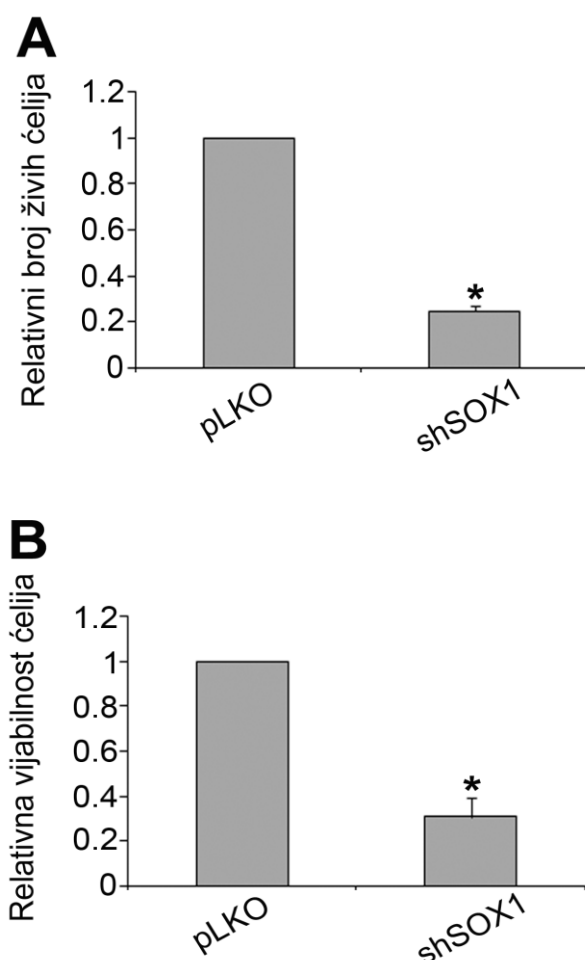
Slika 16. Efekat utišane ekspresije proteina SOX1 na proliferativni kapacitet U251 ćelija. (A) reprezentativni primer imunocitohemijskog bojenja primenom antitela specifičnog za pH3 protein (crveni signal) kod kontrolnih U251 ćelija (pLKO) i U251 ćelija transdukovanih ekspresionim konstruktom pLKO.1/shSOX1 (shSOX1). Jedra ćelija obojena su DAPI-jem (plavi signal) (B) Relativni broj ćelija koje ekspimiraju pH3 protein. Relativni broj pH3 pozitivnih U251 ćelija nakon transdukcije ekspresionim konstruktom pLKO.1/shSOX1 (shSOX1) prikazan je kao stepen promene broja pH3 pozitivnih kontrolnih ćelija (pLKO) kojem je arbitrarno dodeljena vrednost 1. Na grafiku su prikazane srednje vrednosti \pm S.D. iz tri nezavisna eksperimenta. Srednje vrednosti su upoređene Studentovim t-testom. Vrednost $p \leq 0.05$ označena je *. Za vizuelizaciju ekspresije proteina pH3 korišćen je TCS SP8 konfokalni mikroskop (Leica) (uvećanje od 40x) i softver LAS AF-TCS SP8 (Leica Microsystems).

4.1.4. Analiza efekta utišane ekspresije proteina SOX1 na vijabilnost U251 ćelija

Imajući u vidu da je jedna od osnovnih karakteristika maligno transformisanih ćelija i povećana vijabilnost [13], u okviru ove doktorske disertacije analizirana je i vijabilnost U251 ćelija glioblastoma sa smanjenom ekspresijom proteina SOX1 primenom metode bojenja ćelija "Trypan plavom" bojom i MTT testom. Primenom metode bojenja ćelija „Trypan plavom“ bojom detektovano je da nakon transdukcije U251 ćelija ekspresionim konstruktom pLKO.1/shSOX1 (shSOX1) dolazi do smanjenja broja živih ćelija za oko 70%

u odnosu na broj živih ćelija detektovan kod kontrolnih ćelija (pLKO) (Slika 17A). Takođe, rezultati MTT testa su pokazali da je vijabilnost ćelija transdukovanih ekspresionim konstruktom pLKO.1/shSOX1 (shSOX1) smanjena za oko 70% u odnosu na vijabilnost kontrolnih ćelija (pLKO) (Slika 17B).

Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da u uslovima utišane ekspresije proteina SOX1 dolazi do smanjenja vijabilnosti ćelija GBM.

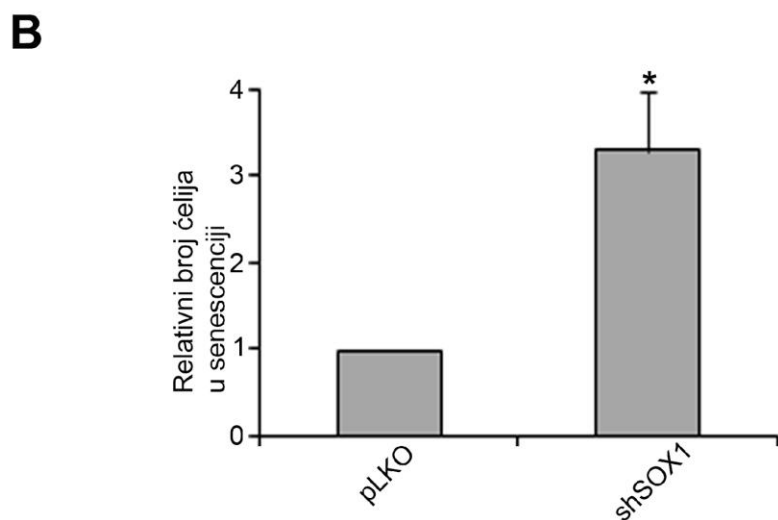
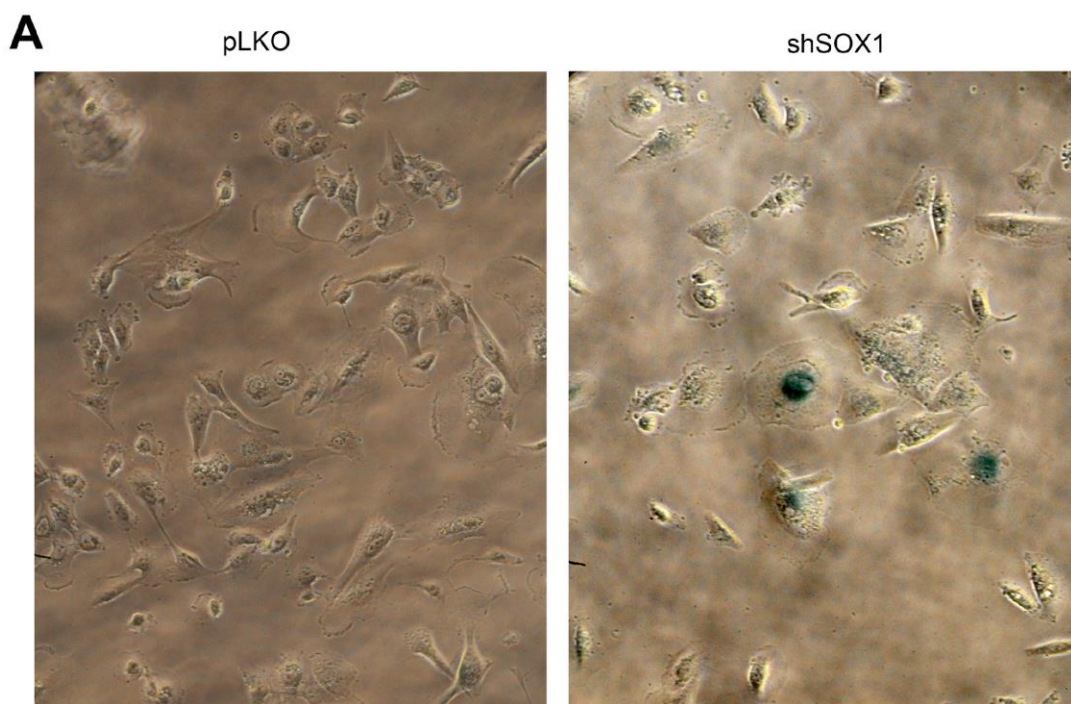


Slika 17. Efekat utišane ekspresije proteina SOX1 na vijabilnost U251 ćelija. A) Relativni broj živih ćelija nakon transdukcije U251 ćelija ekspresionim vektorom pLKO.1 (pLKO) ili ekspresionim konstruktom pLKO.1/shSOX1 (shSOX1) određen bojenjem ćelija “Trypan plavom” bojom. Relativni broj živih U251 ćelija nakon transdukcije pLKO.1/shSOX1 konstruktom (shSOX1) prikazan je kao stepen promene broja živih kontrolnih ćelija (pLKO), kojem je dodeljena vrednost 1. Na grafiku su prikazane srednje vrednosti \pm S.D. iz najmanje tri nezavisna eksperimenta. Srednje vrednosti su upoređene Studentovim t-testom. Vrednost $p \leq$

0.05 označena je * B) Analiza vijabilnosti kontrolnih ćelija (pLKO) i ćelija sa utišanom ekspresijom proteina SOX1 (transdukovanih ekspresionim konstruktom pLKO.1/shSOX1) (shSOX1) primenom MTT testa. Relativna vijabilnost U251 ćelija transdukovanih pLKO.1/shSOX1 konstruktom (shSOX1) prikazana je kao stepen promene vijabilnosti kontrolnih ćelija (pLKO), kojem je dodeljena vrednost 1. Na grafiku su prikazane srednje vrednosti \pm S.D. iz najmanje tri nezavisna eksperimenta. Srednje vrednosti su upoređene Studentovim t-testom. Vrednost $p \leq 0.05$ označena je *.

4.1.5. Analiza efekta utišane ekspresije proteina SOX1 na senescenciju U251 ćelija

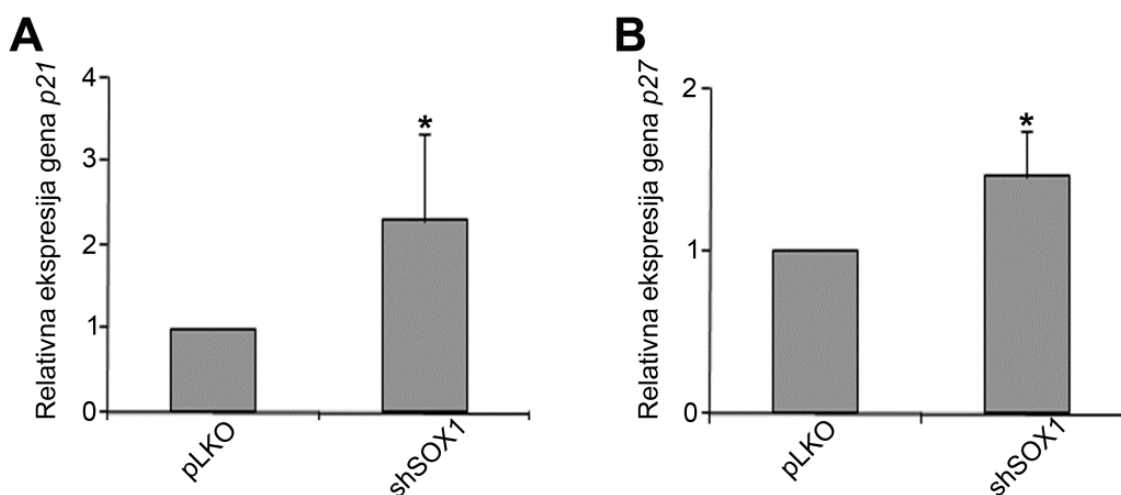
Senescencija ili ćelijsko starenje predstavlja proces ireverzibilnog zaustavljanja rasta ćelija koje je praćeno promenom morfologije ćelija, promenom ekspresije gena (kao što su *p53*, *p21*, *p27* i *Retinoblastoma (Rb)*), kao i povećanom aktivnošću enzima β -galaktozidaze povezane sa senescencijom (*Senescence-Associated β -galactosidase*, SA- β -gal) [328]. Literaturni podaci ukazuju da senescencija poseduje tumor supresorsku aktivnost u ćelijama malignih tumora, odnosno uloga ovog procesa je zaustavljanje nekontrolisanog rasta ćelija [328-330]. Pored toga, podaci iz literature ukazuju da su ćelije glioblastoma razvile različite mehanizme kako bi izbegle senescenciju [331-334]. Imajući u vidu navedene podatke, u okviru ove studije analiziran je efekat utišane ekspresije proteina SOX1 na senescenciju U251 ćelija. Za analizu ovog procesa korišćen je SA- β -gal citohemijski test. Ovaj test se zasniva na sposobnosti enzima β -galaktozidaze povezane sa senescencijom da katalizuje hidrolizu hromogenog supstrata X-gal-a (*5-bromo-4-hloro-3-indolil- β -D-galaktopiranozid*), što je praćeno pojavom plavog produkta u senescentnim ćelijama [328]. Primenom ovog testa detektovano je da se broj ćelija u senescenciji povećava za oko 3,3 puta nakon transdukcije U251 ćelija ekspresionim konstruktom pLKO.1/shSOX1 (shSOX1) u poređenju sa brojem kontrolnih ćelija koje su u senescenciji (pLKO) (Slika 18). Na osnovu navedenih rezultata može se zaključiti da se u uslovima utišane ekspresije proteina SOX1 indukuje senescencija U251 ćelija.



Slika 18. Efekat utišane ekspresije proteina SOX1 na proces senescencije u U251 ćelijama. A) Reprerzentativne slike kontrolnih U251 ćelija (pLKO) i ćelija transdukovanih ekspresionim konstruktom pLKO.1/shSOX1 (shSOX1) nakon dodavanja hromogenog supstrata X-gal-a. U ćelijama koje se nalaze u senescenciji se, usled aktivnosti enzima SA- β -gal, detektuje plava boja. Ćelije su posmatrane korišćenjem invertnog mikroskopa DM IL LED (Leica) pri uveličanju od 20x. Eksperiment je ponovljen u tri nezavisna eksperimenta. B) Relativni broj kontrolnih U251 ćelija i U251 ćelija transdukovanih ekspresionim konstruktom pLKO.1/shSOX1 (shSOX1) koje se nalaze u senescenciji (plavo obojene ćelije). Relativni broj

U251 ćelija u senescenciji nakon transdukcije pLKO.1/shSOX1 konstruktom (shSOX1) prikazan je kao stepen promene broja kontrolnih ćelija u senescenciji (pLKO), kojem je dodeljena vrednost 1. Na grafiku su prikazane srednje vrednosti \pm S.D. iz tri nezavisna eksperimenta. Srednje vrednosti su upoređene Studentovim t-testom. Vrednost $p \leq 0.05$ označena je *.

Podaci iz literature ukazuju da je proces senescencije praćen povećanom ekspresijom gena čiji proteinski produkti imaju ulogu u zaustavljanju ćelijskog ciklusa [335]. Imajući u vidu ove podatke, u U251 ćelijama transdukovanim ekspresionim vektorom pLKO.1 ili ekspresionim konstruktom pLKO.1/shSOX1 analizirana je ekspresija gena *p21* i *p27* koji kodiraju proteine koji imaju ulogu inhibitora ćelijskog ciklusa. Rezultati RT-qPCR analize su pokazali da je u U251 ćelijama transdukovanim ekspresionim konstruktom pLKO.1/shSOX1 ekspresija gena *p21* povećana približno 2,3 puta (Slika 19A), dok je ekspresija gena *p27* povećana približno 1,5 puta (Slika 19B) u poređenju sa ekspresijom ovog gena detektovanom u kontrolnim U251 ćelijama.



Slika 19. Efekat utišane ekspresije proteina SOX1 na ekspresiju gena *p21* (A) i *p27* (B). Tehnikom RT-qPCR analizirana je ekspresija gena *p21* i *p27* nakon transdukcije U251 ćelija ekspresionim vektorom pLKO.1 (pLKO) ili ekspresionim konstruktom pLKO.1/shSOX1 (shSOX1). Nivo ekspresije gena *p21* i *p27* u uzorcima normalizovan je u odnosu na ekspresiju gena *GAPDH* u istom uzorku. Relativna ekspresija gena *p21* i *p27* u ćelijama transdukovanim ekspresionim konstruktom pLKO.1/shSOX1 prikazana je kao stepen promene ekspresije detektovane u kontrolnim U251 ćelijama kojoj je dodeljena vrednost 1. Na grafiku su

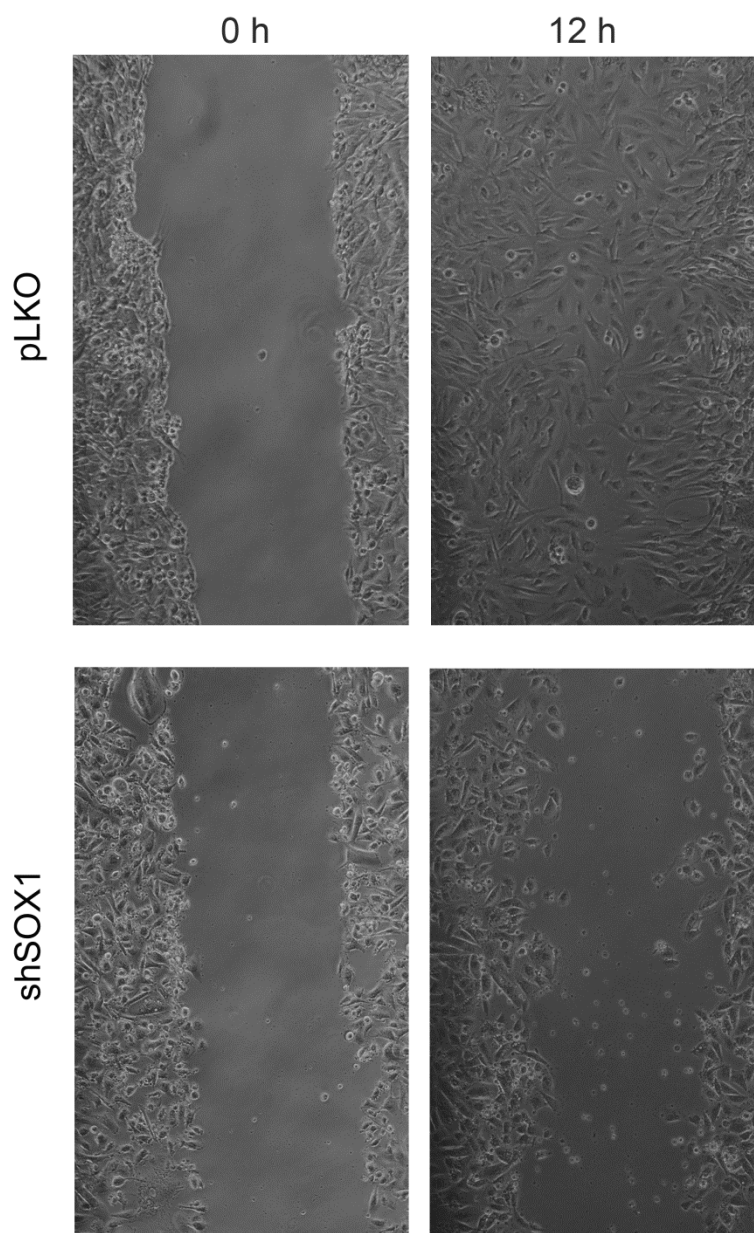
prikazane srednje vrednosti \pm S.D. iz najmanje tri nezavisna eksperimenta. Srednje vrednosti su statistički upoređene Studentovim t -testom. Vrednost $p \leq 0.05$ označena je *.

Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da se u uslovima utišane ekspresije proteina SOX1 povećava broj U251 ćelija u senescenciji što je praćeno povećanom ekspresijom gena čiji su proteinski produkti uključeni u zaustavljanje ćelijskog ciklusa.

4.1.6. Analiza efekta utišane ekspresije proteina SOX1 na migratorni potencijal U251 ćelija

Jedan od osnovnih procesa uključenih u metastaziranje tumora je migracija maligno transformisanih ćelija [13]. Stoga, nakon analize efekta utišane ekspresije proteina SOX1 na proliferativni kapacitet, vijabilnost i senescenciju U251 ćelija, sledeći korak u istraživanju obuhvatao je izučavanje efekta smanjene ekspresije ovog proteina na migratorni potencijal U251 ćelija. Uticaj smanjene ekspresije proteina SOX1 na migraciju U251 ćelija analiziran je primenom Testa zarastanje povrede (*Scratch wound healing assay*). Popunjavanje praznog prostora ćelijama analizirano je 12 h nakon nanošenja povrede. Rezultati primenjenog testa pokazuju da je 12 h nakon nanošenja povrede prazan prostor kontrolnih U251 ćelija (pLKO) bio ispunjen ćelijama, dok su U251 ćelije transdukovane ekspresionim konstruktom pLKO.1/shSOX1 (shSOX1) sa manjom efikasnošću popunjavale prazan prostor u poređenju sa kontrolnim ćelijama (Slika 20).

Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da se u uslovima utišane ekspresije proteina SOX1 smanjuje migratorni potencijal U251 ćelija.



Slika 20. Uticaj smanjene ekspresije proteina SOX1 na migratorni potencijal U251 ćelija. Migratorni potencijal kontrolnih U251 ćelija (pLKO) i ćelija transdukovanih ekspresionim konstruktom pLKO.1/shSOX1 (shSOX1) analiziran je primenom Testa zarastanja povrede. Ćelije su posmatrane invertnim mikroskopom DM IL LED (Leica) pod uvećanjem od 10x u momentu nanošenja povrede (0 h) i 12 h nakon nanošenja povrede.

4.1.7. Analiza ekspresije gena *SOX1* u matičnim ćelijama glioblastoma

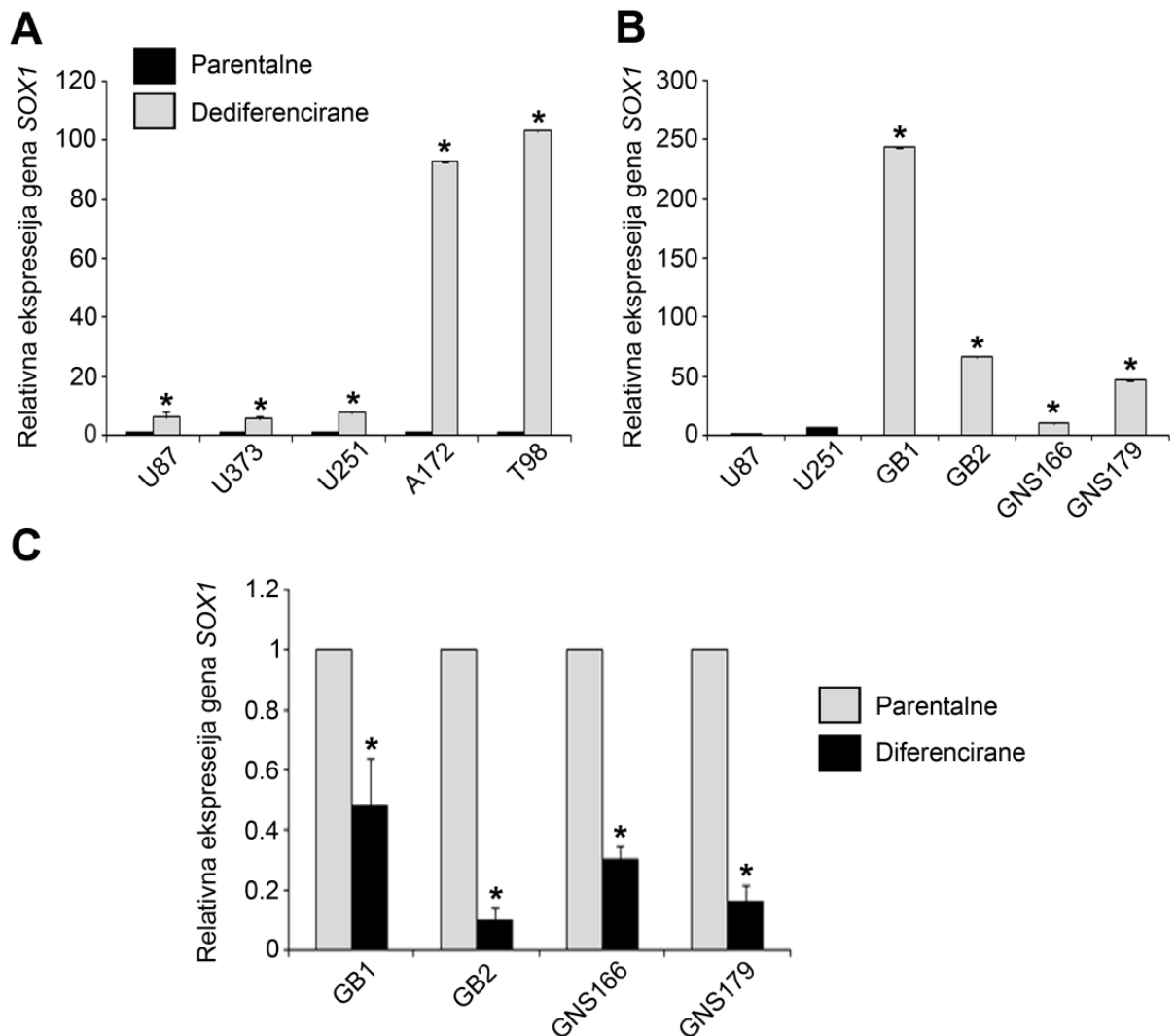
Brojni literaturni podaci ukazuju da su matične ćelije GBM odgovorne za nastanak, progresiju, metastaziranje, rezistenciju na terapiju i relaps tumora [80, 87]. Postoji nekoliko hipoteza o nastanku matičnih ćelija glioblastoma [147]. Po jednoj od njih, matične ćelije GBM nastaju dediferencijacijom (transdiferencijacijom ili reprogramiranjem) tumorskih ćelija glioblastoma [147]. Pokazano je da u procesu dediferencijacije tumorskih ćelija bitnu ulogu imaju regulatorni proteini koji su uključeni u određivanje sudbine ćelija tokom normalnog razvića [232]. Uzimajući u obzir da je gen *SOX1* eksprimiran u GBM kao i da ima bitnu ulogu tokom razvića nervnog sistema, sledeći korak u istraživanju podrazumevao je ispitivanje ekspresije ovog gena nakon dediferencijacije ćelijskih linija poreklom od GBM. Ćelijske linije poreklom od GBM (U87, U373, U251, A172 i T98) su dediferencirane i ekspresija gena *SOX1* je analizirana u nastalim onkosferama (onkosfere mogu da formiraju samo ćelije koje su se dediferencirale) metodom RT-qPCR. Primenom ove metode kod svih dediferenciranih ćelijskih linija detektovano je povećanje ekspresije gena *SOX1* u poređenju sa ekspresijom uočenom u njihovim parentalnim ćelijama (Slika 21A). Najveće povećane ekspresije ovog gena detektovano je nakon dediferencijacije A172 (povećanje oko 92 puta u poređenju sa ekspresijom detektovanom kod parentalnih ćelija) i T98 ćelija (povećanje oko 103 puta u poređenju sa ekspresijom detektovanom kod parentalnih ćelija). Istovremeno, nakon dediferencijacije U87 ćelija detektovano je povećanje ekspresije gena *SOX1* oko 6,3 puta, dok je nakon dediferencijacije U373 ćelija uočeno povećanje ekspresije ovog gena bilo oko 5,8 puta u poređenju sa ekspresijom detektovanom kod njihovih parentalnih ćelija. Pored toga, u dediferenciranim U251 ćelijama ekspresija gena *SOX1* bila je povećana oko 7,8 puta u odnosu na ekspresiju detektovanu u parentalnim ćelijama (Slika 21A).

Druga hipoteza o nastanku GMC polazi sa stanovišta da ove ćelije nastaju od neuralnih matičnih ćelija koje su prošle kroz procese genetičkih i epigenetičkih promena [336]. Kako je *SOX1* marker neuralnih matičnih ćelija [252], ekspresija ovog gena analizirana je u kulturama matičnih ćelija glioblastoma izolovanim iz tumora bolesnika (GMC). Ekspresija gena *SOX1* analizirana je u četiri kulture GMC: GB1, GB2, GNS166 i

GNS179 i upoređena sa ekspresijom ovog gena u U87 i U251 ćelijskim linijama poreklom od glioblastoma. Primenom metode RT-qPCR detektovano je da je ekspresije gena *SOX1* bila statistički značajno povećana u svakoj od analiziranih kultura GMĆ u poređenju sa ekspresijom ovog gena detektovanom u imortalizovanim ćelijskim linijama poreklom od GBM, U87 i U251 (Slika 21B).

U cilju proučavanja da li visok nivo ekspresije gena *SOX1* koreliše sa nediferenciranim stanjem ćelija glioblastoma naredni eksperimentalni korak obuhvatao je diferencijaciju kultura GMĆ i analizu ekspresije ovog gena u diferenciranim ćelijama primenom metode RT-qPCR-a. Rezultati ove analize pokazuju da je proces diferencijacije GMĆ praćen smanjenjem ekspresije gena *SOX1* (Slika 21C). Naime, ekspresija ovog gena bila je smanjena za oko 50% nakon diferencijacije GB1 ćelija, oko 90% nakon diferencijacije GB2 ćelija, oko 70% nakon diferencijacije GNS166 ćelija i za oko 80% nakon diferencijacije GNS179 ćelija u odnosu na ekspresiju detektovanu u njihovim odgovarajućim nediferenciranim GMĆ (Slika 21C).

Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da je gen *SOX1* potencijalni marker GMĆ, kao i da visoka ekspresija ovog gena koreliše sa nediferenciranim stanjem GMĆ što nam ukazuje na potencijalnu ulogu gena *SOX1* u održavanju nediferenciranog stanja GMĆ.

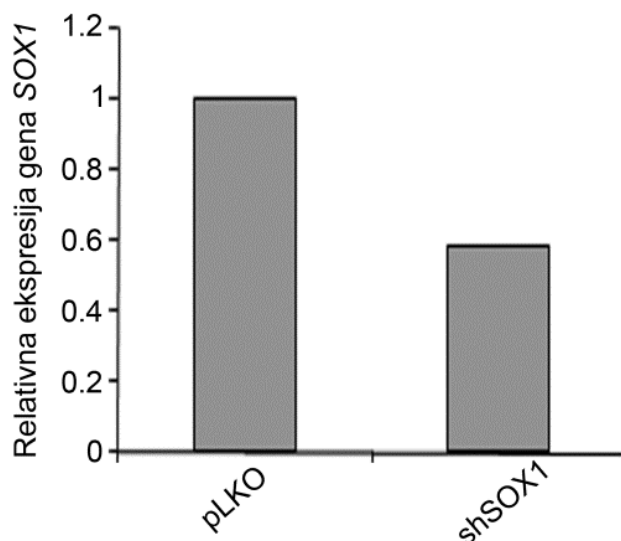


Slika 21. Ekspresija gena *SOX1* u matičnim ćelijama glioblastoma. A) Ekspresija gena *SOX1* nakon dediferencijacije ćelijskih linija poreklom od glioblastoma. Nivo ekspresije gena *SOX1* u uzorcima normalizovan je u odnosu na ekspresiju gena *GAPDH* u istom uzorku. Relativna ekspresija gena *SOX1* u dediferenciranim ćelijama prikazana je kao stepen promene ekspresije detektovane u njihovim odgovarajućim parentalnim ćelijama, kojoj je dodeljena vrednost 1. Na grafiku su prikazane srednje vrednosti \pm S.D. iz najmanje tri nezavisna eksperimenta. Srednje vrednosti su statistički upoređene Studentovim *t*-testom. Vrednost $p \leq 0.05$ označena je * B) Ekspresija gena *SOX1* u permanentnim ćelijskim linijama poreklom od glioblastoma (U87 i U251) i kulturama matičnih ćelija GBM (GB1, GB2, GNS166 i GNS179). Nivo ekspresije gena *SOX1* u uzorcima normalizovan je u odnosu na ekspresiju gena *GAPDH* u istom uzorku. Relativna ekspresija gena *SOX1* u U251 ćelijama i kulturama matičnih ćelija GBM prikazana je kao stepen

promene ekspresije detektovane u U87 ćelijama kojoj je dodeljena vrednost 1. Na grafiku su prikazane srednje vrednosti \pm S.D. iz najmanje tri nezavisna eksperimenta. Srednje vrednosti su statistički upoređene Studentovim *t*-testom. Vrednost $p \leq 0.05$ označena je * C) Ekspresija gena *SOX1* nakon diferencijacije kultura matičnih ćelija glioblastoma. Nivo ekspresije gena *SOX1* u uzorcima normalizovan je u odnosu na ekspresiju gena *GAPDH* u istom uzorku. Relativna ekspresija gena *SOX1* u diferenciranim ćelijama GMĆ prikazana je kao stepen promene ekspresije detektovane u njihovim odgovarajućim parentalnim ćelijama, kojoj je dodeljena vrednost 1. Na grafiku su prikazane srednje vrednosti \pm S.D. iz najmanje dva nezavisna eksperimenta. Srednje vrednosti su statistički upoređene Studentovim *t*-testom. Vrednost $p \leq 0.05$ označena je *

4.1.8. Uspostavljanje uslova za utišavanje ekspresije gena *SOX1* u GNS166 kulturi matičnih ćelija GBM

U cilju ispitivanja potencijalne uloge gena *SOX1* u GMĆ, sledeći korak u istraživanju obuhvatio je uspostavljanje uslova za utišavanje ekspresije gena *SOX1* u GNS166 kulturi matičnih ćelija GBM. U svrhu utišavanja ekspresije ovog gena, GNS166 ćelije su transdukovane lentivirusnim ekspresionim konstruktom pLKO.1/sh*SOX1*. Takođe, ove ćelije su transdukovane i kontrolnim lentivirusnim ekspresionim vektorom pLKO.1 (kontrolne ćelije). Tehnikom RT-qPCR detektovano je smanjenje ekspresije gena *SOX1* za oko 40% u GNS166 ćelijama transdukovanim ekspresionim konstruktom pLKO.1/sh*SOX1* u poređenju sa ekspresijom ovog gena detektovanom u kontrolnim GNS166 ćelijama (Slika 22). Dobijeni rezultati ukazuju da lentivirusna transdukcija ekspresionim konstruktom pLKO.1/sh*SOX1* predstavlja efikasan način za utišavanje ekspresije gena *SOX1* u GNS166 kulturi matičnih ćelija GBM.

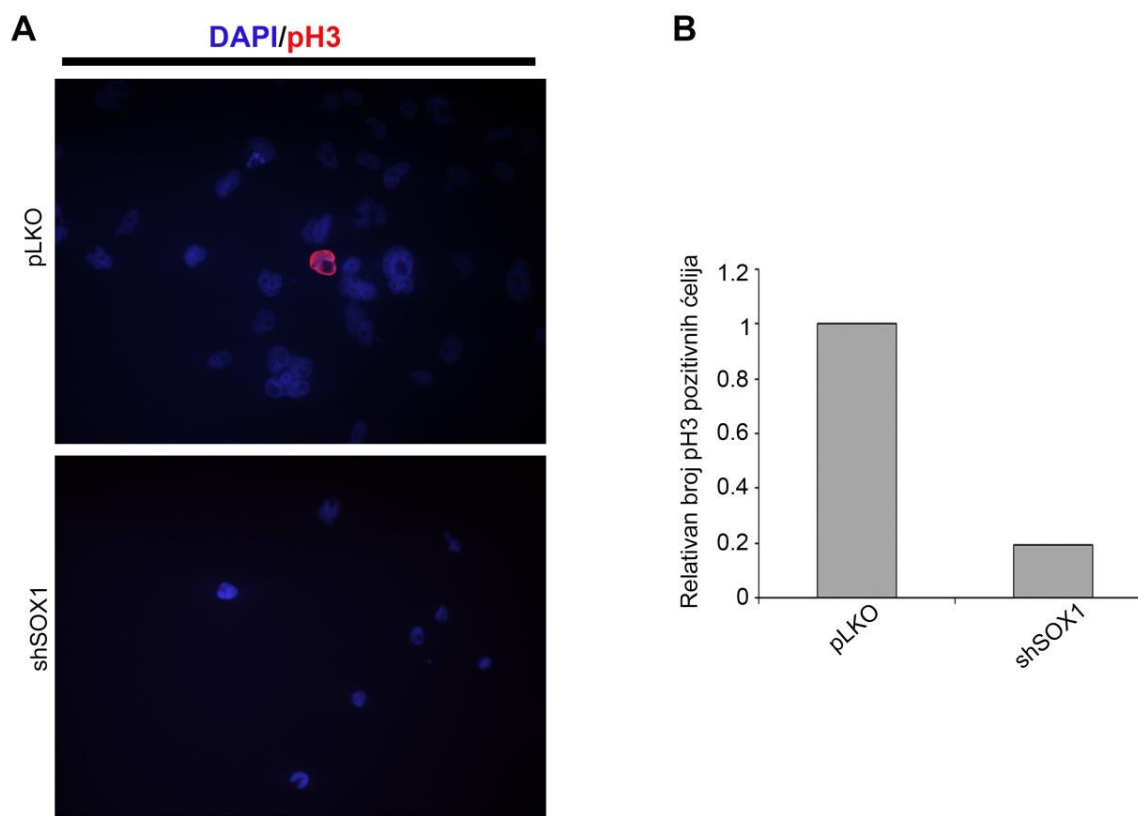


Slika 22. Utišavanje ekspresije gena *SOX1* u GNS166 ćelijama. Tehnikom RT-qPCR analizirana je ekspresija gena *SOX1* u kontrolnim GNS166 ćelijama (pLKO) i u GNS166 ćelijama transdukovanim ekspresionim konstruktom pLKO.1/sh*SOX1* (shSOX1). Nivo ekspresije gena *SOX1* u uzorcima normalizovan je u odnosu na ekspresiju gena *GAPDH* u istom uzorku. Relativna ekspresija gena *SOX1* u ćelijama transdukovanim ekspresionim konstruktom pLKO.1/sh*SOX1* prikazana je kao stepen promene ekspresije ovog gena detektovane u kontrolnim ćelijama kojoj je dodeljena vrednost 1.

4.1.9. Analiza efekta utišane ekspresije gena *SOX1* na proliferativni kapacitet GNS166 kulture matičnih ćelija GBM

Nakon uspostavljanja uslova za smanjenje ekspresije gena *SOX1* u GNS166 GMĆ, analiziran je proliferativni kapacitet GNS166 ćelija u uslovima smanjene ekspresije gena *SOX1*.

Imunocitohemijskom analizom ekspresije pH3 proteina detektovano je da je broj ćelija koje eksprimiraju pH3 protein za oko 80% manji kod GNS166 ćelija transdukovanih ekspresionim konstruktom pLKO.1/sh*SOX1* (shSOX1) u poređenju sa brojem ovih ćelija detektovanih kod kontrolnih ćelija (pLKO) (Slika 23).

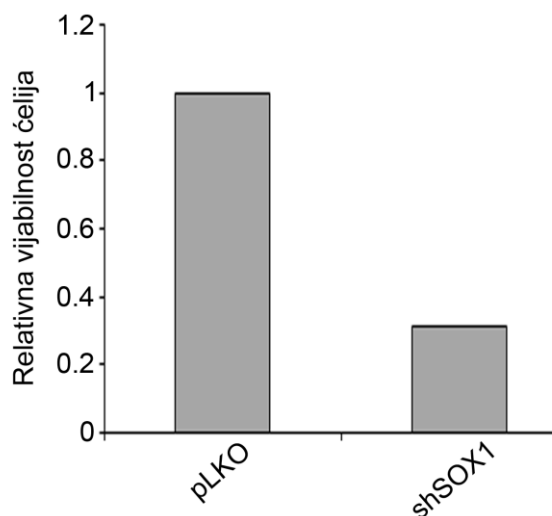


Slika 23. Efekat smanjene ekspresije gena *SOX1* na proliferativni kapacitet GNS166 ćelija. (A) Reprezentativni primer imunocitohemijskog bojenja primenom antitela specifičnog za pH3 protein (crveni signal) kod kontrolnih GNS166 ćelija (pLKO) i GNS166 ćelija transdukovanih ekspresionim konstruktom pLKO.1/shSOX1 (shSOX1) (B) relativni broj ćelija koje ekspimiraju pH3 protein kod kontrolnih GNS166 ćelija (pLKO) i GNS166 ćelija transdukovanih ekspresionim konstruktom pLKO.1/shSOX1 (shSOX1). Relativni broj pH3 pozitivnih GNS166 ćelija transdukovanih ekspresionim konstruktom pLKO.1/shSOX1 (shSOX1) prikazan je kao stepen promene broja pH3 pozitivnih kontrolnih ćelija (pLKO) kojem je arbitrarno dodeljena vrednost 1. Jedra ćelija obojena su DAPI-jem (plavi signal). Za vizuelizaciju ekspresije proteina pH3 korišćen je TCS SP8 konfokalni mikroskop (Leica) (uveličanje od 40x) i softver LAS AF-TCS SP8 (Leica Microsystems).

Ovi rezultati pokazuju da se u uslovima smanjene ekspresije gena *SOX1* smanjuje proliferativni kapacitet GMĆ.

4.1.10. Analiza efekta utišane ekspresije gena *SOX1* na vijabilnost GNS166 kulture matičnih ćelija GBM

Nakon analize proliferativnog kapaciteta GNS166 ćelija sa utišanom ekspresijom gena *SOX1*, analizirana je vijabilnost ovih ćelija primenom MTT testa. Rezultati ove analize pokazali su da je vijabilnost GNS166 ćelija transdukovanih ekspresionim konstruktom pLKO.1/sh*SOX1* (sh*SOX1*) smanjena za približno 70% u poređenju sa vijabilnošću kontrolnih ćelija (pLKO) (Slika 24).



Slika 24. Efekat utišane ekspresije gena *SOX1* na vijabilnost GNS166 ćelija. Relativna vijabilnost kontrolnih GNS166 ćelija (pLKO) i ćelija sa utišanom ekspresijom gena *SOX1* (sh*SOX1*) (transdukovanih ekspresionim konstruktom pLKO.1/sh*SOX1*). Relativna vijabilnost GNS166 ćelija transdukovanih pLKO.1/sh*SOX1* konstruktom (sh*SOX1*) prikazana je kao stepen promene vijabilnosti kontrolnih ćelija (pLKO), kojem je dodeljena vrednost 1.

Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da se u uslovima smanjene ekspresije gena *SOX1* smanjuje vijabilnost ćelija GNS166 kulture GMĆ.

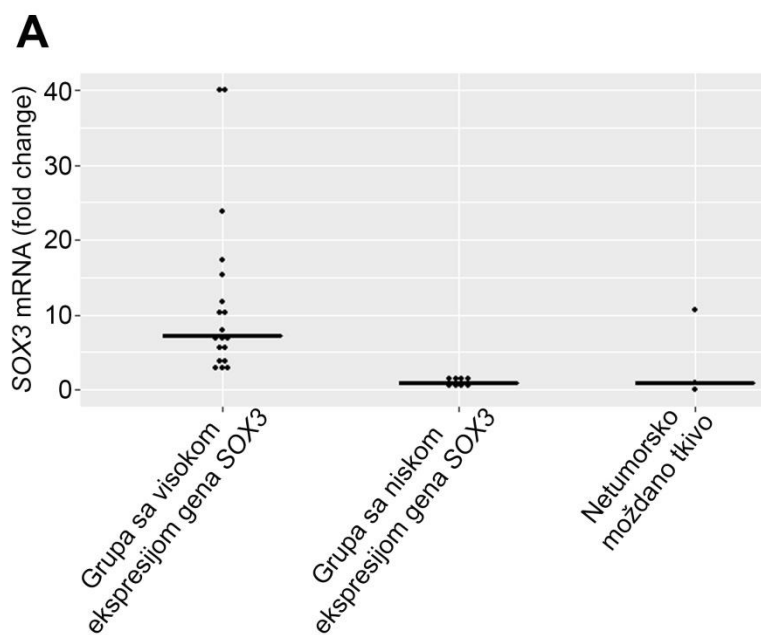
4.2. Analiza uloge gena *SOX3* u promovisanju malignog fenotipa ćelija glioblastoma

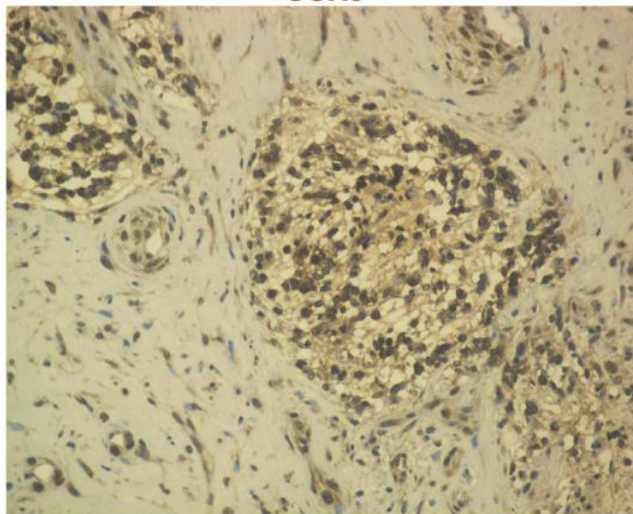
4.2.1. Analiza ekspresije gena/proteina *SOX3/SOX3* u tumorskom tkivu glioblastoma

Podaci iz literature ukazuju da je gen *SOX3* eksprimiran u glioblastomima [192]. Imajući u vidu navedeni podatak u okviru istraživanja prezentovanog u ovoj doktorskoj disertaciji analizirana je ekspresija gena *SOX3* u GBM i netumorskom moždanom tkivu (normalnom moždanom tkivu i moždanom tkivu koje okružuje tumor). Nivo ekspresije gena *SOX3* u normalnom moždanom tkivu, moždanom tkivu koje okružuje tumor i tumorskom tkivu glioblastoma ispitivan je primenom metode RT-qPCR (Slika 25A). Analiza je obuhvatila 27 uzoraka tumorskog tkiva, uzorak normalnog moždanog tkiva (ovaj uzorak je obuhvatao smešu RNK izolovanih iz različitih regiona mozga poreklom od 23 osobe različitog pola i starosti (od 23-86 godina starosti)) i 2 uzorka tkiva izolovana iz regiona mozga neposredno uz tumor. Tehnikom RT-qPCR u uzorcima glioblastoma detektovan je različit nivo ekspresije gena *SOX3* u poređenju sa ekspresijom detektovanom u netumorskom moždanom tkivu. Na osnovu relativne ekspresije gena *SOX3*, 27 uzoraka glioblastoma je svrstano u dve grupe – sa relativnom niskom i sa relativno visokom ekspresijom gena *SOX3*. Grupa sa niskom ekspresijom obuhvatala je 8 uzoraka kod kojih je detektovano ili smanjenje ekspresije gena *SOX3* ili povećanje ekspresije ovog gena do 1,8 puta u poređenju sa ekspresijom detektovanom u netumorskom moždanom tkivom. Sa druge strane, grupa sa visokom ekspresijom gena *SOX3* obuhvatala je 19 uzoraka tumora kod kojih je ekspresija gena *SOX3* bila povećana najmanje 1,8 puta u poređenju sa ekspresijom detektovanom u netumorskom moždanom tkivu. Rezultati Kruskal-Wallisovog testa analize varijanse ukazuju da su razlike između grupa (kontrolne, sa relativno niskom i relativno visokom ekspresijom gena *SOX3*) statističke značajne ($p = 0.0003$). Nakon analize ekspresije gena *SOX3* u GBM ispitivana je ekspresije proteina *SOX3* u uzorcima glioblastoma tumora primenom imunohistohemijske analize. Korišćenjem ove metode ekspresija proteina *SOX3* detektovana je u svim analiziranim uzorcima GBM tumora (Slika 25B). Međutim, ekspresija ovog proteina nije detektovana u svim ćelijama svakog od

analiziranih uzorka tumora što ukazuje na heterogenu ekspresiju proteina SOX3 unutar GMB tumora (Slika 25B).

Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da GBM tumori ekspimiraju *SOX3*/*SOX3*. Pored toga, ekspresija gena *SOX3* je povećana kod većine uzoraka GBM u odnosu na ekspresiju detektovanu u netumorskom moždanom tkivu.



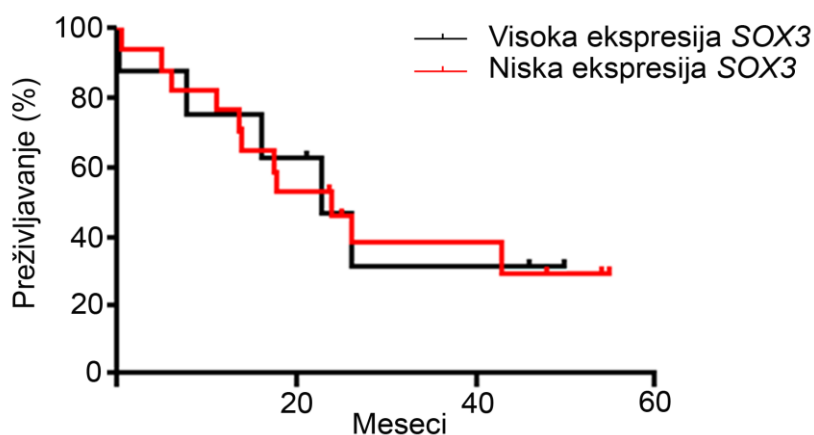
B**SOX3**

Slika 25. Ekspresija SOX3/SOX3 u tumorskom tkivu glioblastoma. A) Relativna ekspresija gena *SOX3* u tumorskom i netumorskom moždanom tkivu. Tehnikom RT-qPCR analizirana je ekspresija gena *SOX3* u 27 uzoraka tumorskog tkiva, jednom uzorku normalnog moždanog tkiva i dva uzorka tkiva izolovana iz regiona mozga neposredno uz tumor. Na osnovu nivoa ekspresije gena *SOX3* u uzorcima GBM formirane su dve grupe, sa visokom i sa niskom ekspresijom ovog gena. Nivo ekspresije gena *SOX3* u uzorku normalizovan je u odnosu na ekspresiju gena *GAPDH* u istom uzorku. Ekspresija gena *SOX3* u uzorcima glioblastoma normalizovana je u odnosu na vrednost medijane netumorskog moždanog tkiva, kojoj je dodeljena vrednost 1. B) Ekspresija proteina SOX3 u GBM. Metodom imunohistohemije analizirana je ekspresija proteina SOX3 kod 13 uzoraka GBM tumora. Na slici je prikazan reprezentativni primer imunohistochemijske analize na parafinskom preseku tumora. Za imunohistochemijsku analizu korišćeno je antitelo specifično za SOX3 protein (braon signal). Jezdra ćelija obojena su hematoksilinom (plavi signal). Za vizuelizaciju ekspresije proteina SOX3 u uzorcima GBM korišćen je BX41 mikroskop (Olympus) (uvećanje od 20x) i digitalna kamera C5060-ADU (Olympus).

4.2.2. Analiza korelacije nivoa ekspresije gena *SOX3* i preživljavanja bolesnika sa GBM

U cilju ispitivanja da li postoji korelacija između nivoa ekspresije gena *SOX3* i preživljavanja obolelih, 27 bolesnika sa GBM je na osnovu nivoa ekspresije gena *SOX3* u ovom tipu tumora podeljeno u dve grupe, grupu sa visokom i grupu sa niskom ekspresijom

ovog gena. Na osnovu rezultata *Kaplan–Meier*-e analize preživljavanja može se zaključiti da ne postoji korelacija između nivoa ekspresije gena *SOX3* i preživljavanja obolelih (Slika 26).

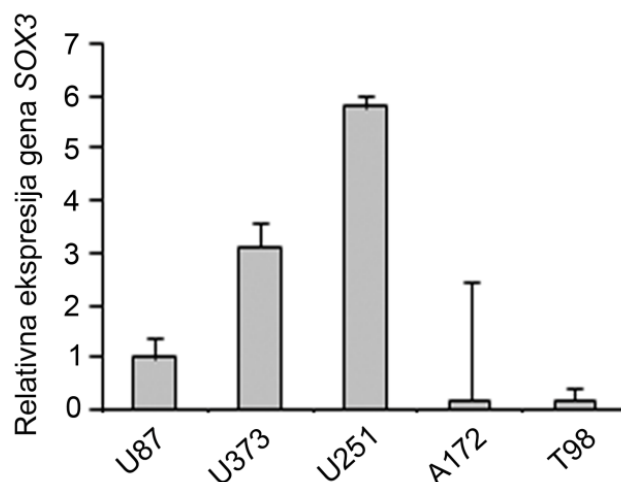


Slika 26. *Kaplan-Meier*-ova kriva preživljavanja bolesnika sa GBM u odnosu na nivo ekspresije gena *SOX3*. Crvena kriva predstavlja preživljavanje obolelih sa visokom ekspresijom *SOX3*, crna kriva sa niskom ekspresijom ovog gena. *Kaplan–Meier*-ova kriva preživljavanja obolelih preuzeta je sa cbiportal sajta.

4.2.3. Analiza ekspresije gena *SOX3* u ćelijskim linijama poreklom od glioblastoma

Imajući u vidu da je ekspresija gena *SOX3* detektovana u glioblastomima, sledeći korak u istraživanju obuhvatao je ispitivanje uloge ovog gena u ćelijama glioblastoma. Kako bi se proučila funkcija gena *SOX3* u ćelijama glioblastoma, prvi korak u istraživanju obuhvatao je pronalaženje adekvatnog model sistema za *in vitro* eksperimente. U tu svrhu ekspresija ovog gena analizirana je u pet permanentnih ćelijskih linija poreklom od glioblastoma, U87, U373, U251, A172 i T98 primenom tehnike RT-qPCR. Rezultati dobijeni primenom tehnike RT-qPCR pokazuju da svih pet analiziranih ćelijskih linija ekspimiraju ovaj gen (Slika 27). Pored toga, viši nivo ekspresije gena *SOX3* detektovan je u U251 i U373 ćelijama u poređenju sa nivoom ekspresije ovog gena u U87, A172 i T98 ćelijama (Slika 27). Na osnovu nivoa ekspresije gena *SOX3* u analiziranim ćelijskim linijama, za proučavanje funkcije gena *SOX3* u ćelijama glioblastoma odabrane su dve

ćelijske linije: U87 ćelijska linija u kojoj je detektovana relativno niska ekspresija ovog gena i U251 ćelijska linija u kojoj je detektovana relativno visoka ekspresija gena *SOX3*.



Slika 27. Ekspresije gena *SOX3* u ćelijskim linijama poreklom od glioblastoma. Metodom RT-qPCR analizirana je ekspresija gena *SOX3* u U87, U373, U251, A172 i T98 ćelijskim linijama poreklom od glioblastoma. Nivo ekspresije gena *SOX3* normalizovan je u odnosu na ekspresiju gena *GAPDH* u istom uzorku. Relativna ekspresija gena *SOX3* u analiziranim ćelijskim linijama prikazana je kao stepen promene ekspresije detektovane u U87 ćelijama kojoj je dodeljena vrednost 1. Na grafiku su prikazane srednje vrednosti \pm S.D. iz najmanje tri nezavisna eksperimenta.

4.2.4. Uporedna analiza ekspresije proteina *SOX3* u astrocitima i ćelijama glioblastoma

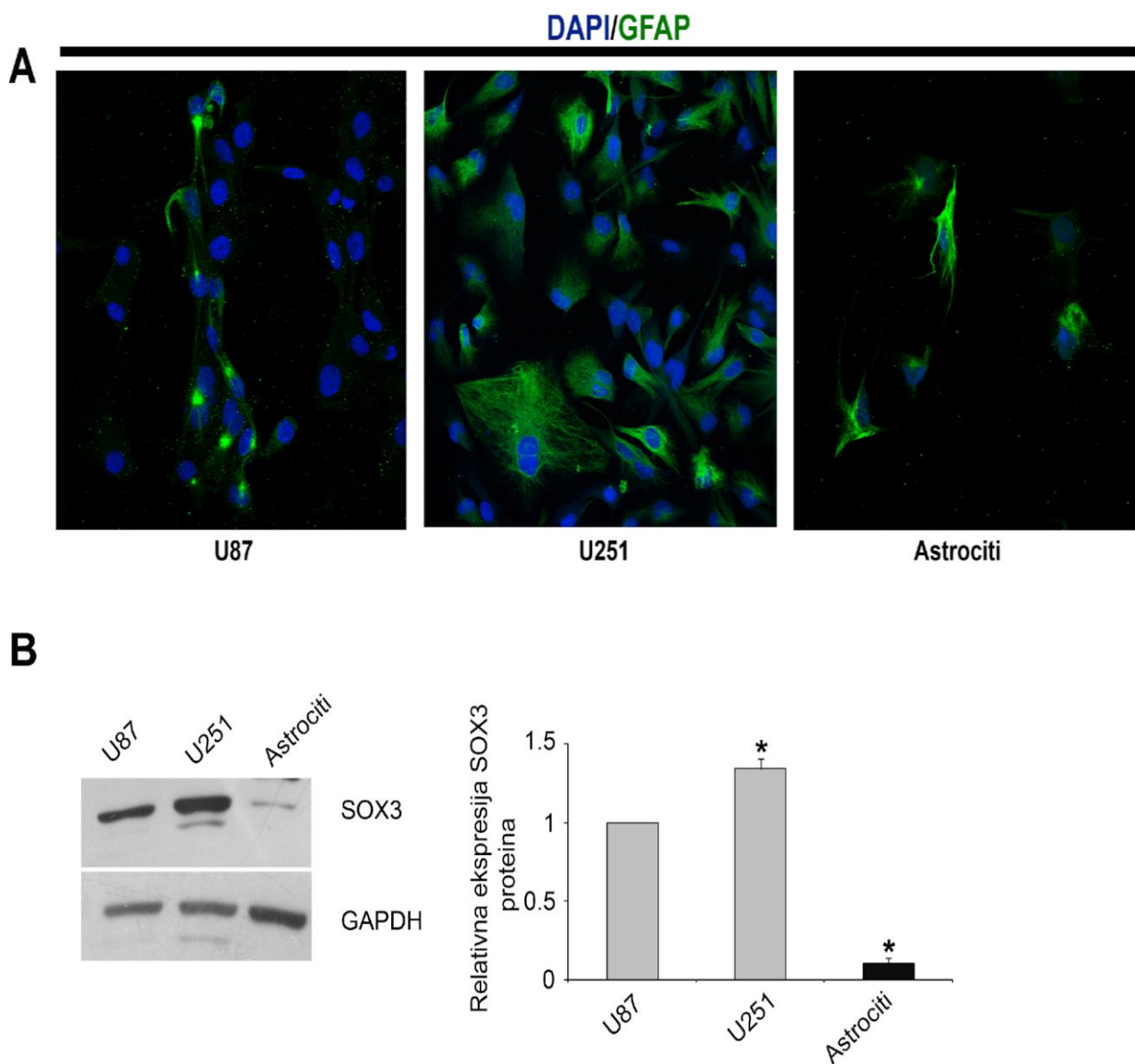
Kako se u literaturi astrociti najčešće navode kao potencijalni kandidati od kojih ćelije GBM vode poreklo [337], sledeći korak u istraživanju obuhvatao je analizu ekspresije proteina *SOX3* u astrocitima i ćelijama glioblastoma, U87 i U251. U cilju generisanja astrocita humane pluripotentne embrionalno karcinomske NT2/D1 ćelije su tretirane retinoičnom kiselinom (RK). Naime, za ove ćelije je pokazano da se pod dejstvom RK diferenciraju u ćelije različitog tipa, uključujući i neurone i astrocite [327, 338].

Imunocitohemijskom analizom primenom antitela specifičnog za GFAP protein, marker astrocita, utvrđeno je da ćelije, dobijene nakon RK-indukovane neuralne

diferencijacije NT2/D1 ćelija i mehaničkog uklanjanja neurona, eksprimiraju GFAP protein što ukazuje na astrocitno poreklo generisanih ćelija (Slika 28A). Pored toga, ćelijske linije GBM, U87 i U251, takođe eksprimiraju protein GFAP što govori u prilog teoriji da GBM vode poreklo od astrocita (Slika 28A).

Nivo ekspresije proteina SOX3 u astrocitima poreklom od NT2/D1 ćelija, kao i u U87 i U251 ćelijama glioblastoma analiziran je primenom tehnike Western blot-a. Rezultati ove analize pokazuju da je ekspresija proteina SOX3 manja za oko 90% u astrocitima poreklom od NT2/D1 ćelija u poređenju sa ekspresijom detektovanom u U87 ćelijama (Slika 28B).

Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da ćelije glioblastoma imaju viši nivo ekspresije proteina SOX3 u poređenju sa astrocitima.



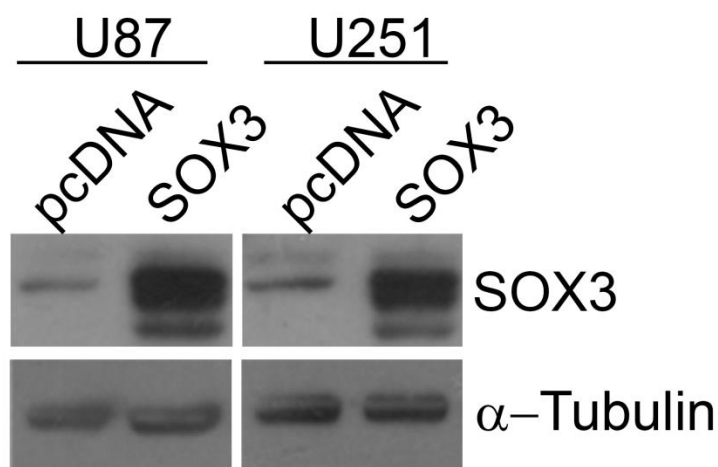
Slika 28. Ekspresija proteina SOX3 u humanim astrocitima i ćelijama GBM. A) Imunocitohemijska analiza ekspresije proteina GFAP u astrocitima poreklom od NT2/D1 ćelija i ćelijama glioblastoma U87 i U251. Za imunocitohemijsko bojenje je korišćeno antitelo specifično za GFAP protein (zeleni signal). Jedra ćelija obojena su DAPI-jem (plavi signal). Za vizuelizaciju ekspresije proteina GFAP korišćen je TCS SP8 konfokalni mikroskop (Leica) (uveličanje od 40x) i softver LAS AF-TCS SP8 (Leica Microsystems). B) Reprezentativni primer Western blot analize ekspresije proteina SOX3 u astrocitima poreklom od NT2/D1 ćelija, U87 i U251 ćelijama i relativni nivo ekspresije proteina SOX3 u ovim ćelijama. Za kvantifikaciju rezultata Western blot analize primenjen je ImageJ softver. Nivo ekspresije proteina SOX3 u uzorcima je

normalizovan u odnosu na ekspresiju proteina GAPDH u istom uzorku. Relativna ekspresija proteina SOX3 u astrocitima i U251 ćelijama glioblastoma prikazana je kao stepen promene ekspresije ovog proteina detektovane u U87 ćelijama kojima je dodeljena vrednost 1. Na grafiku su predstavljene srednje vrednosti \pm S.D. iz tri nezavisna eksperimenta. Srednje vrednosti su upoređene Studentovim t-testom. Vrednost $p \leq 0.05$ označena je *.

4.2.5. Uspostavljanje uslova za modulaciju ekspresije gena *SOX3* u U87 i U251 ćelijama glioblastoma

Kako bi se ispitalo da li gen *SOX3* ima ulogu u promovisanju malignog fenotipa ćelija GBM, sledeći korak u istraživanju podrazumevao je modulaciju ekspresije ovog gena u ćelijama glioblastoma, odnosno povećanje ekspresije gena *SOX3* u ćelijskoj liniji sa relativno niskom ekspresijom gena *SOX3* (U87 ćelije) i ćelijskoj liniji koja se odlikuje relativno visokom ekspresijom ovog gena (U251 ćelije) (Slika 27). Ćelije su transfektovane eukariotskim ekspresionim vektorom pcDNA3.1 (pcDNA) (omogućava ekspresiju ciljnog gena pod kontrolom promotor poreklom od humanog citomegalovirusa) ili ekspresionim konstruktom pcDNA3.1/*SOX3* (*SOX3*) koji sadrži komplementan kodirajući region humanog gena *SOX3*. Nakon privremene (tranzijentne) transfekcije, ekspresija proteina SOX3 u ćelijama transfektovanim ekspresionim vektorom pcDNA3.1 (kontrolne ćelije, pcDNA), odnosno ekspresionim konstruktom pcDNA3.1/*SOX3* (*SOX3*) analizirana je tehnikom Western blot-a. Rezultati ove analize pokazali su da U87 i U251 ćelije, transfektovane ekspresionim konstruktom pcDNA3.1/*SOX3* (*SOX3*), imaju viši nivo ekspresije proteina SOX3 u odnosu na nivo ekspresije ovog gena detektovan u kontrolnim ćelijama (pcDNA) (Slika 29).

Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da su uspostavljeni uslovi za povećanje ekspresije proteina SOX3 u U87 i U251 ćelijama. Imajući to u vidu, u narednim eksperimentima za ispitivanja uticaja povećane ekspresije ovog gena na proliferativni kapacitet, vijabilnost, migratorni i invazivni potencijal, kao i aktivnost WNT i HH signalnih puteva i autofagiju ćelija glioblastoma korišćena je privremena transfekcija U87 i U251 ćelija ekspresionim konstruktom pcDNA3.1/*SOX3*.

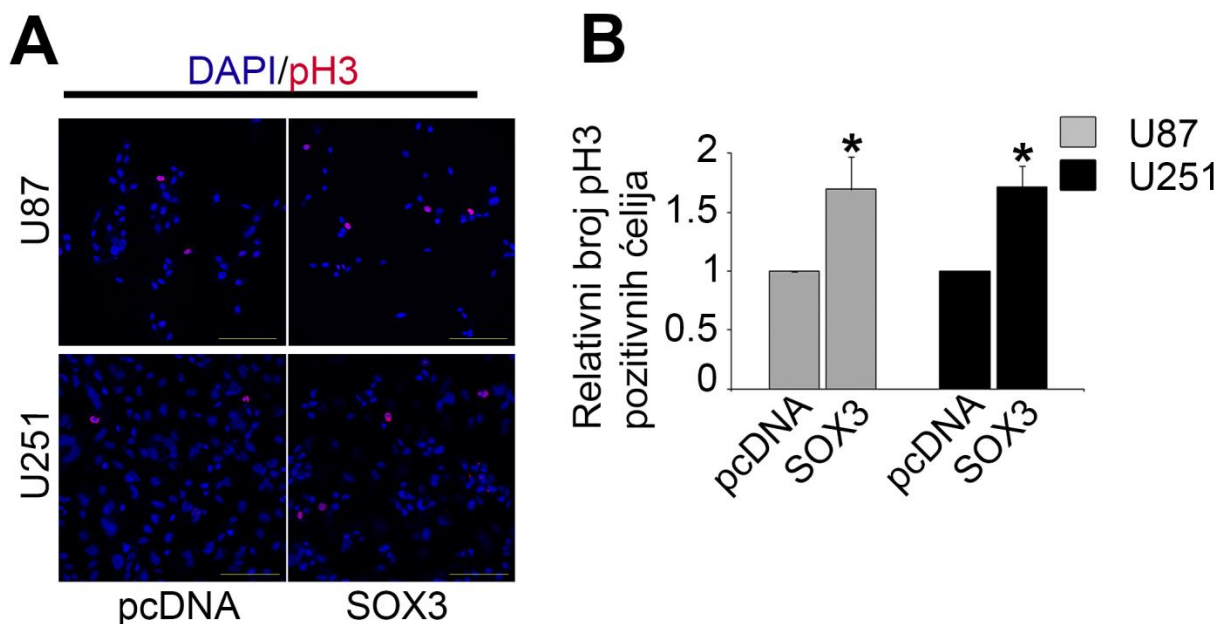


Slika 29. Analiza ekspresije proteina SOX3 u U87 i U251 ćelijama transfektovanim ekspresionim vektorom pcDNA3.1 (pcDNA) ili ekspresionim konstruktom pcDNA3.1/SOX3 (SOX3). Ekspresija proteina SOX3 analizirana je primenom Western blot metode. Na Slici je predstavljen reprezentativni primer Western blot analize ekspresije proteina SOX3 u kontrolnim ćelijama (pcDNA) i ćelijama transfektovanim ekspresionim konstruktom pcDNA3.1/SOX3 (SOX3). α -tubulin je korišćen za normalizaciju količine proteina u uzorcima. Eksperiment je ponovljen u tri nezavisne transfekcije.

4.2.6. Analiza efekta povećane ekspresije proteina SOX3 na proliferativni kapacitet U87 i U251 ćelija

Nakon uspostavljanja uslova za modulaciju ekspresije gena *SOX3*, sledeći korak u istraživanju podrazumevao je ispitivanje uticaja povećane ekspresije proteina SOX3 na proliferativni kapacitet U87 i U251 ćelija. Proliferativni kapacitet kontrolnih ćelija (pcDNA) i ćelija transfektovanih ekspresionim konstruktom pcDNA3.1/SOX3 (SOX3) ispitivan je analizom ekspresije markera ćelija u mitozu, fosforilisane forme histona H3 (pH3).

Imunocitohemijskom analizom ekspresije proteina pH3 detektovano je da je broj U87 i U251 ćelija koje ekspimiraju ovaj protein povećan za oko 1,7 puta nakon transfekcije ovih ćelija ekspresionim konstruktom pcDNA3.1/SOX3 (SOX3) u poređenju sa brojem odgovarajućih kontrolnih ćelija koje ekspimiraju protein pH3 (pcDNA) (Slika 30).



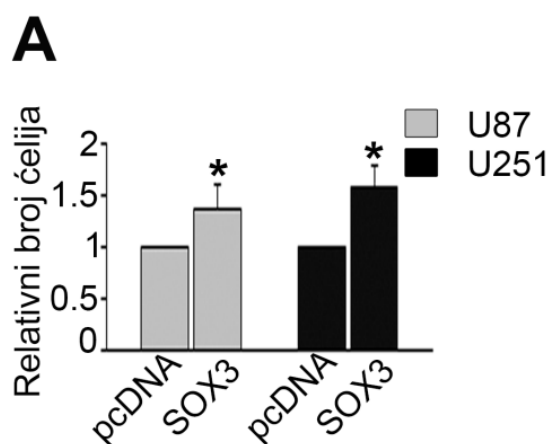
Slika 30. Efekat povećane ekspresije proteina SOX3 na proliferativni kapacitet U87 i U251 ćelija. A) Reprerentativni primeri imunocitohemijskog bojenja kontrolnih U87 i U251 ćelija transfektovanih ekspresionim vektorom pcDNA3.1 (pcDNA) i U87 i U251 ćelija transfektovanih ekspresionim konstruktom pcDNA3.1/SOX3 (SOX3) primenom antitela specifičnog za pH3 protein (crveni signal). Jedra ćelija obojena su DAPI-jem (plavi signal). Za vizuelizaciju ekspresije proteina pH3 korišćen je TCS SP8 konfokalni mikroskop (Leica) i softver LAS AF-TCS SP8 (Leica Microsystems). B) Relativni broj U87 i U251 ćelija koje ekspimiraju pH3 protein kod kontrolnih ćelija (pcDNA) i ćelija transfektovanih ekspresionim konstruktom pcDNA3.1/SOX3 (SOX3). Relativni broj pH3 pozitivnih U87 i U251 ćelija transfektovanih ekspresionim konstruktom pcDNA3.1/SOX3 (SOX3) prikazan je kao stepen promene broja pH3 pozitivnih kontrolnih U87, odnosno kontrolnih U251 ćelija (pcDNA), kojem je dodeljena vrednost 1. Na grafiku su prikazane srednje vrednosti \pm S.D. iz tri nezavisna eksperimenta. Srednje vrednosti su upoređene Studentovim t-testom. Vrednost $p \leq 0.05$ označena je *.

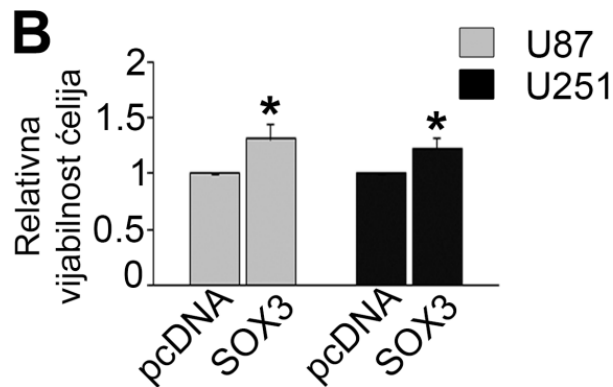
Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da se u uslovima povećane ekspresije proteina SOX3 povećava proliferativni kapacitet ćelija glioblastoma.

4.2.7. Analiza efekta povećane ekspresije proteina SOX3 na vijabilnost U87 i U251 ćelija

Nakon ispitivanja proliferativnog kapaciteta ćelija glioblastoma sa povećanom ekspresijom proteina SOX3, analizirana je vijabilnost U87 i U251 ćelija sa povećanom ekspresijom proteina SOX3 primenom metode bojenja ćelija „Trypan plavom“ bojom i MTT testom. Određivanjem broja živih ćelija u suspenziji primenom metode bojenja ćelija „Trypan plavom“ bojom detektovano je da je broj živih ćelija nakon transfekcije U87 i U251 ćelija ekspresionim konstruktom pcDNA3.1/SOX3 (SOX3) veći za oko 1,4 puta kod U87 ćelija i za oko 1,6 puta kod U251 ćelija u odnosu na broj živih ćelija detektovan kod kontrolnih U87, odnosno U251 ćelija (pcDNA) (Slika 31A).

Rezultati MTT testa pokazali su da se vijabilnost U87 ćelija transfektovanih ekspresionim konstruktom pcDNA3.1/SOX3 (SOX3) povećava za oko 1,3 puta, a U251 ćelija za oko 1,2 puta u odnosu na vijabilnost kontrolnih U87, odnosno U251 ćelija (pcDNA) (Slika 31B).





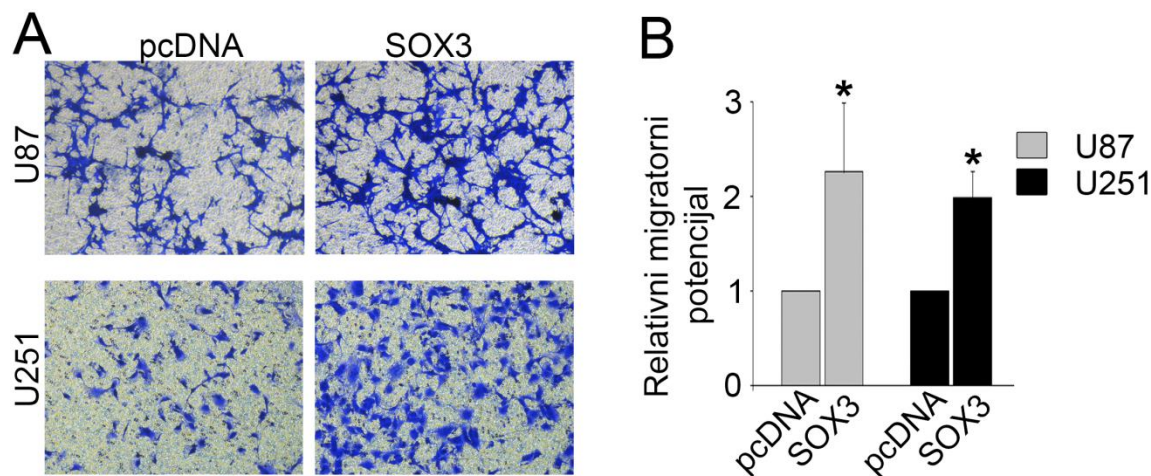
Slika 31. Efekat povećane ekspresije proteina SOX3 na vijabilnost U87 i U251 ćelija. A) Analiza vijabilnosti ćelija primenom metode bojenja ćelija „Trypan plavom“ bojom. Relativni broj živih U87 i U251 ćelija transfektovanih ekspresionim konstruktom pcDNA3.1/SOX3 (SOX3) prikazan je kao stepen promene broja živih kontrolnih U87, odnosno U251 ćelija transfektovanih ekspresionim vektorom pcDNA3.1 (pcDNA), kojem je dodeljena vrednost 1. Na grafiku su prikazane srednje vrednosti \pm S.D. iz tri nezavisna eksperimenta. Srednje vrednosti su upoređene Studentovim t-testom. Vrednost $p \leq 0.05$ označena je *. B) Analiza vijabilnosti ćelija primenom MTT testa. Relativna vijabilnost U87, odnosno U251 ćelija transfektovanih ekspresionim konstruktom pcDNA3.1/SOX3 (SOX3) prikazana je kao stepen promene vijabilnosti kontrolnih U87, odnosno U251 ćelija transfektovanih ekspresionim vektorom pcDNA3.1 (pcDNA) kojem je dodeljena vrednost 1. Na grafiku su prikazane srednje vrednosti \pm S.D. iz tri nezavisna eksperimenta. Srednje vrednosti su upoređene Studentovim t-testom. Vrednost $p \leq 0.05$ označena je *.

Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da se u uslovima povećane ekspresije proteina SOX3 povećava vijabilnost U87 i U251 ćelija glioblastoma.

4.2.8. Analiza efekta povećane ekspresije proteina SOX3 na migratorni potencijal U87 i U251 ćelija

Imajući u vidu da su migracija i invazija jedne od glavnih odlika malignih glioma [339], u ovoj tezi istraživani je i uticaj povećane ekspresije proteina SOX3 na migratorni i invazivni potencijal ćelija glioblastoma. Migratorni potencijal U87 i U251 ćelija analiziran je primenom "Transwell" sistema. Rezultati primene ovog sistema pokazuju da je broj U87 i U251 ćelija koje su migrirale kroz poroznu membranu nakon transfekcije ekspresionim konstruktom pcDNA3.1/SOX3 (SOX3) za oko 2,3 puta veći (U87 ćelije), odnosno za oko 2

puta veći (U251 ćelije) u poređenju sa brojem kontrolnih U87, odnosno U251 ćelija koje su migrirale kroz poroznu membranu (pcDNA) (Slika 32).



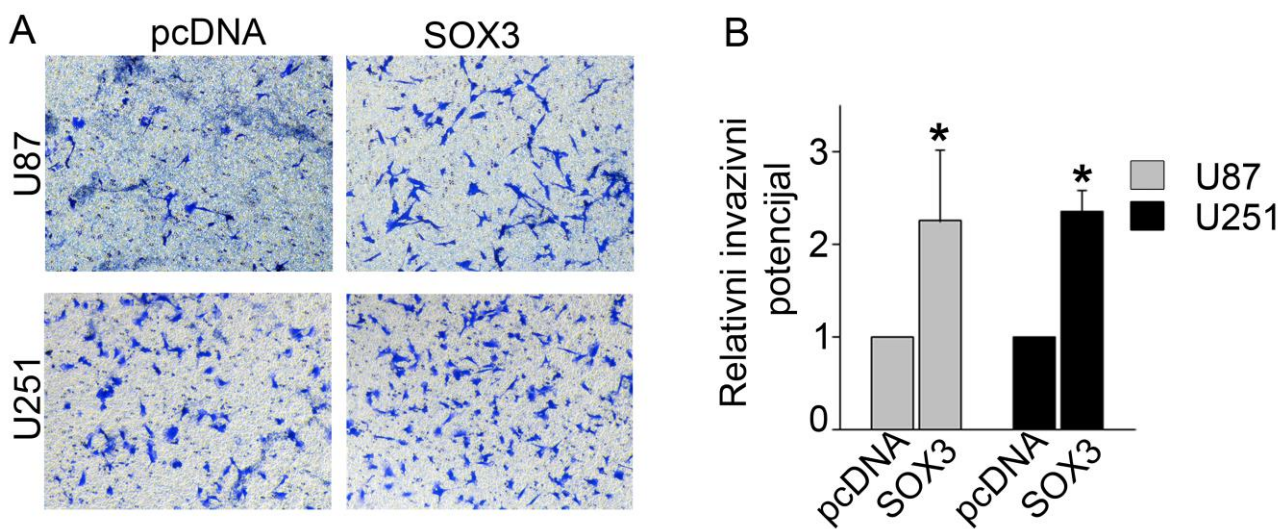
Slika 32. Efekat povećane ekspresije proteina SOX3 na migratorni potencijal U87 i U251 ćelija. Migratorni potencijal kontrolnih U87 i U251 ćelija transfektovanih ekspresionim vektorom pcDNA3.1 (pcDNA) i U87 i U251 ćelija transfektovanih ekspresionim konstruktom pcDNA3.1/SOX3 (SOX3) analiziran je primenom "Transwell" sistema. A) Reprezentativni primeri primene "Transwell" sistema za detekciju migratornog potencijala U87 i U251 ćelija transfektovanim ekspresionim vektorom pcDNA3.1 (pcDNA) ili ekspresionim konstruktom pcDNA3.1/SOX3 (SOX3). Za vizuelizaciju U87 i U251 ćelija koje su migrirale kroz poroznu membranu, 16 h nakon zasejavanja na gornju površinu membrane, korišćen je mikroskop DM IL LED (Leica) (uveličanje od 10x). B) Relativni migratorni potencijal kontrolnih U87 i U251 ćelija (pcDNA) i ćelija transfektovanih ekspresionim konstruktom pcDNA3.1/SOX3 (SOX3). Migratorni potencijal je određen na osnovu broja ćelija koje su migrirale kroz poroznu membranu. Relativni migratorni potencijal U87, odnosno U251 ćelija transfektovanih ekspresionim konstruktom pcDNA3.1/SOX3 (SOX3) prikazan je kao stepen promene broja kontrolnih U87, odnosno U251 ćelija koje su migrirali kroz membranu, kojem je arbitrarno dodeljena vrednost 1. Na grafiku su prikazane srednje vrednosti \pm S.D. iz tri nezavisna eksperimenta. Srednje vrednosti su upoređene Studentovim t-testom. Vrednost $p \leq 0.05$ označena je *.

Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da povećanje ekspresije proteina SOX3 dovodi do povećanja migratornog potencijala U87 i U251 ćelija.

4.2.9. Analiza efekta povećane ekspresije proteina SOX3 na invazivni potencijal U87 i U251 ćelija

Za analizu invazivnog potencijala kontrolnih U87 i U251 ćelija transfektovanih ekspresionim vektorom pcDNA3.1 (pcDNA) i ćelija transfektovanih ekspresionim konstruktom pcDNA3.1/SOX3 (SOX3) korišćen je Test invazivnosti (eng. "*transwell invasion assay*"). Za potrebe izvođenja ovog testa gornja strana porozne membrane *Transwell* sistema obložena je komponentama ekstraćelijskog matriksa. Transfektovane ćelije zasejane su sa gornje strane membrane u medijumu za rast ćelija bez faktora rasta, dok se sa donje strane membrane nalazio medijum za rast ćelija sa faktorima rasta. Da bi prošle kroz pore membrane, ćelije moraju da razlože komponente ekstraćelijskog matriksa. Ćelije koje su uspešno prošle kroz membranu *Transwell* sistema vizuelizovane su bojenjem *Crystal violet* bojom. Rezultati testa invazivnosti pokazuju da je za oko 2,2 puta više U87 i U251 ćelija prošlo kroz membranu nakon transfekcije ekspresionim konstruktom pcDNA3.1/SOX3 (SOX3) u odnosu na broj kontrolnih U87 i U251 ćelija koje su prošle kroz membranu (pcDNA) (Slika 33).

Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da u uslovima povećane ekspresije proteina SOX3 dolazi do povećanja invazivnog potencijala ćelija glioblastoma.

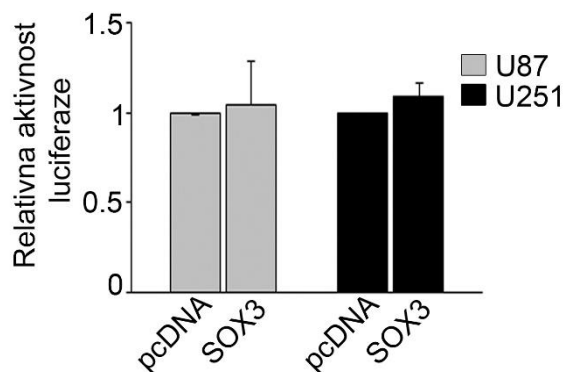


Slika 33. Efekat povećane ekspresije proteina SOX3 na invazivni potencijal U87 i U251 ćelija. Invazivni potencijal kontrolnih U87 i U251 ćelija (pcDNA) i U87 i U251 ćelija transfektovanih ekspresionim konstruktom pcDNA3.1/SOX3 (SOX3) analiziran je primenom Testa invazivnosti (eng. *Transwell invasion assay*). A) Reprezentativni primeri invazije kontrolnih U87 i U251 ćelija (pcDNA) i ćelija transfektovanih ekspresionim konstruktom pcDNA3.1/SOX3 (SOX3) kroz poroznu membranu obloženu sa gornje strane komponentama ekstraćelijskog matriksa. Ćelije su posmatrane 20 h nakon zasejavanja na gornju površinu membrane korišćenjem mikroskopa DM IL LED (Leica), pod uveličanjem od 10x. B) Relativni invazivni potencijal kontrolnih U87 i U251 ćelija (pcDNA) i U87 i U251 ćelija transfektovanih ekspresionim konstruktom pcDNA3.1/SOX3 (SOX3). Invazivni potencijal je određen na osnovu broja ćelija koje su prošle kroz poroznu membranu. Relativni invazivni potencijal U87, odnosno U251 ćelija transfektovanih ekspresionim konstruktom pcDNA3.1/SOX3 (SOX3) prikazan je kao stepen promene broja kontrolnih U87, odnosno U251 ćelija koje su prošle kroz membranu (pcDNA), kojem je dodeljena vrednost 1. Na grafiku su prikazane srednje vrednosti \pm S.D. iz najmanje tri nezavisna eksperimenta. Srednje vrednosti su upoređene Studentovim t-testom. Vrednost $p \leq 0.05$ označena je *.

4.2.10. Analiza efekta povećane ekspresije proteina SOX3 na aktivnost kanonskog WNT signalnog puta u U87 i U251 ćelija

Nakon utvrđivanja efekta povećane ekspresije proteina SOX3 na proliferativni kapacitet, vijabilnost, migratorni i invazivni potencijal ćelija glioblastoma, sledeći korak u istraživanju podrazumevao je otkrivanje molekularnih mehanizama preko kojih protein SOX3 utiče na navedene procese u ovim ćelijama. Podaci iz literature ukazuju da je kanonski WNT signalni put neophodan za pravilno odvijanje procesa razvića [340]. Međutim, u brojnim tumorima aktivnost ovog signalnog puta je izmenjena [340]. Takođe, brojni literaturni podaci ukazuju da nepravilna aktivacija kanonskog WNT signalnog puta promoviše rast i invazivni potencijal ćelija glioblastoma [90]. Imajući u vidu navedene podatke, u okviru ove doktorske disertacije ispitivan je uticaj povećane ekspresije proteina SOX3 na aktivnost WNT signalnog puta. Zlatni standard za izučavanje aktivnosti ovog signalnog puta je luciferazni TOP/FOPFlash reporterski esej [341]. U TOPFlash reporterskom konstrukt uzvodno od reporterskog gena za luciferazu nalaze se tri vezivna mesta za β -katenin/TCF/LEF kompleks. β -katenin je centralni efektor ovog signalnog puta

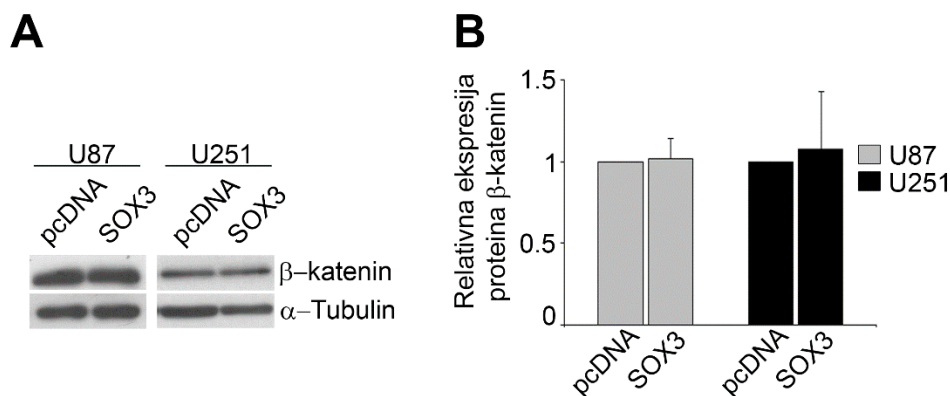
koji se za ciljne sekvence vezuje u kompleksu sa proteinima TCF/LEF [340]. Vezivanjem β -katenin/TCF/LEF kompleksa za vezivna mesta aktivira se transkripcija reporterskog gena [340]. U FOPFlash reporterskom konstrukt ova vezivna mesta su mutirana i ovaj reporterski konstrukt se koristi za merenje nespecifične aktivacije reporterskog gena [341]. Rezultati istraživanja dobijeni korišćenjem ovog reporterskog eseja pokazuju da nema statistički značajnih razlika u aktivnosti luciferaze između U87 i U251 ćelija transfektovanih ekspresionim konstruktom pcDNA3.1/SOX3 (SOX3) i njihovih odgovarajućih kontrolnih U87 i U251 ćelija transfektovanih ekspresionim vektorom pcDNA3.1 (pcDNA) (Slika 34).



Slika 34. Efekat povećane ekspresije proteina SOX3 na aktivnost WNT signalnog puta u U87 i U251 ćelijama. Efekat povećane ekspresije proteina SOX3 na aktivnost luciferaza, koja je merena korišćenjem GloMax 20/20 Luminometra, praćen je korišćenjem luciferaznog TOP/FOPFlash reporterskog eseja. Relativna aktivnost luciferaza kod ćelija transfektovanih ekspresionim konstruktom pcDNA3.1/SOX3 (SOX3) prikazana je kao stepen promene aktivnosti luciferaza kod odgovarajućih kontrolnih ćelija (pcDNA) kojima je dodeljena vrednost 1. Na grafiku su prikazane srednje vrednosti \pm S.D. iz najmanje tri nezavisna eksperimenta. Srednje vrednosti su upoređene Studentovim t-testom.

Pored analize aktivnosti luciferaze, a u cilju izučavanja efekta povećane ekspresije proteina SOX3 na aktivnost WNT signalnog puta, Western blot metodom ispitivan je i nivo ekspresije proteina β -katenina u kontrolnim U87 i U251 ćelijama transfektovanih ekspresionim vektorom pcDNA3.1 (pcDNA) i U87 i U251 ćelijama transfektovanim

ekspresionim konstruktom pcDNA3.1/SOX3 (SOX3). Rezultati Western blot analize pokazuju da nakon transfekcije U87 i U251 ćelija ekspresionim konstruktom pcDNA3.1/SOX3 (SOX3) ne dolazi do promene ekspresije proteina β -katenin u odnosu na nivo ekspresije ovog proteina detektovanog u njihovim odgovarajućim kontrolnim ćelijama (pcDNA) (Slika 35), odnosno ne dolazi do promene aktivnosti WNT signalnog puta u uslovima povećane ekspresije proteina SOX3.



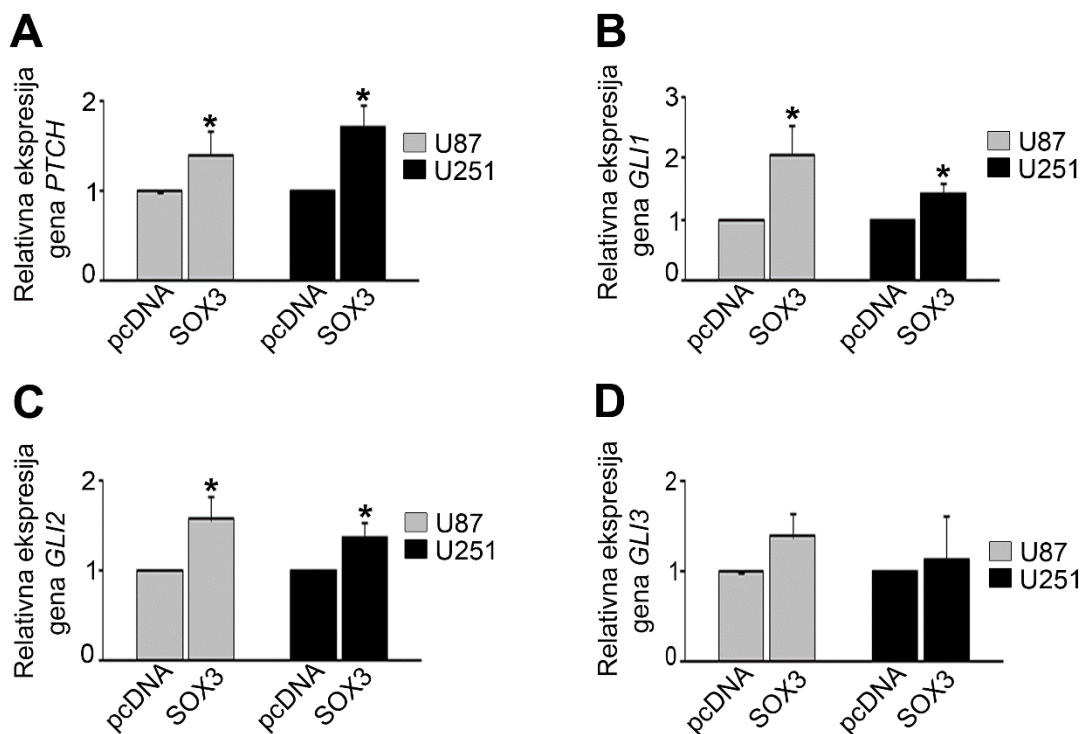
Slika 35. Efekat povećane ekspresije proteina SOX3 na ekspresiju proteina β -katenin u U87 i U251 ćelijama. Ekspresija proteina β -katenin analizirana je primenom Western blot metode. A) Reprezentativni primer Western blot analize ekspresije proteina β -katenin u kontrolnim U87 i U251 ćelijama (pcDNA) i U87 i U251 ćelijama transfektovanim ekspresionim konstruktom pcDNA3.1/SOX3 (SOX3). B) Relativna ekspresija proteina β -katenin u kontrolnim U87 i U251 ćelijama (pcDNA) i U87 i U251 ćelijama transfektovanim ekspresionim konstruktom pcDNA3.1/SOX3 (SOX3). Produkti detektovani nakon Western blot analize su digitalizovani i kvantifikovani uz pomoć ImageJ softvera. Relativna ekspresija proteina β -katenin u U87, odnosno U251 ćelijama transfektovanim pcDNA3.1/SOX3 konstruktom (SOX3) prikazana je kao stepen promene ekspresije ovog proteina detektovane u kontrolnim U87, odnosno U251 ćelijama (pcDNA), kojoj je dodeljena vrednost 1. α -tubulin je korišćen za normalizaciju količine proteina u uzorcima. Na grafiku su predstavljene srednje vrednosti \pm S.D. iz tri nezavisna eksperimenta. Srednje vrednosti su upoređene Studentovim t-testom.

Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da povećanje ekspresija proteina SOX3 ne utiče na aktivnost WNT signalnog puta u ćelijama glioblastoma.

4.2.11. Analiza efekta povećane ekspresije proteina SOX3 na aktivnost HH signalnog puta u U87 i U251 ćelija

Aktivnost HH signalnog puta izmenjena je u različitim tumorima, kao što su glioblastom, meduloblastom, tumori pluća, prostate, dojke i pankreasa [124, 342, 343]. Pokazano je da nepravilna aktivacija ovog signalnog puta promoviše tumorogenezu, progresiju tumora i rezistenciju na terapiju kod glioblastoma [91, 344]. Imajući u vidu ove literaturne podatke, sledeći korak u istraživanju podrazumevao je ispitivanje uticaja povećane ekspresije proteina SOX3 na aktivnost HH signalnog puta u U87 i U251 ćelijama. Aktivnost ovog mehanizma transdukcije signala proučavana je analizom ekspresija gena koji kodira receptor (*PTCH*) i gena koji kodiraju efektore ovog signalnog puta (*GLI1,2,3*) primenom tehnike RT-qPCR. Rezultati ove analize pokazuju da nakon transfekcije U87 i U251 ćelija ekspresionim konstruktom pcDNA3.1/*SOX3* (SOX3) dolazi do povećanja ekspresije gena *PTCH* za više od 1,4 puta u poređenju sa ekspresijom ovog gena detektovanom u njihovim odgovarajućim kontrolnim ćelijama (pcDNA) (Slika 36A). Pored toga, ekspresija gena *GLI1* u U87 i U251 ćelijama transfektovanim ekspresionim konstruktom pcDNA3.1/*SOX3* (SOX3) je povećana za više od 1,4 puta u odnosu na ekspresiju ovog gena u odgovarajućim kontrolnim ćelijama (pcDNA) (Slika 36B). Takođe, u uslovima povećane ekspresije proteina SOX3 detektovano je i povećanje ekspresije gena *GLI2* za više od 1,3 puta u obe ćelijske linije u poređenju sa ekspresijom ovog gena u njihovim odgovarajućim kontrolnim ćelijama (Slika 36C). Istovremeno, statistički značajne razlike u ekspresiji gena *GLI3* nisu detektovane između U87 i U251 sa povećanom ekspresijom proteina SOX3 i njihovih odgovarajućih kontrolnih ćelija (Slika 36D).

Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da povećana ekspresija proteina SOX3 promoviše aktivnost HH signalnog puta u ćelijama glioblastoma.



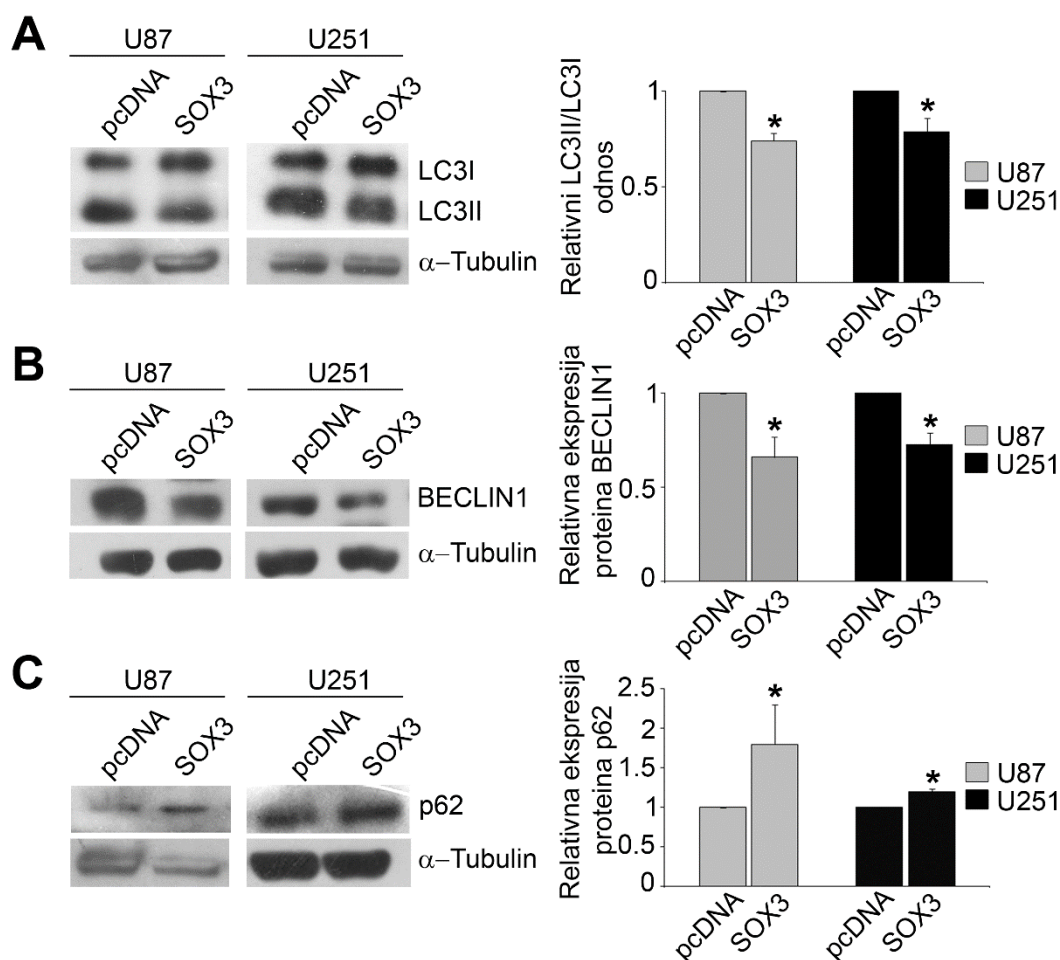
Slika 36. Efekat povećane ekspresije proteina SOX3 na aktivnost HH signalnog puta. Metodom RT-qPCR analizirana je ekspresija gena A) *PTCH*, B) *GLI1*, C) *GLI2* i D) *GLI3* nakon transfekcije U87 i U251 ćelija ekspresionim vektorom pcDNA3.1 (pcDNA) i ekspresionim konstruktom pcDNA3.1/SOX3 (SOX3). Kvantifikacija rezultata dobijenih metodom RT-qPCR predstavljena je grafikom. Nivo ekspresije gena *PTCH*, *GLI1*, *GLI2* i *GLI3* normalizovan je u odnosu na ekspresiju gena *GAPDH* u istom uzorku. Relativni nivo ekspresije gena *PTCH*, *GLI1*, *GLI2* i *GLI3* u ćelijama transfektovanim ekspresionim konstruktom pcDNA3.1/SOX3 (SOX3) izražen je kao stepen promene ekspresije ovih gena u kontrolnim ćelijama (pcDNA), kojoj je dodeljena vrednost 1. Na grafiku su prikazane srednje vrednosti \pm S.D. iz najmanje tri nezavisna eksperimenta. Srednje vrednosti su upoređene Studentovim t-testom. Vrednost $p \leq 0.05$ označena je *.

4.2.12. Analiza efekta povećane ekspresije proteina SOX3 na proces autofagije u U87 i U251 ćelija

Literaturni podaci ukazuju na značajnu funkciju autofagije u tumorigenezi [345, 346]. Pokazano je da autofagija ima dvojaku ulogu u tumorskim ćelijama; ovaj proces može da promoviše ili inhibira rast tumora [92, 345-350]. Naime, uočeno je da uloga

autofagije u tumorskim ćelijama zavisi od tipa ćelija, tipa tumora i faze tumorogeneze [92, 347-350]. Imajući u vidu da autofagija može da ima dvojak u ulogu u tumorskim ćelijama, sledeći korak u istraživanju podrazumevao je ispitivanje uticaja povećane ekspresije proteina SOX3 na proces autofagije u U87 i U251 ćelijama. Primenom Western blot metode analizirana je konverzija proteina LC3-I u LC3-II i ekspresija proteina markera autofagije, p62 i BECLIN1. Autofagiju karakteriše konverzija proteina LC3-I u LC3-II, degradacija proteina p62 u autofagozomima i povećanje ekspresije proteina BECLIN1 [129]. Western blot metodom detektovano je smanjenje konverzije proteina LC3-I u LC3-II za više od 1,2 puta u U87 i U251 ćelijama transfektovanim ekspresionim konstruktom pcDNA3.1/SOX3 (SOX3) u poređenju sa stepenom konverzije ovog proteina u njihovim odgovarajućim kontrolnim ćelijama (pcDNA) (Slika 37A). Takođe, kod U87 i U251 ćelija transfektovanih ekspresionim konstruktom pcDNA3.1/SOX3 detektovano je smanjenje ekspresije proteina BECLIN1 za približno 30% u poređenju sa ekspresijom ovog proteina u njihovim odgovarajućim kontrolnim ćelijama (pcDNA) (Slika 37B). Pored toga, detektovano je povećanje ekspresija proteina p62 u U87 (za oko 1,8 puta) i U251 (za oko 1,2 puta) ćelijama transfektovanim ekspresionim konstruktom pcDNA3.1/SOX3 (SOX3) u poređenju sa ekspresijom ovog proteina u njihovim odgovarajućim kontrolama (pcDNA) (Slika 37C).

Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da povećanje ekspresije proteina SOX3 ima inhibitorski efekat na proces autofagije u ćelijama glioblastoma.



Slika 37. Efekat povećane ekspresije proteina SOX3 na proces autofagije u U87 i U251 ćelijama. A) Reprezentativni primer Western blot analize ekspresije proteina LC3I i LC3II i grafički prikaz odnosa relativne ekspresije proteina LC3II i LC3I (LC3II/LC3I) u kontrolnim U87 i U251 ćelijama (pcDNA) i U87 i U251 ćelijama transfektovanim ekspresionim konstruktom pcDNA3.1/SOX3 (SOX3). α -tubulin je korišćen za normalizaciju količine proteina u uzorcima. Produkti detektovani nakon Western blot analize su digitalizovani i kvantifikovani uz pomoć ImageJ softvera. Relativni odnos ekspresije proteina LC3II/LC3I u ćelijama transfektovanim konstruktom pcDNA3.1/SOX3 (SOX3) prikazan je kao stepen promene odnosa ekspresije proteina LC3II/LC3I u kontrolnim ćelijama (pcDNA) kojem je dodeljena vrednost 1. Na grafiku su prikazane srednje vrednosti \pm S.D. iz najmanje tri nezavisna eksperimenta. Srednje vrednosti su upoređene Studentovim t-testom. Vrednost $p \leq 0.05$ označena je *. B) Reprezentativni primer Western blot analize ekspresije proteina BECLIN1 i grafički prikaz relativne ekspresije proteina BECLIN1 u kontrolnim U87 i U251 ćelijama (pcDNA) i U87 i U251 ćelijama transfektovanim ekspresionim konstruktom pcDNA3.1/SOX3 (SOX3). α -tubulin je korišćen za normalizaciju količine proteina u uzorcima. Produkti detektovani nakon Western blot analize su digitalizovani i kvantifikovani uz pomoć ImageJ softvera. Relativna ekspresija proteina BECLIN1

u ćelijama transfektovanim ekspresionim konstruktom pcDNA3.1/SOX3 (SOX3) prikazana je kao stepen promene ekspresije ovog proteina u kontrolnim ćelijama (pcDNA) kojoj je dodeljena vrednost 1. Na grafiku su prikazane srednje vrednosti \pm S.D. iz najmanje tri nezavisna eksperimenta. Srednje vrednosti su upoređene Studentovim t-testom. Vrednost $p \leq 0.05$ označena je *. C) Reprezentativni primer Western blot analize ekspresije proteina p62 i grafički prikaz relativne ekspresije proteina p62 u kontrolnim U87 i U251 ćelijama (pcDNA) i U87 i U251 ćelijama transfektovanim ekspresionim konstruktom pcDNA3.1/SOX3 (SOX3). α -tubulin je korišćen za normalizaciju količine proteina u uzorcima. Produkti detektovani nakon Western blot analize su digitalizovani i kvantifikovani uz pomoć ImageJ softvera. Relativna ekspresija proteina p62 u ćelijama transfektovanim ekspresionim konstruktom pcDNA3.1/SOX3 (SOX3) prikazana je kao stepen promene ekspresije ovog proteina detektovane u kontrolnim ćelijama (pcDNA) kojoj je dodeljena vrednost 1. Na grafiku su prikazane srednje vrednosti \pm S.D. iz najmanje tri nezavisna eksperimenta. Srednje vrednosti su upoređene Studentovim t-testom. Vrednost $p \leq 0.05$ označena je *.

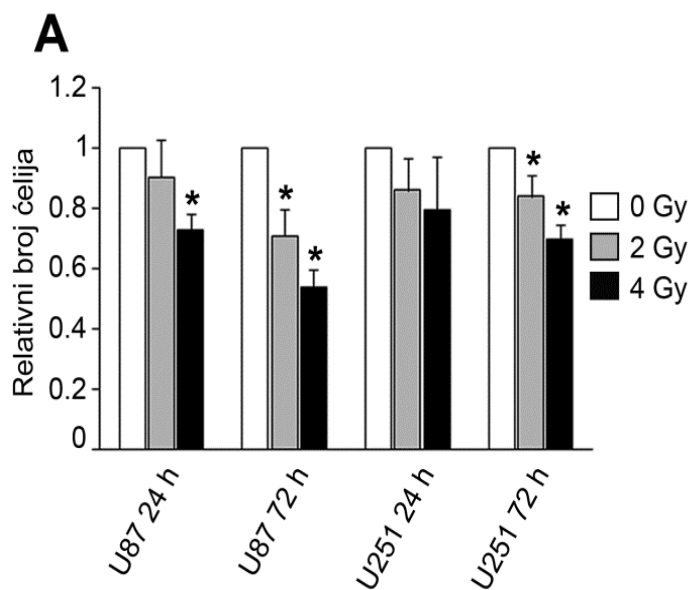
4.2.13. Analiza efekta radio- i hemio- terapije na ekspresiju gena SOX3 u U87 i U251 ćelijama

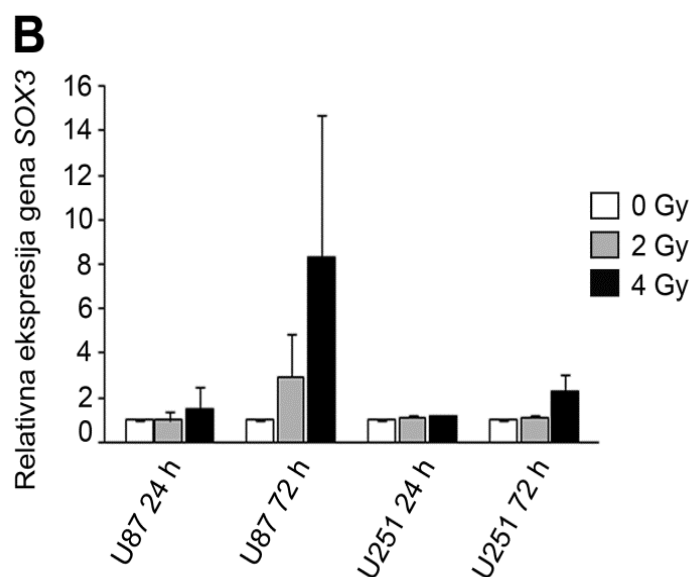
Standardni tretman bolesnika sa glioblastomom podrazumeva hirurško uklanjanje tumora koje je zatim praćeno radio- i hemio-terapijom [89]. Imajući u vidu ove podatke, u okviru ove doktorske disertacije ispitivan je i uticaj radio- i hemio-terapije na ekspresiju gena SOX3 u U87 i U251 ćelijskim linijama.

Za analizu uticaja radioterapije na ekspresiju gena SOX3, U87 i U251 ćelije su izložene γ zračenju jačine 2 ili 4 Gy. Efekat zračenja na ekspresiju gena SOX3 praćen je nakon 24 i 72 h. Prvi korak u proučavanju efekta radioterapije na ekspresiju gena SOX3 obuhvatao je analizu uticaja radijacije na broj živih U87 i U251 ćelija. Broj živih U87 i U251 ćelija analiziran je 24 i 72 h nakon izlaganja zračenju. Rezultati istraživanja pokazuju da 24 h nakon izlaganja zračenju dolazi do smanjenja broja živih U87 ćelija ozračenih sa 4 Gy u poređenju sa brojem živih neozračenih U87 ćelija. Pored toga, 72 h od izlaganja zračenju dolazi do smanjenja broja živih U87 ćelija ozračenih sa 2 i 4 Gy u poređenju sa brojem živih neozračenih U87 ćelija (Slika 38A). Dvadeset četiri sata nakon izlaganja zračenju U251 ćelija dozama od 2 i 4 Gy nije detektovana razlika u broju živih ozračenih U251 ćelija i broju živih U251 ćelije koje nisu bile izložene zračenju (Slika 38A). Nasuprot tome, 72 h nakon izlaganja U251 ćelija zračenju od 2 i 4 Gy detektovano je statistički

značajno smanjenje broja živih ćelija u poređenju sa brojem živih U251 ćelija koje nisu bile izložene zračenju (Slika 38A). Nakon utvrđivanja broja živih ćelija, primenom tehnike RT-qPCR ispitivana je ekspresija gena *SOX3* kod U87 i U251 ćelija izloženih γ zračenju jačine 2 ili 4 Gy. Dobijeni rezultati pokazuju da 24 i 72 sata nakon izlaganja ćelija zračenju nema statistički značajnih razlika u ekspresiji gena *SOX3* između U87 i U251 ćelija izloženih zračenju od 2 i 4 Gy i njihovih odgovarajućih kontrolnih ćelija (Slika 38B).

Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da radioterapija u kojoj se koristi γ zračenje jačine 2 ili 4 Gy ne dovodi do promene ekspresije gena *SOX3* u ćelijama GBM.



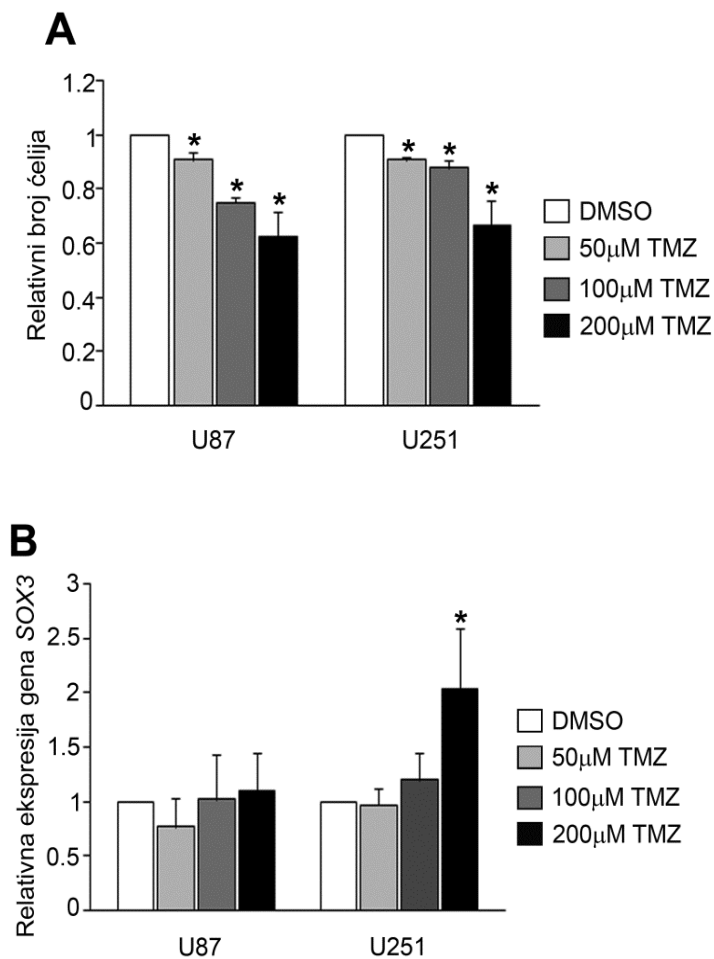


Slika 38. Efekat γ zračenja na broj ćelija i ekspresiju gena *SOX3* u U87 i U251 ćelijama. A) Efekat γ zračenja na broj živih U87 i U251 ćelija. Ćelije su ozračene sa 2 ili 4 Gy, dok kontrola predstavlja ćelije koje nisu izložene zračenju (0 Gy). Broj živih ćelija analiziran je 24 i 72 h nakon izlaganja ćelija radijaciji. Relativni broj živih U87 i U251 ćelija nakon izlaganja zračenju jačine 2 ili 4 Gy prikazan je kao stepen promene broja njihovih odgovarajućih kontrolnih ćelija koje nisu bile izložene zračenju (0 Gy) kojem je dodeljena vrednost 1. Na grafiku su prikazane srednje vrednosti \pm S.D. iz tri nezavisna eksperimenta. Srednje vrednosti su upoređene Studentovim t-testom. Vrednost $p \leq 0.05$ označena je *. B) Efekat γ zračenja na ekspresiju gena *SOX3* u U87 i U251 ćelijama. Ćelije su zračene sa 2 i 4 Gy, dok kontrola predstavlja ćelije koje nisu izložene zračenju (0 Gy). Ekspresija gena *SOX3* analizirana je 24 i 72 h nakon izlaganja ćelija radijaciji. Nivo ekspresije gena *SOX3* u uzorku normalizovan je u odnosu na ekspresiju gena *GAPDH* u istom uzorku. Relativni nivo ekspresije gena *SOX3* u ozračenim ćelijama prikazan je kao stepen promene ekspresiju ovog gena detektovane u odgovarajućim kontrolnim ćelijama koje nisu izložene zračenju (0 Gy), kojoj je dodeljena vrednost 1. Na grafiku su prikazane srednje vrednosti \pm S.D. iz tri nezavisna eksperimenta. Srednje vrednosti su upoređene Studentovim t-testom.

U cilju ispitivanja uticaja hemioterapije na ekspresiju gena *SOX3*, U87 i U251 ćelije su tretirane sa 50, 100 i 200 μ M temozolomidom u trajanja od 72 h. Po isteku tretmana utvrđivan je broj živih ćelija. Dobijeni rezultati pokazuju da korišćene koncentracije temozolomida dovode do statistički značajnog smanjenja broja živih U87 i U251 ćelija u poređenju sa brojem ćelija kod njihovih odgovarajućih kontrola (U87 i U251 ćelije tretirane

DMSO-om) (Slika 39A). Naime, pri tretmanu U87 i U251 ćelija 50 μM temozolomidom detektovano je smanjenje broja živih ćelija za oko 10 %, dok je pri tretmanu ovih ćelija 100 μM temozolomidom detektovano smanjenje broja živih ćelija za oko 25% (U87), odnosno 15% (U251) u poređenju sa brojem živih kontrolnih ćelija. Efekat temozolomida na broj živih ćelija bio je najizraženiji pri tretmanu U87 i U251 ćelija 200 μM temozolomidom (smanjenje broja živih ćelija za oko 35% u poređenju sa brojem živih kontrolnih ćelija). Po utvrđivanju broja živih U87 i U251 ćelija nakon tretmana temozolomidom, sledeći korak u istraživanju obuhvatao je ispitivanje uticaja tretmana temozolomidom na ekspresija gena *SOX3* u U87 i U251 ćelijama. Tretman U87 ćelija različitim koncentracijama temozolomida nije doveo do statistički značajne promene ekspresije gena *SOX3* u ovim ćelijama u poređenju sa ekspresijom ovog gena detektovanom u kontrolnim U87 ćelijama (DMSO-om tretirane ćelije) (Slika 39B). Pored toga, tretman U251 ćelija sa 50 i 100 μM temozolomidom nije doveo do statistički značajne promene ekspresije gena *SOX3* u ovim ćelijama u poređenju sa ekspresijom ovog gena detektovanom u kontrolnim U251 ćelijama. Sa druge strane, tretman U251 ćelija 200 μM temozolomidom doveo je do statistički značajnog povećanja ekspresije gena *SOX3* u ovim ćelijama (oko 2 puta) u odnosu na ekspresiju ovog gena detektovanu u kontrolnim, DMSO-om tretiranim U251 ćelijama (Slika 39B).

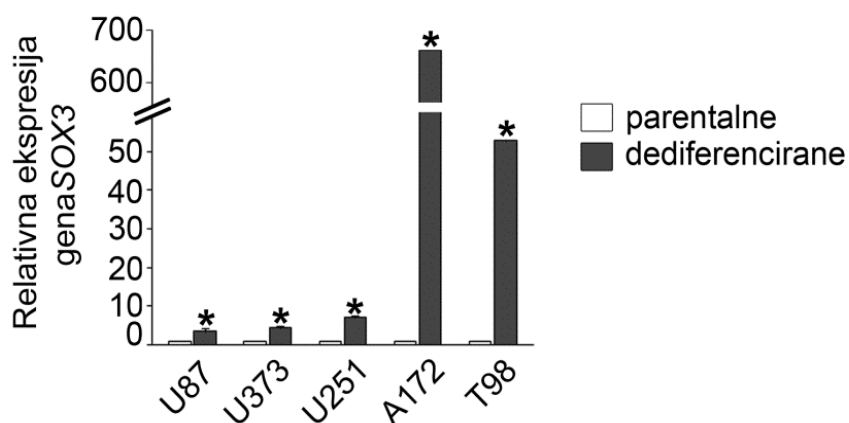
Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da efekat temozolomida na ekspresiju gena *SOX3* u ćelijama glioblastoma zavisi od koncentracije (doze) temozolomida i tipa ćelija.



Slika 39. Efekat tretmana temozolomidom (TMZ) na broj ćelija i ekspresiju gena *SOX3* u U87 i U251 ćelijama. A) Efekat tretmana temozolomidom na broj živih U87 i U251 ćelija. Ćelije su tretirane 72 h sa 50, 100 i 200 μ M temozolomidom (TMZ), dok su kao kontrola korišćene U87 i U251 ćelije tretirane DMSO-om. Broj živih ćelija analiziran je nakon završetka tretmana ćelija. Relativni broj živih ćelija nakon tretmana različitim koncentracijama temozolomida izračunat je kao stepen promene broja živih kontrolnih ćelija, kojem je dodeljena vrednost 1. Na grafiku su prikazane srednje vrednosti \pm S.D. iz tri nezavisna eksperimenta. Srednje vrednosti su upoređene Studentovim t-testom. Vrednost $p \leq 0.05$ označena je *. B) Efekat tretmana temozolomidom na ekspresiju gena *SOX3* u U87 i U251 ćelijama. Ćelije su tretirane 50, 100 i 200 μ M temozolomidom (TMZ), dok su kontrolne ćelije tretirane DMSO-om. Tretman je trajao 72 h nakon čega je analizirana ekspresija gena *SOX3*. Nivo ekspresije gena *SOX3* u svakom od uzoraka normalizovan je u odnosu na ekspresiju gena *GAPDH* u istom uzorku. Relativni nivo ekspresije gena *SOX3* u ćelijama tretiranim temozolomidom (TMZ) prikazan je kao stepen promene ekspresije ovog gena u kontrolnim ćelijama, kojoj je dodeljena vrednost 1. Na grafiku su prikazane srednje vrednosti \pm S.D. iz tri nezavisna eksperimenta. Srednje vrednosti su upoređene Studentovim t-testom. Vrednost $p \leq 0.05$ označena je *

4.2.14. Analiza ekspresije gena *SOX3* u matičnim ćelijama glioblastoma

Imajući u vidu podatak da gen *SOX3* ima bitnu ulogu tokom razvića nervnog sistema [351-353] i hipotezu da matične ćelije GBM, koje se smatraju odgovornim za nastanak, progresiju, rezistenciju na terapiju i relaps tumora [80, 87], mogu da nastanu procesom dediferencijacije tumorskih ćelija, u kome bitnu ulogu imaju regulatorni proteini koji su uključeni u proces razvića [232], u okviru ove doktorske disertacije analizirana je ekspresija gena *SOX3* nakon dediferencijacije ćelijskih linija GBM (U87, U373, U251, A172 i T98) korišćenjem metoda RT-qPCR. Primenom ove metode kod svih analiziranih dediferenciranih ćelijskih linija detektovano je statistički značajno povećanje ekspresije gena *SOX3* u poređenju sa ekspresijom uočenom u njihovim parentalnim ćelijama (Slika 40A). Najveće povećanje ekspresije ovog gena detektovano je nakon dediferencijacije ćelija A172 (povećanje oko 690 puta u poređenju sa ekspresijom detektovanom u parentalnim ćelijama) i T98 (povećanje oko 50 puta u poređenju sa ekspresijom detektovanom u parentalnim ćelijama). Istovremeno, nakon dediferencijacije U87 ćelija detektovano je povećanje ekspresije gena *SOX3* za oko 3,5 puta, U373 ćelija za oko 4,4 puta, a nakon dediferencijacije U251 ćelija za oko 7,1 puta u odnosu na ekspresiju detektovanu u odgovarajućim parentalnim ćelijama (Slika 40).



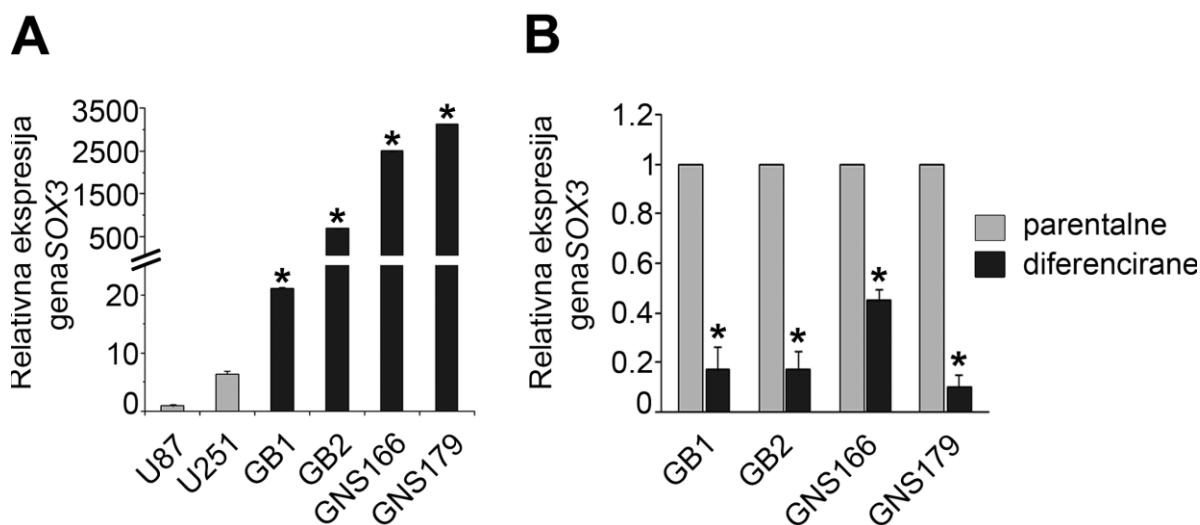
Slika 40. Ekspresija gena *SOX3* u dediferenciranim ćelijskim linijama poreklom od glioblastoma. Nivo ekspresije gena *SOX3* u svakom od uzoraka normalizovan je u odnosu na ekspresiju gena *GAPDH* u istom

uzorku. Relativna ekspresija gena *SOX3* u dediferenciranim ćelijama prikazana je kao stepen promene ekspresije detektovane u odgovarajućim parentalnim ćelijama, kojoj je dodeljena vrednost 1. Na grafiku su prikazane srednje vrednosti \pm S.D. iz najmanje tri nezavisna eksperimenta. Srednje vrednosti su statistički upoređene Studentovim *t*-testom. Vrednost $p \leq 0.05$ označena je *

Pored hipoteze o nastanku GMĆ dediferencijacijom tumorskih ćelija, u literaturi je opisana i hipoteza o nastanku GMĆ od neuralnih matičnih ćelija koje su prošle kroz procese genetičkih i epigenetičkih promena [336]. Imajući u vidu da je *SOX3* marker neuralnih matičnih ćelija, u okviru ove doktorske disertacije analizirana je i ekspresija ovog gena u kulturama matičnih ćelija glioblastoma izolovanih iz tumora bolesnika. Ekspresija gena *SOX3* analizirana je primenom metode RT-qPCR u 4 kulture GMĆ (GB1, GB2, GNS166 i GNS179) i upoređena sa ekspresijom ovog gena u U87 i U251 ćelijskim linijama poreklom od glioblastoma. Rezultati ove analize pokazuju da je u svakoj od analiziranih kultura GMĆ detektovana relativno visoka ekspresija gena *SOX3* (povećanje od 20 do 3153 puta u poređenju sa ekspresijom ovog gena u imortalizovanoj ćelijskoj liniji GBM, U87) (Slika 41A).

U cilju ispitivanja da li visok nivo ekspresije gena *SOX3* koreliše sa nediferenciranim stanjem ćelija glioblastoma, naredni eksperimentalni korak obuhvatao je diferencijaciju kultura GMĆ i analizu ekspresije ovog gena u diferenciranim GMĆ. Rezultati RT-qPCR analize pokazuju da je ekspresija gena *SOX3* u diferenciranim kulturama GMĆ relativno niža u poređenju sa ekspresijom ovog gena u nediferenciranim parentalnim ćelijama (Slika 41B). Naime, ekspresija gena *SOX3* smanjuje se u opsegu od 55% do 90% nakon diferencijacije GB1, GB2, GNS166 i GNS179 ćelija u odnosu na ekspresiju ovog gena detektovanu u odgovarajućim nediferencirane GMĆ (Slika 41B).

Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da je gen *SOX3* potencijalni marker GMĆ, kao i da visoka ekspresija ovog gena koreliše sa nediferenciranim stanjem GMĆ što nam ukazuje na potencijalnu ulogu gena *SOX3* u održavanju matičnosti GMĆ.



Slika 41. Ekspresija gena *SOX3* u matičnim ćelijama glioblastoma. A) Ekspresija gena *SOX3* u permanentnim ćelijskim linijama poreklom od glioblastoma (U87 i U251) i kulturama matičnih ćelija GBM (GB1, GB2, GNS166 i GNS179). Nivo ekspresije gena *SOX3* u svakom od uzoraka normalizovan je u odnosu na ekspresiju gena *GAPDH* u istom uzorku. Relativna ekspresija gena *SOX3* u U251 ćelijama i kulturama matičnih ćelija GMC prikazana je kao stepen promene ekspresije ovog gena detektovane u U87 ćelijama, kojoj je dodeljena vrednost 1. Na grafiku su prikazane srednje vrednosti \pm S.D. iz tri nezavisna eksperimenta. Srednje vrednosti su statistički upoređene Studentovim *t*-testom. Vrednost $p \leq 0.05$ označena je * B) Ekspresija gena *SOX3* nakon diferencijacije kultura matičnih ćelija glioblastoma. Nivo ekspresije gena *SOX3* u svakom od uzorka normalizovan je u odnosu na ekspresiju gena *GAPDH* u istom uzorku. Relativna ekspresija gena *SOX3* u diferenciranim kulturama matičnih ćelija glioblastoma prikazana je kao stepen promene ekspresije detektovane u odgovarajućim parentalnim ćelijama, kojoj je dodeljena vrednost 1. Na grafiku su prikazane srednje vrednosti \pm S.D. iz tri nezavisna eksperimenta. Srednje vrednosti su statistički upoređene Studentovim *t*-testom. Vrednost $p \leq 0.05$ označena je *

4.3. Analiza uticaja retinoične kiseline na karakteristike U251 ćelija glioblastoma

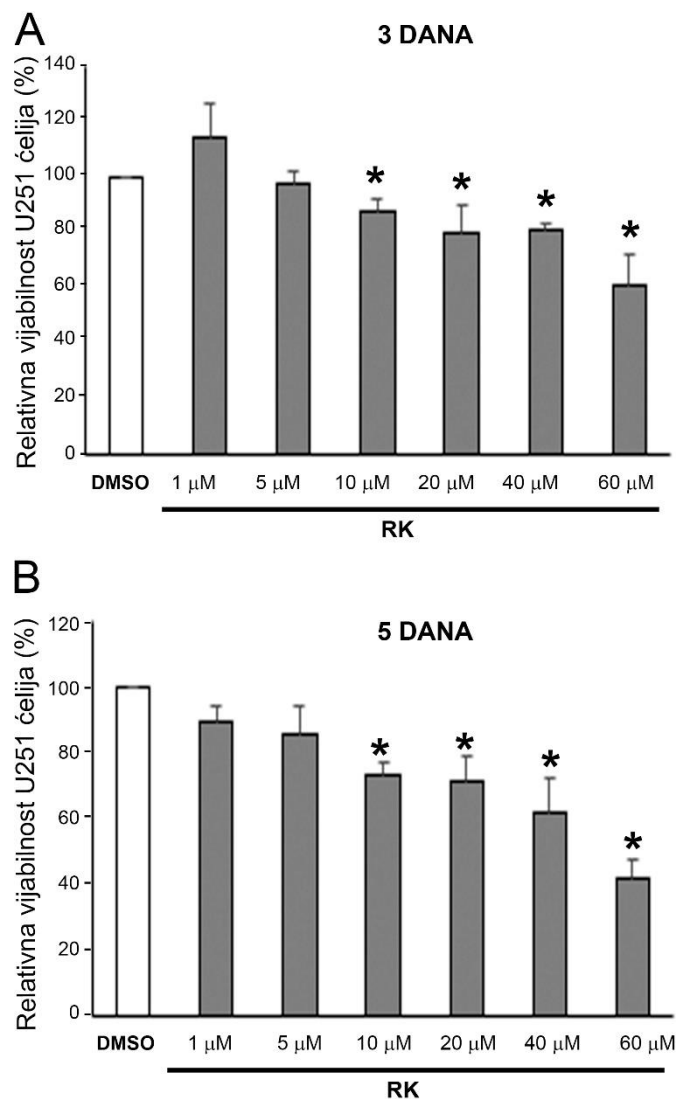
4.3.1. Analiza uticaja retinoične kiseline na vijabilnost U251 ćelija

Literaturni podaci ukazuju da *all-trans* retinoična kiselina ispoljava antitumorska dejstva kod različitih tipova tumorskih ćelija [293-298]. Sa druge strane, podaci iz literature o efektu RK na maligne karakteristike ćelija GBM su kontradiktorni [299-306]. Imajući u

vidu ove podatke u okviru ove doktorske disertacije analiziran je i uticaj RK na karakteristike U251 ćelija glioblastoma.

Prvi korak u istraživanju obuhvatao je analizu uticaja RK na vijabilnost U251 ćelija. Za potrebe ove analize ćelije su tretirane 3 i 5 dana različitim rastućim koncentracijama RK (1, 5, 10, 20, 40 i 60 μM). Nakon isteka tretmana RK-om, vijabilnost ćelija analizirana je primenom MTT testa. Rezultati ovog testa pokazali su da nema statistički značajnih razlika u vijabilnosti U251 ćelija gajenih 3 i 5 dana u medijumu koji je sadržao 1 i 5 μM RK i kontrolnih U251 ćelija gajenih 3 i 5 dana u medijumu koji je sadržao DMSO (Slika 42). Nasuprot tome, statistički značajne razlike u vijabilnosti detektovane su između U251 ćelija gajenih 3 i 5 dana u medijumu koji je sadržao 10, 20, 40 ili 60 μM RK i kontrolnih U251 ćelija gajenih 3 i 5 dana u medijumu koji je sadržao DMSO. Naime, rezultati MTT testa su pokazali da je vijabilnost U251 ćelija gajenih 3 i 5 dana u medijumom koji je sadržao 10, 20, 40 ili 60 μM RK smanjena u poređenju sa vijabilnošću ćelija gajenih u istom periodu u medijumu koji je sadržao DMSO (Slika 42). Pored toga, uočeno je da je smanjenje vijabilnosti U251 ćelija bilo izraženije nakon petodnevnog tretmana u medijumu koji je sadržao 10, 20, 40 ili 60 μM RK u poređenju sa trodnevnim tretmanom. Takođe, smanjenje vijabilnost ćelija je bilo najizraženije nakon gajenja U251 ćelija u medijumu koji je sadržao 60 μM RK. Naime, nakon 3 dana gajenja ćelija u medijumu koji je sadržao 60 μM RK vijabilnost ćelija je bila smanjena za približno 40% (Slika 42A), dok je nakon 5 dana tretmana vijabilnost bila smanjena za približno 60% u poređenju sa vijabilnošću odgovarajućih kontrolnih U251 ćelija gajenih 3, odnosno 5 dana u medijumu koji je sadržao DMSO (Slika 42B).

Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da RK smanjuje vijabilnost U251 ćelija glioblastoma na dozno- i vremensko-zavisani način.



Slika 42. Efekat retinoične kiseline na vijabilnost U251 ćelija. U251 ćelije su gajene u medijumu koji je sadržao 1, 5, 10, 20, 40 ili 60 μM RK 3 dana (A) i 5 dana (B). Relativna vijabilnost U251 ćelija tretiranih različitim koncentracijama RK prikazana je kao stepen promene vijabilnosti njihovih odgovarajućih kontrolnih ćelija tretiranih DMSO-om, kojoj je dodeljena vrednost 100%. Na grafiku su prikazane srednje vrednosti ± S.D. iz tri nezavisna eksperimenta. Srednje vrednosti su upoređene Studentovim t-testom. Vrednost $p \leq 0.05$ označena je *.

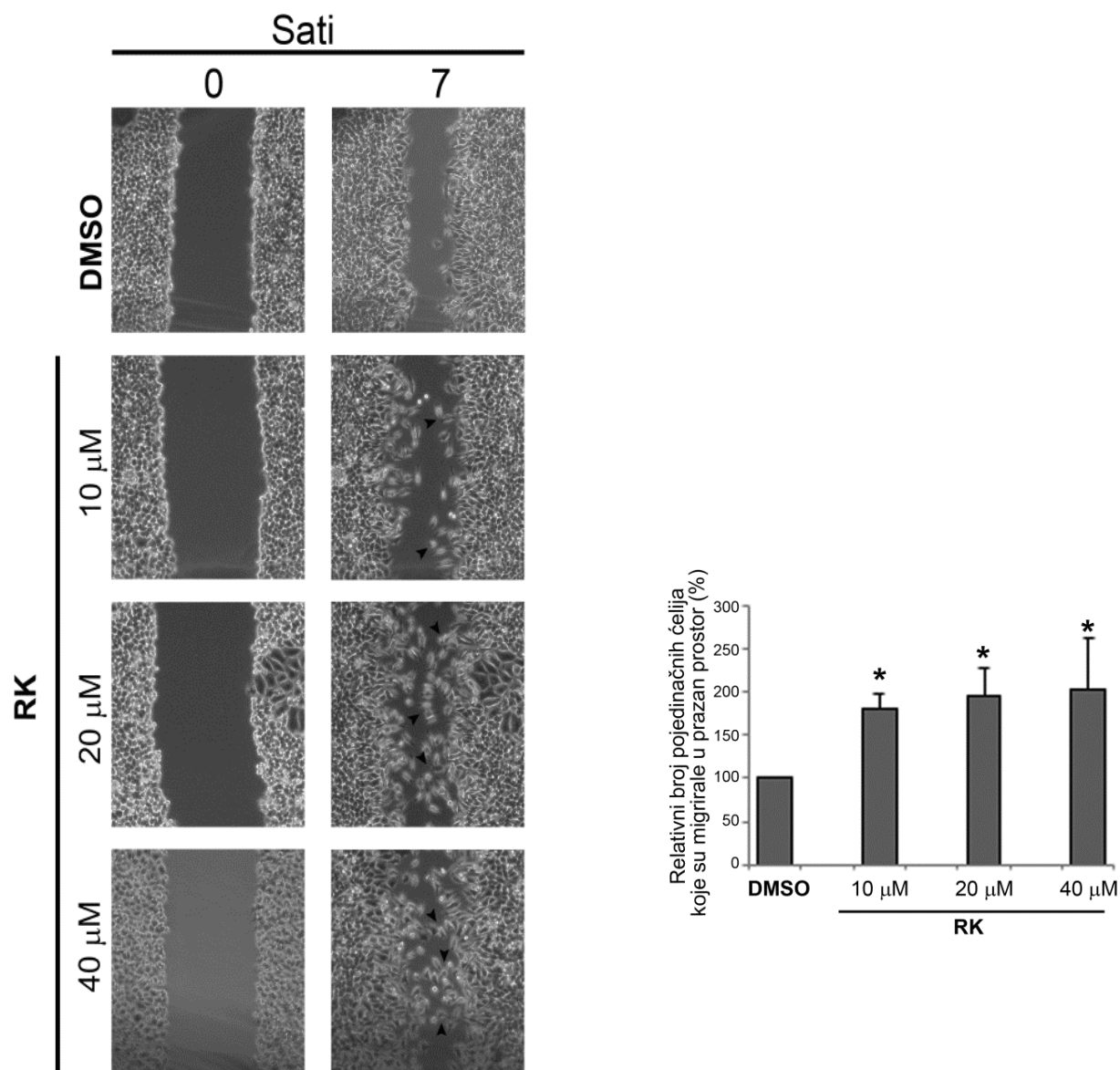
Imajući u vidu dobijene rezultate u daljem ispitivanju efekta RK na karakteristike U251 ćelija glioblastoma, ove ćelije su gajene u medijumu koji je sadržao 10, 20 ili 40 μM RK u vremenu trajanja od 5 dana. U daljim istraživanjima nije korišćena 60 μM RK

imajući u vidu da je pri korišćenju ove koncentracije RK detektovan najveći citotoksični efekat na U251 ćelije.

4.3.2. Analiza efekta retinoične kiseline na migratorni potencijal U251 ćelija

Kako metastaziranje tumora uključuje i sposobnost malignih ćelija da migriraju [13], naredni korak u istraživanju podrazumevao je analizu efekta RK na migratorni potencijal U251 ćelija. Migratorni potencijal U251 ćelija gajenih u medijumu koji je sadržao 10, 20 ili 40 μM RK analiziran je primenom Testa zarastanje povrede (eng. *scratch wound healing assay*) nakon 5 dana tretmana. Popunjavanje praznog prostora ćelijama analizirano je 7 h nakon nanošenja povrede. Rezultati primenjenog testa pokazuju da kontrolne, DMSO-om tretirane ćelije uglavnom kohezivno migriraju u prazan prostor (zajedničkim napredovanjem ćelija koje se nalaze na ivicama povređenog mesta), dok RK tretirane ćelije uglavnom migriraju u prazan prostor kao pojedinačne ćelije i na taj način ga popunjavaju (Slika 43). Naime, oko dva puta više pojedinačnih U251 ćelija detektovano je u praznom prostoru nakon 5 dana tretmana različitim koncentracijama RK u poređenju sa brojem pojedinačnih ćelija u praznom prostoru uočenim nakon 5 dana tretmana U251 ćelija DMSO-om. Istovremeno, statistički značajne razlike u relativnom broju pojedinačnih ćelija koje su migrirale u prazan prostor nisu uočene između U251 ćelija gajenih u medijumu koji sadrži 10, 20 i 40 μM RK.

Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da tretman U251 ćelija RK menja način migracije ovih ćelija, od kolektivnog ka migraciji pojedinačnih ćelija u prazan prostor.



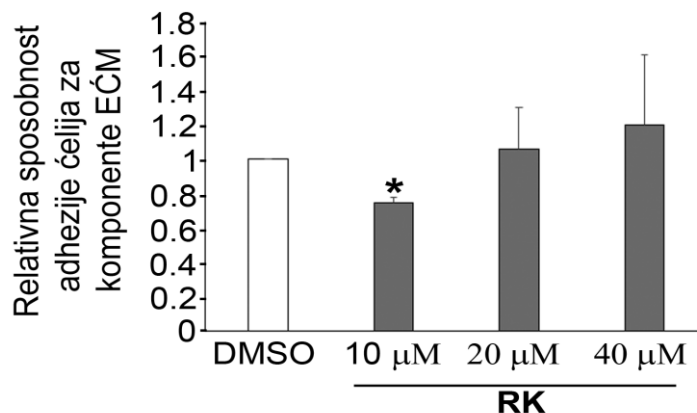
Slika 43. Efekat retinoične kiseline na migratorni potencijal U251 ćelija. A) Reprezentativni primer primene Testa zarastanja povrede za analizu migratornog potencijala U251 ćelija gajenih 5 dana u medijumu koji je sadržao DMSO, 10, 20 ili 40 μM RK. Ćelije su posmatrane mikroskopom DM IL LED (Leica) pod uveličanjem od 10x u momentu nanošenja povrede i 7 h nakon nanošenja povrede. 0, 7 – sati od momenta nanošenja povrede (formiranja praznog prostora). Crni trouglovi pokazuju pojedinačne ćelije koje su migrirale u prazan prostor. B) Relativni broj pojedinačnih U251 ćelija koje su migrirale u prazan prostor nakon petodnevnog gajenja u medijumu koji je sadržao DMSO-om, 10, 20 ili 40 μM RK. Relativni broj pojedinačnih U251 ćelija tretiranih RK koje su migrirale u prazan prostor prikazan je stepen promene broja pojedinačnih U251 ćelija tretiranih DMSO-om koje su migrirale u prazan prostor, kojem je dodeljena

vrednost 100%. Na grafiku su prikazane srednje vrednosti \pm S.D. tri nezavisna eksperimenta. Srednje vrednosti su statistički upoređene Studentovim t -testom. Vrednost $p \leq 0.05$ označena je *.

4.3.3. Analiza efekta retinoične kiseline na sposobnost adhezije U251 ćelija za komponente ekstraćelijskog matriksa

Kako literaturni podaci ukazuju da sposobnost tumorskih ćelija da metastaziraju zavisi od njihovih mogućnosti da se vežu za komponente ekstraćelijskog matriksa (EĆM) i degraduju ih [354, 355], u okviru ove doktorske disertacije analizirano je i da li RK utiče na sposobnost adhezije U251 ćelija za komponente ekstraćelijskog matriksa. Adhezivna sposobnost U251 ćelija tretiranih RK analizirana je primenom Testa za analizu adhezije ćelija za komponente EĆM. Za potrebe ove analize U251 ćelije su gajene 5 dana u medijumu koji je sadržao DMSO, 10, 20 i 40 μ M RK nakon čega su zasejane u bunariće mikrotitar ploče prethodno obložene EĆM. Rezultati primenjenog Testa pokazuju da gajenje ćelija u medijumu koji je sadržao 10 μ M RK dovodi do smanjenja za oko 20% broja U251 ćelija koje adheriraju za komponente EĆM u poređenju sa brojem U251 ćelija tretiranih DMSO-om koji adheriraju za komponente EĆM (Slika 44). Istovremeno, statistički značajne razlike u broju ćelija koje adheriraju za komponente EĆM nisu detektovane između U251 ćelija gajenih u medijumu koji je sadržao 20 i 40 μ M RK i kontrolnih U251 ćelija gajenih u medijumu koji je sadržao DMSO (Slika 44).

Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da efekat RK na sposobnost adhezije U251 ćelija glioblastoma za komponente EĆM zavisi od primenjene koncentracije RK.



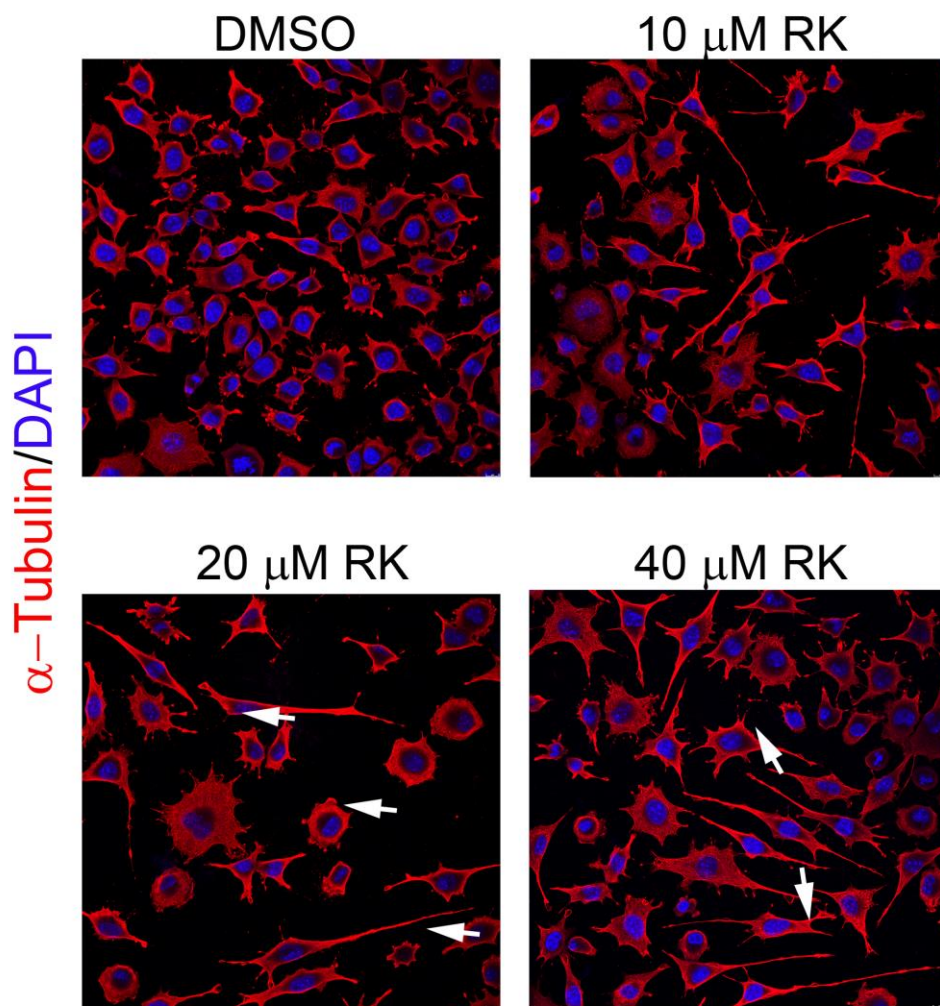
Slika 44. Analiza efekta RK na sposobnost adhezija U251 ćelija za komponente EĆM. Sposobnost adhezije U251 ćelija za komponente EĆM analizirana je nakon 5 dana gajenja ćelija u medijumu koji je sadržao DMSO, 10, 20 ili 40 µM RK, primenom Testa za analizu adhezije ćelija za komponente EĆM. Relativna sposobnost adhezije U251 ćelija gajenih u medijumu koji je sadržao različite koncentracije RK prikazana je kao stepen promene sposobnosti adhezije U251 ćelija tretiranih DMSO-om, kojoj je dodeljena vrednost 1. Na grafiku su prikazane srednje vrednosti ± S.D. iz tri nezavisna eksperimenta. Srednje vrednosti su statistički upoređene Studentovim *t*-testom. Vrednost $p \leq 0.05$ označena je *.

4.3.4. Analiza efekta retinoične kiseline na neuralnu diferencijaciju U251 ćelija

Diferencijacija tumorskih ćelija u cilju smanjenja malignog potencijala ovih ćelija predstavlja jednu od perspektivnih strategija u terapiji tumora [284]. Na osnovu literaturnih podataka može se uočiti da je jedan od najčešće primenjivanih agensa u diferencijacionoj terapiji RK [285]. Imajući u vidu navedene podatke, sledeći korak u istraživanju obuhvatao je ispitivanje da li tretman RK indukuje neuralnu diferencijaciju U251 ćelija glioblastoma. U tu svrhu analizirana je morfologija i ekspresija markera neuralne diferencijacije kod U251 ćelija gajenih 5 dana u medijumom koji je sadržao DMSO, 10, 20 ili 40 µM RK.

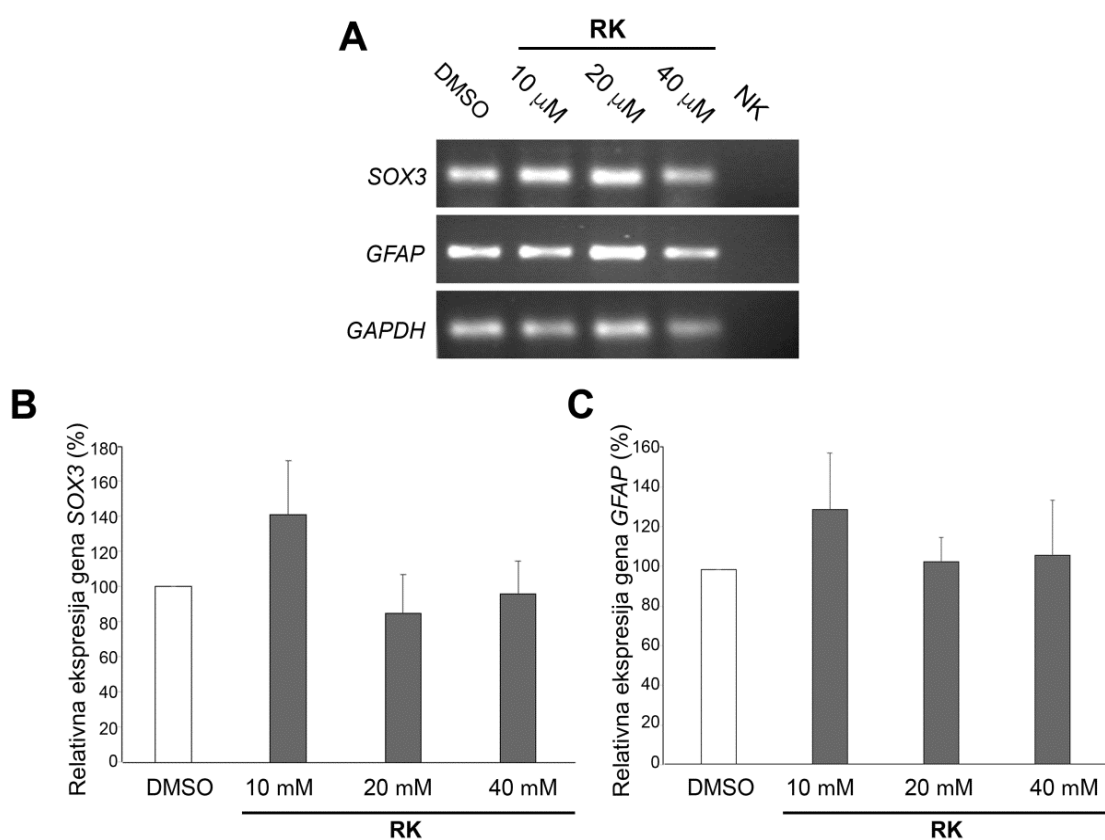
Morfologija U251 ćelija nakon 5 dana gajenja u medijumu koji je sadržao DMSO, 10, 20 ili 40 µM RK ispitivana je imunocitohemijskom analizom ekspresije citoskeletnog proteina, α -tubulina. Rezultati ove analize su pokazali da tretman U251 ćelija različitim koncentracijama RK indukuje promene morfologije U251 ćelija u poređenju sa morfologijom kontrolnih U251 ćelija (tretiranih DMSO-om) (Slika 45). Naime, nakon

tretmana RK kod većine U251 ćelija detektovani su izduženi, tanki razgranuti nastavci, dok su kod većine kontrolnih ćelija uočena mala, okrugla tela sa kratkim nastavcima (Slika 45).



Slika 45. Efekat retinoične kiseline na morfologiju U251 ćelija. Morfologija U251 ćelija gajenih 5 dana u medijumu koji je sadržao DMSO, 10, 20 ili 40 μM RK proučavana je imunocitohemijskom analizom ekspresije proteina α -tubulina (crveni signal). Jedra ćelija su obojena DAPI-jem (plavi signal). Ćelije su posmatrane TCS SP8 konfokalnim mikroskopom (Leica) (uveličanje od 40x) korišćenjem softvera LAS AF-TCS SP8 (Leica Microsystems). Bele strelice označavaju ćelije sa dugim, razgranatim nastavcima. DMSO – kontrolne U251 ćelije tretirane DMSO-om.

Nakon analize morfologije U251 ćelija tretiranih RK, sledeći korak u istraživanju obuhvatao je analizu ekspresije markera neuralne diferencijacije gena *SOX3* (marker neuralnih progenitora) i *GFAP* (marker astrocita) kod ovih ćelija primenom semi-kvantitativnog RT-PCR-a. Rezultati ove analize su pokazali da tretman RK ne indukuje statistički značajne promene u ekspresiji gena *SOX3* i *GFAP* kod U251 ćelija tretiranih RK u poređenju sa ekspresije ova dva gena detektovanoj u U251 ćelijama tretiranim DMSO-om (Slika 46).



Slika 46. Efekat RK na neuralnu diferencijaciju U251 ćelija. A) Reprerzentativni primer semikvantitativne RT-PCR analize ekspresije gena *SOX3* i *GFAP* kod U251 ćelija gajenih 5 dana u medijumu koji je sadržao DMSO, 10, 20 ili 40 μM RK. NK – negativna kontrola PCR reakcije. B) Efekat RK na ekspresiju gena *SOX3*. Produkti semikvantitativnog RT-PCR-a su digitalizovani i kvantifikovani uz pomoć ImageJ softvera. Nivo ekspresije gena *SOX3* u svakom od uzoraka normalizovan je u odnosu na ekspresiju gena *GAPDH* u istom uzorku. Relativna ekspresija gena *SOX3* kod U251 ćelija gajenih u medijumu sa različitim koncentracijama RK prikazana je kao stepen promene ekspresije ovog gena detektovane kod U251 ćelija gajenih u medijumu

sa DMSO-om, kojoj je dodeljena vrednost 100%. Na grafiku su prikazane srednje vrednosti \pm S.D. iz tri nezavisna eksperimenta. Srednje vrednosti su statistički upoređene Studentovim *t*-testom. C) Efekat RK na ekspresiju gena *GFAP*. Produkti semikvantitativnog RT-PCR-a su digitalizovani i kvantifikovani uz pomoć ImageJ softvera. Nivo ekspresije gena *GFAP* u svakom od uzoraka normalizovan je u odnosu na ekspresiju gena *GAPDH* u istom uzorku. Relativna ekspresija gena *GFAP* kod U251 ćelija gajenim u medijumu sa različitim koncentracijama RK prikazana je kao stepen promene ekspresije ovog gena detektovane kod U251 ćelija gajenih u medijumu sa DMSO-om, kojoj je dodeljena vrednost 100%. Na grafiku su prikazane srednje vrednosti \pm S.D. iz tri nezavisna eksperimenta. Srednje vrednosti su statistički upoređene Studentovim *t*-testom.

Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da RK iako dovodi do promena morfologije U251 ćelija ne dovodi do promene u ekspresiji markera koji bi ukazali da je indukovana neuralna diferencijacija.

5. DISKUSIJA

Iz literature je poznato da mnogi proteini koji su ključni regulatori embrionalnog razvića, uključujući i proteine SOX, imaju značajne funkcije i u procesu karcinogeneze [217]. Ekspresija proteina SOXB1 detektovana je u neuralnim matičnim ćelijama mozga tokom razvića i kod čoveka na adultnom stupnju gde ovi proteini predstavljaju značajne regulatore održavanja populacije ovih ćelija u nediferenciranom i proliferišućem stanju [166, 356, 357]. Sa druge strane, ekspresija ovih proteina detektovana je i u glioblastomima [192]. Za razliku od gena *SOX2* čija je funkcija dobro proučena kod glioblastoma (pokazano je da ovaj gen promovise maligni potencijal ćelija glioblastoma i da je bitan za održavanje populacije glioblastoma matičnih ćelija [318]), u literaturi je veoma malo podataka o potencijalnoj ulozi gena *SOX1* i *SOX3* u ćelijama glioblastoma. Stoga je u okviru ove doktorske disertacije analizirana uloga gena *SOX1* i *SOX3* u ovim ćelijama.

5.1. Analiza uloge gena *SOX1* u promovisanju malignog fenotipa ćelija glioblastoma

Prvi podaci o povezanosti proteina SOX1 sa tumorima potiču od strane Gure i saradnika koji su detektovali visok titar antitela specifičnih za SOX1 u serumu bolesnika sa sitnoćelijskim karcinomom pluća [256]. Nakon toga uočeno je da je promotor gena *SOX1* hipermetilovan kod karcinoma grlića materice i karcinoma jajnika [257, 258]. Pored toga, pokazano je da SOX1 ima ulogu tumor supresora u hepatocelularnom karcinomu, kao i karcinomu grlića materice, nazofarinksa, dojke i želuca [193-197]. Dugi niz godina smatralo se da SOX1 ima univerzalnu tumor supresorsku aktivnost u malignim oboljenjima, međutim skorašnji podaci ističu da se ćelije malignog tumora prostate, koje imaju sposobnost invazije, odlikuju povećanom ekspresijom gena *SOX1* u poređenju sa ćelijama ovog tumora koje nemaju sposobnost invazije, kao i parentalnim ćelijama [198]. O uticaju gena *SOX1* na maligni potencijal ćelija GBM malo se znalo pre ovog istraživanja. Stoga je u okviru ove doktorske disertacije analizirana ekspresija gena *SOX1* u ćelijskim linijama poreklom od glioblastoma, generisane su ćelije glioblastoma sa utišanom

ekspresijom ovog gena i ispitan je efekat izmenjene ekspresije gena *SOX1* na karakteristike ćelija glioblastoma.

5.1.1. Efekat utišane ekspresije gena *SOX1* na karakteristike ćelija glioblastoma

Rezultati prethodnih istraživanja su pokazali da je gen *SOX1* eksprimiran u glioblastoma tumorima, dok ekspresija ovog gena nije detektovana kod astrocitoma gradusa I, II i III [192] što ukazuje da ovaj protein može biti indikator gradusa glioma tumora. Pored toga, detektovano je da je ekspresija ovog gena povećana u tumorskom tkivu GBM u odnosu na netumorsko moždano tkivo, kao i da povećana ekspresija ovog gena korelira sa lošijim preživljavanjem obolelih [322]. Ovi podaci ukazuju na potencijalnu ulogu gena *SOX1* u GBM. U okviru ove doktorske disertacije u cilju proučavanja uloge ovog gena u ćelijama GBM, analiziran je efekat utišane ekspresije gena *SOX1* na karakteristike ćelija GBM. Prvi korak u ispitivanju obuhvatao je analizu ekspresije gena *SOX1* u permanentnim ćelijskim linijama poreklom od GBM. Rezultati ovog ispitivanja pokazali su da svaka od analiziranih ćelijskih linija poreklom od GBM eksprimira gen *SOX1*, kao i da je nivo ekspresije ovog gena različit u analiziranim ćelijskim linijama. Naime, relativno viši nivo ekspresije ovog gena detektovan je u U251 i U373 ćelijama u poređenju sa ekspresijom ovog gena u U87, A172 i T98 ćelijama. Ovi rezultati su u skladu sa podacima iz literature ukazuju da postoje razlike i u nivou ekspresije gena *SOX2*, kao i gena *SOX4* i *SOX9* između ćelijskih linija poreklom od GBM [319, 358]. Detektovane razlike u nivou ekspresije proteina *SOX1* u različitim ćelijskim linijama GBM mogu biti posledica intra- i inter-tumorske heterogenosti koja je karakteristična za GBM [359].

Nakon analize ekspresije gena *SOX1* u ćelijskim linijama poreklom od glioblastoma, sledeći korak u istraživanju podrazumevao je generisanje ćelija glioblastoma sa utišanom ekspresijom ovog gena. Lentivirusnom transdukcijom primenom konstrukta pLKO.1/sh*SOX1* u koji je klonirana shRNA sekvenca specifična za humanu *SOX1* iRNK generisane su U251 ćelije sa utišanom ekspresijom gena *SOX1*. Nakon uspostavljanja uslova za utišavanje ekspresije gena *SOX1* analiziran je proliferativni kapacitet, vijabilnost, senescencija i migratorni potencijal U251 ćelija glioblastoma.

Nekontrolisana proliferacija ćelija predstavlja važnu karakteristiku tumora neophodnu za njegov nastanak i progresiju [2]. Pokazano je da GBM tumori mogu da nastane kao rezultat nekontrolisane proliferacije ćelija glijne, kao i usled nebalansiranog odnosa između deobe i smrti ovih ćelija [360]. Takođe, ćelije GBM imaju najveći proliferativni indeks među astrocitomima [360]. Sa druge strane, analiza vijabilnosti ćelija je veoma značajan deo izučavanja malignih bolesti jer omogućava utvrđivanje mehanizama delovanja lekova koji se koriste u terapiji i otvara mogućnosti za identifikovanje novih terapijskih pristupa u lečenju ovih bolesti [360]. Kako je pokazano da proteini SOX mogu da inhibiraju ili promovišu proliferaciju i vijabilnost ćelija [361], u okviru ove doktorske disertacije analizirano je da li gen *SOX1* utiče na ove procese u ćelijama GBM. U ovoj tezi je prvi put pokazano da gen *SOX1* može da promoviše proliferaciju i vijabilnost tumorskih ćelija. Naime, u uslovima smanjene ekspresije proteina SOX1 detektovano je smanjenje proliferacije i vijabilnosti U251 ćelija glioblastoma. Za razliku od ovih rezultata, prethodna istraživanja ukazuju da ektopična ekspresija gena *SOX1* u ćelijama karcinoma grlića materice, dojke, želuca i jetre smanjuje proliferaciju/vijabilnost ćelija ovih tumora posredstvom kanonskog WNT signalnog puta [193, 195-197]. Razlike u rezultatima dobijenim u okviru prethodnih istraživanja i u okviru istraživanja prezentovanog u ovoj doktorskoj disertaciji ukazuju da efekat proteina SOX1 na proliferativni kapacitet i vijabilnost ćelija zavisi od tipa tumora. I za druge članove SOX familije, kao što su SOX2, SOX4 i SOX9 je pokazano da u različitim tipovima tumora mogu da ostvaruju suprotan efekat na proces proliferacije [190, 199, 200, 217]. Imajući u vidu rezultate ovog istraživanja i prethodna istraživanja koja su pokazala da GBM imaju najveći proliferativni indeks među astrocitomima [360], kao i da je gen *SOX1* eksprimiran u GBM, ali ne i u ostalim gliomima [192] može se pretpostaviti da je ovaj gen jedan od faktora odgovornih za povećani proliferativni indeks GBM tumora.

Literaturni podaci ukazuju da ćelije mogu da zaustave nekontrolisanu proliferaciju aktiviranjem perioda mirovanja, apoptoze ili senescencije posredstvom tumor supresora [328]. Međutim, jedna od glavnih karakteristika ćelija malignih tumora je sposobnost da izbegnu proces senescencije [13]. Kao i većina tumora, i GBM su razvili mehanizme pomoću kojih izbegavaju aktivaciju procesa senescencije, te se smatra da bi indukcija

senescencija mogla biti jedna od strategija u uspešnom lečenju ovog oboljenja [331-334]. Rezultati dobijeni istraživanjem prezentovanim u ovoj disertaciji pokazuju da utišavanje ekspresije gena *SOX1* indukuje senescenciju ćelija GBM što je praćeno i povećanom ekspresijom gena *p21* i *p27* čiji su proteinski produkti uključeni u zaustavljanje ćelijskog ciklusa. Za razliku od ovih rezultata, podaci iz literature pokazuju da ektopična ekspresija gena *SOX1* indukuje senescenciju ćelija hepatocelularnog karcinoma i karcinoma nazofarinksa [194, 197]. Kod ova dva tipa karcinoma pokazano je da gen *SOX1* ima ulogu tumor supresora [194, 197]. Kako rezultati dobijeni u okviru ove disertacije pokazuju da se u uslovima utišane ekspresije ovog gena smanjuje proliferacija i vijabilnosti i indukuje senescencija ćelija glioblastoma može se zaključiti da u ovom tipu tumora gen *SOX1* ima onkogenu aktivnost.

Imajući u vidu rezultate ovog istraživanja i literaturne podatke, može se zaključiti da gen *SOX1* nema univerzalnu funkciju tumor supresora ili onkogen, odnosno da u zavisnosti od tipa tumora ovaj gen promovise ili inhibira maligni fenotip. Takođe, može se pretpostaviti da ovaj gen poseduje značajnu funkciju u promovisanju rasta tumora. Ova pretpostavka podržana je podacima iz literature koji pokazuju da nakon ksenotransplantacije U251 ćelija sa utišanom ekspresijom gena *SOX1* u imunodeficientne miševе dolazi do nastanka tumora značajno manjih dimenzija u poređenju sa dimenzijama tumora kod kontrolnih životinja (imunodeficientni miševi u koje su ksenotransplantirane U251 ćelije sa nemodifikovanom ekspresijom gena *SOX1*) [322].

Jedna od karakteristika GBM odgovorna za lošu prognozu kod ovog tipa tumora je i veoma izražena sposobnost infiltracije ćelija glioblastoma u okolno normalno moždano tkivo [362]. Pokazano je da su ćelije GBM sposobne da migriraju u udaljene delove mozga u odnosu na lokaciju primarnog tumora što onemogućava kompletno hirurško odstranjivanje tumora [363]. Takođe, migracija i invazija ćelija GBM u udaljene delove mozga omogućava tim ćelijama da prežive terapiju zračenjem i hemioterapiju [364]. Naime, i pored savremenih metoda i tehnika, nemoguće je detektovati pojedinačne ćelije koje su se odvojile od tumorske mase što dovodi do relapsa GBM [362]. Imajući u vidu navedene podatke, smatra se da bi identifikacija molekularnih mehanizama odgovornih za

migraciju ćelija GBM doprinela razvoju novih terapijskih strategija za tretman ovog tipa tumora [362].

Rezultati prikazani u ovoj tezi pokazuju da je gen *SOX1* uključen u molekularnu mrežu koja reguliše migraciju ćelija GBM. Naime, u uslovima utišane ekspresije ovog gena detektovano je smanjenje migratornog potencijala U251 ćelija. Ovaj rezultat po prvi put ukazuje da gen *SOX1* promovise migraciju tumorskih ćelija. Nasuprot ovim rezultatima, podaci iz literature pokazuju da u uslovima ektopične ekspresije gena *SOX1* dolazi do smanjenja migratornog potencijala ćelija karcinoma nazofarinksa [194], dok epigenetička inaktivacija gena *SOX1* promovise migraciju ćelija karcinoma pluća [365]. Kako je u literaturi inhibitorni efekat gena *SOX1* na migraciju tumorskih ćelija povezan sa tumor supresorskom aktivnošću ovog gena, može se pretpostaviti da je u ćelijama GBM efekat gena *SOX1* na migraciju ćelija povezan sa njegovom onkogenom aktivnošću u ovom tipu tumora. Uticaj gena *SOX1* na migratornu sposobnost ćelija glioblastoma ukazuje na potencijalnu ulogu ovog gena u procesu metastaziranja ćelija GBM u okolno tkivo. Na osnovu rezultata dobijenih u okviru istraživanja prezentovanog u ovoj doktorskoj disertaciji i literaturnih podataka, može se zaključiti da je gen *SOX1* deo molekularne mašinerije koja reguliše migraciju tumorskih ćelija, kao i da od tipa tumora zavisi da li će efekat ovog gena na migraciju tumorskih ćelija biti inhibitorni ili stimulatívni.

5.1.2. Efekat utišane ekspresije gena *SOX1* na karakteristike matičnih ćelija glioblastoma

Podaci iz literature pokazuju da glioblastoma tumori sadrže populaciju samo-obnavljajućih tumor-inicirajućih matičnih ćelija (GMC) koje doprinose nastanku tumora i rezistenciji na terapiju [147]. Imajući u vidu ove podatke, smatra se da će rasvetljavanje mehanizama koji održavaju populaciju GMC dopriniti pronalazenju novih terapeutika za tretman GBM. Jedna od hipoteza o matičnim ćelijama tumora polazi sa stanovišta da ove ćelije imaju niz karakteristika specifičnih za normalne matične ćelije i da su geni koji imaju značajne funkcije u neuralnim matičnim ćelijama bitni i za funkcionisanje matičnih ćelija tumora [366]. Kako je regulatorni protein SOX1 marker neuralnih matičnih ćelija [367] i

jedan od ključnih faktora neophodnih za održavanje proliferacije neuralnih matičnih/progenitorskih ćelija [255], u okviru istraživanja prezentovanog u ovoj doktorskoj disertaciji ispitivana je ekspresija ovog gena u kulturama GMĆ izolovanim iz tumora bolesnika. Dobijeni rezultati pokazuju da je u kulturama GMĆ nivo ekspresije gena *SOX1* značajno viši u poređenju sa ekspresijom ovog gena u imortalizovanim ćelijskim linijama poreklom od GBM: U87 i U251. Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa podacima iz literature koji ukazuju da je protein SOX1 jedan od 19 regulatornih proteina čija je ekspresija povećana u GMĆ u odnosu na ekspresiju detektovanu u diferenciranim ćelijama GBM [232]. Takođe, visok nivo ekspresije ovog gena detektovan je u matičnim ćelijama karcinoma dojke [368], kao i ćelijama kancera prostate koje imaju osobinu tumor-inicirajućih ćelija [198]. Ovi rezultati ukazuju da je gen *SOX1* jedan od markera matičnih ćelija GBM. Pored toga, istraživanja prezentovana u okviru ove doktorske disertacije pokazuju da se ekspresija gena *SOX1* povećava nakon procesa dediferencijacije imortalizovanih ćelijskih linija poreklom od GBM. Pored toga, nakon procesa diferencijacije GMĆ, ekspresija gena *SOX1* se smanjila. Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da je visok nivo ekspresije gena *SOX1* karakteristika GMĆ, kao i da visok nivo ekspresije ovog gena koreliše sa nediferenciranim stanjem ćelija glioblastoma, što ukazuje na značajnu ulogu ovog gena u održavanju GMĆ u matičnom stanju.

Matične ćelije tumora se odlikuju sposobnošću samo-obnavljanja, konstantnom proliferacijom i mogućnošću formiranja tumora nakon transplantacije [147]. Takođe, uočeno je da utišavanje ekspresija gena *SOX1* u kulturama GMĆ smanjuje sposobnost samo-obnavljanja ovih ćelija *in vitro* i nastanak i progresiju tumora *in vivo* [322]. Rezultati dobijeni u okviru ovog istraživanja pokazuju da se u uslovima smanjene ekspresije gena *SOX1* smanjuje proliferativni kapacitet GMĆ. Takođe, u okviru istraživanja prezentovanog u ovoj doktorskoj disertaciji pokazano je i da se u uslovima smanjene ekspresije gena *SOX1* smanjuje vijabilnost kultura GMĆ. Na osnovu ovih rezultata i literaturnih podataka može se pretpostaviti da je ekspresija gena *SOX1* neophodna za održavanje populacije GMĆ i da ovaj gen precizno reguliše odnos između proliferacije, samo-obnavljanja i diferencijacije.

Imajući u vidu rezultate dobijene proučavanjem efekta utišane ekspresije gena *SOX1* na karakteristike ćelija glioblastoma i GMĆ može se zaključiti da gen *SOX1*

promoviše maligni fenotip ćelija glioblastoma. S obzirom da rezultati ovog istraživanja ukazuju da ovaj gen održava populaciju GMC u nediferenciranom stanju i da njegova povećana ekspresija korelira sa lošijim preživljavanjem obolelih [322], ovaj gen bi mogao predstavljati novi marker za delovanje ciljane terapije.

5.2. Analiza uloge gena *SOX3* u promovisanju malignog fenotipa ćelija glioblastoma

Prvi podaci koji ukazuju na ulogu gena *SOX3* u tumorogenezi datiraju iz 2000. godine [203]. Xia i saradnici su pokazali da ektopična ekspresija ovog gena u fibroblastima embriona pileta dovodi do formiranja fokusa transformisanih ćelija, odnosno uočili su da gen *SOX3* ispoljava onkogeni potencijal u ovim ćelijama [203]. Ovi rezultati uvrstili su gen *SOX3* u grupu gena sa potencijalno važnom ulogom u tumorogenezi i otvorili su put za ispitivanje njegove funkcije u ovom procesu. Nakon ovog istraživanja, pokazano je da gen *SOX3* može da ima onkogeni potencijal kod karcinoma skvamoznih ćelija jednjaka, epitelijalnog karcinoma jajnika, osteosarkoma i T-ćelijskih limfoma [205-208]. Takođe, uočeno je da je povećana ekspresija ovog gena povezana sa progresijom tumora i sa lošijim preživljavanjem kod bolesnika sa hepatocelularnim karcinomom [204].

Podaci iz literature pokazuju da je gen *SOX3* eksprimiran u glioma tumorima [192, 282]. Međutim, pre ovog istraživanja malo se znalo o uticaju gena *SOX3* na maligni fenotip ćelija GBM. Stoga je u okviru ove doktorske disertacije analizirana ekspresija gena *SOX3* u tumorskom tkivu glioblastoma, matičnim ćelijama glioblastoma i ćelijskim linijama poreklom od glioblastoma, generisane su ćelije glioblastoma sa povećanom ekspresijom ovog gena i ispitan je efekat povećane ekspresije gena *SOX3* na karakteristike ćelija glioblastoma. Pored toga, analiziran je efekat povećane ekspresije ovog gena na aktivnost WNT i HH signalnih puteva i na proces autofagije. Takođe, u okviru ovog istraživanja je po prvi put analiziran uticaj radio- i hemio- terapije na ekspresiju gena *SOX3*.

5.2.1. Ekspresije gena/proteina *SOX3/SOX3* u tumorskom tkivu glioblastoma i ćelijskim linijama poreklom od glioblastoma

Podaci iz literaturi pokazuju da se *SOX3/SOX3* eksprimira u GBM tumorima [192, 282]. Rezultati dobijeni u okviru ovog istraživanja ukazuju na različit nivo ekspresije gena *SOX3* u uzorcima glioblastoma tumora u poređenju sa ekspresijom detektovanom u netumorskom moždanom tkivu. Pored toga, kod otprilike 70% analiziranih biopsija GBM tumora detektovan je povećan nivo ekspresije gena *SOX3* u poređenju sa ekspresijom detektovanom u netumorskom moždanom tkivu. Ovi rezultati su u saglasnosti sa rezultatima dobijenih od strane Su i saradnika koji su detektovali viši nivo ekspresije proteina *SOX3* kod glioma gradusa III i IV u poređenju sa ekspresijom detektovanom u normalnom moždanom tkivu [282]. Takođe, podaci iz literature ukazuju na povećanu ekspresiju *SOX3/SOX3* u uzorcima epitelijalnog karcinoma jajnika [206], osteosarkoma [208], karcinoma skvamoznih ćelija jednjaka [205] i hepatocelularnog karcinoma [204].

Rezultati dobijeni u ovoj tezi ukazuju da se nivo ekspresije gena *SOX3* u GBM ne može posmatrati kao prognostički marker za ovaj tip tumora jer nije detektovana korelacija između nivoa ekspresije gena *SOX3* i preživljavanja obolelih. Takođe, Qui i saradnici nisu uočili korelaciju između nivoa ekspresije gena *SOX3* i preživljavanja obolelih od osteosarkoma [208]. S druge strane, podaci iz literature pokazuju da je visok nivo ekspresije gena *SOX3* u korelaciji sa lošijim preživljavanjem obolelih od karcinoma skvamoznih ćelija jednjaka [205] i hepatocelularnog karcinoma [204]. Analiza ekspresije proteina *SOX3* u uzorcima tumora glioblastoma pokazala je da je ovaj gen ekspimiran u svim analiziranim uzorcima GBM tumora. Međutim, ekspresija ovog proteina nije detektovana u svakoj ćeliji u svakom od analiziranih uzorka tumora. Ovi rezultati su u saglasnosti sa podacima iz literature koji takođe pokazuju da protein *SOX3* ne ekspimiraju sve ćelije glioblastoma tumora [192].

Istraživanja sprovedena u ovoj doktorskoj disertaciji pokazali su da svaka od analiziranih ćelijskih linija poreklom od GBM eksprimira gen *SOX3*. Takođe, uočeno je da se ćelijske linije međusobno razlikuju po nivou ekspresije ovog gena. Ovaj rezultat je u saglasnosti sa rezultatom ove teze koji pokazuje da svi analizirani GBM tumori

eksprimiraju *SOX3*/*SOX3*, kao i da je nivo ekspresije ovog gena različit u GBM uzorcima različitih bolesnika. Takođe, u okviru ovog istraživanja detektovano je da se ćelijske linije poreklom od glioblastoma međusobno razlikuju i po nivou ekspresije gena *SOX1*. Podaci iz literature ukazuju da se ćelijske linije poreklom od glioblastoma međusobno razlikuju i po nivou ekspresije gena *SOX2* [369] i *SOX9* [319].

Tip ćelija od kojih gliomi vode poreklo još uvek nije definisan [337]. Kao jedan od potencijalnih kandidata koji se veoma često navodi u literaturi su astrociti [337]. Sposobnost astrocita da se dele i dediferenciraju, kao i podatak da je ekspresija proteina GFAP, markera astrocita, veoma često detektovana u gliomima, ukazuje da gliomi mogu voditi poreklo od ovih ćelija [337]. Kada se dediferencirani astrociti ozrače γ -zračenjem postaju immortalizovani i mogu da indukuju pojavu glioma gradusa III i IV nakon ksenotransplantacije u mozak imunodeficientnog miša [370]. Imajući u vidu ove podatke, u okviru ovog istraživanja upoređivana je ekspresija proteina *SOX3* u astrocitima generisanim diferencijacijom humane embrionalne karcinomske ćelijske linije NT2/D1 i ćelijskim linijama poreklom od GBM. Uočeno je da je ekspresija proteina *SOX3* povećana u U87 i U251 ćelijama u poređenju sa ekspresijom ovog proteina detektovanom u astrocitima poreklom od NT2/D1 ćelija. Imajući u vidu da su astrociti ćelije od kojih GBM potencijalno vode poreklo, može se spekulirati da je gen *SOX3* jedan od kandidata koji može da bude uključen u transformaciju astrocita u ćelije glioma tumora. Iz literature je poznato da ektopična ko-ekspresija gena *SOX2*, *OLIG2* i *ZBP1* dovodi do transformacije immortalizovanih astrocita u glioma-inicirajuće ćelije [371]. Imajući u vidu funkcionalnu ekvivalentnost gena *SOX2* i *SOX3* [372], može se pretpostaviti da je i gen *SOX3* uključen u transformaciju astrocita u ćelije glioma tumora.

5.2.2. Efekat povećane ekspresije gena *SOX3* na karakteristike ćelija glioblastoma

U cilju analize uloge gena *SOX3* u ćelijama glioblastoma, generisane su U87 i U251 ćelije sa povećanom ekspresijom ovog gena i analiziran je efekat povećane ekspresije na proliferativni kapacitet, vijabilnost, migratorni i invazivni potencijal ćelija GBM.

Promenjen proliferativni kapacitet i vijabilnost važan su deo nastanka i progresije malignih tumora [373]. Imajući u vidu navedene podatke, u okviru ove disertacije analiziran je efekat povećane ekspresije proteina SOX3 na proliferativni kapacitet i vijabilnost ćelija glioblastoma. Detektovano je da se u uslovima povećane ekspresije ovog proteina povećava proliferativni kapacitet i vijabilnost U87 i U251 ćelija GBM. Dobijeni rezultati ukazuju da je gen *SOX3* deo regulatorne mreže uključene u proces proliferacije i vijabilnosti ćelija GBM, što sugeriše da bi smanjenje ekspresije gena *SOX3* predstavljalo jedan od potencijalnih pristupa za smanjenje rasta tumora. Pored toga, literaturni podaci ukazuju da skraćena forma proteina SOX3 koja funkcioniše kao dominantno-negativni mutant promoviše izlazak ćelija GBM iz ćelijskog ciklusa [192], kao i da u uslovima utišane ekspresije proteina SOX3 dolazi do smanjenja proliferativnog kapaciteta matičnih ćelija glioblastoma [282]. Pored toga, smanjenje ekspresije proteina SOX3 indukuje smanjenje proliferativnog kapaciteta ćelija osteosarkoma [374], dok povećanje ekspresije gena *SOX3* promoviše proliferaciju ćelija karcinoma jajnika [206]. Detektovano je i da se u uslovima smanjene ekspresije gena *SOX3* smanjuje vijabilnost skvamoznih ćelija karcinoma jednjaka [281].

U okviru ove doktorske disertacije, pored analize efekta utišane ekspresije proteina SOX1 na migratorni potencijal ćelija GBM, analiziran je i efekat povećane ekspresije proteina SOX3 na migratorni i invazivni potencijal ovih ćelija, imajući u vidu da migracija i invazija ćelija GBM u udaljene delove mozga omogućava tim ćelijama da prežive terapiju zračenjem i hemioterapiju i onemogućava kompletno hirurško odstranjivanje tumora [363, 364]. Rezultati dobijeni u ovoj tezi pokazuju da se u uslovima povećane ekspresije proteina SOX3 povećava migratorni i invazivni potencijal ćelija GBM što ukazuje na ulogu ovog gena u procesu metastaziranja ćelija GBM. Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa rezultatima Su i saradnika koji su detektovali da se u uslovima utišane ekspresije proteina SOX3 smanjuje migratorni i invazivni potencijal matičnih ćelija glioblastoma [282]. Takođe, pokazano je da povećanje ekspresije proteina SOX3 promoviše migraciju i invaziju ćelija osteosarkoma [208] skvamoznih ćelija karcinoma jednjaka [375] i ćelija epitelijalnog karcinoma jajnika [206]. Pored toga, u uslovima smanjenja ekspresije gena *SOX3* detektovao je smanjenje invazivnog potencijala matičnih ćelija endometrijalnog

karcinoma [376]. Nasuprot ovim podacima, uočeno je i da se u uslovima povećane ekspresije gena *SOX3* smanjuje migratorni i invazivni potencijal ćelija karcinoma dojke [377].

Imajući u vidu rezultate dobijene u okviru istraživanja prezentovanog u ovoj doktorskoj disertaciji i literaturne podatke može se pretpostaviti da je gen *SOX3* deo molekularne mreže koja reguliše migratorni i invazivni potencijal malignih ćelija, kao i da uticaj gena *SOX3* na smanjenje ili povećanje migratornog i invazivnog potencijala ovih ćelija zavisi od tipa maligniteta.

Uzimajući u obzir rezultate dobijene u okviru istraživanja prezentovanog u ovoj doktorskoj disertaciji može se zaključiti da gen *SOX3* promovise maligni potencijal ćelija glioblastoma.

5.2.3. Efekta povećane ekspresije proteina SOX3 na aktivnost kanonskog WNT i HH signalnog puta i proces autofagije u ćelijama glioblastoma

Kako rezultati istraživanja prezentovanog u ovoj doktorskoj disertaciji ukazuju da protein *SOX3* promovise maligni potencijal ćelija glioblastoma, u okviru ove teze analizirano je da li ovaj protein ostvaruje svoje funkcije u ćelijama GBM modulisanjem aktivnosti WNT i HH signalnih puteva.

Izmenjena aktivnost WNT signalnog puta povezana je sa nastankom, progresijom i povećanim invazivnim potencijalom različitih tipova tumora [378]. Pokazano je da je kanonski WNT signalni put kod GBM odgovoran za rezistenciju na hemio- i radio-terapiju, povećani migratorni i invazivni potencijal i održavanje osobina matičnih ćelija glioblastoma [378]. Rezultati dobijeni u okviru istraživanja prezentovanog u ovoj doktorskoj disertaciji pokazuju da povećanje ekspresije proteina *SOX3* ne utiče na aktivnost WNT signalnog puta u ćelijama glioblastoma, što ukazuje da ovaj protein ne ostvaruje svoju funkciju u ćelijama GBM preko WNT signalnog puta. Literaturni podaci ukazuju da povećana ekspresija proteina *SOX3* ne utiče na aktivnost WNT signalnog puta i u humanoj teratokarcinomskoj ćelijskoj liniji NT2/D1 [379]. Sa druge strane, detektovano je da gen *SOX3* moduliše aktivnost ovog signalnog puta tokom embrionalnog razvića žabe

(*Xenopus leavis*) [380]. Na osnovu rezultata dobijenih u okviru ovog istraživanja i literaturnih podataka može se pretpostaviti da protein SOX3 utiče na aktivnost WNT signalnog puta tokom razvića, dok u tumorskim ćelijama ovaj protein ostvaruje svoje funkcije nezavisno od ovog signalnog puta.

Izmenjena aktivnost HH signalnog puta uočena je u mnogobrojnim malignitetima, uključujući i GBM [124]. Tumorogeneza, progresija tumora, kao i odgovor malignih ćelija na terapiju su procesi na koje utiče HH signalni put [381]. Rezultati ove teze pokazuju da povećana ekspresija proteina SOX3 promoviše aktivnost HH signalnog puta u ćelijama glioblastoma. Ovi rezultati su u saglasnosti sa podatkom da protein SOX3 tokom razvića hipotalamusa miša deluje kao direktni aktivator transkripcije gena *Shh*, liganada HH signalnog puta i na taj način povećava aktivnost ovog signalnog puta [382]. Pored toga, uočeno je da protein SOX3 sinergistički deluje sa GLI regulatornim proteinima i tako indukuju transkripciju ciljnih gena HH signalnog puta [383]. Imajući u vidu ulogu HH signalnog puta u GBM, kao i efekat povećane ekspresije gena *SOX3* na aktivnost ovog signalnog puta, može se pretpostaviti da gen *SOX3* u ćelijama GBM funkcije ostvaruje, jednim delom, preko aktivacije HH signalnog puta. Takođe, može se pretpostaviti da u ćelijama GBM protein SOX3 deluje sinergistički sa GLI proteinima i na taj način promoviše maligni fenotip ćelija GBM.

Autofagija ima značajnu funkciju u tumorogenezi [384]. Pokazano je da ovaj proces može da promoviše ili inhibira rast tumora u zavisnosti od tipa ćelija, tipa tumora i faze tumorogeneze [92, 347-350]. U okviru istraživanja prezentovanog u ovoj doktorskoj disertaciji pokazano je da povećanje ekspresije proteina SOX3 ima inhibitorni efekat na proces autofagije u ćelijama GBM. Pretragom literature nisu pronađeni podaci o uticaju proteina SOX3 na proces autofagije, tako da su dobijeni rezultati prvi podaci koji ukazuju da protein SOX3 moduliše ovaj proces. Nasuprot tome, podaci iz literature pokazuju da druga dva člana *SOXB1* podgrupe imaju uticaj na proces autofagije. Utišavanje ekspresije proteina SOX1 indukuje autofagiju kod ćelija nesitnoćelijskog karcinoma pluća, što dovodi do povećanja rezistencije ovih ćelija na terapiju [385]. Smanjenje ekspresije proteina SOX2 promoviše proces autofagije u ćelijskim linijama karcinoma pluća [386], dok ektopično

povećanje ekspresije ovog proteina indukuje autofagiju u ćelijama karcinoma debelog creva smanjujući na taj način maligni potencijal ovih ćelija [387].

Na osnovu rezultata dobijenih u okviru istraživanja prezentovanih u ovoj disertaciji može se pretpostaviti da je smanjenje autofagije u U87 i U251 ćelijama sa povećanom ekspresijom proteina SOX3 povezano sa povećanim malignim potencijalom ovih ćelija. Ova hipoteza podržana je literaturnim podacima koji ukazuju da glioma tumori višeg gradusa imaju nižu ekspresiju proteina uključenih u proces autofagije u odnosu na glioma tumore nižeg gradusa [93]. Takođe, utvrđeno je i da je progresija glijalnih tumora praćena sa smanjenjem autofagije [94]. Na osnovu literaturnih podataka i dobijenih rezultata može se pretpostaviti da je onkogeni aktivnost proteina SOX3, uočena u ćelijama GBM, bar delom posledica uticaja ovog proteina na proces autofagije.

Nedavna istraživanja su pokazala da HH signalni put reguliše autofagiju i da je smanjenje autofagije preko HH signalnog puta zavisno od GLI2 regulatornog proteina [388]. Rezultati ove teze pokazuju da se u uslovima povećane ekspresije proteina SOX3 povećava ekspresija gena *GLI2*, a smanjuje proces autofagije. Imajući u vidu literaturne podatke i rezultate istraživanja ove doktorske disertacije, može se pretpostaviti da postoji povezanost SOX3-GLI2-autofagija u ćelijama GBM koja je odgovorna za promovisanje malignog potencijala ovih ćelija. Ova pretpostavka ukazuje da bi povećana ekspresija proteina SOX3 indukovala povećanje aktivnosti HH signalnog puta što bi dovelo do smanjenja autofagije u ćelijama GBM, a zajedničkim delovanjem promovisalo bi maligni fenotipa ćelija GBM.

5.2.4. Efekat radio- i hemio-terapije na ekspresiju gena *SOX3* u ćelijama GBM

Standardni tretman obolelih od GBM podrazumeva hirurško uklanjanje tumora koje je zatim praćeno radio- i hemio-terapijom [89]. Međutim, pokazano je da ćelije GBM mogu da razviju rezistenciju na terapiju [87]. Zbog pojave rezistencije značajno je identifikovati gene uključene u odgovor ćelija na terapiju jer bi to potencijalno vodilo ka identifikaciji novih markera za delovanje ciljane terapije.

Rezultati prikazani u ovoj tezi pokazuju da tretman ćelijskih linija poreklom od GBM γ zračenjem ne dovodi do promene ekspresije gena *SOX3*, što ukazuje da ovaj gen najverovatnije ne učestvuje u odgovoru ćelija GBM na radioterapiju. Nasuprot ovome, detektovano je da efekat temozolomida na ekspresiju gena *SOX3* u ćelijama glioblastoma zavisi od koncentracije (doze) temozolomida i tipa ćelija GBM. Na osnovu ovog rezultata može se spekulirati da bi *SOX3* mogao kod nekih obolelih učestvovati u odgovoru ćelija GBM na hemioterapiju temozolomidom. Ova pretpostavka podržana je podacima iz literature koji pokazuju da nakon tretmana temozolomidom dolazi do povećanja ekspresije gena *SOX2* u ćelijama GBM i da visok nivo ekspresije ovog gena promovira rezistenciju ovih ćelija na temozolomid [319]. Rezultati prezentovani u ovoj tezi predstavljaju prve podatke o efektu hemio- i radio-terapije na ekspresiju gena *SOX3*.

5.2.5. Ekspresija gena *SOX3* u matičnim ćelijama glioblastoma

Imajući u vidu značaj GMC u nastanku tumora i rezistenciji na terapiju [147], u okviru ove doktorske disertacije, pored analize ekspresije gena *SOX1*, analizirana je i ekspresija gena *SOX3* u matičnim ćelijama glioblastoma.

Rezultati dobijeni u ovoj tezi pokazuju da se ekspresija gena *SOX3* povećava nakon dediferencijacije imortalizovanih ćelijskih linija poreklom od GBM. Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa rezultatima Su i saradnika koji su detektovali viši nivo ekspresije proteina *SOX3* u GMC poreklom od U87 i U251 ćelijskih linija u poređenju sa ekspresijom ovog proteina u njihovim parentalnim ćelijama [282]. Pored toga, u okviru istraživanja prezentovanog u ovoj disertaciji detektovana je povećana ekspresija gena *SOX3* u kulturama GMC u poređenju sa ekspresijom ovog gena u imortalizovanim U87 i U251 ćelijskim linijama poreklom od GBM. Takođe, nakon diferencijacije kultura GMC uočeno je smanjenje ekspresija ovog gena u poređenju sa ekspresijom detektovanom kod nediferenciranih kultura GMC. Imajući u vidu da se ekspresija ovog gena menja sa procesima diferencijacije GMC i dediferencijacije ćelija GBM može se pretpostaviti da je gen *SOX3* deo regulatorne mreže uključene u održavanje matičnosti GMC. Takođe, istraživanja Gong-a i saradnika sugerišu da visoka ekspresija gena *SOX3* pozitivno koreliše

sa nediferenciranim stanjem matičnih ćelija karcinoma endometrijuma [280]. Pored toga, kod glodara je detektovano da se ekspresija proteina SOX3 smanjuje sa diferencijacijom nediferenciranih neurosfera poreklom od subventrikularne zone [389]. Na osnovu svega navedenog može se zaključiti da je gena *SOX3* potencijalni marker GMC, kao i da je visoka ekspresija ovog gena neophodna za održavanje matičnosti GMC.

Na osnovu rezultata dobijenih u okviru istraživanja prezentovanog u ovoj disertaciji i literaturnih podataka može se zaključiti da gen *SOX3* promoviše maligni fenotip ćelija GBM i da ovaj gen predstavlja potencijalno mesto delovanja ciljane terapije za lečenje GBM.

5.3. Efekat tretmana retinoičnom kiselinom na karakteristike U251 ćelija glioblastoma

Prosečno preživljavane bolesnika sa GBM je oko 15 meseci [65]. Zbog toga je veoma značajno identifikovati nove pristupe u terapiji. Neki od tih novih terapijskih pristupa su usmereni na osnovne karakteristike malignih ćelija glioblastoma, kao što su nekontrolisani proliferativni kapacitet, migratorni i invazivni potencijal, rezistencija na apoptozu, nemogućnost diferencijacije i intenzivna angiogeneza [308, 309, 390-393].

Jedna od perspektivnih strategija u lečenju malignih oboljenja je primena RK [285] za koju je pokazano da reguliše brojne procese, kao što su proliferacija, diferencijacija i apoptoza u različitim tipovima normalnih i malignih ćelija [295, 394]. Pored toga, uočeno je da RK ispoljava antitumorske efekte kod određenog broja tumora [300-303, 395-397].

Literaturni podaci o efektu RK na ćelije glioblastoma su oprečni. Pokazano je da efekat RK na ove ćelije zavisi od primenjene koncentracije RK, vremena trajanja tretmana i tipa ćelija GBM [295, 311-313, 394]. Imajući u vidu navedene podatke, u okviru istraživanja prezentovanog u ovoj doktorskoj disertaciji analiziran je efekat RK na vijabilnost, migratorni potencijal, sposobnost adhezije za komponente ekstraćelijskog matriksa, morfologiju i neuralnu diferencijaciju U251 ćelija glioblastoma.

Rezultati ove teze pokazuju da RK smanjuje vijabilnost U251 ćelija glioblastoma na dozno- i vremensko-zavisan način. Ovi rezultati su u saglasnosti sa rezultatima dobijenim

kod U87 ćelija [316]. Pored toga, detektovano je da visoke koncentracije RK (10, 20, 40 i 60 μM) smanjuju vijabilnost U251 ćelija, dok niske koncentracije RK ne dovode do smanjenja vijabilnost ovih ćelija. Za razliku od ovog istraživanja, Lu i saradnici su pokazali da i tretman nižim koncentracijama RK (2,5 μM) smanjuje proliferaciju U251 ćelija za oko 60% [313]. Moguće objašnjenje za razlike u dobijenim rezultatima su varijacije u genotipu, fenotipu i rastu različitih subklonova U251 ćelija [398]. Takođe, rezultati istraživanja ove disertacije ukazuju da tretman farmakološki relevantnom koncentracijom RK (10 μM) smanjuje vijabilnost U251 ćelija, dok tretman ćelija 1 μM RK, takođe farmakološki relevantnom koncentracijom ovog agensa, u trajanju od 3 dana dovodi do blagog povećanja vijabilnosti ovih ćelija. Kod GL-15 ćelija glioblastoma je takođe detektovano da tretman ovih ćelija niskim koncentracijama RK (0,1-1 μM) povećava proliferaciju ćelija, dok tretman višim koncentracijama RK (5-10 μM) smanjuju proliferativni kapacitet ćelija [315]. Na osnovu dobijenih rezultata i literaturnih podataka može se zaključiti da efekat tretmana RK na vijabilnost ćelija GBM zavisi ne samo od doze ovog agensa, već i od tipa ćelija.

Glavno obeležje ćelija GBM je difuzna migracija i invazija u okolno normalno moždano tkivo što onemogućava kompletno hirurško uklanjanje tumora, kao i efikasno delovanje radioterapije [399]. Pokazano je da tretman RK smanjuje migraciju primarnih kultura GBM, kao i U87 i SHG-44 ćelija glioma [295, 312, 316]. Rezultati ove teze pokazuju da tretman U251 ćelija RK menja način migracije ovih ćelija, od kolektivnog ka migraciji pojedinačnih ćelija u prazan prostor. Imajući u vidu da ćelije GBM migriraju u različite regione normalnog moždanog tkiva kao pojedinačne ćelije [400], na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da tretman RK može promovisati infiltraciju ćelija GBM u normalno moždano tkivo.

Literaturni podaci ukazuju da sposobnost malignih ćelija da formiraju metastaze zavisi i od njihove sposobnosti da adheriraju za komponente EĆM i degraduju ove komponente [401]. Rezultati dobijeni u ovoj tezi pokazuju da farmakološki relevantna koncentracija RK (10 μM) nakon 5 dana tretmana smanjuje sposobnost adhezije U251 ćelija za komponente EĆM. Smanjenje sposobnosti adhezije ćelija za komponente EĆM pod dejstvom RK uočeno je i kod ćelijske linije karcinoma grlića materice (SiHa) i A375

ćelijske linije melanoma [402, 403]. Podaci o značaju smanjenja sposobnosti adhezije tumorskih ćelija za komponente EĆM su oprečni. Dok jedni autori smatraju da smanjena sposobnost adhezije tumorskih ćelija za komponente EĆM smanjuje metastatski potencijal ovih ćelija [404], drugi autori smatraju da je smanjena sposobnost adhezije tumorskih ćelija za komponente EĆM povezana sa povećanim metastatskim potencijalom ovih ćelija [405, 406]. Dalja istraživanja, koja bi omogućila utvrđivanje jačine adhezije ćelija za komponente EĆM, mogućnost remodelovanja matriksa, invazivni potencijal i stopu širenja ćelija, razjasniće da li je smanjenje sposobnosti adhezije U251 ćelija za komponente EĆM pod dejstvom RK povezano sa smanjenjem ili povećanjem metastatskog potencijala ovih ćelija.

Literaturni podaci ukazuju da maligni tumori, pored tumorskih ćelija sadrže i populaciju matičnih ćelija tumora koje su sposobne da se samoobnavljaju i daju sve ostale tipove ćelija jednog tumora [407]. Ovi podaci su vodili ka pretpostavci da bi agensi koji promovišu ćelijsku diferencijaciju mogli da prouzrokuju uvođenje malignih ćelija u manje agresivno i post-mitotičko stanje [407, 408]. Osnovni cilj diferencijacione terapije je indukovanje procesa diferencijacije malignih ćelija i na taj način ograničavanje rasta tumora [408]. Pokazano je da diferencijacija ćelija može biti praćena promenama u morfologiji ćelija [409, 410]. Rezultati ove teze pokazuju da tretman RK indukuje promenu morfologije U251 ćelija. Međutim, tretman RK nije indukovao statistički značajne promene u ekspresiji gena *SOX3* (marker neuralnih progenitora) i *GFAP* (marker astrocita), što ukazuje da tretman U251 ćelija glioblastoma RK nije indukovao neuralnu diferencijaciju U251 ćelija glioblastoma. Za razliku od rezultata dobijenih u okviru ovih istraživanja, podaci iz literature ukazuju da RK indukuje diferencijaciju T98G, U87 i M059K ćelija glioblastoma [309, 411]. Pored toga, povezanost indukovanja diferencijacije ćelija sa promenom morfologije uočeno je kod nekoliko ćelijskih linija poreklom od GBM, kao što su T98G, U87MG, SHG-44 i humane linije neurosfera glioblastoma [309, 412-414].

Imajući u vidu rezultate dobijene u ovom istraživanju može se zaključiti da su potrebna dodatna istraživanja efekta tretmana RK na karakteristike ćelija glioblastoma pre potencijalne primene RK u terapiji glioblastoma tumora.

6. ZAKLJUČCI

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

1. Permanentne ćelijske linije poreklom od glioblastoma ekspimiraju gen *SOX1* i međusobno se razlikuju po nivou ekspresije ovog gena.
2. Generisane su U251 ćelije glioblastoma sa utišanom ekspresijom gena *SOX1*. U uslovima utišane ekspresije ovog gena smanjuje se proliferativni kapacitet, vijabilnost i migratorni potencijal i indukuje senescencija U251 ćelijama glioblastoma.
3. Proces dediferencijacije ćelijskih linija poreklom od glioblastoma praćen je povećanjem ekspresije gena *SOX1*.
4. Kulture matičnih ćelija glioblastoma ekspimiraju gen *SOX1* i viši nivo ekspresije ovog gena detektovan je u kulturama matičnih ćelija glioblastoma u poređenju sa ekspresijom ovog gena uočenom u permanentnim ćelijskim linijama poreklom od GBM. Proces diferencijacije ovih ćelija praćen je smanjenjem ekspresije gena *SOX1*.
5. Generisane su GNS166 kulture matičnih ćelija GBM sa utišanom ekspresijom gena *SOX1*. U uslovima utišane ekspresije ovog gena smanjuje se proliferativni kapacitet i vijabilnost GNS166 kultura matičnih ćelija GBM.
6. U uzorcima glioblastoma tumora detektovana je ekspresije gena *SOX3*. Kod većine uzoraka GBM tumora ekspresija ovog gena je bila povećana u poređenju sa ekspresijom detektovanom u netumorskom moždanom tkivu. Rezultati *Kaplan–Meier–e* analize preživljavanja ukazuju da ne postoji povezanost između nivoa ekspresije gena *SOX3* i preživljavanja obolelih.
7. Permanentne ćelijske linije poreklom od glioblastoma ekspimiraju gen *SOX3* i međusobno se razlikuju po nivou ekspresije ovog gena.

8. Generisane su ćelije sa povećanom ekspresijom proteina SOX3. U uslovima povećane ekspresije ovog proteina povećava se proliferativni kapacitet, vijabilnost, migratorni i invazivni potencijal U87 i U251 ćelija.
9. Povećanje ekspresija proteina SOX3 u U87 i U251 ćelijama glioblastoma ne utiče na aktivnost WNT signalnog puta, promovise aktivnost HH signalnog puta i dovodi do smanjenja procesa autofagije u ovim ćelijama.
10. Radioterapija u kojoj se koristi γ zračenje ne utiče na ekspresiju gena *SOX3* u ćelijama GBM, dok efekat temozolomida, leka koji se koristi u hemioterapiji, na ekspresiju gena *SOX3* zavisi od koncentracije (doze) leka i tipa ćelija glioblastoma.
11. Proces dediferencijacije ćelijskih linija poreklom od glioblastoma praćen je povećanjem ekspresije gena *SOX3*.
12. Kulture matičnih ćelija glioblastoma ekspimiraju gen *SOX3* i viši nivo ekspresije ovog gena detektovan je u kulturama matičnih ćelija glioblastoma u poređenju sa ekspresijom ovog gena uočenom u permanentnim ćelijskim linijama poreklom od GBM. Proces diferencijacije ovih ćelija praćen je smanjenjem ekspresije gena *SOX3*.
13. Tretman U251 ćelija RK smanjuje vijabilnost, menja način migracije i indukuje promene morfologije U251 ćelija, ali ne indukuje neuralnu diferencijaciju ovih ćelija. Pored toga, fiziološki relevantna koncentracija RK smanjuje sposobnost adhezije U251 ćelija za komponente ekstraćelijskog matriksa.

Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da geni *SOX1* i *SOX3* promovisu maligni fenotip ćelija glioblastoma, kao i da visoka ekspresija ova dva gena koreliše sa nediferenciranim stanjem matičnih ćelija glioblastoma. Rezultati ove doktorske disertacije po prvi put ukazuju da geni *SOX1* i *SOX3* mogu predstavljati nove markere za delovanje ciljane terapije glioblastoma.

7. REFERENCE

1. Evan, G.I. and K.H. Vousden, *Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer*. Nature, 2001. **411**(6835): p. 342-8.
2. Feitelson, M.A., et al., *Sustained proliferation in cancer: Mechanisms and novel therapeutic targets*. Semin Cancer Biol, 2015. **35 Suppl**: p. S25-S54.
3. Brady-Kalnay, S.M., *Molecular mechanisms of cancer cell-cell interactions: cell-cell adhesion-dependent signaling in the tumor microenvironment*. Cell Adh Migr, 2012. **6**(4): p. 344-5.
4. Sinha, T., *Tumors: Benign and Malignant*. Cancer Therapy & Oncology International Journal, 2018. **10**(3): p. 555790.
5. Torre, L.A., et al., *Global cancer statistics, 2012*. CA Cancer J Clin, 2015. **65**(2): p. 87-108.
6. Devi, U., *Basics of carcinogenesis*. Health Administrator, 2005. **7**(1): p. 16-24.
7. Malarkey, E.D., M. Hoenerhoff, and R.R. Robert Maronpot, *Carcinogenesis: Mechanisms and Manifestations in Haschek and Rousseaux's Handbook of Toxicologic Pathology*, M.W. Haschek, R. G.C., and W.A. M., Editors. 2013, Academic Press. p. 107-146.
8. Liu, J., *The dualistic origin of human tumors*. Semin Cancer Biol, 2018. **53**: p. 1-16.
9. Sonnenschein, C. and A.M. Soto, *Theories of carcinogenesis: an emerging perspective*. Semin Cancer Biol, 2008. **18**(5): p. 372-7.
10. Wilson, L.V., *Carcinogenesis as the Sum of Its Parts*. DISRUPTIVE SCIENCE AND TECHNOLOGY, 2012. **1**(2): p. 110-115.
11. Soto, A.M. and C. Sonnenschein, *Regulation of cell proliferation: the negative control perspective*. Ann N Y Acad Sci, 1991. **628**: p. 412-8.
12. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *The hallmarks of cancer*. Cell, 2000. **100**(1): p. 57-70.
13. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of Cancer: The Next Generation*. Cell, 2011. **144**(5): p. 646-674.

14. Cheng, N., et al., *Transforming growth factor-beta signaling-deficient fibroblasts enhance hepatocyte growth factor signaling in mammary carcinoma cells to promote scattering and invasion*. Mol Cancer Res, 2008. **6**(10): p. 1521-33.
15. Bhowmick, N.A., E.G. Neilson, and H.L. Moses, *Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression*. Nature, 2004. **432**(7015): p. 332-7.
16. Junttila, M.R. and G.I. Evan, *p53-a Jack of all trades but master of none*. Nature Reviews Cancer, 2009. **9**(11): p. 821-829.
17. Adams, J.M. and S. Cory, *The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy*. Oncogene, 2007. **26**(9): p. 1324-37.
18. Willis, S.N. and J.M. Adams, *Life in the balance: how BH3-only proteins induce apoptosis*. Current Opinion in Cell Biology, 2005. **17**(6): p. 617-625.
19. Lowe, S.W., E. Cepero, and G. Evan, *Intrinsic tumour suppression*. Nature, 2004. **432**(7015): p. 307-15.
20. Shay, J.W. and S. Bacchetti, *A survey of telomerase activity in human cancer*. Eur J Cancer, 1997. **33**(5): p. 787-91.
21. Bryan, T.M. and T.R. Cech, *Telomerase and the maintenance of chromosome ends*. Curr Opin Cell Biol, 1999. **11**(3): p. 318-24.
22. Hanahan, D. and J. Folkman, *Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis*. Cell, 1996. **86**(3): p. 353-64.
23. Talmadge, J.E. and I.J. Fidler, *AACR centennial series: the biology of cancer metastasis: historical perspective*. Cancer Res, 2010. **70**(14): p. 5649-69.
24. Fidler, I.J., *The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited*. Nat Rev Cancer, 2003. **3**(6): p. 453-8.
25. Negrini, S., V.G. Gorgoulis, and T.D. Halazonetis, *Genomic instability--an evolving hallmark of cancer*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2010. **11**(3): p. 220-8.
26. Salk, J.J., E.J. Fox, and L.A. Loeb, *Mutational heterogeneity in human cancers: origin and consequences*. Annu Rev Pathol, 2010. **5**: p. 51-75.
27. Jackson, S.P. and J. Bartek, *The DNA-damage response in human biology and disease*. Nature, 2009. **461**(7267): p. 1071-8.

28. Kastan, M.B., *DNA damage responses: mechanisms and roles in human disease: 2007 G.H.A. Clowes Memorial Award Lecture*. Mol Cancer Res, 2008. **6**(4): p. 517-24.
29. Dvorak, H.F., *Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing*. N Engl J Med, 1986. **315**(26): p. 1650-9.
30. Pages, F., et al., *Immune infiltration in human tumors: a prognostic factor that should not be ignored*. Oncogene, 2010. **29**(8): p. 1093-102.
31. DeNardo, D.G., P. Andreu, and L.M. Coussens, *Interactions between lymphocytes and myeloid cells regulate pro- versus anti-tumor immunity*. Cancer Metastasis Rev, 2010. **29**(2): p. 309-16.
32. Grivennikov, S.I., F.R. Greten, and M. Karin, *Immunity, inflammation, and cancer*. Cell, 2010. **140**(6): p. 883-99.
33. Qian, B.Z. and J.W. Pollard, *Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis*. Cell, 2010. **141**(1): p. 39-51.
34. Karnoub, A.E. and R.A. Weinberg, *Chemokine networks and breast cancer metastasis*. Breast Dis, 2006. **26**: p. 75-85.
35. Phan, L.M., S.C. Yeung, and M.H. Lee, *Cancer metabolic reprogramming: importance, main features, and potentials for precise targeted anti-cancer therapies*. Cancer Biol Med, 2014. **11**(1): p. 1-19.
36. Pavlova, N.N. and C.B. Thompson, *The Emerging Hallmarks of Cancer Metabolism*. Cell Metab, 2016. **23**(1): p. 27-47.
37. Muenst, S., et al., *The immune system and cancer evasion strategies: therapeutic concepts*. J Intern Med, 2016. **279**(6): p. 541-62.
38. G.M., C., *Cancer*, in *The Cell: A Molecular Approach 2nd edition*. 2000, Sinauer Associates.
39. Louis, D.N., et al., *The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary*. Acta Neuropathol, 2016. **131**(6): p. 803-20.

40. Ferlay, J., et al., *Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012*. International Journal of Cancer, 2015. **136**(5): p. E359-E386.
41. Ostrom, Q.T., et al., *CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2008-2012*. Neuro Oncol, 2015. **17 Suppl 4**: p. iv1-iv62.
42. Mesfin, F.B. and M.A. Al-Dhahir, *Cancer, Brain, Gliomas*, in *StatPearls*. 2018: Treasure Island (FL).
43. Pollack, I.F., *Brain tumors in children*. N Engl J Med, 1994. **331**(22): p. 1500-7.
44. Wen, P.Y. and S. Kesari, *Malignant gliomas in adults*. N Engl J Med, 2008. **359**(5): p. 492-507.
45. Ohgaki, H. and P. Kleihues, *Population-based studies on incidence, survival rates, and genetic alterations in astrocytic and oligodendroglial gliomas*. J Neuropathol Exp Neurol, 2005. **64**(6): p. 479-89.
46. Savitz, D.A., H. Checkoway, and D.P. Loomis, *Magnetic field exposure and neurodegenerative disease mortality among electric utility workers*. Epidemiology, 1998. **9**(4): p. 398-404.
47. Mitchell, D.A., et al., *Sensitive detection of human cytomegalovirus in tumors and peripheral blood of patients diagnosed with glioblastoma*. Neuro-Oncology, 2008. **10**(1): p. 10-18.
48. Gladson, C.L., R.A. Prayson, and W.M. Liu, *The pathobiology of glioma tumors*. Annu Rev Pathol, 2010. **5**: p. 33-50.
49. Louis, D.N., et al., *The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system*. Acta Neuropathol, 2007. **114**(2): p. 97-109.
50. Komori, T., Y. Muragaki, and M.F. Chernov, *Pathology and Genetics of Gliomas*. Prog Neurol Surg, 2018. **31**: p. 1-37.
51. Hamilton, R.L. and I.F. Pollack, *The molecular biology of ependymomas*. Brain Pathology, 1997. **7**(2): p. 807-822.
52. Cachia, D., et al., *Case-based review: ependymomas in adults*. Neuro-Oncology Practice, 2018. **5**(3): p. 142-153.

53. McGuire, C.S., K.L. Sainani, and P.G. Fisher, *Incidence patterns for ependymoma: a Surveillance, Epidemiology, and End Results study Clinical article*. Journal of Neurosurgery, 2009. **110**(4): p. 725-729.
54. Ruda, R., M. Gilbert, and R. Soffiatti, *Ependymomas of the adult: molecular biology and treatment*. Current Opinion in Neurology, 2008. **21**(6): p. 754-761.
55. Sasidharan, A. and R. Krishnatry, *Molecular insights turning game for management of ependymoma: A review of literature*. Cancer Translational Medicine, 2018. **4**(5): p. 123-128.
56. Wesseling, P., M. van den Bent, and A. Perry, *Oligodendroglioma: pathology, molecular mechanisms and markers*. Acta Neuropathol, 2015. **129**(6): p. 809-27.
57. Lau, C.S., K. Mahendraraj, and R.S. Chamberlain, *Oligodendrogliomas in pediatric and adult patients: an outcome-based study from the Surveillance, Epidemiology, and End Result database*. Cancer Manag Res, 2017. **9**: p. 159-166.
58. Reifenberger, J., et al., *Molecular genetic analysis of oligodendroglial tumors shows preferential allelic deletions on 19q and 1p*. Am J Pathol, 1994. **145**(5): p. 1175-90.
59. Reifenberger, G. and D.N. Louis, *Oligodendroglioma: toward molecular definitions in diagnostic neuro-oncology*. J Neuropathol Exp Neurol, 2003. **62**(2): p. 111-26.
60. Bromberg, J.E. and M.J. van den Bent, *Oligodendrogliomas: molecular biology and treatment*. Oncologist, 2009. **14**(2): p. 155-63.
61. Gao, J., et al., *A rare case of oligoastrocytoma with atypical symptoms initially diagnosed as multiple sclerosis: A case report*. Mol Clin Oncol, 2016. **4**(2): p. 206-208.
62. Ruiz, J. and G.J. Lesser, *Low-grade gliomas*. Curr Treat Options Oncol, 2009. **10**(3-4): p. 231-42.
63. Okamoto, Y., et al., *Population-based study on incidence, survival rates, and genetic alterations of low-grade diffuse astrocytomas and oligodendrogliomas*. Acta Neuropathol, 2004. **108**(1): p. 49-56.
64. Khani, P., et al., *Genetic and epigenetic contribution to astrocytic gliomas pathogenesis*. J Neurochem, 2019. **148**(2): p. 188-203.

65. Aldape, K., et al., *Glioblastoma: pathology, molecular mechanisms and markers*. Acta Neuropathol, 2015. **129**(6): p. 829-48.
66. Bečulić, H., *Hirurgija tumora centralnog nervnog sistema* 2016: Agfa - print doo Tešanj.
67. Barthel, F.P., P. Wesseling, and R.G.W. Verhaak, *Reconstructing the molecular life history of gliomas*. Acta Neuropathol, 2018. **135**(5): p. 649-670.
68. Cloughesy, T.F., W.K. Cavenee, and P.S. Mischel, *Glioblastoma: from molecular pathology to targeted treatment*. Annu Rev Pathol, 2014. **9**: p. 1-25.
69. Ostrom, Q.T., et al., *The epidemiology of glioma in adults: a "state of the science" review*. Neuro Oncol, 2014. **16**(7): p. 896-913.
70. Hanif, F., et al., *Glioblastoma Multiforme: A Review of its Epidemiology and Pathogenesis through Clinical Presentation and Treatment*. Asian Pac J Cancer Prev, 2017. **18**(1): p. 3-9.
71. Linos, E., et al., *Atopy and risk of brain tumors: a meta-analysis*. J Natl Cancer Inst, 2007. **99**(20): p. 1544-50.
72. Nakada, M., et al., *Aberrant signaling pathways in glioma*. Cancers (Basel), 2011. **3**(3): p. 3242-78.
73. Yang, H., et al., *IDH1 and IDH2 mutations in tumorigenesis: mechanistic insights and clinical perspectives*. Clin Cancer Res, 2012. **18**(20): p. 5562-71.
74. Furnari, F.B., et al., *Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment*. Genes Dev, 2007. **21**(21): p. 2683-710.
75. Chin, L., et al., *Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways*. Nature, 2008. **455**(7216): p. 1061-1068.
76. Alvarez-Satta, M. and A. Matheu, *Primary cilium and glioblastoma*. Ther Adv Med Oncol, 2018. **10**: p. 1758835918801169.
77. Brennan, C.W., et al., *The Somatic Genomic Landscape of Glioblastoma*. Cell, 2013. **155**(2): p. 462-477.
78. Noushmehr, H., et al., *Identification of a CpG Island Methylator Phenotype that Defines a Distinct Subgroup of Glioma*. Cancer Cell, 2010. **17**(5): p. 510-522.

79. Verhaak, R.G., et al., *Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1*. *Cancer Cell*, 2010. **17**(1): p. 98-110.
80. Brennan, C.W., et al., *The somatic genomic landscape of glioblastoma*. *Cell*, 2013. **155**(2): p. 462-77.
81. Noroxxe, D.S., H.S. Poulsen, and U. Lassen, *Hallmarks of glioblastoma: a systematic review*. *ESMO Open*, 2016. **1**(6): p. e000144.
82. Anjum, K., et al., *Current status and future therapeutic perspectives of glioblastoma multiforme (GBM) therapy: A review*. *Biomed Pharmacother*, 2017. **92**: p. 681-689.
83. Reinartz, R., et al., *Functional Subclone Profiling for Prediction of Treatment-Induced Intratumor Population Shifts and Discovery of Rational Drug Combinations in Human Glioblastoma*. *Clin Cancer Res*, 2017. **23**(2): p. 562-574.
84. Sottoriva, A., et al., *Intratumor heterogeneity in human glioblastoma reflects cancer evolutionary dynamics*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013. **110**(10): p. 4009-14.
85. Qazi, M.A., et al., *Intratumoral heterogeneity: pathways to treatment resistance and relapse in human glioblastoma*. *Ann Oncol*, 2017. **28**(7): p. 1448-1456.
86. Singh, S.K., et al., *Identification of human brain tumour initiating cells*. *Nature*, 2004. **432**(7015): p. 396-401.
87. Louis, D.N., *Molecular pathology of malignant gliomas*. *Annu Rev Pathol*, 2006. **1**: p. 97-117.
88. Davis, M.E., *Glioblastoma: Overview of Disease and Treatment*. *Clin J Oncol Nurs*, 2016. **20**(5 Suppl): p. S2-8.
89. Stupp, R., et al., *Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma*. *New England Journal of Medicine*, 2005. **352**(10): p. 987-996.
90. Lee, Y., et al., *WNT signaling in glioblastoma and therapeutic opportunities*. *Laboratory Investigation*, 2016. **96**(2): p. 137-150.
91. Clement, V., et al., *HEDGEHOG-GLII signaling regulates human glioma growth, cancer stem cell self-renewal, and tumorigenicity*. *Curr Biol*, 2007. **17**(2): p. 165-72.

92. Kanzawa, T., et al., *Role of autophagy in temozolomide-induced cytotoxicity for malignant glioma cells*. Cell Death and Differentiation, 2004. **11**(4): p. 448-457.
93. Pirtoli, L., et al., *The prognostic role of Beclin 1 protein expression in high-grade gliomas*. Autophagy, 2009. **5**(7): p. 930-6.
94. Huang, X., et al., *Reduced expression of LC3B-II and Beclin 1 in glioblastoma multiforme indicates a down-regulated autophagic capacity that relates to the progression of astrocytic tumors*. J Clin Neurosci, 2010. **17**(12): p. 1515-9.
95. Logan, C.Y. and R. Nusse, *The Wnt signaling pathway in development and disease*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2004. **20**: p. 781-810.
96. Wodarz, A. and R. Nusse, *Mechanisms of Wnt signaling in development*. Annu Rev Cell Dev Biol, 1998. **14**: p. 59-88.
97. Mareel, M., et al., *E-cadherin/catenin/cytoskeleton complex: a regulator of cancer invasion*. J Cell Physiol, 1997. **173**(2): p. 271-4.
98. Bullions, L.C. and A.J. Levine, *The role of beta-catenin in cell adhesion, signal transduction, and cancer*. Curr Opin Oncol, 1998. **10**(1): p. 81-7.
99. Kimelman, D. and W. Xu, *beta-catenin destruction complex: insights and questions from a structural perspective*. Oncogene, 2006. **25**(57): p. 7482-91.
100. Kormish, J.D., D. Sinner, and A.M. Zorn, *Interactions between SOX factors and Wnt/beta-catenin signaling in development and disease*. Dev Dyn, 2010. **239**(1): p. 56-68.
101. Hoppler, S. and C.L. Kavanagh, *Wnt signalling: variety at the core*. J Cell Sci, 2007. **120**(Pt 3): p. 385-93.
102. Roose, J., et al., *The Xenopus Wnt effector XTcf-3 interacts with Groucho-related transcriptional repressors*. Nature, 1998. **395**(6702): p. 608-612.
103. Gordon, M.D. and R. Nusse, *Wnt signaling: Multiple pathways, multiple receptors, and multiple transcription factors*. Journal of Biological Chemistry, 2006. **281**(32): p. 22429-22433.
104. Clevers, H., *Wnt/beta-catenin signaling in development and disease*. Cell, 2006. **127**(3): p. 469-480.

105. Daniels, D.L. and W.I. Weis, *Beta-catenin directly displaces Groucho/TLE repressors from Tcf/Lef in Wnt-mediated transcription activation*. Nat Struct Mol Biol, 2005. **12**(4): p. 364-71.
106. Arce, L., N.N. Yokoyama, and M.L. Waterman, *Diversity of LEF/TCF action in development and disease*. Oncogene, 2006. **25**(57): p. 7492-504.
107. Stadel, R., R. Hoffmans, and K. Basler, *Transcription under the control of nuclear Arm/beta-catenin*. Curr Biol, 2006. **16**(10): p. R378-85.
108. Gregorieff, A. and H. Clevers, *Wnt signaling in the intestinal epithelium: from endoderm to cancer*. Genes & Development, 2005. **19**(8): p. 877-890.
109. Park, C.H., et al., *Quercetin, a potent inhibitor against beta-catenin/Tcf signaling in SW480 colon cancer cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2005. **328**(1): p. 227-34.
110. Morin, P.J., et al., *Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC*. Science, 1997. **275**(5307): p. 1787-90.
111. Fujie, H., et al., *Frequent beta-catenin aberration in human hepatocellular carcinoma*. Hepatol Res, 2001. **20**(1): p. 39-51.
112. Woo, D.K., et al., *Altered expression and mutation of beta-catenin gene in gastric carcinomas and cell lines*. Int J Cancer, 2001. **95**(2): p. 108-13.
113. He, L., et al., *Wnt/beta-catenin signaling cascade: A promising target for glioma therapy*. J Cell Physiol, 2019. **234**(3): p. 2217-2228.
114. Sareddy, G.R., et al., *Activation of Wnt/beta-catenin/Tcf signaling pathway in human astrocytomas*. Neurochem Int, 2009. **55**(5): p. 307-17.
115. Denysenko, T., et al., *WNT/beta-catenin Signaling Pathway and Downstream Modulators in Low- and High-grade Glioma*. Cancer Genomics Proteomics, 2016. **13**(1): p. 31-45.
116. Liu, C., et al., *Wnt/beta-Catenin pathway in human glioma: expression pattern and clinical/prognostic correlations*. Clin Exp Med, 2011. **11**(2): p. 105-12.
117. Jiang, J. and C.C. Hui, *Hedgehog signaling in development and cancer*. Dev Cell, 2008. **15**(6): p. 801-12.

118. Didiasova, M., L. Schaefer, and M. Wygrecka, *Targeting GLI Transcription Factors in Cancer*. *Molecules*, 2018. **23**(5).
119. Taipale, J. and P.A. Beachy, *The Hedgehog and Wnt signalling pathways in cancer*. *Nature*, 2001. **411**(6835): p. 349-54.
120. Taipale, J., et al., *Patched acts catalytically to suppress the activity of Smoothed*. *Nature*, 2002. **418**(6900): p. 892-7.
121. Altaba, A.R.I., *Catching a Gli-mpse of Hedgehog*. *Cell*, 1997. **90**(2): p. 193-196.
122. Villavicencio, E.H., D.O. Walterhouse, and P.M. Iannaccone, *The Sonic hedgehog-Patched-Gli pathway in human development and disease*. *American Journal of Human Genetics*, 2000. **67**(5): p. 1047-1054.
123. Yang, L., et al., *Activation of the hedgehog-signaling pathway in human cancer and the clinical implications*. *Oncogene*, 2010. **29**(4): p. 469-481.
124. de Sauvage, F., *Targeting the Hedgehog Pathway in Cancer*. *Annals of Oncology*, 2010. **21**: p. 23-23.
125. Wang, K., et al., *Gli1 inhibition induces cell-cycle arrest and enhanced apoptosis in brain glioma cell lines*. *Journal of Neuro-Oncology*, 2010. **98**(3): p. 319-327.
126. Cui, D.M., et al., *Gli1 is a potential target for alleviating multidrug resistance of gliomas*. *Journal of the Neurological Sciences*, 2010. **288**(1-2): p. 156-166.
127. Braun, S., et al., *Hedgehog signaling in glioblastoma multiforme*. *Cancer Biology & Therapy*, 2012. **13**(7): p. 487-495.
128. Takezaki, T., et al., *Essential role of the Hedgehog signaling pathway in human glioma-initiating cells*. *Cancer Science*, 2011. **102**(7): p. 1306-1312.
129. Levine, B. and G. Kroemer, *Autophagy in the pathogenesis of disease*. *Cell*, 2008. **132**(1): p. 27-42.
130. Dice, J.F., *Chaperone-mediated autophagy*. *Autophagy*, 2007. **3**(4): p. 295-299.
131. Kunz, J.B., H. Schwarz, and A. Mayer, *Determination of four sequential stages during microautophagy in vitro*. *Journal of Biological Chemistry*, 2004. **279**(11): p. 9987-9996.
132. Klionsky, D.J. and S.D. Emr, *Cell biology - Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation*. *Science*, 2000. **290**(5497): p. 1717-1721.

133. Grasso, D. and M.I. Vaccaro, *Macroautophagy and the oncogene-induced senescence*. *Frontiers in Endocrinology*, 2014. **5**.
134. Clarke, P.G., *Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanisms*. *Anat Embryol (Berl)*, 1990. **181**(3): p. 195-213.
135. Sinha, S. and B. Levine, *The autophagy effector Beclin 1: a novel BH3-only protein*. *Oncogene*, 2008. **27 Suppl 1**: p. S137-48.
136. Liu, W.J., et al., *p62 links the autophagy pathway and the ubiquitin-proteasome system upon ubiquitinated protein degradation*. *Cellular & Molecular Biology Letters*, 2016. **21**.
137. Hoyer-Hansen, M. and M. Jaattela, *Autophagy - An emerging target for cancer therapy*. *Autophagy*, 2008. **4**(5): p. 574-580.
138. Maiuri, M.C., et al., *Control of autophagy by oncogenes and tumor suppressor genes*. *Cell Death and Differentiation*, 2009. **16**(1): p. 87-93.
139. Brech, A., et al., *Autophagy in tumour suppression and promotion*. *Mol Oncol*, 2009. **3**(4): p. 366-75.
140. Hu, Y.L., et al., *Hypoxia-induced autophagy promotes tumor cell survival and adaptation to antiangiogenic treatment in glioblastoma*. *Cancer Res*, 2012. **72**(7): p. 1773-83.
141. Bischof, J., et al., *Cancer stem cells: The potential role of autophagy, proteolysis, and cathepsins in glioblastoma stem cells*. *Tumour Biol*, 2017. **39**(3): p. 1010428317692227.
142. Yang, Z.F. and D.J. Klionsky, *Mammalian autophagy: core molecular machinery and signaling regulation*. *Curr Opin Cell Biol*, 2010. **22**(2): p. 124-131.
143. Carmo, A., et al., *Effect of temozolomide on the U-118 glioma cell line*. *Oncol Lett*, 2011. **2**(6): p. 1165-1170.
144. Kanzawa, T., et al., *Role of autophagy in temozolomide-induced cytotoxicity for malignant glioma cells*. *Cell Death Differ*, 2004. **11**(4): p. 448-57.
145. Kaza, N., L. Kohli, and K.A. Roth, *Autophagy in Brain Tumors: A New Target for Therapeutic Intervention*. *Brain Pathology*, 2012. **22**(1): p. 89-98.

146. Bayin, N.S. and G.D. Placantonakis, *Heterogeneity and Diversity of Cancer Stem Cells in Glioblastoma*. International Journal of Stem Cell Research & Therapy 2014. **1**(1): p. 1:001.
147. Lathia, J.D., et al., *Cancer stem cells in glioblastoma*. Genes & Development, 2015. **29**(12): p. 1203-1217.
148. Bradshaw, A., et al., *Cancer Stem Cell Hierarchy in Glioblastoma Multiforme*. Front Surg, 2016. **3**: p. 21.
149. Sakariassen, P.O., H. Immervoll, and M. Chekenya, *Cancer stem cells as mediators of treatment resistance in brain tumors: Status and controversies*. Neoplasia, 2007. **9**(11): p. 882-892.
150. Pevny, L.H. and R. Lovell-Badge, *Sox genes find their feet*. Curr Opin Genet Dev, 1997. **7**(3): p. 338-44.
151. Wegner, M., *From head to toes: the multiple facets of Sox proteins*. Nucleic Acids Res, 1999. **27**(6): p. 1409-20.
152. Lefebvre, V., et al., *Control of cell fate and differentiation by Sry-related high-mobility-group box (Sox) transcription factors*. Int J Biochem Cell Biol, 2007. **39**(12): p. 2195-214.
153. Laudet, V., D. Stehelin, and H. Clevers, *Ancestry and diversity of the HMG box superfamily*. Nucleic Acids Res, 1993. **21**(10): p. 2493-501.
154. Harley, V.R., R. Lovell-Badge, and P.N. Goodfellow, *Definition of a consensus DNA binding site for SRY*. Nucleic Acids Res, 1994. **22**(8): p. 1500-1.
155. Gubbay, J., et al., *A gene mapping to the sex-determining region of the mouse Y chromosome is a member of a novel family of embryonically expressed genes*. Nature, 1990. **346**(6281): p. 245-50.
156. Sinclair, A.H., et al., *A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif*. Nature, 1990. **346**(6281): p. 240-4.
157. Schepers, G.E., R.D. Teasdale, and P. Koopman, *Twenty pairs of sox: extent, homology, and nomenclature of the mouse and human sox transcription factor gene families*. Dev Cell, 2002. **3**(2): p. 167-70.

158. Lefebvre, V., P. Li, and B. de Crombrughe, *A new long form of Sox5 (L-Sox5), Sox6 and Sox9 are coexpressed in chondrogenesis and cooperatively activate the type II collagen gene*. EMBO J, 1998. **17**(19): p. 5718-33.
159. Wunderle, V.M., et al., *Cloning and characterization of SOX5, a new member of the human SOX gene family*. Genomics, 1996. **36**(2): p. 354-8.
160. Hiraoka, Y., et al., *The mouse Sox5 gene encodes a protein containing the leucine zipper and the Q box*. Biochim Biophys Acta, 1998. **1399**(1): p. 40-6.
161. Osaki, E., et al., *Identification of a novel Sry-related gene and its germ cell-specific expression*. Nucleic Acids Res, 1999. **27**(12): p. 2503-10.
162. Polanco, J.C. and P. Koopman, *Sry and the hesitant beginnings of male development*. Dev Biol, 2007. **302**(1): p. 13-24.
163. Kamachi, Y. and H. Kondoh, *Sox proteins: regulators of cell fate specification and differentiation*. Development, 2013. **140**(20): p. 4129-44.
164. Avilion, A.A., et al., *Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function*. Genes Dev, 2003. **17**(1): p. 126-40.
165. de la Rocha, A.M., et al., *Role of SOX family of transcription factors in central nervous system tumors*. Am J Cancer Res, 2014. **4**(4): p. 312-24.
166. Graham, V., et al., *SOX2 functions to maintain neural progenitor identity*. Neuron, 2003. **39**(5): p. 749-765.
167. Kiefer, J.C., *Back to basics: Sox genes*. Dev Dyn, 2007. **236**(8): p. 2356-66.
168. Takahashi, K. and S. Yamanaka, *Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors*. Cell, 2006. **126**(4): p. 663-76.
169. Weiss, J., et al., *Sox3 is required for gonadal function, but not sex determination, in males and females*. Mol Cell Biol, 2003. **23**(22): p. 8084-91.
170. Karnavas, T., et al., *SoxB, cell cycle and neurogenesis*. Front Physiol, 2013. **4**: p. 298.
171. Sellers, K., et al., *Transcriptional control of GABAergic neuronal subtype identity in the thalamus*. Neural Dev, 2014. **9**: p. 14.

172. Makrides, N., et al., *Sequential Role of SOXB2 Factors in GABAergic Neuron Specification of the Dorsal Midbrain*. Front Mol Neurosci, 2018. **11**: p. 152.
173. Tanaka, S., et al., *Interplay of SOX and POU factors in regulation of the Nestin gene in neural primordial cells*. Mol Cell Biol, 2004. **24**(20): p. 8834-46.
174. Murugan, S., et al., *WT1 and Sox11 regulate synergistically the promoter of the Wnt4 gene that encodes a critical signal for nephrogenesis*. Experimental Cell Research, 2012. **318**(10): p. 1134-1145.
175. Schilham, M.W., et al., *Defects in cardiac outflow tract formation and pro-B-lymphocyte expansion in mice lacking Sox-4*. Nature, 1996. **380**(6576): p. 711-4.
176. Smits, P., et al., *The transcription factors L-Sox5 and Sox6 are essential for cartilage formation*. Dev Cell, 2001. **1**(2): p. 277-90.
177. Melichar, H.J., et al., *Regulation of gammadelta versus alphabeta T lymphocyte differentiation by the transcription factor SOX13*. Science, 2007. **315**(5809): p. 230-3.
178. Dumitriu, B., et al., *Sox6 cell-autonomously stimulates erythroid cell survival, proliferation, and terminal maturation and is thereby an important enhancer of definitive erythropoiesis during mouse development*. Blood, 2006. **108**(4): p. 1198-1207.
179. Britsch, S., et al., *The transcription factor Sox10 is a key regulator of peripheral glial development*. Genes & Development, 2001. **15**(1): p. 66-78.
180. Stolt, C.C., et al., *Terminal differentiation of myelin-forming oligodendrocytes depends on the transcription factor Sox10*. Genes & Development, 2002. **16**(2): p. 165-170.
181. Stolt, C.C., et al., *The Sox9 transcription factor determines glial fate choice in the developing spinal cord*. Genes & Development, 2003. **17**(13): p. 1677-1689.
182. Wagner, T., et al., *Autosomal sex reversal and campomelic dysplasia are caused by mutations in and around the SRY-related gene SOX9*. Cell, 1994. **79**(6): p. 1111-20.
183. Foster, J.W., et al., *Campomelic dysplasia and autosomal sex reversal caused by mutations in an SRY-related gene*. Nature, 1994. **372**(6506): p. 525-30.

184. Chaboissier, M.C., et al., *Functional analysis of Sox8 and Sox9 during sex determination in the mouse*. Development, 2004. **131**(9): p. 1891-901.
185. Barrionuevo, F., et al., *Testis cord differentiation after the sex determination stage is independent of Sox9 but fails in the combined absence of Sox9 and Sox8*. Developmental Biology, 2009. **327**(2): p. 301-312.
186. Feng, C.W.A., et al., *SOX30 is required for male fertility in mice*. Scientific Reports, 2017. **7**.
187. Castillo, S.D. and M. Sanchez-Cespedes, *The SOX family of genes in cancer development: biological relevance and opportunities for therapy*. Expert Opin Ther Targets, 2012. **16**(9): p. 903-19.
188. Dong, C., D. Wilhelm, and P. Koopman, *Sox genes and cancer*. Cytogenet Genome Res, 2004. **105**(2-4): p. 442-7.
189. Zhu, Y., et al., *The role of Sox genes in lung morphogenesis and cancer*. Int J Mol Sci, 2012. **13**(12): p. 15767-83.
190. Vervoort, S.J., R. van Boxtel, and P.J. Coffey, *The role of SRY-related HMG box transcription factor 4 (SOX4) in tumorigenesis and metastasis: friend or foe?* Oncogene, 2013. **32**(29): p. 3397-409.
191. Thu, K.L., et al., *SOX15 and other SOX family members are important mediators of tumorigenesis in multiple cancer types*. Oncoscience, 2014. **1**(5): p. 326-35.
192. Holmberg, J., et al., *Activation of Neural and Pluripotent Stem Cell Signatures Correlates with Increased Malignancy in Human Glioma*. Plos One, 2011. **6**(3).
193. Chen, J.T., et al., *SOX1 suppresses cell growth and induces apoptosis by regulating Wnt/beta-catenin signaling pathway in gastric cancer*. International Journal of Clinical and Experimental Pathology, 2016. **9**(11): p. 11658-11663.
194. Guan, Z., et al., *SOX1 down-regulates beta-catenin and reverses malignant phenotype in nasopharyngeal carcinoma*. Molecular Cancer, 2014. **13**.
195. Lin, Y.W., et al., *SOX1 suppresses cell growth and invasion in cervical cancer*. Gynecologic Oncology, 2013. **131**(1): p. 174-181.
196. Song, L.Q., et al., *SOX1 inhibits breast cancer cell growth and invasion through suppressing the Wnt/-catenin signaling pathway*. Apmis, 2016. **124**(7): p. 547-555.

197. Tsao, C.M., et al., *SOX1 Functions as a Tumor Suppressor by Antagonizing the WNT/beta-Catenin Signaling Pathway in Hepatocellular Carcinoma*. *Hepatology*, 2012. **56**(6): p. 2277-2287.
198. Mathews, L.A., et al., *Epigenetic regulation of CpG promoter methylation in invasive prostate cancer cells*. *Molecular Cancer*, 2010. **9**.
199. Rudin, C.M., et al., *Comprehensive genomic analysis identifies SOX2 as a frequently amplified gene in small-cell lung cancer*. *Nature Genetics*, 2012. **44**(10): p. 1111-+.
200. Otsubo, T., et al., *SOX2 is frequently downregulated in gastric cancers and inhibits cell growth through cell-cycle arrest and apoptosis*. *British Journal of Cancer*, 2008. **98**(4): p. 824-831.
201. Wuebben, E.L. and A. Rizzino, *The dark side of SOX2: cancer - a comprehensive overview*. *Oncotarget*, 2017. **8**(27): p. 44917-44943.
202. Bass, A.J., et al., *SOX2 is an amplified lineage-survival oncogene in lung and esophageal squamous cell carcinomas*. *Nature Genetics*, 2009. **41**(11): p. 1238-U105.
203. Xia, Y., et al., *The oncogenic potential of the high mobility group box protein Sox3*. *Cancer Res*, 2000. **60**(22): p. 6303-6.
204. Feng, Y., et al., *Overexpression of Sox3 is associated with promoted tumor progression and poor prognosis in hepatocellular carcinoma*. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 2017. **10**(7): p. 7873-7881.
205. Li, K., et al., *Overexpression of Sox3 is Associated with Diminished Prognosis in Esophageal Squamous Cell Carcinoma*. *Annals of Surgical Oncology*, 2013. **20**: p. S459-S466.
206. Yan, Q., et al., *Sex-determining region Y-box3 (SOX3) functions as an oncogene in promoting epithelial ovarian cancer by targeting Src kinase*. *Tumor Biology*, 2016. **37**(9): p. 12263-12271.
207. Kim, R., et al., *Genome-based identification of cancer genes by proviral tagging in mouse retrovirus-induced T-cell lymphomas*. *J Virol*, 2003. **77**(3): p. 2056-62.

208. Qiu, M., et al., *Sex-determining region Y-box protein 3 induces epithelial-mesenchymal transition in osteosarcoma cells via transcriptional activation of Snail1*. J Exp Clin Cancer Res, 2017. **36**(1): p. 46.
209. Stanisavljevic, D., et al., *SOX14 activates the p53 signaling pathway and induces apoptosis in a cervical carcinoma cell line*. PLoS One, 2017. **12**(9): p. e0184686.
210. Ferletta, M., et al., *Forced expression of Sox21 inhibits Sox2 and induces apoptosis in human glioma cells*. Int J Cancer, 2011. **129**(1): p. 45-60.
211. Liu, P., et al., *Sex-determining region Y box 4 is a transforming oncogene in human prostate cancer cells*. Cancer Res, 2006. **66**(8): p. 4011-9.
212. Castillo, S.D., et al., *Novel transcriptional targets of the SRY-HMG box transcription factor SOX4 link its expression to the development of small cell lung cancer*. Cancer Res, 2012. **72**(1): p. 176-86.
213. Vegliante, M.C., et al., *SOX11 regulates PAX5 expression and blocks terminal B-cell differentiation in aggressive mantle cell lymphoma*. Blood, 2013. **121**(12): p. 2175-85.
214. Qu, Y., et al., *The metastasis suppressor SOX11 is an independent prognostic factor for improved survival in gastric cancer*. International Journal of Oncology, 2014. **44**(5): p. 1512-1520.
215. Zhang, S., et al., *Oncogenicity of the transcription factor SOX8 in hepatocellular carcinoma*. Med Oncol, 2014. **31**(4): p. 918.
216. Matheu, A., et al., *Oncogenicity of the developmental transcription factor Sox9*. Cancer Res, 2012. **72**(5): p. 1301-15.
217. Castillo, S.D. and M. Sanchez-Cespedes, *The SOX family of genes in cancer development: biological relevance and opportunities for therapy*. Expert Opinion on Therapeutic Targets, 2012. **16**(9): p. 903-919.
218. Hoek, K.S., et al., *In vivo switching of human melanoma cells between proliferative and invasive states*. Pigment Cell & Melanoma Research, 2008. **21**(2): p. 269-269.
219. Hoek, K.S., et al., *Metastatic potential of melanomas defined by specific gene expression profiles with no BRAF signature*. Pigment Cell Research, 2006. **19**(4): p. 290-302.

220. Bakos, R.M., et al., *Nestin and SOX9 and SOX10 transcription factors are coexpressed in melanoma*. *Exp Dermatol*, 2010. **19**(8): p. e89-94.
221. Stovall, D.B., P. Cao, and G. Sui, *SOX7: from a developmental regulator to an emerging tumor suppressor*. *Histol Histopathol*, 2014. **29**(4): p. 439-45.
222. Yang, T., et al., *Sox17 inhibits hepatocellular carcinoma progression by downregulation of KIF14 expression*. *Tumour Biol*, 2014. **35**(11): p. 11199-207.
223. Zhang, W., et al., *Epigenetic inactivation of the canonical Wnt antagonist SRY-box containing gene 17 in colorectal cancer*. *Cancer Res*, 2008. **68**(8): p. 2764-72.
224. Wang, G., et al., *Knockdown of SOX18 inhibits the proliferation, migration and invasion of hepatocellular carcinoma cells*. *Oncol Rep*, 2015. **34**(3): p. 1121-8.
225. Pula, B., et al., *SOX18 expression predicts response to platinum-based chemotherapy in ovarian cancer*. *Anticancer Res*, 2014. **34**(8): p. 4029-37.
226. Pula, B., et al., *Impact of SOX18 expression in cancer cells and vessels on the outcome of invasive ductal breast carcinoma*. *Cell Oncol (Dordr)*, 2013. **36**(6): p. 469-83.
227. Petrovic, I., et al., *SOX18 Is a Novel Target Gene of Hedgehog Signaling in Cervical Carcinoma Cell Lines*. *PLoS One*, 2015. **10**(11): p. e0143591.
228. Thu, K.L., et al., *SOX15 is a candidate tumor suppressor in pancreatic cancer with a potential role in Wnt/beta-catenin signaling*. *Oncogene*, 2014. **33**(3): p. 279-288.
229. Ben-Porath, I., et al., *An embryonic stem cell-like gene expression signature in poorly differentiated aggressive human tumors*. *Nat Genet*, 2008. **40**(5): p. 499-507.
230. Gangemi, R.M., et al., *SOX2 silencing in glioblastoma tumor-initiating cells causes stop of proliferation and loss of tumorigenicity*. *Stem Cells*, 2009. **27**(1): p. 40-8.
231. Alonso, M.M., et al., *Genetic and epigenetic modifications of Sox2 contribute to the invasive phenotype of malignant gliomas*. *PLoS One*, 2011. **6**(11): p. e26740.
232. Suva, M.L., et al., *Reconstructing and Reprogramming the Tumor-Propagating Potential of Glioblastoma Stem-like Cells*. *Cell*, 2014. **157**(3): p. 580-594.
233. Caglayan, D., et al., *Sox21 inhibits glioma progression in vivo by forming complexes with Sox2 and stimulating aberrant differentiation*. *Int J Cancer*, 2013. **133**(6): p. 1345-56.

234. Lin, B., et al., *Massively parallel signature sequencing and bioinformatics analysis identifies up-regulation of TGFBI and SOX4 in human glioblastoma*. PLoS One, 2010. **5**(4): p. e10210.
235. Bruna, A., et al., *High TGFbeta-Smad activity confers poor prognosis in glioma patients and promotes cell proliferation depending on the methylation of the PDGF-B gene*. Cancer Cell, 2007. **11**(2): p. 147-60.
236. Galatro, T.F., et al., *Differential expression of ID4 and its association with TP53 mutation, SOX2, SOX4 and OCT-4 expression levels*. PLoS One, 2013. **8**(4): p. e61605.
237. Weigle, B., et al., *Highly specific overexpression of the transcription factor SOX11 in human malignant gliomas*. Oncol Rep, 2005. **13**(1): p. 139-44.
238. Hide, T., et al., *Sox11 prevents tumorigenesis of glioma-initiating cells by inducing neuronal differentiation*. Cancer Res, 2009. **69**(20): p. 7953-9.
239. Ueda, R., et al., *Expression of a transcriptional factor, SOX6, in human gliomas*. Brain Tumor Pathol, 2004. **21**(1): p. 35-8.
240. Ueda, R., et al., *Preferential expression and frequent IgG responses of a tumor antigen, SOX5, in glioma patients*. Int J Cancer, 2007. **120**(8): p. 1704-11.
241. Kurtzdotter, I., et al., *SOX5/6/21 Prevent Oncogene-Driven Transformation of Brain Stem Cells*. Cancer Res, 2017. **77**(18): p. 4985-4997.
242. Kordes, U. and C. Hagel, *Expression of SOX9 and SOX10 in central neuroepithelial tumor*. J Neurooncol, 2006. **80**(2): p. 151-5.
243. Wang, L., et al., *Oncogenic role of SOX9 expression in human malignant glioma*. Med Oncol, 2012. **29**(5): p. 3484-90.
244. Yang, Y.P., et al., *Inhibition of cancer stem cell-like properties and reduced chemoradioresistance of glioblastoma using microRNA145 with cationic polyurethane-short branch PEI*. Biomaterials, 2012. **33**(5): p. 1462-1476.
245. Kim, I.K., et al., *Sox7 promotes high-grade glioma by increasing VEGFR2-mediated vascular abnormality*. J Exp Med, 2018. **215**(3): p. 963-983.
246. Collignon, J., et al., *A comparison of the properties of Sox-3 with Sry and two related genes, Sox-1 and Sox-2*. Development, 1996. **122**(2): p. 509-20.

247. Malas, S., et al., *Cloning and mapping of the human SOX1: a highly conserved gene expressed in the developing brain*. Mamm Genome, 1997. **8**(11): p. 866-8.
248. Elkouris, M., et al., *Sox1 maintains the undifferentiated state of cortical neural progenitor cells via the suppression of Prox1-mediated cell cycle exit and neurogenesis*. Stem Cells, 2011. **29**(1): p. 89-98.
249. Pevny, L.H., et al., *A role for SOX1 in neural determination*. Development, 1998. **125**(10): p. 1967-78.
250. Ekonomou, A., et al., *Neuronal migration and ventral subtype identity in the telencephalon depend on SOX1*. PLoS Biol, 2005. **3**(6): p. e186.
251. Malas, S., et al., *Sox1-deficient mice suffer from epilepsy associated with abnormal ventral forebrain development and olfactory cortex hyperexcitability*. Neuroscience, 2003. **119**(2): p. 421-32.
252. Venere, M., et al., *Sox1 marks an activated neural stem/progenitor cell in the hippocampus*. Development, 2012. **139**(21): p. 3938-49.
253. Nishiguchi, S., et al., *Sox1 directly regulates the gamma-crystallin genes and is essential for lens development in mice*. Genes Dev, 1998. **12**(6): p. 776-81.
254. Kamachi, Y., et al., *Involvement of Sox1, 2 and 3 in the early and subsequent molecular events of lens induction*. Development, 1998. **125**(13): p. 2521-32.
255. Kan, L., et al., *Dual function of Sox1 in telencephalic progenitor cells*. Dev Biol, 2007. **310**(1): p. 85-98.
256. Gure, A.O., et al., *Serological identification of embryonic neural proteins as highly immunogenic tumor antigens in small cell lung cancer*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2000. **97**(8): p. 4198-4203.
257. Lai, H.C., et al., *Identification of novel DNA methylation markers in cervical cancer*. Int J Cancer, 2008. **123**(1): p. 161-7.
258. Su, H.Y., et al., *An epigenetic marker panel for screening and prognostic prediction of ovarian cancer*. International Journal of Cancer, 2009. **124**(2): p. 387-393.
259. Stevanovic, M., et al., *SOX3 is an X-linked gene related to SRY*. Hum Mol Genet, 1993. **2**(12): p. 2013-8.

260. Foster, J.W. and J.A. Graves, *An SRY-related sequence on the marsupial X chromosome: implications for the evolution of the mammalian testis-determining gene*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(5): p. 1927-31.
261. Graves, J.A., *Sex chromosome specialization and degeneration in mammals*. Cell, 2006. **124**(5): p. 901-14.
262. Bowles, J., G. Schepers, and P. Koopman, *Phylogeny of the SOX family of developmental transcription factors based on sequence and structural indicators*. Dev Biol, 2000. **227**(2): p. 239-55.
263. Woods, K.S., et al., *Over- and underdosage of SOX3 is associated with infundibular hypoplasia and hypopituitarism*. American Journal of Human Genetics, 2005. **76**(5): p. 833-849.
264. Alatzoglou, K.S., et al., *Increased Transactivation Associated with SOX3 Polyalanine Tract Deletion in a Patient with Hypopituitarism*. Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 2011. **96**(4): p. E685-E690.
265. Brunelli, S., et al., *Expression of Sox3 throughout the developing central nervous system is dependent on the combined action of discrete, evolutionarily conserved regulatory elements*. Genesis, 2003. **36**(1): p. 12-24.
266. Wood, H.B. and V. Episkopou, *Comparative expression of the mouse Sox1, Sox2 and Sox3 genes from pre-gastrulation to early somite stages*. Mech Dev, 1999. **86**(1-2): p. 197-201.
267. Bylund, M., et al., *Vertebrate neurogenesis is counteracted by Sox1-3 activity*. Nat Neurosci, 2003. **6**(11): p. 1162-8.
268. Rogers, N., et al., *Expression of the murine transcription factor SOX3 during embryonic and adult neurogenesis*. Gene Expr Patterns, 2013. **13**(7): p. 240-8.
269. Rizzoti, K., et al., *SOX3 is required during the formation of the hypothalamo-pituitary axis*. Nat Genet, 2004. **36**(3): p. 247-55.
270. Kondoh, H., M. Uchikawa, and Y. Kamachi, *Interplay of Pax6 and SOX2 in lens development as a paradigm of genetic switch mechanisms for cell differentiation*. Int J Dev Biol, 2004. **48**(8-9): p. 819-27.

271. Solomon, N.M., et al., *Array comparative genomic hybridisation analysis of boys with X-linked hypopituitarism identifies a 3.9 Mb duplicated critical region at Xq27 containing SOX3*. *J Med Genet*, 2007. **44**(4): p. e75.
272. Laumonier, F., et al., *Transcription factor SOX3 is involved in X-linked mental retardation with growth hormone deficiency*. *Am J Hum Genet*, 2002. **71**(6): p. 1450-5.
273. Woods, K.S., et al., *Over- and underdosage of SOX3 is associated with infundibular hypoplasia and hypopituitarism*. *Am J Hum Genet*, 2005. **76**(5): p. 833-49.
274. Hamel, B.C., et al., *Familial X-linked mental retardation and isolated growth hormone deficiency: clinical and molecular findings*. *Am J Med Genet*, 1996. **64**(1): p. 35-41.
275. Hol, F.A., et al., *Identification and characterization of an Xq26-q27 duplication in a family with spina bifida and panhypopituitarism suggests the involvement of two distinct genes*. *Genomics*, 2000. **69**(2): p. 174-81.
276. Lagerstrom-Fermer, M., et al., *X-linked recessive panhypopituitarism associated with a regional duplication in Xq25-q26*. *Am J Hum Genet*, 1997. **60**(4): p. 910-6.
277. Mizuno, K., et al., *Elucidation of distinctive genomic DNA structures in patients with 46,XX testicular disorders of sex development using genome wide analyses*. *J Urol*, 2014. **192**(2): p. 535-41.
278. Moalem, S., et al., *XX male sex reversal with genital abnormalities associated with a de novo SOX3 gene duplication*. *Am J Med Genet A*, 2012. **158A**(7): p. 1759-64.
279. Sutton, E., et al., *Identification of SOX3 as an XX male sex reversal gene in mice and humans*. *J Clin Invest*, 2011. **121**(1): p. 328-41.
280. Gong, B., et al., *Overexpression of microRNA-194 suppresses the epithelial-mesenchymal transition in targeting stem cell transcription factor Sox3 in endometrial carcinoma stem cells*. *Tumour Biol*, 2017. **39**(6): p. 1010428317706217.
281. Zheng, Y.F., et al., *The effect of high Sox3 expression on lymphangiogenesis and lymph node metastasis in esophageal squamous cell carcinoma*. *Am J Transl Res*, 2017. **9**(6): p. 2684-2693.

282. Su, R., et al., *Knockdown of SOX2OT inhibits the malignant biological behaviors of glioblastoma stem cells via up-regulating the expression of miR-194-5p and miR-122*. *Molecular Cancer*, 2017. **16**.
283. Dhermain, F., *Radiotherapy of high-grade gliomas: current standards and new concepts, innovations in imaging and radiotherapy, and new therapeutic approaches*. *Chin J Cancer*, 2014. **33**(1): p. 16-24.
284. Cruz, F.D. and I. Matushansky, *Solid tumor differentiation therapy - is it possible?* *Oncotarget*, 2012. **3**(5): p. 559-67.
285. Yan, M. and Q. Liu, *Differentiation therapy: a promising strategy for cancer treatment*. *Chin J Cancer*, 2016. **35**: p. 3.
286. Caren, H., S. Beck, and S.M. Pollard, *Differentiation therapy for glioblastoma - too many obstacles?* *Molecular & Cellular Oncology*, 2016. **3**(2).
287. Flynn, P.J., et al., *Retinoic acid treatment of acute promyelocytic leukemia: in vitro and in vivo observations*. *Blood*, 1983. **62**(6): p. 1211-7.
288. Lotem, J. and L. Sachs, *In vivo control of differentiation of myeloid leukemic cells by recombinant granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin 3*. *Blood*, 1988. **71**(2): p. 375-82.
289. Sachs, L., *The control of hematopoiesis and leukemia: from basic biology to the clinic*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996. **93**(10): p. 4742-9.
290. Tao, Y., Y. Yang, and W. Wang, *Effect of all-trans-retinoic acid on the differentiation, maturation and functions of dendritic cells derived from cord blood monocytes*. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 2006. **47**(3): p. 444-50.
291. Mathew, J.S. and R.P. Sharma, *Effect of all-trans-retinoic acid on cytokine production in a murine macrophage cell line*. *Int J Immunopharmacol*, 2000. **22**(9): p. 693-706.
292. Kagechika, H. and K. Shudo, *Synthetic retinoids: Recent developments concerning structure and clinical utility*. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2005. **48**(19): p. 5875-5883.

293. Grummer, M.A., Z.N. Salih, and R.D. Zachman, *Effect of retinoic acid and ethanol on retinoic acid receptor beta and glial fibrillary acidic protein mRNA expression in human astrocytoma cells*. Neuroscience Letters, 2000. **294**(2): p. 73-76.
294. Kim, E.J., et al., *Inhibition of caco-2 cell proliferation by all-trans retinoic acid: Role of insulin-like growth factor binding protein-6*. Journal of Cellular Physiology, 2002. **190**(1): p. 92-100.
295. Liang, C., L. Yang, and S.W. Guo, *All-trans retinoic acid inhibits migration, invasion and proliferation, and promotes apoptosis in glioma cells in vitro*. Oncology Letters, 2015. **9**(6): p. 2833-2838.
296. Donato, L.J. and N. Noy, *Suppression of mammary carcinoma growth by retinoic acid: Proapoptotic genes are targets for retinoic acid receptor and cellular retinoic acid-binding protein II signaling*. Cancer Research, 2005. **65**(18): p. 8193-8199.
297. Donato, L.J., J.H. Suh, and N. Noy, *Suppression of mammary carcinoma cell growth by retinoic acid: the cell cycle control gene Btg2 is a direct target for retinoic acid receptor signaling*. Cancer Research, 2007. **67**(2): p. 609-615.
298. Manor, D., et al., *Mammary carcinoma suppression by cellular retinoic acid binding protein-II*. Cancer Research, 2003. **63**(15): p. 4426-4433.
299. Latagliata, R., et al., *The role of all-trans-retinoic acid (ATRA) treatment in newly-diagnosed acute promyelocytic leukemia patients aged > 60 years*. Annals of Oncology, 1997. **8**(12): p. 1273-1275.
300. Robertson, K.A., et al., *Multiple members of the retinoic acid receptor family are capable of mediating the granulocytic differentiation of HL-60 cells*. Mol Cell Biol, 1992. **12**(9): p. 3743-9.
301. Simeone, A.M. and A.M. Tari, *How retinoids regulate breast cancer cell proliferation and apoptosis*. Cellular and Molecular Life Sciences, 2004. **61**(12): p. 1475-1484.
302. Pasquali, D., et al., *Differential effects of all-trans-retinoic acid (RA) on Erk1/2 phosphorylation and cAMP accumulation in normal and malignant human prostate epithelial cells: Erk1/2 inhibition restores RA-induced decrease of cell growth in*

- malignant prostate cells*. European Journal of Endocrinology, 2005. **152**(4): p. 663-669.
303. Zheng, Y., et al., *Effect of retinoids on AOM-induced colon cancer in rats: modulation of cell proliferation, apoptosis and aberrant crypt foci*. Carcinogenesis, 1999. **20**(2): p. 255-260.
304. Herreros-Villanueva, M., T.K. Er, and L. Bujanda, *Retinoic Acid Reduces Stem Cell-Like Features in Pancreatic Cancer Cells*. Pancreas, 2015. **44**(6): p. 918-924.
305. Chen, M.C., et al., *Retinoic acid and cancer treatment*. Biomedicine (Taipei), 2014. **4**: p. 22.
306. Schug, T.T., et al., *Opposing effects of retinoic acid on cell growth result from alternate activation of two different nuclear receptors*. Cell, 2007. **129**(4): p. 723-33.
307. Castellino, R.C. and D.L. Durden, *Mechanisms of disease: the PI3K-Akt-PTEN signaling node--an intercept point for the control of angiogenesis in brain tumors*. Nat Clin Pract Neurol, 2007. **3**(12): p. 682-93.
308. Fathima Hurmath, K., P. Ramaswamy, and D.N. Nandakumar, *IL-1beta microenvironment promotes proliferation, migration, and invasion of human glioma cells*. Cell Biol Int, 2014. **38**(12): p. 1415-22.
309. Haque, A., et al., *Induction of apoptosis and immune response by all-trans retinoic acid plus interferon-gamma in human malignant glioblastoma T98G and U87MG cells*. Cancer Immunol Immunother, 2007. **56**(5): p. 615-25.
310. Niu, C.S., et al., *Effect of all-trans retinoic acid on the proliferation and differentiation of brain tumor stem cells*. J Exp Clin Cancer Res, 2010. **29**: p. 113.
311. Tang, K., et al., *[Effect of all-trans-retinoic acid on C6 glioma cell proliferation and differentiation]*. Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban, 2008. **33**(10): p. 892-7.
312. Bouterfa, H., et al., *Retinoids inhibit human glioma cell proliferation and migration in primary cell cultures but not in established cell lines*. Neurosurgery, 2000. **46**(2): p. 419-30.

313. Lu, J., et al., *ATRA-inhibited proliferation in glioma cells is associated with subcellular redistribution of beta-catenin via up-regulation of Axin*. J Neurooncol, 2008. **87**(3): p. 271-7.
314. Liang, C., L. Yang, and S. Guo, *All-trans retinoic acid inhibits migration, invasion and proliferation, and promotes apoptosis in glioma cells in vitro*. Oncol Lett, 2015. **9**(6): p. 2833-2838.
315. Paillaud, E., et al., *Retinoic acid increases proliferation rate of GL-15 glioma cells, involving activation of STAT-3 transcription factor*. J Neurosci Res, 2002. **67**(5): p. 670-9.
316. Papi, A., et al., *Inhibitory effects of retinoic acid and IIF on growth, migration and invasiveness in the U87MG human glioblastoma cell line*. Oncol Rep, 2007. **18**(4): p. 1015-21.
317. Suva, M.L., N. Riggi, and B.E. Bernstein, *Epigenetic reprogramming in cancer*. Science, 2013. **339**(6127): p. 1567-70.
318. Berezovsky, A.D., *Sox2 Promotes Malignancy in Glioblastoma by Regulating Plasticity and Astrocytic Differentiation (vol 16, pg 193, 2014)*. Neoplasia, 2014. **16**(5): p. 461-461.
319. Garros-Regulez, L., et al., *mTOR inhibition decreases SOX2-SOX9 mediated glioma stem cell activity and temozolomide resistance*. Expert Opin Ther Targets, 2016. **20**(4): p. 393-405.
320. Pollard, S.M., et al., *Glioma stem cell lines expanded in adherent culture have tumor-specific phenotypes and are suitable for chemical and genetic screens*. Cell Stem Cell, 2009. **4**(6): p. 568-80.
321. Popovic, J., et al., *Expression analysis of SOX14 during retinoic acid induced neural differentiation of embryonal carcinoma cells and assessment of the effect of its ectopic expression on SOXB members in HeLa cells*. PLoS One, 2014. **9**(3): p. e91852.
322. Garcia, I., et al., *Oncogenic activity of SOX1 in glioblastoma*. Sci Rep, 2017. **7**: p. 46575.

323. Topalovic, V., et al., *Epigenetic regulation of human SOX3 gene expression during early phases of neural differentiation of NT2/D1 cells*. PLoS One, 2017. **12**(9): p. e0184099.
324. Vicentic, J.M., et al., *All-trans retinoic acid influences viability, migration and adhesion of U251 glioblastoma cells*. Archives of Biological Sciences, 2017. **69**(4): p. 699-706.
325. Petrovic, I., et al., *SOX18 Is a Novel Target Gene of Hedgehog Signaling in Cervical Carcinoma Cell Lines*. Plos One, 2015. **10**(11).
326. Drakulic, D., A. Krstic, and M. Stevanovic, *Establishment and initial characterization of SOX2-overexpressing NT2/D1 cell clones*. Genet Mol Res, 2012. **11**(2): p. 1385-400.
327. Sandhu, J.K., M. Sikorska, and P.R. Walker, *Characterization of astrocytes derived from human NTera-2/D1 embryonal carcinoma cells*. Journal of Neuroscience Research, 2002. **68**(5): p. 604-614.
328. Dimri, G.P., *What has senescence got to do with cancer?* Cancer Cell, 2005. **7**(6): p. 505-512.
329. Campisi, J., *Cellular senescence as a tumor-suppressor mechanism*. Trends in Cell Biology, 2001. **11**(11): p. S27-S31.
330. Ohtani, N., D.J. Mann, and E. Hara, *Cellular senescence: Its role in tumor suppression and aging*. Cancer Science, 2009. **100**(5): p. 792-797.
331. Song, Z.H., et al., *Escape of U251 glioma cells from temozolomide-induced senescence was modulated by CDK1/survivin signaling*. American Journal of Translational Research, 2017. **9**(5): p. 2163-2180.
332. Kumar, R., et al., *Induction of senescence in primary glioblastoma cells by serum and TGFbeta*. Sci Rep, 2017. **7**(1): p. 2156.
333. Killela, P.J., et al., *TERT promoter mutations occur frequently in gliomas and a subset of tumors derived from cells with low rates of self-renewal*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(15): p. 6021-6.

334. Arita, H., et al., *TERT promoter mutations rather than methylation are the main mechanism for TERT upregulation in adult gliomas*. Acta Neuropathologica, 2013. **126**(6): p. 939-941.
335. Flores, J.M., J. Martin-Caballero, and R.A. Garcia-Fernandez, *p21 and p27 a shared senescence history*. Cell Cycle, 2014. **13**(11).
336. Huang, Z., et al., *Cancer stem cells in glioblastoma-molecular signaling and therapeutic targeting*. Protein & Cell, 2010. **1**(7): p. 638-655.
337. Jiang, Y. and L. Uhrbom, *On the origin of glioma*. Ups J Med Sci, 2012. **117**(2): p. 113-21.
338. Lee, V.M. and P.W. Andrews, *Differentiation of NTERA-2 clonal human embryonal carcinoma cells into neurons involves the induction of all three neurofilament proteins*. J Neurosci, 1986. **6**(2): p. 514-21.
339. Naumann, U., et al., *Glioma cell migration and invasion as potential target for novel treatment strategies*. Translational Neuroscience, 2013. **4**(3): p. 314-329.
340. Logan, C.Y. and R. Nusse, *The Wnt signaling pathway in development and disease*. Annual Review of Cell and Developmental Biology, 2004. **20**: p. 781-810.
341. Korinek, V., et al., *Constitutive transcriptional activation by a beta-catenin-Tcf complex in APC(-/-) colon carcinoma*. Science, 1997. **275**(5307): p. 1784-1787.
342. Ailles, L. and L.L. Siu, *Targeting the Hedgehog Pathway in Cancer: Can the Spines Be Smoothened?* Clinical Cancer Research, 2011. **17**(8): p. 2071-2073.
343. Rubin, L.L. and F.J. de Sauvage, *Targeting the Hedgehog pathway in cancer*. Nature Reviews Drug Discovery, 2006. **5**(12): p. 1026-1033.
344. Lee, Y., et al., *WNT signaling in glioblastoma and therapeutic opportunities*. Lab Invest, 2016. **96**(2): p. 137-50.
345. Mathew, R., V. Karantza-Wadsworth, and E. White, *Role of autophagy in cancer*. Nature Reviews Cancer, 2007. **7**(12): p. 961-967.
346. Bhutia, S.K., et al., *Autophagy: Cancer's Friend or Foe?* Advances in Cancer Research, Vol 118, 2013. **118**: p. 61-95.

347. Hu, Y.L., et al., *Hypoxia-Induced Autophagy Promotes Tumor Cell Survival and Adaptation to Antiangiogenic Treatment in Glioblastoma*. *Cancer Research*, 2012. **72**(7): p. 1773-1783.
348. Bischof, J., et al., *Cancer stem cells: The potential role of autophagy, proteolysis, and cathepsins in glioblastoma stem cells*. *Tumor Biology*, 2017. **39**(3).
349. Yang, Z.F. and D.J. Klionsky, *Mammalian autophagy: core molecular machinery and signaling regulation*. *Current Opinion in Cell Biology*, 2010. **22**(2): p. 124-131.
350. Carmo, A., et al., *Effect of temozolomide on the U-118 glioma cell line*. *Oncology Letters*, 2011. **2**(6): p. 1165-1170.
351. Dee, C.T., et al., *Sox3 regulates both neural fate and differentiation in the zebrafish ectoderm*. *Developmental Biology*, 2008. **320**(1): p. 289-301.
352. Uwanogho, D., et al., *Embryonic expression of the chicken Sox2, Sox3 and Sox11 genes suggests an interactive role in neuronal development*. *Mech Dev*, 1995. **49**(1-2): p. 23-36.
353. Miyagi, S., H. Kato, and A. Okuda, *Role of SoxB1 transcription factors in development*. *Cell Mol Life Sci*, 2009. **66**(23): p. 3675-84.
354. Khalili, A.A. and M.R. Ahmad, *A Review of Cell Adhesion Studies for Biomedical and Biological Applications*. *Int J Mol Sci*, 2015. **16**(8): p. 18149-84.
355. Okegawa, T., et al., *The role of cell adhesion molecule in cancer progression and its application in cancer therapy*. *Acta Biochim Pol*, 2004. **51**(2): p. 445-57.
356. Bylund, M., et al., *Vertebrate neurogenesis is counteracted by Sox1-3 activity*. *Nature Neuroscience*, 2003. **6**(11): p. 1162-1168.
357. Ferri, A.L.M., et al., *Sox2 deficiency causes neurodegeneration and impaired neurogenesis in the adult mouse brain*. *Development*, 2004. **131**(15): p. 3805-3819.
358. Zhang, J., et al., *SOX4 inhibits GBM cell growth and induces G0/G1 cell cycle arrest through Akt-p53 axis*. *BMC Neurol*, 2014. **14**: p. 207.
359. Friedmann-Morvinski, D., *Glioblastoma heterogeneity and cancer cell plasticity*. *Crit Rev Oncog*, 2014. **19**(5): p. 327-36.
360. Urbanska, K., et al., *Proliferative and apoptotic activity of glioblastoma multiforme cells cultured on in ovo model*. *In Vivo*, 2014. **28**(4): p. 541-8.

361. Reiprich, S. and M. Wegner, *From CNS stem cells to neurons and glia: Sox for everyone*. Cell Tissue Res, 2015. **359**(1): p. 111-24.
362. Claes, A., A.J. Idema, and P. Wesseling, *Diffuse glioma growth: a guerilla war*. Acta Neuropathologica, 2007. **114**(5): p. 443-458.
363. Altieri, R., et al., *Glioma Surgery: Technological Advances to Achieve a Maximal Safe Resection*. Surg Technol Int, 2015. **27**: p. 297-302.
364. Joy, A.M., et al., *Migrating glioma cells activate the PI3-K pathway and display decreased susceptibility to apoptosis*. J Cell Sci, 2003. **116**(Pt 21): p. 4409-17.
365. Li, N. and S. Li, *Epigenetic inactivation of SOX1 promotes cell migration in lung cancer*. Tumour Biol, 2015. **36**(6): p. 4603-10.
366. Nicolis, S.K., *Cancer stem cells and "stemness" genes in neuro-oncology*. Neurobiol Dis, 2007. **25**(2): p. 217-29.
367. Alcock, J. and V. Sottile, *Dynamic distribution and stem cell characteristics of Sox1-expressing cells in the cerebellar cortex*. Cell Res, 2009. **19**(12): p. 1324-33.
368. Wright, M.H., et al., *Brcal breast tumors contain distinct CD44+/CD24- and CD133+ cells with cancer stem cell characteristics*. Breast Cancer Res, 2008. **10**(1): p. R10.
369. Hattermann, K., et al., *Stem cell markers in glioma progression and recurrence*. International Journal of Oncology, 2016. **49**(5): p. 1899-1910.
370. Dufour, C., et al., *Astrocytes reverted to a neural progenitor-like state with transforming growth factor alpha are sensitized to cancerous transformation*. Stem Cells, 2009. **27**(10): p. 2373-82.
371. Singh, D.K., et al., *Oncogenes Activate an Autonomous Transcriptional Regulatory Circuit That Drives Glioblastoma*. Cell Reports, 2017. **18**(4): p. 961-976.
372. Adikusuma, F., et al., *Functional Equivalence of the SOX2 and SOX3 Transcription Factors in the Developing Mouse Brain and Testes*. Genetics, 2017. **206**(3): p. 1495-1503.
373. Feitelson, M.A., et al., *Sustained proliferation in cancer: Mechanisms and novel therapeutic targets*. Seminars in Cancer Biology, 2015. **35**: p. S25-S54.

374. Guo, Y.J., et al., *Downregulation of SOX3 leads to the inhibition of the proliferation, migration and invasion of osteosarcoma cells*. International Journal of Oncology, 2018. **52**(4): p. 1277-1284.
375. Zheng, Y.F., et al., *The effect of high Sox3 expression on lymphangiogenesis and lymph node metastasis in esophageal squamous cell carcinoma*. American Journal of Translational Research, 2017. **9**(6): p. 2684-2693.
376. Gong, B.L., et al., *Overexpression of microRNA-194 suppresses the epithelial-mesenchymal transition in targeting stem cell transcription factor Sox3 in endometrial carcinoma stem cells*. Tumor Biology, 2017. **39**(6).
377. Acloque, H., et al., *Reciprocal Repression between Sox3 and Snail Transcription Factors Defines Embryonic Territories at Gastrulation*. Developmental Cell, 2011. **21**(3): p. 546-558.
378. Zuccarini, M., et al., *The Role of Wnt Signal in Glioblastoma Development and Progression: A Possible New Pharmacological Target for the Therapy of This Tumor*. Genes, 2018. **9**(2).
379. Mojsin, M., et al., *Crosstalk between SOXB1 proteins and WNT/beta-catenin signaling in NT2/D1 cells*. Histochem Cell Biol, 2015. **144**(5): p. 429-41.
380. Zorn, A.M., et al., *Regulation of Wnt signaling by Sox proteins: XSox17 alpha/beta and XSox3 physically interact with beta-catenin*. Mol Cell, 1999. **4**(4): p. 487-98.
381. Braun, S., et al., *Hedgehog signaling in glioblastoma multiforme*. Cancer Biol Ther, 2012. **13**(7): p. 487-95.
382. Zhao, L., et al., *Disruption of SoxB1-dependent Sonic hedgehog expression in the hypothalamus causes septo-optic dysplasia*. Dev Cell, 2012. **22**(3): p. 585-96.
383. Blaess, S., et al., *Sonic hedgehog signaling in the development of the mouse hypothalamus*. Front Neuroanat, 2014. **8**: p. 156.
384. White, E., *The role for autophagy in cancer*. J Clin Invest, 2015. **125**(1): p. 42-6.
385. Li, N., et al., *Cisplatin-induced downregulation of SOX1 increases drug resistance by activating autophagy in non-small cell lung cancer cell*. Biochem Biophys Res Commun, 2013. **439**(2): p. 187-90.

386. Chou, Y.T., et al., *The emerging role of SOX2 in cell proliferation and survival and its crosstalk with oncogenic signaling in lung cancer*. *Stem Cells*, 2013. **31**(12): p. 2607-19.
387. Cho, Y.Y., et al., *Autophagy and cellular senescence mediated by Sox2 suppress malignancy of cancer cells*. *PLoS One*, 2013. **8**(2): p. e57172.
388. Jimenez-Sanchez, M., et al., *The Hedgehog signalling pathway regulates autophagy*. *Nat Commun*, 2012. **3**: p. 1200.
389. Wang, T.W., et al., *Sox3 expression identifies neural progenitors in persistent neonatal and adult mouse forebrain germinative zones*. *J Comp Neurol*, 2006. **497**(1): p. 88-100.
390. Li, B., et al., *TMEM140 is associated with the prognosis of glioma by promoting cell viability and invasion (vol 8, 89, 2015)*. *Journal of Hematology & Oncology*, 2015. **8**.
391. Castellino, R.C. and D.L. Durden, *Mechanisms of Disease: the PI3K-Akt-PTEN signaling node - an intercept point for the control of angiogenesis in brain tumors*. *Nature Clinical Practice Neurology*, 2007. **3**(12): p. 682-693.
392. Kyritsis, A.P., M.L. Bondy, and V.A. Levin, *Modulation of Glioma Risk and Progression by Dietary Nutrients and Antiinflammatory Agents*. *Nutrition and Cancer-an International Journal*, 2011. **63**(2): p. 174-184.
393. Olson, J.J., et al., *The role of targeted therapies in the management of progressive glioblastoma : a systematic review and evidence-based clinical practice guideline*. *J Neurooncol*, 2014. **118**(3): p. 557-99.
394. Xia, S.L., et al., *CRABP-II- and FABP5-independent responsiveness of human glioblastoma cells to all-trans retinoic acid*. *Oncotarget*, 2015. **6**(8): p. 5889-5902.
395. Huang, M.E., et al., *Use of all-trans retinoic acid in the treatment of acute promyelocytic leukemia*. *Blood*, 1988. **72**(2): p. 567-72.
396. Huang, M.E., et al., *Use of all-trans retinoic acid in the treatment of acute promyelocytic leukemia*. *Haematol Blood Transfus*, 1989. **32**: p. 88-96.
397. Fritz, H., et al., *Vitamin A and Retinoid Derivatives for Lung Cancer: A Systematic Review and Meta Analysis*. *Plos One*, 2011. **6**(6).

398. Torsvik, A., et al., *U-251 revisited: genetic drift and phenotypic consequences of long-term cultures of glioblastoma cells*. *Cancer Med*, 2014. **3**(4): p. 812-24.
399. Hou, L.C., et al., *Recurrent glioblastoma multiforme: a review of natural history and management options*. *Neurosurg Focus*, 2006. **20**(4): p. E5.
400. Brosicke, N. and A. Faissner, *Role of tenascins in the ECM of gliomas*. *Cell Adh Migr*, 2015. **9**(1-2): p. 131-40.
401. Liotta, L.A., *Tumor invasion and metastases--role of the extracellular matrix: Rhoads Memorial Award lecture*. *Cancer Res*, 1986. **46**(1): p. 1-7.
402. Chattopadhyay, N., et al., *Effect of all-trans-retinoic acid on integrin receptors of human cervical cancer (SiHa) cells*. *Gynecol Oncol*, 1999. **75**(2): p. 215-21.
403. Hendrix, M.J., et al., *Retinoic acid inhibition of human melanoma cell invasion through a reconstituted basement membrane and its relation to decreases in the expression of proteolytic enzymes and motility factor receptor*. *Cancer Res*, 1990. **50**(13): p. 4121-30.
404. Jiang, W.G., et al., *Tissue invasion and metastasis: Molecular, biological and clinical perspectives*. *Semin Cancer Biol*, 2015. **35** **Suppl**: p. S244-S275.
405. Cavallaro, U. and G. Christofori, *Cell adhesion in tumor invasion and metastasis: loss of the glue is not enough*. *Biochim Biophys Acta*, 2001. **1552**(1): p. 39-45.
406. Park, J.E., et al., *Hypoxic tumor cell modulates its microenvironment to enhance angiogenic and metastatic potential by secretion of proteins and exosomes*. *Mol Cell Proteomics*, 2010. **9**(6): p. 1085-99.
407. Shackleton, M., et al., *Heterogeneity in cancer: cancer stem cells versus clonal evolution*. *Cell*, 2009. **138**(5): p. 822-9.
408. Caren, H., S. Beck, and S.M. Pollard, *Differentiation therapy for glioblastoma - too many obstacles?* *Mol Cell Oncol*, 2016. **3**(2): p. e1124174.
409. Kamada, R., et al., *Effective Cellular Morphology Analysis for Differentiation Processes by a Fluorescent 1,3a,6a-Triazapentalene Derivative Probe in Live Cells*. *PLoS One*, 2016. **11**(8): p. e0160625.

410. Buell, D.N., et al., *Cell cycle and morphological changes during growth and differentiation of a rat basophilic leukemia cell line*. *Cancer Res*, 1976. **36**(9 pt.1): p. 3131-7.
411. Liu, Q., et al., *All-trans retinoic acid induced the differentiation of human glioma cells*. *Clinical Oncology and Cancer Research*, 2011. **8**: p. 42-46.
412. Das, A., N.L. Banik, and S.K. Ray, *Retinoids induced astrocytic differentiation with down regulation of telomerase activity and enhanced sensitivity to taxol for apoptosis in human glioblastoma T98G and U87MG cells*. *J Neurooncol*, 2008. **87**(1): p. 9-22.
413. Ying, M., et al., *Regulation of glioblastoma stem cells by retinoic acid: role for Notch pathway inhibition*. *Oncogene*, 2011. **30**(31): p. 3454-67.
414. Zeng, Y., et al., *Differentially expressed genes from the glioblastoma cell line SHG-44 treated with all-trans retinoic acid in vitro*. *J Clin Neurosci*, 2009. **16**(2): p. 285-94.

Stručna biografija

Jelena D. Marjanović, rođena je 1988. godine u Šapcu gde je završila osnovnu i srednju školu. Osnovne akademske studije završila je 2010. godine na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, a Master akademske studije 2012. godine na istom fakultetu. Eksperimentalni deo master rada uradila je u Laboratoriji za humanu molekularnu genetiku Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo Univerziteta u Beogradu. Doktorske studije upisala je 2012. godine na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, studijski program Molekularna biologija, smer Molekularna biologija eukariota. Od 2012. godine zaposlena je u Laboratoriji za humanu molekularnu genetiku Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo Univerziteta u Beogradu. Zvanje istraživač saradnik stekla je 2014. godine. Autor je ili koautor radova u međunarodnim časopisima i imala je saopštenja na domaćim i međunarodnim skupovima.

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Јелена Марјановић
Број индекса М3007/2012

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Анализа улоге гена *SOX1* и *SOX3* у промовисању малигног фенотипа ћелија глиобластома

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

Потпис аутора

У Београду, 13.05.2019.

Јелена Марјановић

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Јелена Марјановић

Број индекса M3007/2012

Студијски програм Молекуларна биологија еукариота

Наслов рада Анализа улоге гена *SOX1* и *SOX3* у промовисању малигног
фенотипа ћелија глиобластома

Ментори **академик Милена Стевановић**
др Данијела Дракулић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањена у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

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

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

Потпис аутора

У Београду, 13.05.2019.

Јелена Марјановић

Изјава о коришћењу

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

"Анализа улоге гена *SOX1* и *SOX3* у промовисању малигног фенотипа ћелија глиобластома"

која је моје ауторско дело.

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

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

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци.
Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

Потпис аутора

У Београду, 13.05.2019.

Јелена Марјановић

1. **Ауторство.** Дозвољава се умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. **Ауторство – некомерцијално.** Дозвољава се умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. **Ауторство – некомерцијално – без прерада.** Дозвољава се умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
4. **Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима.** Дозвољава се умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. **Ауторство – без прерада.** Дозвољава се умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
6. **Ауторство – делити под истим условима.** Дозвољава се умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.