

UNIVERZITET U BEOGRADU  
BIOLOŠKI FAKULTET

Isidora Petrović

**Transkripciona regulacija ekspresije  
humanog *SOX18* gena**

Doktorska disertacija

Beograd, 2012.

UNIVERSITY OF BELGRADE  
FACULTY OF BIOLOGY

Isidora Petrović

**Transcriptional regulation of the human  
SOX18 gene expression**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2012

## **MENTORI:**

dr Milena Stevanović, naučni savetnik, dopisni član SANU

Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Univerzitet u Beogradu

dr Goran Brajušković, docent

Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

## **ČLANOVI KOMISIJE:**

dr Milena Stevanović, naučni savetnik, dopisni član SANU

Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Univerzitet u Beogradu

dr Goran Brajušković, docent

Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

dr Svetlana Radović, vanredni profesor

Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

Datum odbrane:

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

*Ovom prilikom se zahvaljujem svom mentoru, dr Mileni Stevanović, na ukazanom poverenju, i nesebičnoj pomoći u realizaciji ovog rada. Zahvaljujem se na ukazanoj prilici da svoju doktorsku disertaciju realizujem u Laboratoriji za humanu molekularnu genetiku, u stručnom i stimulativnom okruženju. Zahvaljujem se za spremnost da svoje znanje i iskustvo podeli sa mnom.*

*Dr Svetlani Radović, koja je bila član komisije za odbranu moje magistarske teze, se zahvaljujem što je i ovog puta prihvatila da bude član komisije i pomogne u kritičkoj analizi i oceni ove teze.*

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

*Veliku zahvalnost, za pomoć, razumevanje i prijatnu atmosferu, dugujem svim svojim dragim, bliskim, kolegama iz laboratorije, koji su godinama bili deo mog laboratorijskog života. Veliko je zadovoljstvo bilo sa njima raditi, družiti se i deliti istraživačke brige.*

*Veliko hvala i svim kolegama Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, na pomoći, savetima i uvek dobroj atmosferi.*

*Najviše želim da se zahvalim svojoj porodici na ljubavi i podršci, na svakom interesantnom i inspirativnom trenutku koji provodimo zajedno. Zbog njih je sve ovo moguće i njima posvećujem ovaj rad.*

NASLOV: Transkripciona regulacija ekspresije humanog *SOX18* gena

## REZIME

Humani *SOX18* gen pripada familiji *SOX* gena koji kodiraju DNK-vezujuće proteine koji imaju ulogu transkripcionih faktora i arhitektonskih komponenti hromatina. *SOX18* gen ima važnu ulogu u regulaciji vaskularnog razvića, i učestvuje u specifikaciji i diferencijaciji endotelijalnih ćelija, angiogenezi i limfangiogenezi. Mutacije u *SOX18* genu kod čoveka su povezane sa sindromom Hipotrihoza-Limfedem-Talengiektazija (eng. Hypotrichosis-Lymphedema-Talangiectasia) čije su karakteristike poremećaji u razviću dlake, vaskularnog i limfnog sistema. Iako do danas ima dosta podataka o ulozi *SOX18* gena u procesima vaskularogeneze, angiogeneze i limfangiogeneze, još uvek se malo zna o molekularnim mehanizmima uključenim u regulaciju ekspresije ovog gena.

Osnovni ciljevi, istraživanja predstavljenog u ovoj tezi, bili su analiza transkripcione regulacije ekspresije humanog *SOX18* gena, kao i analiza uticaja pro-angiogenetskih faktora i inhibitora angiogeneze na ekspresiju ovog gena u endotelijalnim ćelijama. Ispitivanja transkripcione regulacije su obuhvatala analizu uloge određenih transkripcionih faktora u regulaciji aktivnosti *SOX18* promotora, kao i u regulaciji endogene ekspresije *SOX18* gena. Transkripciona regulacija je ispitivana u dva model sistema: HeLa ćelijama, koje su korišćena kao tumorski model sistem i EA.hy926 ćelijama, koje su korišćene kao endotelijalni model sistem. *In silico* analizom su identifikovana potencijalna vezivna mesta za različite transkripcione faktore koji mogu biti uključeni u regulaciju ekspresije *SOX18* gena. Za dalju funkcionalnu analizu odabrani su transkripcioni faktori Sp3, ZBP-89, NF-Y i EGR1. Na osnovu eksperimenata smanjene elektroforetske pokretljivosti, funkcionalnih/mutacionih analiza, i analiza ekspresije u nativnom kontekstu, pokazano je da su transkripcioni faktori Sp3 i ZBP-89 negativni, a NF-Y i EGR1 pozitivni regulatori transkripcije humanog *SOX18* gena. Na ovaj način pokazana je funkcionalna veza između transkripcionih faktora Sp3, ZBP-89, NF-Y i EGR1 i *SOX18* gena i omogućeno je bolje razumevanje, dela, transkripcione kontrole ekspresije ovog gena.

Polazeći od pretpostavke da su procesi vaskularogeneze i angiogeneze kontrolisani velikim brojem različitih faktora, uključujući faktore rasta, citokine, adhezione molekule i

endogene inhibitore, deo istraživanja se odnosio na analizu uticaja odabranih pro- i anti-angiogenetskih faktora na ekspresiju SOX18 proteina u endotelijalnom model sistemu. Tretman endotelijalnih ćelija sa određenim faktorom, a potom analiza uticaja na nivou SOX18 proteina, pokazao je da su vaskularni endotelijalni faktor rasta (eng. vascular endothelial growth factor-VEGF ) i tumorski faktor nekroze (eng. tumor necrosis factor-TNF) odgovorni za povećanje nivoa SOX18 proteina u endotelijalnim ćelijama. Na ovaj način je pokazano da je SOX18 pod uticajem VEGF i TNF signalnih puteva, koji stimulišu angiogenezu. Sa druge strane, nesteroidni antiinflamatorni lekovi (eng. nonsteroidal antiinflammatory drugs-NSAID) dovode do izraženog smanjenja u nivou SOX18 proteina u endotelijalnim ćelijama. Dobijeni rezultati otvarajući mogućnost za potencijalnu farmakološku manipulaciju ekspresijom *SOX18* gena.

KLJUČNE REČI: SOX18, transkripcija, promotor, transkripcioni faktor, endotelijalne ćelije, angiogeneza

NAUČNA OBLAST: Biologija

UŽA NAUČNA OBLAST: Molekularna biologija

UDK BROJ: 577.218(043.3)

TITLE: Transcriptional regulation of the human *SOX18* gene expression

## ABSTRACT

Human *SOX18* gene belongs to the family of *SOX* genes that encode DNA-binding proteins, which display properties of both transcription factors and architectural components of chromatin. *SOX18* gene plays important role in vascular development, endothelial cell specification and differentiation, angiogenesis and lymphangiogenesis. Mutations in human *SOX18* gene are associated with Hypotrichosis-Lymphedema-Talangiectasia syndrome, characterized by defects in hair, vascular and lymphatic development. Despite the mounting evidence that *SOX18* gene is an important player in vasculogenesis, angiogenesis and lymphangiogenesis, little is known about molecular mechanisms involved in the regulation of its expression.

The aim of this study was to investigate transcriptional regulation of the human *SOX18* gene expression, as well as the effects of pro- and anti-angiogenic factors on *SOX18* expression in endothelial cells. Analyses of transcriptional regulation included identification of transcription factors that are involved in regulation of *SOX18* promoter activity, as well as in regulation of endogenous *SOX18* expression. Two model systems were used: HeLa cells, as a tumor model system, and EA.hy926 cells, as an endothelial model system. Several putative transcription factor binding sites were identified by *in silico* analysis of the *SOX18* promoter sequence. Transcription factors Sp3, ZBP-89, NF-Y and EGR1 were selected for further functional analysis. By *in vitro* binding assays, functional/mutagenesis assays and analyses of endogenous *SOX18*, it has been shown that transcription factors Sp3 and ZBP-89 act as negative regulators, while NF-Y and EGR1 operate as positive regulators of *SOX18* gene expression. These results gave first functional link between Sp3, ZBP-89, NF-Y and EGR1 transcription factors and *SOX18* gene, thus providing better understanding of transcriptional regulation of *SOX18* gene expression.

Considering that processes of vasculogenesis and angiogenesis are under control of many various factors including growth factors, cytokines, adhesion molecules and endogenous inhibitors, further investigation included analysis of the effect of selected pro-

and anti-angiogenic factors on *SOX18* expression in endothelial model system. Treatment of endothelial cells with selected factors, followed by Western blot analyses revealed that vascular endothelial growth factor (VEGF) and tumor necrosis factor (TNF), increases the level of SOX18 protein. By this it has been shown that SOX18 expression is under control of VEGF and TNF signaling pathways. On the other hand, treatment with selected non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAID), led to strong decrease in SOX18 protein level. Taken together, these results open the possibility of pharmacological manipulation of *SOX18* gene expression.

KEY WORDS: SOX18, transcription, promoter, transcription factor, endothelial cells, angiogenesis

SCIENTIFIC FIELD: Biology

SCIENTIFIC DISCIPLINE: Molecular biology

UDC NUMBER: 577.218(043.3)



# SADRŽAJ

<b>1. Uvod</b>	1
1.1 Regulacija genske ekspresije kod eukariota	2
1.1.1 Strukturna organizacija promotora kod eukariota	6
1.1.2 Pojačivači i utišivači transkripcije gena (enhenseri i sajenseri)	9
1.1.3 Transkripcioni faktori	11
1.1.3.1 Sp3 (eng. specificity protein 3)	14
1.1.3.2 ZBP-89 (eng. zinc finger binding protein)	16
1.1.3.3 NF-Y (eng. nuclear factor Y)	17
1.1.3.4 EGR1 (eng early growth response protein 1)	18
1.2 <i>SOX/Sox</i> geni	19
1.2.1 Osnovne karakteristike SOX proteina	23
1.2.2 Interakcije SOX proteina sa drugim transkripcionim faktorima	24
1.2.3 SOX proteini-transkripcioni aktivatori i represori	27
1.3 Funkcija SOX proteina	28
1.4 <i>SOXF/SoxF</i> grupa	30
1.4.1 Molekularna funkcija SOXF proteina	31
1.4.2 SOXF u razviću srca, krvnih i limfnih sudova	32
1.5 SOX18 transkripcioni faktor	33
1.5.1 Mutacije u <i>Sox18/SOX18</i> genu	35
1.5.2 SOX18, vaskularne bolesti i kancerogeneza	36
1.5.3 SOX18 target geni	39
1.5.4 Analiza promotora humanog <i>SOX18</i> gena	40
1.6 Angiogeneza	41
1.6.1 Proangiogenetski faktori	42
1.6.2 Antiangiogenetski faktori	44
<b>2. Cilj rada</b>	45

<b>3. Materijal i metode</b>	47
3.1 Eksperimentalni materijal	47
3.1.1 Bakterijski sojevi korišćeni u radu	47
3.1.2 Vektori korišćeni u radu	47
3.1.3 Plazmidni konstrukti korišćeni u radu	48
3.1.4 Čelijske linije korišćene u radu	49
3.1.5 Antitela krišćena u radu	50
3.1.6 Oligonukleotidi korišćeni u radu	50
3.1.7 Komercijalni kitovi	51
3.1.8 Farmakološki agensi	51
3.1.9 Kompjuterski programi	52
3.2 Eksperimentalne metode	52
3.2.1 <i>In silico</i> analiza humanog <i>SOX18</i> promotorskog regiona i poređenje sa ortologom sekvencom miša	52
3.2.2 Generisanje mutiranog promotorskog konstrukta 255mutCAT6	53
3.2.3 Izolacija plazmidne DNK „Qiagen EndoFree®Plasmid“ kitom	53
3.2.4 Tranzijentna transfekcija HeLa ćelija kalcijum fosfatnom precipitacijom	54
3.2.5 Tranzijentna transfekcija EA.hy926 ćelija Lipofectamine reagensom	54
3.2.6 Priprema ćelijskih ekstrakata	55
3.2.7 $\beta$ -galaktozidazni esej	55
3.2.8 CAT esej	56
3.2.9 Izolovanje jedarnih proteina iz HeLa i EA.hy926 ćelija	57
3.2.10 Izolovanje bakterijski eksprimiranih rekombinantnih proteina	57
3.2.11 Esej smanjene elektroforetske pokretljivosti (eng. electomobility shift assay-EMSA)	58
3.2.12 Izolovanje ukupnih ćelijskih proteina iz HeLa, EA.hy926 i HUVEC ćelija	59
3.2.13 Imunološka detekcija proteina (Western blot)	59
3.2.14 Izolacija RNK	60
3.2.15 Reverzna transkripcija	60
3.2.16 RT-PCR	61

3.2.17 Kvantitativni RT-PCR (qRT-PCR)	61
<b>4. Rezultati</b>	62
4.1 <i>In silico</i> analiza promotorskog regiona <i>SOX18</i> gena i poređenje sa ortologom sekvencom kod miša	62
4.2 Uloga transkripcionog faktora Sp3 u regulaciji transkripcije <i>SOX18</i> gena	64
4.3 Uloga transkripcionog faktora ZBP-89 u regulaciji transkripcije <i>SOX18</i> gena	68
4.4 Uloga transkripcionog faktora NF-Y u regulaciji transkripcije <i>SOX18</i> gena	71
4.5 Uloga transkripcionog faktora EGR1 u regulaciji transkripcije <i>SOX18</i> gena	74
4.5.1 <i>In vitro</i> vezivanje EGR1 transkripcionog faktora za potencijalna vezivna mesta u <i>SOX18</i> promotoru	75
4.5.2 Analiza uloge pojačane ekspresije EGR1 na aktivnost <i>SOX18</i> promotorskih konstrukata u HeLa i EA.hy926 ćelijama	80
4.5.3 Analiza uticaja mutacija u vezivnim mestima za EGR1 na aktivnost <i>SOX18</i> minimalnog promotorskog regiona	82
4.5.4 Analiza uticaja povećane ekspresije EGR1 na nivo endogene <i>SOX18</i> ekspresije	82
4.6 Funkcionalna kompeticija između EGR1 i Sp3 u regulaciji aktivnosti <i>SOX18</i> promotora	86
4.7 Ekspresija <i>SOX18</i> gena u primarnim humanim endotelijalnim ćelijama	87
4.8 Odabir angiogenetskih i anti-angiogenetskih faktora čiji će uticaj na <i>SOX18</i> ekspresiju biti ispitivan	89
4.9 Uticaj angiogenetskih faktora rasta na nivo SOX18 proteina u HUVEC ćelijama	90
4.10 Uticaj ekstraćelijskih proteina matriksa na nivo SOX18 proteina u HUVEC ćelijama	93
4.11 Uticaj TNF-a na nivo SOX18 proteina u HUVEC ćelijama	94
4.12 Uticaj NSAID na nivo SOX18 proteina u HUVEC ćelijama	95
<b>5. Diskusija</b>	9
5.1 <i>In silico</i> analiza potencijalnih vezivnih mesta za transkripcione faktore u <i>SOX18</i> promotoru i odabir transkripcionih faktora za dalju analizu	99
5.2 Uloga transkripcionog faktora Sp3 u transkripcionoj regulaciji <i>SOX18</i> gena	100
5.3 Uloga transkripcionog faktora ZBP-89 u transkripcionoj regulaciji	

<i>SOX18</i> gena	102
5.4 Uloga transkripcionog faktora NF- $\kappa$ B u transkripcionoj regulaciji <i>SOX18</i> gena	103
5.5 Uloga transkripcionog faktora EGR1 u transkripcionoj regulaciji <i>SOX18</i> gena	104
5.6 Uloga funkcionalne kompeticije između transkripcionih faktora EGR1 i Sp3 u transkripcionoj regulaciji <i>SOX18</i> gena	107
5.7 Značaj ispitivanja uloge angiogenetskih faktora i farmakoloških inhibitora angiogeneze na <i>SOX18</i> ekspresiju	110
5.8 Uticaj faktora rasta VEGF na nivo SOX18 proteina u HUVEC ćelijama	111
5.9 Uticaj citikina TNF na nivo SOX18 proteina u HUVEC ćelijama	112
5.10 Uticaj NSAID na nivo SOX18 proteina u HUVEC ćelijama	113
5.11 <i>SOX18</i> kao potencijalni target gen u terapiji vaskularnih bolesti i kancera	114
<b>6. Zaključci</b>	117
<b>Literatura</b>	119

## 1. UVOD

Danas je jednostavno pronaći i razumeti definiciju transkripcije, datu u “slobodnoj enciklopediji”: transkripcija je sinteza RNK molekula kao kopije dela jednog lanca DNK (gena) koji katalizuje enzim RNK polimeraza, drugim rečima transkripcija je ništa više od pretvaranja genetičke informacije iz oblika DNK u RNK ([www.wikipedia.org](http://www.wikipedia.org)).

Međutim, ova jednostavna definicija prikriva složenost procesa koji opisuje. Jedan od velikih izazova molekularne genetike jeste, već decenijama, razumevanje procesa transkripcije, preciznije, razumevanje njegove regulacije i otkrivanje molekularnih mehanizama koji u toj regulaciji učestvuju. Preciznost kojom se biološki procesi odvijaju leži upravo u tačnom i sinhronizovanom sledu događaja koji omogućavaju odgovarajuću ekspresiju gena. Biološki značaj transkripcione regulacije je posebno naglašen u slučajevima kada najmanje promene u transkripcionoj mašineriji mogu dovesti do razvoja različitih bolesti. Konačno, smatra se da su upravo promene u transkripcionoj regulaciji predstavljale značajnu kvalitativnu i kvantitativnu genetičku komponentu za evolutivne promene.

Transkripciona regulacija je mnogo dinamičniji proces nego što se ranije smatralo. Ona uključuje veoma složenu interakciju između proksimalnih i distalnih regulatornih regiona, transkripcionih faktora i ko-faktora, zavisna je od metilacionog statusa regulatornih regiona kao i uzvodnih signalnih kaskada i različitih uslova sredine. Regulatorni mehanizmi su istovremeno kompleksni ali i veoma osetljivi i tačni.

Ovaj rad se bavi analizom transkripcione regulacije ekspresije humanog *SOX18* gena sa posebnim osvrtom na mehanizme koji imaju ulogu u regulaciji procesa angiogeneze. Predstavljena je uloga određenih transkripcionih faktora sa jedne strane i angiogenetskih signalnih molekula sa druge strane. Zajedno, definisanje ovih mehanizama omogućava bolje razumevanje uloge humanog *SOX18* gena u složenim fiziološkim procesima kao i u određenim patofiziološkim procesima u kojima, takođe, učestvuje.

## 1.1 Regulacije genske ekspresije kod eukariota

Kod višćelijskih organizama, tokom razvića ili kao odgovor na široki spektar ekstraćelijskih signala, diferencijalno se eksprimiraju protein-kodirajući geni, a rezultat toga je formiranje specifičnih ćelijskih tipova, tkiva i organa. Regulacija ekspresije gena i sinteza proteina kod eukariota su složeni procesi koji su kontrolisani na više nivoa. Ti procesi obuhvataju transkripcionu kontrolu, posttranskripcionu regulaciju (kontrola obrade pre-iRNK i transporta iz jedra), kontrolu degradacije iRNK, translacionu i posttranslacionu kontrolu, (aktivacija proteina kroz razne modifikacije), epigenetičku kontrolu (Darnell, 1982). Za ekspresiju većine gena najvažnija je transkripciona kontrola (Alberts, 1994). Na taj način sprečava se sinteza nepotrebnih intermedijera i štede ćelijski resursi (Darnell, 1982). Transkripciji eukariotskih gena koji kodiraju proteine prethodi veliki broj događaja u ćeliji, kao što su dekondezacija i remodelovanje hromatina na ciljnom lokusu, modifikacije histona, precizne prostorne i vremenski koordinisane interakcije između opštih i specifičnih transkripcionih faktora i *cis* regulatornih elemenata kao što su promotori, pojačivači (eng. enhanser), prigušivači (eng. silencer) i izolatori (eng. insulators) (Orphanides and Reinberg, 2002; Smale and Kadonaga, 2003; West and Fraser, 2005).

Eukariotski geni kodiraju proteine, odnosno informacione RNK molekule (iRNK) koji nose informaciju za sintezu proteina, kao i druge, ne-kodirajuće RNK molekule kojima pripadaju transportna RNK (tRNK), ribozozomalna RNK (rRNK), mikro RNK (miRNK), mala-nuklearna RNK (eng. small-nuclear snRNK), mala-interferirajuća RNK (eng. small interfering siRNK). Za razliku od prokariota, koji imaju jednu RNK polimerazu, kod eukariota postoje tri: RNK polimeraza I koja prepisuje gene za rRNK, RNK polimeraza II koja prepisuje gene koji kodiraju proteine i neke nuklearne RNK, dok je RNK polimeraza III uključena u sintezu malih RNK kao što su tRNK i 5S RNK (Lewis, 1982). Treba napomenuti da mikro RNK, mogu biti i proizvod obrade primarnog iRNK transkripta.

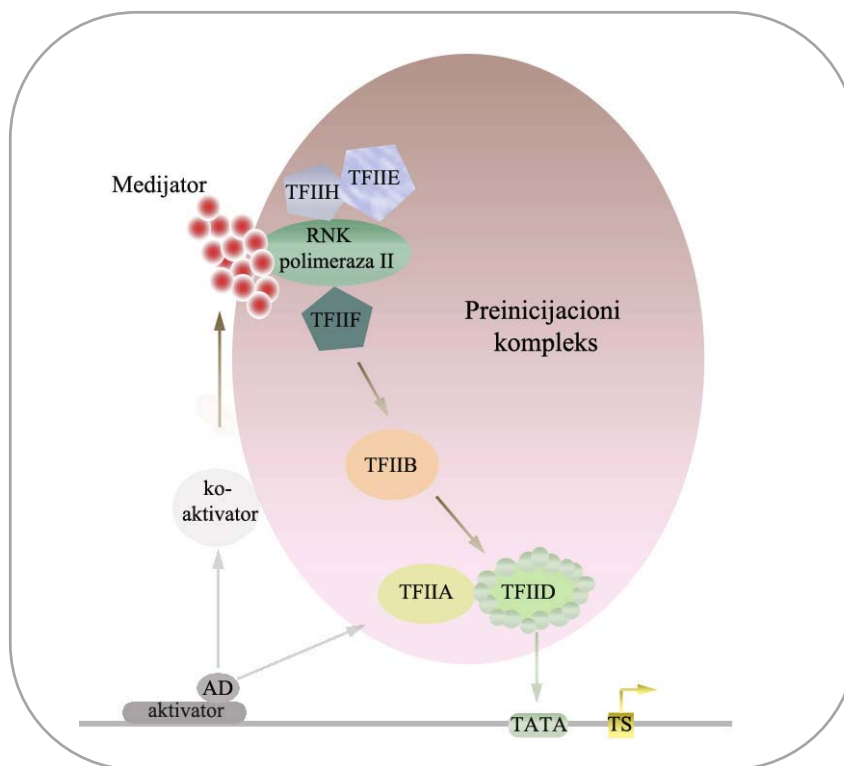
Faktori koji su uključeni u transkripciju eukariotskih protein-kodirajućih gena RNK polimerazom II, mogu biti klasifikovani u tri grupe: opšti (generalni) transkripcioni faktori (GTF), promotor specifični aktivatorski proteini (aktivatori) i ko-aktivatori. GTF proteini su neophodni i mogu biti dovoljni za transkripcionu inicijaciju *in vitro* (Orphanides et al.,

1996). Toj grupi pripadaju RNK polimeraza II i pomoćne komponente uključujući TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIE, TFIIIF i TFIIH. Međutim, ako posmatramo transkripciju *in vivo*, pored ovih „klasičnih“ GTF proteina, za transkripciju je neophodan i tzv. medijator, koji predstavlja visoko konzerviran, složeni kompleks sastavljen od većeg broja subjednica, prvobitno opisan kod kvasaca (Conaway et al., 2005; Malik and Roeder, 2005). Medijator ima ulogu u prenosu regulatornih signala između sekvencno-specifičnih transkripcionih faktora i komponenti bazalne transkripcione mašinerije. GTF-ovi se vezuju za jezgro promotora i formiraju preinicijacioni kompleks (PIK), koji usmerava RNK polimerazu II ka startu transkripcije (TS). Prvi korak u formiranju PIK-a je vezivanje TFIID za promotor (Slika 1). TFIID se sastoji od TATA vezujućeg proteina (eng. TATA binding protein-TBP) i grupe povezanih pridruženih faktora (eng. TBP associated factors-TAFs). Sledeći faktor koji se direktno vezuje za TFIID je TFIIA, čime se stabilizuje interakcija između TFIID i DNK (Maldonado et al., 1990). Nakon vezivanja TFIIA, vezuje se TFIIB omogućavajući vezivanje RNK polimeraze II za preinicijacioni kompleks i postavlja je pravilno u odnosu na start transkripcije (Li et al., 1994). Preinicijacioni kompleks se finalno formira vezivanjem preostalih faktora, TFIIIF, TFIIE i TFIIH (Slika 1) koji čine holoenzim mase blizu 2 MDa (Dvir et al., 2001).

Aktuelni model transkripcione regulacije posmatra ovaj proces kao ciklus tokom koga se PIK stimuliše samo jednom. Pošto se RNA polimeraza II udalji od promotora, nosačka struktura koju čine TFIID, TFIIE, TFIIH i medijator ostaje vezana za jezgro promotora, tako da nova inicijacija zahteva samo regrutovanje RNA polimeraza II-TFIIIF kompleksa i TFIIB.

Transkripciona aktivnost je značajno stimulisana prisustvom druge grupe transkripcionih faktora koji su označeni kao aktivatori. Uopšteno, aktivatori predstavljaju sekvencno-specifične DNK-vezujuće proteine čija su vezivna mesta, najčešće, prisutna uzvodno od jezgra promotora (Ptashne and Gann, 1997). Pored DNK-vezujućeg domena, tipičan aktivator poseduje odvojeni aktivatorski domen, koji učestvuje u aktivaciji transkripcije. Mnogi aktivatori formiraju hetero- ili homodimere, te precizan sastav tih kompleksa može da diktira njihovu specifičnost vezivanja za DNK i konačno njihovu aktivnost (Claessens and Gewirth, 2004). Takođe, varijacije u DNK u okviru vezivnog

mesta za određeni aktivator, mogu imati značajan uticaj na aktivnost (Pabo and Sauer, 1992; Massari and Murre, 2000). To je najbolje opisano na primerima vezivnih mesta za nuklearne receptore koji obuhvataju veliku klasu ligand-zavisnih aktivatora. Relativna orijentacija vezivnih polumesta i nukleotidne sekvence koja razdvaja ta polumesta, ima važnu ulogu u određivanju aktivnosti nuklearnog receptora (Claessens and Gewirth, 2004).



**Slika 1.** Transkripcija kod eukariota. Shematski prikaz učesnika u transkripciji gena RNK polimerazom II. Opšti transkripcioni faktori (objašnjeno u tekstu): TFIIA-H; TS- start transkripcije, AD-aktivacioni domen. Shema urađena po uzoru na publikovanu shemu (Maston et al., 2006).

Aktivnost samih aktivatora može biti izmenjena prisustvom treće grupe faktora označenih kao ko-aktivatori. Uobičajeno je da ko-aktivatori nemaju DNK-vezujući domen, već ostvaruju proteinske interakcije sa već vezanim aktivatorima. Specifična grupa ko-aktivatora u određenoj ćeliji igra važnu ulogu u određivanju sposobnosti aktivatora da pozitivno ili negativno reguliše transkripciju (Lemon and Tjian, 2000).

Posle preinicijacije i inicijacije transkripcije sledi proces elongacije. Prvobitno se smatralo da je regrutovanje polimeraze na promotor prvi regulisan korak u aktivaciji genske



ekspresije (Keaveney and Struhl, 1998). Međutim, kasnija istraživanja na višćelijskim organizmima ukazala su na još neke nivoe regulacije, uključujući i post-inicijacijsku regulaciju, tačnije, regulaciju na nivou elongacije. Zeitlinger i saradnici su pokazali da 15% tkivno-specifičnih gena ima vezanu polimerazu na promotorima u svim tkivima, ali je prolazak polimeraze ka startu transkripcije dozvoljen samo u specifičnim tkivima (Zeitlinger et al., 2007). Ovo je postignuto takozvanim stanjem „pauze“, gde je polimeraza stabilno vezana ispred promotora i čeka odgovarajući signal za oslobađanje i otpočinjanje elongacije. Takođe, inducibilni geni koji brzo reaguju na spoljašnje stimulse, kao što su geni toplotnog šoka (*Hsp70* vinske mušice) ili neki proto-onkogeni (*junB* i *c-myc* sisara) se odlikuju time da je na njihovim promotorima bazalna transkripciona mašinerija, uključujući RNK polimerazu II, postavljena, transkripcija je započeta, ali posle polimerizacije nekoliko desetina ribonukleotida elongacija transkripcije je zaustavljena (Rougvie and Lis, 1988; Strobl and Eick, 1992; Rasmussen and Lis, 1993; Aida et al., 2006). Na ovaj način, sve je spremno za brzu reakciju elongacije kao odgovor na stimulus, pri čemu formirani transkripcioni kompleks pomoću određenih regulatornih proteina kao što je NELF (Negative Elongation Factor) održava proksimalni promotorski region slobodnim od nukleozoma (Gilchrist et al., 2008; Mavrich et al., 2008).

Terminacija transkripcije je završna faza transkripcije gena koja se dešava kada RNK polimeraza II naiđe na poliadenilacioni signal (AATAA) na kodirajućem lancu DNK. Poliadenilacioni signal prepoznaje poli A polimeraza koja na iRNK molekul dodaje oko 250 adenina, formirajući karakterističan poli A rep (Tran et al., 2001). Poli A rep ima važnu ulogu u transportu iRNK iz nukleusa i njenoj stabilnosti u citoplazmi.

Konačno, treba istaći da se transkripcija gena ostvaruje u kontekstu hromatina. Hromatin je visoko organizovana i gusto pakovana struktura koja je sačinjena od DNK i histonskih proteina. Više strukture hromatina predstavljaju prvu barijeru za aktivaciju transkripcije. Za ostvarivanje transkripcije neophodno je otvaranje upakovanog, kondenzovanog hromatina u regionima koji obuhvataju promotor gena, pa i sam gen. Prvo se dekonduzuju veliki hromatinski domeni (25 - 100 kb), a zatim dolazi do remodelovanja hromatina u okviru promotorskog regiona što je praćeno i kovalentnim modifikacijama histona u okviru nukleozoma (Wallrath et al., 1994). Acetilacijom ili metilacijom slobodnih

amino grupa na N- terminalnom delu histonskih molekula, dolazi do oslobađanja DNK iz forme u kojoj se nalazi (Turner et al., 1992). Ovakva modifikacija uslovlja gubitak pozitivne šarže molekula histona, čime se smanjuje njihov afinitet za fosfatne grupe DNK (Wolffe and Pruss, 1996). Mnogi transkripcioni faktori, poseduju specijalizovane domene preko kojih mogu da prepoznaju acetilovane i metilovane lizine u okviru histona, što za posledicu može da ima inicijaciju i stabilizaciju interakcija između ovih transkripcionih faktora i promotorskih regiona (Daniel et al., 2005; de la Cruz et al., 2005). Kao rezultat modifikacija, dolazi do promena u strukturi i poziciji nukleozoma na transkripciono aktivnim promotorima. Takođe, istraživanja na genomskoj skali kod različitih organizama, od kvasca do čoveka, ukazuju da su nedostatak nukleozoma, hiperacetilacija lizinskih ostataka H3 i H4 histona, kao i trimetilovani H3 protein, generalne epigenetske karakteristike transkripciono aktivnih gena (Heintzman and Ren, 2007).

### **1.1.1 Strukturna organizacija promotora kod eukariota**

Promotor gena predstavlja sekvencu uzvodno od gena koji se prepisuje i sastoji se od jezgra i uzvodne sekvence. Jezgro promotora obuhvata mesto inicijacije transkripcije i sadrži sve regulatorne sekvence potrebne za prepoznavanje od strane bazalne transkripcione mašinerije i inicijaciju transkripcije uključujući i prvi nukleotid od kojeg počinje transkripcija (Maston et al., 2006). Proksimalni promotor je definisan kao region koji se nalazi odmah uzvodno od jezgra promotora koji obuhvata sekvencu od nekoliko stotina baznih parova (Maston et al., 2006). Proksimalni promotor sadrži vezivna mesta za opšte i tkivno-specifične transkripcione faktore koji mogu imati aktivatorsku ili represorsku ulogu u regulaciji transkripcije gena (Slika 2).

Prvi identifikovani promotorski element bio je TATA boks (TATAWAAR; W-A/T, R- A/G) (Breathnach and Chambon, 1981) koji je uobičajeno lociran 25 do 30 baznih parova (bp) uzvodno od starta transkripcije (Slika 3). Ovaj motiv najčešće prepoznaje i vezuje TATA vezujući protein (TATA binding protein- TBP), subjedinična opšteg transkripcionog faktora TFIID (Burley and Roeder, 1996), mada su i drugi, TBP-u slični proteini (TBP related factors-TRF) sposobni da vezuju ovaj element (Berk, 2000). TBP se

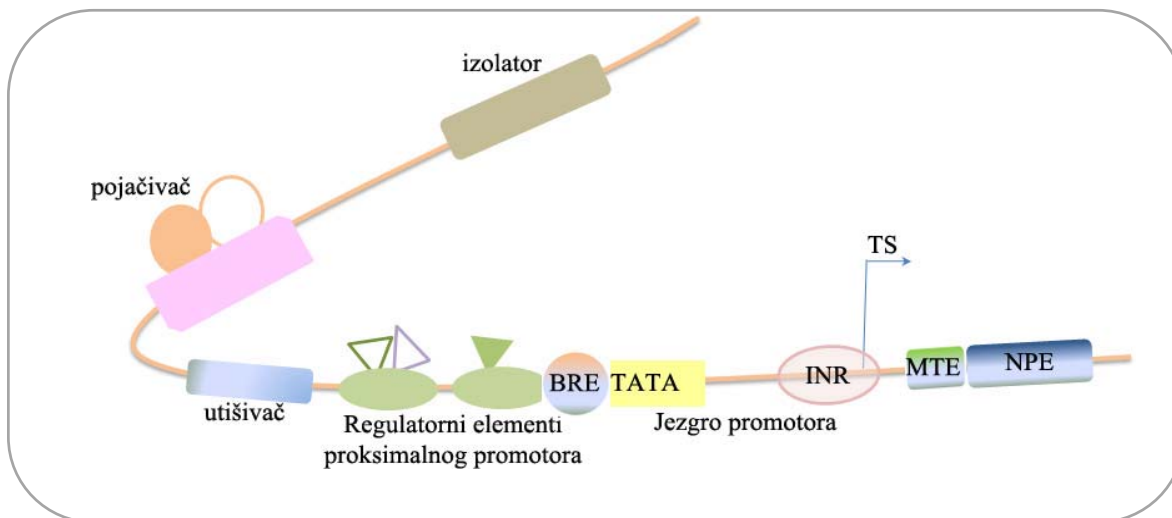
vezuje za mali žljeb DNK i izaziva savijanje DNK uzvodno i nizvodno u odnosu na TATA boks, delimično odvijajući DNK dupleks na mestu kontakta, zahvaljujući inserciji fenilalanina.

Veliki broj promotora ne sadrži TATA motiv. Ovakvi promotori sadrže druge konsenzusne elemente kao što je inicijatorski element (Inr, YYANWYY; Y- C/T, N- A/C/G/T) koji okružuje start transkripcije (eng. transcription start point-*tsp*), odnosno nalazi se na poziciji od -2 do +4 u odnosu na *tsp* (Smale and Baltimore, 1989) (Slika 2). Inr element mogu posedovati i promotori sa TATA motivom. Dok Inr može da stimuliše transkripciju nezavisno od TATA boksa, oba elementa deluju sinergistički kada se nađu zajedno u promotoru (Smale et al., 1990).

Nizvodni promotorski element (Downstream promoter element - DPE, RGWYV; R- A/G, W- A/T, Y- C/T, V- A/C/G) (Kadonaga, 2002) je tipičan za promotore koji nemaju TATA motiv, i on funkcioniše u sadejstvu sa Inr elementom (Burke and Kadonaga, 1997). Relativna pozicija ovog promotorskog elementa je kritična za optimalnu transkripciju, i on je lociran od +28 do +32 u odnosu na *tsp* (Kutach and Kadonaga, 2000) (Slika 2). Kao i u slučaju TATA motiva i Inr elementa, DPE prepoznaje i vezuje TFIID, verovatno preko subjedinica TAFII60 i TAFII40 (TAF6 i TAF9 po novoj nomenklaturi) (Burke and Kadonaga, 1997).

BRE element koji prepoznaje TFIIB (TFIIB recognition element – BRE, SSRCGCC; S- G/C, R- A/G) je promotorski element koji se nalazi odmah uzvodno od TATA boksa i koji vezuje TFIIB transkripcioni faktor (Lagrange et al., 1998) (Slika 2). Za ovaj element je pokazano da može i da stimuliše i da reprimira transkripciju (Evans et al., 2001).

MTE (Motif ten element, CSARCSSAACGS; S- G/C, R- A/G) je identifikovan pri kompjuterskoj analizi promotora vinske mušice (Ohler et al., 2002) i do sada nije detektovan kod promotora vertebrata. Ovaj promotorski element je pozicioniran od 18 do 29 bp nizvodno od *tsp*, delimično se preklapajući sa 5' krajem DPE motiva (Slika 2). MTE zahteva prisustvo Inr elementa i funkcioniše sinergistički sa TATA boksom ili DPE motivom (Lim et al., 2004).



**Slika 2.** Shematski prikaz strukture promotora kod eukariota. NPE-nizvodni promotorski elementi; MTE-„Motif ten element“; INR-inicijacioni kompleks; TS-start transkripcije; BRE-„TFIIB recognition element“. Pridruženi trouglovi i krugovi na shemi, predstavljaju kofaktore koji učestvuju u regulaciji interagujući sa DNK-vezujućim transkripcionim faktorima.

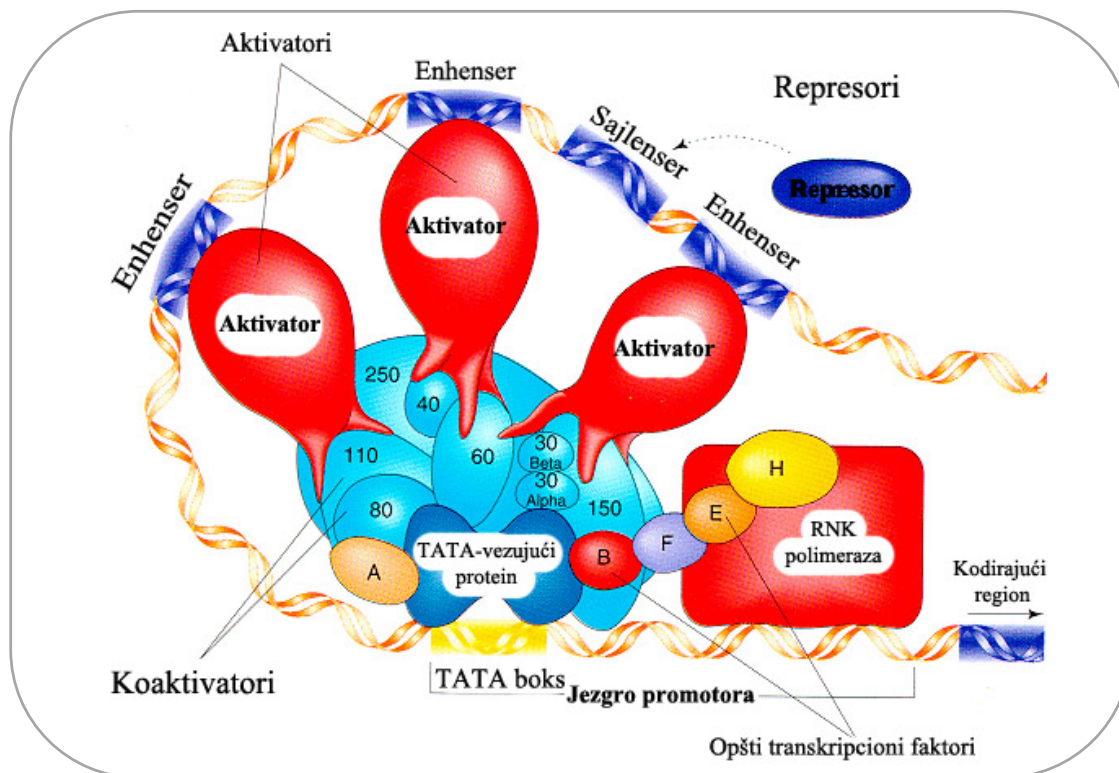
Izolator predstavlja tzv. graničnik, odnosno element koji štiti gene od uticaja transkripcione mašinerije susednih gena (Maston et al., 2006). Tipično su dugi oko 0,5-3 kb i funkcionišu nezavisno od orijentacije, ali su zavisni od pozicije. Precizan broj izolatora u humanom genomu nije poznat, ali se zna da su prisutni samo u regionima koji su bogati kodirajućim genima i regulatornim sekvencama (Fourel et al., 2004).

Opšta karakteristika sisarskih promotora koji ne sadrže TATA boks i DPE je prisustvo nizova CG nukleotida, odnosno prisustvo CpG ostrva (Blake et al., 1990). Ovi promotori sadrže mnoštvo CG boks motiva koja prepoznaju Sp1 i srodni transkripcioni faktori (Brandeis et al., 1994; Macleod et al., 1994). Prema literaturnim podacima, CpG ostrva su najčešće prisutna klasa promotorskih elemenata, s obzirom da je procenjeno da su prisutna kod 79-88% promotora čoveka i kod 71% promotora miša (Kim et al., 2005; Bajic et al., 2006).

### 1.1.2. Pojačivači i utišivači transkripcije gena (enhenseri i sajlerseri)

Pojačivači ili enhenseri („enhancers“) predstavljaju *cis* regulatorne elemente koji stimulišu proces transkripcije, nezavisno od svoje pozicije i orijentacije u odnosu na mesto otpočinjanja transkripcije (Arnosti and Kulkarni, 2005). Jedna od osobina enhensera višćelijskih organizama je da su njihove pozicije najčešće lokalizovane u okviru 100 kilobaza u odnosu na gen koji regulišu. Smatra se da je uobičajeno da enhenseri budu u *cis* poziciji u odnosu na svoje ciljne gene iako postoje podaci o *trans* regulaciji preko uparivanja sestrinskih hromatida (Kennison and Southworth, 2002). Enhenseri su funkcionalno slični elementima iz proksimalnog promotora. U mnogim slučajevima, isti aktivatori koji se vezuju za enhenserske elemente vezuju se, takođe, i za proksimalne promotorske elemente. Međutim, za razliku od regulatornih elemenata iz proksimalnog promotora, enhenseri su tipično udaljeni transkripcioni kontrolni elementi. Mogu biti nekoliko stotina kilobaza uzvodno od promotora, nizvodno od promotora, u okviru introna ili čak posle 3' kraja gena (Blackwood and Kadonaga, 1998). Smatra se da tako udaljeni regulatorni elementi ostvaruju svoju funkciju pomoću formiranja DNK petlje, kojom se enhenseri dovode u blizinu jezgra promotora (Vilar and Saiz, 2005). Veoma je interesantna i studija koja ukazuje da se PIK može formirati na distalnom enhenseru, a ne samo na jezgru promotora kako se obično smatra (Szutorisz et al., 2005).

Utišivači ili sajlerseri („silencers“) predstavljaju sekvencno-specifične regulatorne elemente koji, kao i enhenseri, funkcionišu nezavisno od orijentacije i udaljenosti od jezgra promotora. Mogu postojati kao deo proksimalnog promotora, distalnih enhensera ili kao nezavisni udaljeni regulatorni elementi (Maston et al., 2006).



**Slika 3.** Shematski prikaz “transkripcionog aparata”. Opšti transkripcioni faktori, označeni slovima alfabeta, su esencijalni za transkripciju ali ne mogu sami da utiču na povećanje ili smanjenje transkripcije. Ovu ulogu imaju aktivatori (predstavljani crvenom bojom) ili represori (predstavljani tamno plavom bojom). Aktivatori, a moguće i represori, komuniciraju sa opštim transkripcionim faktorima preko ko-aktivatora (svetlo plavo, izraženi brojevima koji označavaju njihovu masu u kDa), koji su u kompleksu sa TATA-vezujućim proteinom (TBP). Slika je preuzeta (Tjian, 1995).

Utišivači predstavljaju vezivna mesta za negativne transkripcione faktore, odnosno represore. Represori ostvaruju svoju funkciju regrutujući različite negativne ko-faktore označene kao ko-represori, (Popescu and Zimonjic, 2002). Postoji nekoliko modela koji objašnjavaju kako represori ostvaruju svoju funkciju. U nekim slučajevima represor radi tako što blokira vezivanje obližnjeg aktivatora (Harris et al., 2005) ili tako što direktno kompetira za isto mesto (Li et al., 2004). Sa druge strane, represor može da spreči vezivanje aktivatora ili transkripcionih faktora iz opšte transkripcione mašinerije regrutovanjem faktora koji će uticati na hromatinsku strukturu (Srinivasan and Atchison, 2004). Konačno, ostoje podaci da represor može blokirati transkripciju ihibiranjem formiranja PIK-a (Chen and Widom, 2005).

### 1.1.3 Transkripcioni faktori

Svi ćelijski procesi koji obezbeđuju rast, razviće, morfogenezu, diferencijaciju ćelija, regulisani su na nivou genske ekspresije. Regulacija ekspresije gena na nivou transkripcije je strogo kontrolisani proces u kome učestvuju proteini označeni kao transkripcioni faktori. Oni predstavljaju DNK-vezujuće proteine koji se vezuju u okviru promotora gena ili enhenserskih sekvenci i učestvuju u aktivaciji ili inhibicije ekspresije gena. U osnovi, svi transkripcioni faktori se mogu podeliti na: opšte transkripcione faktore koji su direktno uključeni u formiranje preinicijacionog i inicijacionog kompleksa i koji su odgovorni za otpočinjanje transkripcije i specifične transkripcione faktore koji se vezuju za odgovarajuće DNK motive i imaju ulogu aktivatora ili represora transkripcije. Svoju ulogu mogu ostvarivati ili direktnom interakcijom sa komponentama bazalne transkripcione mašinerije ili indirektno, regrutujući koaktivatore ili korepresore (Hahn, 1993; Hoey et al., 1993; Gill et al., 1994; Ryu et al., 1999; Conkright et al., 2003).

Procenjeno je da kod čoveka postoji oko 200-300 različitih transkripcionih faktora koji se vezuju za jezgro promotora i predstavljaju deo opšte transkripcione mašinerije (Farnham, 2009). Pored toga, u humanim ćelijama ima oko 1400 drugih transkripcionih faktora koji su sekvencno-specifični i regulišu transkripciju određenih gena vezujući se mesto-specifične *cis*-regulatorne elemente (Lander et al., 2001). Svaka promena u ekspresiji gena usled neadekvatne transkripcione regulacije dovodi do poremećaja u razviću, razvoja bolesti, uključujući i kancer (Jimenez-Sanchez et al., 2001).

Transkripcioni faktori imaju modularnu strukturu i sadrže nekoliko domena uključujući DNK vezujući domen, domen preko koga ostvaruju aktivatorsku ili represorsku funkciju i domen za protein-protein interakcije koji služi ili za formiranje homo/heterodimera ili za interakcije sa drugim regulatornim proteinima uključenim u transkripciju (Alberts, 1994; Tjian, 1995). DNK vezujući domeni transkripcionih faktora su klasifikovani u više tipova uključujući HTH (helix-turn-helix), homeodomen, cinkani prstići (zinc finger), "leucinski rajsferšlus" (leucine zipper), bHLH (basic helix-loop-helix), WH (winged helix) i winged HTH (winged helix-turn-helix) (Locker, 2001).

U višćelijskim organizmima, transkripcioni faktori uglavnom ne obavljaju svoju funkciju pojedinačno, već pomoću ko-faktora ostvaruju funkcionalnu mrežu u kojoj su moguće mnogostruke proteinske interakcije. bHLH motiv i leucinski rajsfešlus pored specifičnog vezivanja za odgovarajuće DNK sekvence služe i za formiranje dimera. Formiranje homo- i hetero-dimera od strane transkripcionih faktora je još jedan način kojim se povećava raznovrsnost i specifičnost vezivanja za DNK (Lamb and McKnight, 1991). Utvrđeno je da mnogi transkripcioni faktori međusobno stupaju u interakcije preko svojih cinkanih prstića (Merika and Orkin, 1995) ili preko svojih aktivacionih domena (Mitchell and Tjian, 1989).

Dok kod prokariota regulatorni proteini aktiviraju ili reprimiraju gene uglavnom pojedinačno, kod eukariota uglavnom funkcionišu u određenim kombinacijama, specifičnim za stupanj razvika i tip ćelija. Po jednom modelu, vezivna mesta za transkripcione faktore u tkivno-specifičnim enhenserima i promotorima služe kao matrica za regrutovanje odgovarajuće kombinacije ovih proteina iz čitavog "pula" faktora prisutnih u datom tipu ćelije (Arnone and Davidson, 1997). Prema drugom modelu, baziranom na istraživanjima procesa hematopoeze, transkripcioni faktori su sposobni da obrazuju multimerne komplekse nezavisno od DNK matrice (enhensera), odnosno pre vezivanja za specifične DNK sekvence (Sieweke and Graf, 1998). Ovako formirani kompleksi mogu imati različit uticaj na različite enhensere. Tokom diferencijacije dolazi do sukcesivnih promena u sastavu multimernih kompleksa. Naime, pojedini transkripcioni faktori bivaju zamenjeni drugim, što za posledicu ima promenu afiniteta kompleksa za pojedine enhenserske sekvence. Ovako izmenjeni kompleksi, ne samo da stiču sposobnost aktivacije novih enhensera, već takođe mogu da reprimiraju enhensere koji više nisu potrebni za dati program ekspresije gena.

Sastav i struktura vezivnih mesta za transkripcione faktore u promotoru gena određuje njegov ekspresioni profil. Stoga vezivna mesta za transkripcione faktore predstavljaju veoma važne sekvence koje predstavljaju potencijalne targete za mutacije, odnosno prirodnu selekciju ekspresije gena (Wray et al., 2003). Većina transkripcionih faktora prepoznaje vezivno mesto koje obuhvata 5-8 bp, a većina toleriše jednu, a često i više, specifičnih supstitucija nukleotida, bez gubitka sposobnosti vezivanja (Locker, 2001).



Ukoliko se u analizu uvrste i sekvence koje okružuju vezivno mesto, onda se broj nukleotida neophodan za specifično vezivanje određenog proteina može smanjiti na 4-6 bp. Dva različita pristupa se primenjuju za definisanje konsenzusne sekvence za koju se vezuje transkripcioni faktor: prvi je poređenje sekvenci (porede se različita vezivna mesta za isti protein i određuje prosečni nukleotidni sastav), a drugi je biohemijski esej (*in vitro* određivanje afiniteta vezivanja protein za određenu sekvencu).

Iako se većina transkripcionih faktora može vezati za izmenjene sekvence, njihovo vezivanje može pratiti različita kinetika (Czerny et al., 1993). Razlike u afinitetu vezivanja su posebno značajne kada se dva vezivna mesta preklapaju ili su blisko postavljena, jer u tom slučaju u svakom trenutku samo jedno vezivno mesto može biti zauzeto (načestći primer su GC-bogata vezivna mesta). U tim slučajevima razlika u količini raspoloživog proteina i kinetici vezivanja odlučuje koje vezivno mesto će biti zauzeto sa kojim proteinom u datom trenutku (Wray et al., 2003).

Kompjuterske analize promotorskih sekvenci ukazuju da svi promotori sadrže na desetine ili čak na stotine potencijalnih vezivnih mesta za transkripcione faktore. Međutim, zbog mnogobrojnih razloga, mnoga od ovih predviđenih konsenzusnih mesta ne vezuje proteine *in vivo* i nemaju uticaj na transkripciju (Biggin and McGinnis, 1997; Li and Johnston, 2001). Identifikacija potencijalnog vezivnog mesta koje zaista vezuje određeni transkripcioni faktor i ima funkcionalni značaj u regulaciji transkripcije zahteva primenu različitih eksperimentalnih metoda, a ti ekperimentalni pristupi su prikazani u ovom radu.

Većina opisanih transkripcionih faktora pripada određenim familijama gena, a veličina svake familije pokazuje značajnu varijaciju između različitih organizama (Latchman, 1998; Locker, 2001). U Tabeli 1 dat je pregled nekih familija transkripcionih faktora koji regulišu ekspresiju gena kod čoveka.

**Tabela 1.** Broj članova odabranih familija transkripcionih faktora kod čoveka. Kao što se vidi u tabeli, veliki broj transkripcionih faktora pripada familiji proteina koji ostvaruju vezivanje za DNK preko cinkanih-prstića.

Familija transkripcionog faktora	Broj gena u familiji
Homeodomen	267
Nuklearni receptor	59
Cinkani-prstić	706
bHLH	131
Pax	38
RUNX	3
Myb	32

U daljem tekstu biće prikazane opšte karakteristike odabranih transkripcionih faktora čija je uloga u regulaciji ekspresije *SOX18* gena ispitivana u ovoj tezi.

### 1.1.3.1 Sp3 – (eng. specificity protein 3)

Sp3 transkripcioni faktor pripada Sp-multigenskoj familiji proteina zajedno sa Sp1, Sp2 i Sp4 čiji su članovi evolutivno srodni i poseduju visoko konzerviran DNK vezujući domen koji pripada C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> tipu cinkanih prstića (Suske, 1999; Bouwman and Philipsen, 2002; Kaczynski et al., 2003). DNK-vezujući domen se nalazi na C-terminusu proteina, visoko je konzerviran kod Sp1, Sp3 i Sp4 proteina, i u skladu sa tim, sva tri proteina prepoznaju i sa istim afinitetom se vezuju za klasično GC-boks Sp1 vezivno mesto (Hagen et al., 1992). Sp2 protein poseduje zamenu aminokiseline histidin u leucin u prvom cinkanom prstiću koja dovodi do većeg afiniteta vezivanja za GT-bogate sekvence (Kingsley and Winoto, 1992). Postoje tri izoforme Sp3 proteina, jedna koja u punoj dužini ima molekulsku masu oko 110-115 kDa i dve kraće forme molekulske mase oko 60-70kDa kojima nedostaje deo N-terminusa kompletnog proteina (Kingsley and Winoto, 1992).

Funkcija Sp3 proteina u regulaciji transkripcije gena je dvostruka. On može ostvarivati svoju funkciju i kao aktivator i kao represor, gde kraće forme proteina uvek

imaju represorsku funkciju (Kennett et al., 1997). Postoje i podaci koji ukazuju na njegovu aktivatorsku funkciju (Li et al., 1994; Udvardia et al., 1995; Ihn and Trojanowska, 1997; Zhao and Chang, 1997), ali i oni koji govore o njegovoj represorskoj aktivnosti (Sun et al., 2002). Primećeno je da promotori koji poseduju pojedinačno vezivno mesto za Sp protein mogu biti aktivirani Sp3 transkripcionim faktorom, dok oni koji imaju više vezivnih mesta najčešće nisu aktivirani ili veoma slabo reaguju na Sp3 (Birnbaum et al., 1995; Dennig et al., 1996). Da li će Sp3 biti aktivator ili represor zavisi i od ćelijskog konteksta. Tako je pokazano da se Sp3 u transfektovanim NT2-D1 ćelijama ponaša kao aktivator, za razliku od HeLa i insekatskih ćelija gde pokazuje represorsku aktivnost (Sjottem et al., 1996). Smatra se da pored toga što ima aktivatorski domen, ovaj faktor svoju represorsku funkciju ostvaruje zahvaljujući represorskom domenu koji je pozicioniran neposredno ispred prvog cinkanog-prstića (Suske, 1999). Aminokiselinski triplet KKE, je apsolutno esencijalan za ovu represorsku funkciju (Dennig et al., 1996). Mutacija ove tri amino kiseline u alanine pretvara Sp3 u jak aktivator.

Regulacija ekspresije gena Sp familijom transkripcionih faktora često zavisi od relativnog odnosa u ekspresiji Sp proteina. Pokazano je da je u endotelijalnim ćelijama nivo Sp1 veći u odnosu na nivo Sp3 i da povećana ekspresija Sp3 dovodi do smanjenja Sp1-posredovane *KDR/flk-1* aktivnosti (Hata et al., 1998). Promene u Sp1/Sp3 odnosu su primećene i kada se C2C12 miociti kultivišu u hipoksičnim uslovima tokom kojih dolazi do značajnog smanjenja u nivou Sp3, dok Sp1 nivo ostaje nepromenjen. Tokom hipoksije aktivirani su geni za piruvat kinazu M i b-enolazu, a autori ukazuju da je to omogućeno upravo uklanjanjem Sp3-transkripcionog represora (Discher et al., 1998).

Zbog svoje dvostruke funkcije Sp3 transkripcioni faktor može biti target uzvodnih signalnih puteva i na taj način učestvovati u regulaciji ekspresije gena u uslovima kada je ćelija izložena dejstvu spoljnih signala, dok Sp1 može biti odgovoran za konstitutivnu ekspresiju ciljnih gena (Suske, 1999).

### 1.1.3.2 ZBP-89 – (eng. zinc finger binding protein)

ZBP-89 je transkripcioni faktor molekulske mase od 89-kDa koji zajedno sa ZBP-99, čini ZBP familiju transkripcionih faktora. DNK vezujući domen ovog proteina se sastoji od četiri cinkana prstića koji su, za razliku od C-terminalne pozicije kod Sp proteina, smešteni na N-terminusu (Law et al., 1999). Ovaj transkripcioni faktor poseduje bifunkcionalni regulatorni domen što ukazuje da može ostvarivati aktivnost i kao transkripcioni aktivator i kao represor. ZBP-89 je transkripcioni represor ekspresije gena za vimentin (Zhang et al., 2003), ENA-78 (eng. epithelial neutrophil-activating peptide-78) (Keates et al., 2001), gastrin (Bai et al., 2002), ODC (eng. ornithine decarboxylase) (Law et al., 1998a), Pax7 (Salmon et al., 2009) i adrenodoksin kod goveda (Cheng et al., 2000). Za drugu grupu gena funkcionise kao transkripcioni aktivator, a to su geni za T ćelijske  $\alpha$  i  $\beta$  receptore (Wang et al., 1993), protein-tirozin kinazu specifičnu za limfocite (Yamada et al., 2001), kolagen tip 1 (Hasegawa et al., 2000), alkalnu fosfatazu intestinuma (Malo et al., 2006), receptor hormona rasta (Xu et al., 2006) ciklin zavisni kinazni inhibitor p21<sup>waf1</sup> (Bai and Merchant, 2000; Bai and Merchant, 2007).

Svoju represorsku funkciju ZBP-89 najčešće ostvaruje kompeticijom za ista ili preklapajuća vezivna mesta sa Sp1, Sp3, Sp4, WT1 (eng. Wilms tumor 1) i cKrox (eng. collagen-Krüppel box) transkripcionim faktorima (Merchant et al., 1996; Moshier et al., 1996; Hasegawa et al., 1997; Law et al., 1998b). Nešto drugačiji mehanizam represije je uočen pri ispitivanju regulacije ekspresije gena za vimentin, gde je pokazano da ZBP-89 direktno interaguje sa Sp1 transkripcionim faktorom, iako su vezivna mesta ova dva faktora međusobno udaljena 235 bp (Zhang et al., 2003). Na taj način onemogućena je interakcija Sp1 sa transkripcionom mašinerijom čime je inhibirana transkripcija gena za vimentin. Za razliku od represije, malo se zna o mehanizmima transkripcione aktivacije posredovane ZBP-89 transkripcionim faktorom. Ovaj protein ima ulogu aktivatora u butiratom indukovanoj aktivaciji transkripcije p21<sup>waf1</sup> gena, gde ZBP-89 stupa u interakciju sa koaktivatorom p300 što je praćeno regrutovanjem Sp1 u transkripcioni kompleks (Bai and Merchant, 2000). p300 je transkripcioni koaktivator koji poseduje histon acetiltransferazni

domen, zahvaljujući kome smanjuje afinitet vezivanja histonskih proteina za DNK i na taj način omogućuje lakši pristup drugim transkripcionim faktorima (Ogryzko et al., 1996).

ZBP-89 je uključen u regulaciju mnogih ćelijskih funkcija koje su u korelaciji i sa razvojem kancera, kao što su rast, diferencijacija, transformacija, starenje (Zhang et al., 2010). Pokazano je da je nivo ZBP-89 proteina povećan u nekim tumorskim tkivima i ćelijskim linijama, uključujući kancer želuca (Taniuchi et al., 1997), kolonorektalni kancer (Moran et al., 2005), kancer dojke (Serova et al., 2006), melanom (Strasberg Rieber et al., 2001). U ćelijama kancera kod čoveka ZBP-89 efikasno indukuje apoptozu preko p53-zavisnog, ali i p53-nezavisnog mehanizma (Zhang et al., 2010). Takođe, povećava efekat nekih anti-kancer lekova, pa je razmatran kao potencijalni target u anticancer terapiji (Zhang et al., 2010).

### **1.1.3.3 NF-Y – (eng. nuclear factor Y)**

NF-Y predstavlja široko zastupljeni heterotrimerni transkripcioni faktor koji se sastoji od subjedinica NF-YA, NF-YB i NF-YC (Mantovani, 1998). Ovaj transkripcioni faktor prepoznaje CCAAT boks, sveprisutni element u promotoru eukariota koga prepoznaju i drugi transkripcioni faktori kao što su NF-1 (nuclear factor 1), c/EBP (enhancer binding protein), MSY (Y-box protein) (Mantovani, 1998). U najvećem broju promotora eukariota, CCAAT boks koga prepoznaje NF-Y smešten je 60-100 nukleotida uzvodno od starta transkripcije. Interesantno je, međutim, da se oko 40% vezivnih mesta za NF-Y ne nalazi u okviru osnovnog promotora, već u intronima ili udaljenim 3' ili 5' regionima gena (Testa et al., 2005). Subjedinica NF-YA je odgovorna za specifično prepoznavanje i vezivanje za DNK, ali se ova subjedinica ne vezuje pojedinačno za DNK molekul, već tek nakon formiranja heterotrimernog kompleksa sa preostale dve subjedinice (Kim et al., 1996).

NF-Y pripada grupi malobrojnih proteina, među kojima su i SOX proteini, koji se vezuju za manji žleb DNK (Ronchi et al., 1995). Funkcija NF-Y proteina je višestruka. Uopšteno, on promoviše i stabilise vezivanje drugih transkripcionih faktora za susedne DNK-vezujuće elemente, privlači ko-aktivatore što dovodi do pojačavanja transkripcije

gena (Ronchi et al., 1995; Bellorini et al., 1997; Frontini et al., 2002). Kao i većina transkripcionih faktora, NF-Y može imati ulogu aktivatora transkripcije (Reed et al., 1995; Zhu et al., 2003), ili represora (Gowri et al., 2003), dok kod nekih gena NF-Y ima bifunkcionalnu ulogu, i aktivatora i represora (Bernadt et al., 2005). Pokazano je da NF-Y reguliše transkripciju ciljnih gena u kooperaciji sa transkripcionim faktorima kao što su Sp1 (Roder et al., 1997; Roder et al., 1999), GATA (Huang et al., 2004) i SREBP (Jump et al., 2001). Takođe, pokazano je da je vezivanje ovog transkripcionog faktora u promotorima gena precizno regulisano tokom rasta i diferencijacije (Testa et al., 2005).

#### **1.1.3.4 EGR1 – (eng. early growth response protein 1)**

EGR1 transkripcioni faktor pripada grupi gena „ranog odgovora“, koji su vrlo brzo, tranzijentno eksprimirani pod dejstvom različitih vanćelijskih stimulusa, uključujući faktore rasta, citokine, stimulse izazvane povredama tkiva itd. (Gashler and Sukhatme, 1995; Kaufmann and Thiel, 2001). Istu familiju čine i njemu srodni transkripcioni faktori EGR2, -3 i -4. Vezivanje za DNK ovaj transkripcioni faktor ostvaruje preko tri cinkana prstića koji se nalaze C-terminalno u proteinu i pretežno se vezuje za GC-bogate promotorske sekvence (Gashler and Sukhatme, 1995).

Jednom vezan za DNK, svoju funkciju može ostvariti i kao aktivator i kao represor. Strukturna analiza je pokazala da EGR1 ima jak transaktivacioni domen na N-terminusu (Gashler and Sukhatme, 1995). Ko-aktivatori kao što su CBP i p300 značajno povećavaju njegovu transaktivacionu funkciju (Silverman et al., 1998). Inhibitorni domen EGR1 proteina se sastoji od 34 amino kiseline pozicionirane N-terminalno od DNK vezivnog domena (Gashler et al., 1993). Otkrivena su dva represorska proteina NAB1 i NAB2 („nerve growth factor-induced“) koji blokiraju EGR1 aktivnost direktnom interakcijom sa ovim proteinom (Russo et al., 1995).

EGR1 prepoznaje ista ili slična vezivna mesta kao i transkripcioni faktori Sp1/3 i WT1 (Wilms tumor suppressor) (Silverman and Collins, 1999). Mnogi promotori sadrže preklapajuća mesta za ove transkripcione faktore, a *in vitro* studije sa rekombinantnim proteinima pokazuju da ovi transkripcioni faktori kompetiraju za ista vezivna mesta i mogu

da zamene jedan drugog u mnogim promotorima (Liu et al., 1998; Silverman and Collins, 1999).

Poznato je da se EGR1 ekspirira u različitim tipovima ćelijama, a od posebnog značaja za rezultate prikazane u ovoj tezi je činjenica da je ekspiriran u endotelijalnim ćelijama. Mnogi spoljašnji stimuli, odgovorni za razvoj vaskularnih bolesti, kao što su mehaničke povrede, hipoksija, angiotenzin II, fibroblastni faktor rasta, mogu da dovedu do indukcije EGR1 (Khachigian et al., 1996; Khachigian and Collins, 1997). Posle aktivacije vaskularnih ćelija, ekspresija EGR1 dovodi do regulacije transkripcije različitih gena koji su uključeni u genuz vaskularnih bolesti. Neki od tih gena su PDGFA (eng. platelet derived growth factor A) (Khachigian et al., 1995), FGF2 (eng. fibroblast growth factor) (Biesiada et al., 1996), apolipoprotein A1 (Kilbourne et al., 1995), TNF $\alpha$  (eng. tumor necrosis factor  $\alpha$ ) (Yao et al., 1997), tkivni faktor-TF (Cui et al., 1996), interleukin 2 (Skerka et al., 1995), ICAM-1 ([intercellular adhesion molecule 1](#)) (Maltzman et al., 1996), trombospondin (Shingu and Bornstein, 1994). Svi ovi geni imaju jedno ili, češće, više vezivnih mesta za EGR1 u svojim promotorima.

Konačno, postoje studije koje govore o važnoj ulozi EGR1 transkripcionog faktora u proliferaciji endotelijalnih ćelija, neovaskularizaciji, tumorskoj angiogenezi i rastu tumora (Fahmy et al., 2003). Zbog svega navedenog i ovaj protein je identifikovan kao potencijalni terapijski target u lečenju bolesti koje mogu biti povezane sa poremećajem u regulaciji angiogeneze.

## 1.2 SOX/Sox geni

Prvi otkriveni gen iz familije Sox gena bio je Sry (akronim od „sex-determining region on the Y chromosome”) gen, identifikovan i okarakterisan 1990. godine (Gubbay et al., 1990; Sinclair et al., 1990). Njegovim otkrićem okončana je potraga za genom odgovornim za determinaciju muškog pola koji je lociran na Y hromozomu. SRY pripada superfamiliji proteina koji poseduju HMG domen. Među njima postoje proteini sa više HMG domena koji ostvaruju interakciju sa DNK nezavisno od sekvence i oni koji imaju jedan HMG domen koji se specifično vezuje za DNK sekvencu (Soullier et al., 1999;

Wegner, 1999). SRY pripada ovoj drugoj grupi. Ostali članovi *Sox/SOX* genske familije otkriveni su na osnovu homologije sa *Sry* genom u okviru HMG boks domena i na osnovu ove karakteristike nastao je akronim *Sox* (S*ry*-related HMG box) (Gubbay et al., 1990; Denny et al., 1992). Brojevi su *Sox* genima dodeljivani na osnovu redosleda otkrivanja.

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

Prvobitno je vladalo mišljenje da su *Sox* geni karakteristični samo za višćelijske organizme (Metazoa). Međutim, analizom genomske sekvence jednoćelijskog organizma *Monosiga brevicollis* (Protozoa, red Choanoflagellata) otkrivene su dve *Sox* genima slične sekvence čije predviđene HMG domene odlikuje 49 – 50% identičnosti u aminokiselinskoj sekvenci sa HMG domenima *Sry/SRY* gena miša i čoveka (King et al., 2008). Uzimajući u obzir da su ovi jednoćelijski organizmi najbliži srodnici višćelijskih organizama, pretpostavlja se da je pojava predačkog *Sox* gena prethodila pojavi Metazoa (Guth and Wegner, 2008). Kod višćelijskih organizama *Sox* geni su detektovani već kod sunđera, gde je kod tri različite vrste sunđera detektovano od 3 do 4 gena (Jager et al., 2006; Larroux et al., 2008). Ovi *Sox* geni pripadaju SoxB ili SoxF grupi, a nekiod članova ove familije se ne

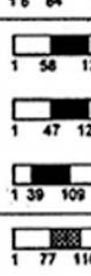
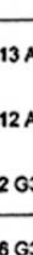
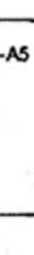
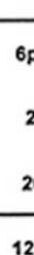



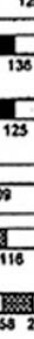
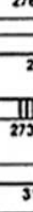









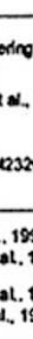




mogu svrstati ni u jednu od postojećih grupa. Kod dupljara je broj identifikovanih *Sox* gena mnogo veći i, u zavisnosti od vrsta, kreće se od 10 do 14 (Jager et al., 2006). *Sox* geni dupljara mogu biti svrstani u tri grupe: SoxB, SoxF i SoxE, ali i ovde postoje geni koji se ne mogu klasifikovati na osnovu postojeće podele. Ovi podaci ukazuju da se prva ekspanzija *Sox* gena odigrala kod prvih Metazoa, pre divergencije sunđera i dupljara, i da su SoxB, SoxF i SoxE grupe filogenetski veoma stare (Guth and Wegner, 2008). S obzirom da su ovi organizmi vrlo jednostavne građe, bez kompleksnih tkiva i bilateralne simetrije, verovatno *Sox* geni kod njih obavljaju neke osnovne funkcije vezane za višćelijsku organizaciju, što se veoma razlikuje od složenih funkcija koje ovi geni obavljaju kod kičmenjaka. SoxC i SoxD grupa gena se pojavljuju kod organizama sa bilateralnom simetrijom, gde se može primetiti drastična razlika u broju *Sox* gena između protostomija i deuterostomija.

Insekti (*Drosophila melanogaster*) i nematode (*Caenorhabditis elegans*) poseduju po osam, odnosno pet *Sox* gena, a svi ovi geni imaju odgovarajuće ortologe u pomenutim grupama *Sox* gena kičmenjaka (Bowles et al., 2000). Pretpostavlja se da je tokom evolucije kičmenjaka veoma rano došlo do duplikacije originalnog seta *Sox* gena dva puta, a zatim i do njihove divergencije (Hokamp et al., 2003). Neki od dupliranih gena su podelili postojeće funkcije koju je prvobitni gen obavljao pre duplikacije, dok su neke kopije stekle nove funkcije tokom evolucije (subfunkcionalizacija i neofunkcionalizacija gena) (Lynch and Force, 2000) Tokom procesa subfunkcionalizacije i neofunkcionalizacije gena postoji period kada su obe kopije gena eksprimirane deleći iste funkcije. Time se mogu objasniti slične funkcije različitih članova iste grupe *Sox* gena, gde jedan član grupe može zameniti drugog u obavljanju neke funkcije.

Na Tabeli 2, prikazano je 8 grupa *Sox* gena (A-H) koje su prisutne kod miša i čoveka.

**Tabela 2.** Klasifikacija Sox gena miša i čoveka, sa oznakom grupe, pozicijom na hromozomu kod miša i čoveka (lokus) i strukturnom organizacijom gena. Na shemi organizacije gena blokovi označavaju funkcionalne domene: crni-HMG boks domen, uzdužne pruge-transaktivacioni domen, poprečne pruge-transrepresorski domen, dijagonalne pruge-dimerizacioni domen. Tabela je preuzeta (Lefebvre et al., 2007).

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

### 1.2.1 Osnovne karakteristike SOX protein

Kao što smo već napomenuli, SOX proteini se vezuju specifično za DNK sekvencu pomoću HMG domena i ostvaruju svoju funkciju kao transkripcioni faktori. Pored svoje uloge u vezivanju za DNK, HMG domen učestvuje u konformacionim promjenama DNK, interakcijama sa drugim proteinima i transportu proteina unutar i van jedra (Lefebvre et al., 2007). Ovaj domen je visoko konzerviran kod SOX proteina iste grupe, a proteini različitih grupa pokazuju oko 50% homologije u okviru domena. Pretpostavlja se da je evolucija ovog domena išla u pravcu ostvarivanja jedinstvenih funkcija SOX proteina pojedinih grupa. Domeni SOX proteina izvan HMG boks domena visoko su evolutivno očuvani kod ortologa i članova iste grupe, a potpuno različiti kod pripadnika različitih grupa (Lefebvre et al., 2007). Ovi domeni uključuju transaktivacione, transrepresorske i domene odgovorne za dimerizaciju proteina (Lefebvre et al., 2007).

Svi SOX proteini prepoznaju veoma sličnu heksamernu DNK sekvencu  $^{A/T}A/TCAA^{A/T}G$ . Naravno, i okolna sekvenca utiče na afinitet vezivanja, a konsenzusni nukleotidni sastav okolne sekvence za različite SOX proteine varira (Mertin et al., 1999). Afinitet za određene nukleotide direktno zavisi od strukture HMG boks domena, što SOX proteinima iz iste grupe obezbeđuje regulisanje ekspresije istih ciljnih gena, dok proteini iz drugih grupa mogu da kompetiraju za ista mesta ili da preko izmenjenih sekvenci regulišu druge ciljne gene (Lefebvre et al., 1998). Važno je naglasiti da je otkriveno više slučajeva u kojima se SOX proteini vezuju za sekvence DNK koje samo delimično odgovaraju konsenzusnoj sekvenci identifikovanoj u *in vitro* eksperimentima (Mertin et al., 1999). Sekvence slične konsenzusnoj veoma su zastupljene u genomu, pa je jasno da specifičnost DNK sekvence nije jedini kriterijum za vezivanje SOX proteina u regulatornim regionima ciljnih gena *in vivo*. Konformacija DNK u regionima gde se nalaze nekonsenzusne sekvence može da bude jedan od kriterijuma po kojima SOX proteini vrše selekciju mesta za vezivanje.

SOX proteini se vezuju za manji žljeb DNK i izazivaju savijanje DNK zavojnice, pri čemu ugao savijanja može da varira između 30° i 110° (Weiss, 2001). Ovakav raspon savijanja obezbeđen je fleksibilnom strukturom HMG boks domena koja postaje rigidna

prilikom vezivanja za DNK, izazivajući savijanje zavojnice. Istovremeno, interakcija sa DNK obezbeđuje kompletno savijanje proteina i zauzimanje tercijarne strukture. S obzirom da se SOX proteini vezuju za manji žljeb DNK, sterički je omogućeno njihovo vezivanje u neposrednoj blizini drugih transkripcionih faktora, koji se vezuju za veći žljeb DNK (Wegner, 1999). Postavljena je hipoteza da SOX proteini organizuju hromatin i omogućavaju vezivanje drugih transkripcionih faktora i formiranje aktivnih transkripcionih kompleksa (enhensozoma) (Wegner, 1999).

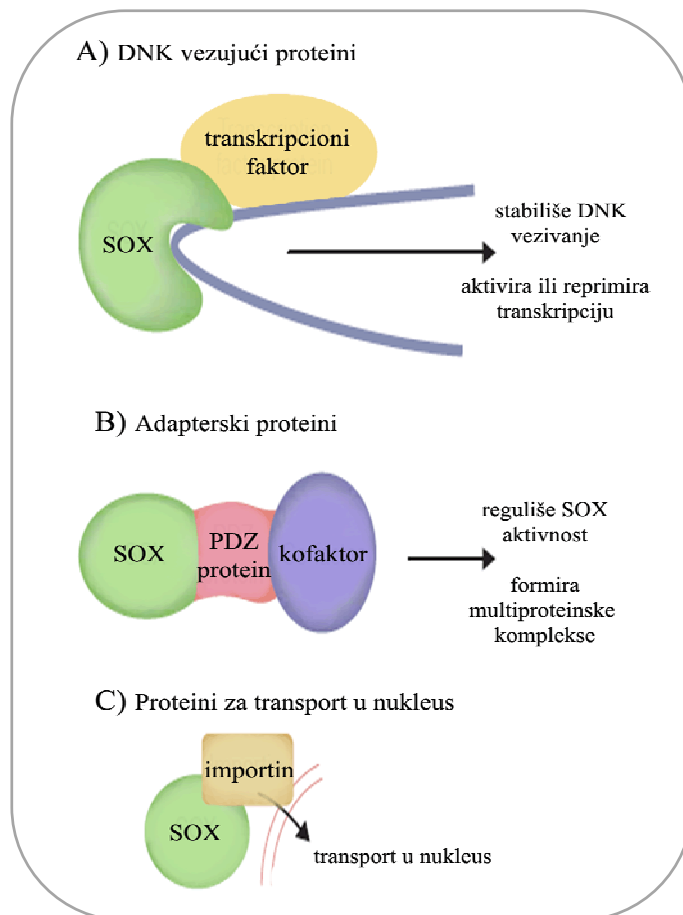
### 1.2.2 Interakcije SOX proteina sa drugim transkripcionim faktorima

Uzimajući u obzir da svi SOX proteini prepoznaju i vezuju se za sličnu DNK sekvencu, da se eksprimiraju u različitim tkivama i da isti ćelijski tip ko-eksprimira više SOX proteina, postavlja se pitanje kako svaki SOX protein prepoznaje svoj specifični target gen? Pretpostavlja se da svaki SOX protein interaguje sa svojim partnerskim proteinima i na taj način ostvaruje tkivno specifičnu regulaciju genske ekspresije (Kamachi et al., 2000). Literaturni podaci govore da SOX proteini formiraju multi-proteinske komplekse na promotorkim ili enhenserskim sekvencama i da ti kompleksi određuju funkcionalnu specifičnost SOX proteina u različitim ćelijama (Wilson and Koopman, 2002).

SOX proteini interaguju sa drugim transkripcionim faktorima, adapterskim proteinima i faktorima odgovornim za transport u nukleus (Slika 4). Najveći broj interakcija sa drugim proteinima se ostvaruje preko HMG domena. Preko DNK vezujućeg domena interakciju sa svojim partnerskim proteinima ostvaruju SOX2, SOX9, SOX10, SOX18, SRY (Tabele 3). Takođe, neki ostvaruju interakciju i preko C-terminalnog domena ili domena „namotani kalem“ (eng. coiled-coil) (Tabela 3).

Transkripcioni faktori koji interaguju sa SOX proteinima pripadaju različitim familijama i mogu aktivirati ili reprimirati transkripciju sa ciljnih promotora. Pokazano je da SOX2 interaguje sa PAX6 transkripcionim faktorom i aktivira transkripciju  $\delta$ -kristalina, gena koji se eksprimira u sočivu oka (Kamachi et al., 2001). Takođe, pokazano je da SOX2 i SOX3 interaguju sa transkripcionim faktorima Oct3/4, tokom regulacije *Fgf4*, UTF1 i

*osteopontin* gena tokom rane embriogeneze (Yuan et al., 1995; Botquin et al., 1998; Nishimoto et al., 1999; Kamachi et al., 2000).



**Slika 4.** Tri različita tipa interakcije SOX-protein. Partneri SOX proteina mogu biti podeljeni u tri grupe: A) DNK-vezujuć proteini - učestvuju u regulaciji genske ekspresije. B) Adapterski proteini, - obezbeđuju vezu SOX proteina sa drugim proteinima. C) Importini-neophodni za transport SOX proteina u nukleus. Shema je preuzeta (Wilson and Koopman, 2002).

Sa druge strane, SOX proteini mogu da regrutuju i transkripcione represore. Npr. Na primer, *Fgf3* ekspresija je reprimirana kooperativnim dejstvom SOX6 i CtBP2 proteina (Murakami et al., 2001) Poslednjih godina otkriveno je još SOX partnera, uključujući MEF2C koji interaguje sa SOX18 proteinom, Sp1/3 koji interaguju sa SOX10, androgeni receptor koji interaguje sa SRY proteinom (Yuan et al., 2001).

U tabeli 3. su prikazani do sada otkriveni partneri SOX proteina, domeni SOX proteina preko kojih je omogućena interakcija sa partnerskim proteinima, kao i ciljni geni čija je ekspresija regulisana i ćelijski tipovi, odnosno tkiva, u kojima su ostvarene interakcije.

**Tabela 3.** SOX proteini i njihovi partneri. Tabela je preuzeta (Wilson and Koopman, 2002).

SOX protein	Partner protein	SOX domen za interakciju	Ciljni gen	Ćelijski tip/tkivo	Referenca
<b>SOX2</b>	Oct3/4	HMG domen	<i>fgf-4</i> , <i>UTF1</i> , <i>hoxb1</i> , <i>osteopontin</i>	Embriion pre implantacije, zadnji mozak	Yuan H, 1995; Botquin V, 1998; Nishimoto M, 1999; Di Rocco G, 2001.
<b>SOX2</b>	Pax6	HMG domen	<i>kristalin</i>	sočivo	Kamachi Y 2001
<b>SOX4</b>	Syntenin	Nije određen	<i>nepoznat</i>	B ćelije	Geijsen N, 2001
<b>SOX5</b>	SOX6	“coiled-coil” domen	<i>col2A1</i>	hondrocite	Lefebvre V, 1998
<b>SOX6</b>	CtBP1	ak 383-388	<i>fgf-3</i>	Optičke vezikule	Murakami A, 2001
<b>XSOX17α/β</b>	β-catenin	C-terminus	<i>nepoznat</i>	Endoderm	Zorn A, 1999
<b>SOX9</b>	SF1	HMG domen	<i>AMH</i>	Sertolijeve ćelije	de Santa Barbara P, 1998
<b>SOX9</b>	HSP70	C terminalne ak 236-330	<i>nepoznat</i>	Različita tkiva	Marshall O, 2001
<b>SOX10</b>	Pax3	Nije određen	<i>c-ret</i>	Neuralna resta	Lang D, 2000., Kuhlbrodt K, 1998,
<b>SOX10</b>	EGR2/Krox-20	Nije određen	<i>Koneksin 32</i>	Glijalne ćelije	Bondurand N 2001
<b>SOX10</b>	Sp1/3	HMG domen	<i>Sub. nikotin.receptora</i>	PNS	Melnikova I, 2000
<b>SOX11</b>	Brn1	Nije određen	<i>nepoznat</i>	Glijalne ćelije	Kuhlbrodt K, 1998
<b>SOX18</b>	Mef2c	HMG domen	<i>nepoznat</i>	Endotel	Hosking BM 2001

<b>SRY</b>	Androgen receptor	HMG domen	<i>nepoznat</i>	Sertolijeve ćelije	Yuan X, 2001
<b>SRY</b>	SIP1	C-terminus	<i>nepoznat</i>	Sertolijeve ćelije	Poulat F, 1997
<b>SRY</b>	Importin- $\beta$	HMG domen	<i>nepoznat</i>	Sertolijeve ćelije	Forwood J, 2001
<b>SRY</b>	Calmodulin	HMG domen	<i>nepoznat</i>	Sertolijeve ćelije	Harley VR, 1996

### 1.2.3 SOX proteini – transkripcioni aktivatori i represori

SOX proteini koji pripadaju grupama B1, C, E i F, koji čine 12 od ukupno dvadeset SOX proteina čoveka i miša, poseduju potentan transaktivacioni domen na svom C-terminusu. Ovaj domen SOX2 i SOX9 proteina fizički interaguje sa transkripcionim koaktivatorima CBP/p300 i na taj način ovi proteini stupaju u kontakt sa komponentama transkripcione mašinerije (Nowling et al., 2003; Tsuda et al., 2003).

U tumačenju mehanizama transaktivacije i transrepresije od posebnog interesa je B grupa *Sox* gena koja je evoluirala u dve podgrupe: B1 koju čine transkripcioni aktivatori SOX1, SOX2 i SOX3 i B2 koja obuhvata transkripcione represore SOX14 i SOX21 (Uchikawa et al., 1999). Pet SOX proteina B grupe pokazuju visoku homologiju u okviru HMG boks domena i preklapajući profil ekspresije. Represori B2 podgrupe *in vivo* reprimiraju aktivnost *Sox* gena podgrupe B1 (Uchikawa et al., 1999). Domen odgovoran za represiju nalazi se van HMG boks-a, na C-terminusu, što ukazuje da ovi proteini deluju, ne samo kao kompetitori SOXB1 proteina za vezivanje za DNK, već i direktnim interakcijama preko C-terminalnog domena (Uchikawa et al., 1999).

SOX15, jedini član G grupe SOX proteina, ostvaruje svoju represorsku funkciju, takođe preko domena lokalizovanog na C-terminusu (Beranger et al., 2000). Zanimljivo je da SOX proteini D grupe (SOX5, 6 i 13) mogu regulisati transkripciju i kao koaktivatori i kao represori. SOX proteini ove grupe u sadejstvu sa SOX9 kooperativno aktiviraju specifične gene uključene u proces hondrogeneze, iako nemaju transaktivacioni domen, niti direktno reaguju sa SOX9 (Lefebvre et al., 1998). Ovakav mehanizam aktivacije može se

objasniti njihovom ulogom arhitektonskih faktora ili/i interakcijama sa drugim proteinima. Mehanizmi preko kojih ovi proteini ostvaruju represiju, potpuno su drugačiji i veoma raznovrsni. U ćelijama ušnog mehura, SOX6 reaguje sa transkripcionim korepresorom CtBP2 preko kratkog motiva PLNLSS koji se nalazi van HMG boks domena (Lefebvre et al., 2007), dok u beta ćelijama pankreasa interaguje sa Pdx1 proteinim preko HMG boks domena. U oligodendrocitima SOX5 i SOX6 kompetiraju sa SOX proteinima E grupe (SOX8, 9 i 10) za vezivanje za DNK (Stolt et al., 2006). SOX13 vrši represiju gena specifičnih za T limfocite direktnim vezivanjem za DNK i istiskivanjem TCF1 proteina, ali domen odgovoran za ovu aktivnost još uvek nije identifikovan (Melichar et al., 2007).

### 1.3 Funkcija SOX proteina

Transkripcioni faktori SOX proteinske familije regulišu različite procese tokom razvića, a takođe, kontrolišu homeostazu u adultnim tkivima. Funkcija SOX proteina može biti prilagođena određenoj fazi razvoja ili određenom ćelijskom kontekstu (Wegner, 2010). Ima dosta podataka o istovremenoj ekspresiji različitih SOX protein u određenom tkivu, gde oni ostvaruju redudantnu, sinergističku ili antagonističku funkciju.

Posle otkrića da je SRY odgovoran za determinaciju muškog pola, zajedno sa SOX9 (Koopman, 2005) i za druge SOX proteine otkrivena je funkcija tokom razvića i u različitim fiziološkim procesima u adultnom organizmu. Danas se zna da SOX proteini učestvuju u neurogenezi, razviću skeleta, hematopoezi, razviću dlake, kardiogenezi, angiogenezi (Tabela 4). Takođe, treba napomenuti da je SOX2 protein neophodan za održavanje pluripotentnosti embrionalnih matičnih ćelija (Avilion et al., 2003). Pokazano je da SOX2, zajedno sa Oct3/4, c-Myc i Klf4, može da reprogramira adultne i embrionalne fibroblaste u pravcu pluripotentne matične ćelije (Takahashi and Yamanaka, 2006). Zato *Sox2* i označavaju kao glavni gen “matičnosti” ćelija.

S obzirom na veliki broj funkcija Sox gena, pregled funkcija ove genske familije kod miša dat je u Tabeli 4.



**Tabela 4.** Pregled funkcija *Sox* gena miša. Preuzeta tabela (Lefebvre et al., 2007).

Grupa	Gen	Uloga
A	<i>Sry</i>	Determinacija pola (Polanco and Koopman, 2007) Regulacija dopaminergičnih neurona nigrostriatalnog sistema (Dewing et al., 2007)
B1	<i>Sox1</i>	Razviće oka (Kondoh et al., 2004) Neurogeneza (Bylund et al., 2003; Pevny and Placzek, 2005)
	<i>Sox2</i>	Održavanje pluripotentnosti embrionalnih matičnih ćelija (Avilion et al., 2003) Neurogeneza (Pevny and Placzek, 2005; Wegner and Stolt, 2005) Razviće oka (Kamachi et al., 1998; Kondoh et al., 2004) Razviće hipofize (Kelberman et al. 2006)
	<i>Sox3</i>	Neurogeneza (Bylund et al., 2003; Pevny and Placzek, 2005) Razviće oka (Kamachi et al., 1998; Kondoh et al., 2004) Razviće hipofize (Rizzoti et al., 2004) Razviće gonada (Weiss et al., 2003)
B2	<i>Sox14</i>	Neurogeneza (Sandberg et al., 2005)
	<i>Sox21</i>	Neurogeneza (Sandberg et al., 2005)
C	<i>Sox4</i>	Kardiogeneza (Schilham et al., 1996) Limfopoeza (Schilham et al., 1997) Razviće pankreasa (Wilson et al., 2005) Neurogeneza (Bergsland et al., 2006)
	<i>Sox11</i>	Kardiogeneza (Sock et al., 2004) Razviće oka, pluća, pankreasa, skeleta i slezine (Sock et al., 2004) Neurogeneza (Bergsland et al., 2006)
	<i>Sox12</i>	Nepoznata
D	<i>Sox5</i>	Razviće skeleta (Smits et al., 2001) Razviće nervne kreste (Perez-Alcala et al., 2004) Gliogeneza (Stolt et al., 2006)
	<i>Sox6</i>	Provodljivost srčanog mišića (Hagiwara et al., 2000) Razviće skeleta (Smits et al., 2001) Gliogeneza (Stolt et al., 2006) Eritropoeza (Dumitriu et al., 2006; Yi et al., 2006)
	<i>Sox13</i>	Limfopoeza (Melichar et al., 2007)

E	<b>Sox8</b>	Gliogeneza (Stolt et al., 2004 and 2005) Razviće testisa (Chaboissier et al., 2004) Osteogeneza (Schmidt et al., 2005) Formiranje nervne kreste (Maka et al., 2005; O'Donnell et al., 2006)
	<b>Sox9</b>	Determinacija pola (Barrionuevo et al., 2006a; Kobayashi et al., 2005) Hondrogeneza (Bi et al., 1999; Akiyama et al., 2002) Razviće nervne kreste (Cheung et al., 2005) Gliogeneza (Stolt et al., 2003; Wegner and Stolt, 2005) Održavanje ćelija notohorda (Barrionuevo et al., 2006) Kardiogeneza (Akiyama et al., 2004) Formiranje unutrašnjeg uha (Taylor and LaBonne, 2005) Formiranje folikula dlake (Vidal et al., 2005)
	<b>Sox10</b>	Razviće nervne kreste (Wegner and Stolt, 2005; Kelsh et al., 2006) Formiranje unutrašnjeg uha (Taylor and LaBonne, 2005)
F	<b>Sox7</b>	Kardiogeneza (Zhang et al., 2005)
	<b>Sox17</b>	Formiranje endoderma ( Kanai-Azuma et al., 2002) Angiogeneza (Matsui et al., 2006)
	<b>Sox18</b>	Kardiogeneza (Pennisi et al., 2000; Zhang et al., 2005) Angiogeneza (Downes & Koopman, 2001; Matsui et al., 2006) Razviće folikula dlake (Pennisi et al., 2000)
G	<b>Sox15</b>	Regeneracija skeletne mišićne mase (Lee et al., 2004; Meeson et al., 2007)
H	<b>Sox30</b>	nepoznata

#### 1.4 SoxF/SOXF grupa

*SoxF/SOXF* grupa kojoj pripadaju *Sox7/SOX7*, *Sox17/SOX17* i *Sox18/SOX18* geni, kodira transkripcione faktore koji imaju značajnu ulogu u kardiovaskularnom razviću. *SOXF* transkripcioni faktori određuju sudbinu endotelijalnih ćelija i upravljaju ćelijskom diferencijacijom u pravcu razvića srca, krvnih i limfnih sudova (Francois et al., 2010). Njihova uloga je visoko očuvana tokom evolucije, a funkcija fino koordinisana pomoću specifičnih kofaktora i partnerskih proteina. S obzirom na njihovu važnu ulogu u kardiogenezi, vaskularogenezi i limfogenezi, mutacije u *SOXF* genima učestvuju u etiologiji humanih vaskularnih bolesti. mutacije u *SOX18* genu su povezane sa

poremećajem limfnog sistema koji dovodi do gastroenteropatija (Hokari et al., 2008). Zatim, dominantna i recesivna forma mutacija u *SOX18* genu leži u osnovi naslednog sindroma označenog kao Hypotrichosis–Lymphedema–Telangiectasia ili skraćeno HLT sindrom (Irrthum et al., 2003).

Takođe, SOX17 je identifikovan kao potencijalni kandidat odgovoran za razvoj primarnog limfedema kog čoveka (Ferrell et al., 2008). Međutim, molekularni mehanizmi kojima SOXF protein učestvuju u etiologiji i patofiziologiji navedenih oboljenja nisu još uvek u potpunosti okarakterisani.

#### 1.4.1 Molekularna funkcija SOXF proteina

Kao i ostali SOX proteini, SOXF transkripcioni faktori prepoznaju i vezuju se za heptamernu konsenzus DNK sekvencu  $^{A/T}CAA^{A/T}G$  (Hosking et al., 1995; Niimi et al., 2004). SOXF proteini aktiviraju transkripciju ciljnih gena pomoću *trans*-aktivacionog domena koji se nalazi C-terminalno u odnosu na HMG boks domen (Hosking et al., 1995). Kratki aminokiselinski motiv DXXEFD/EQYL koji posreduje u interakciji sa  $\beta$ -kateninom, očuvan je kod svih članova SOXF grupe (Sinner et al., 2004).

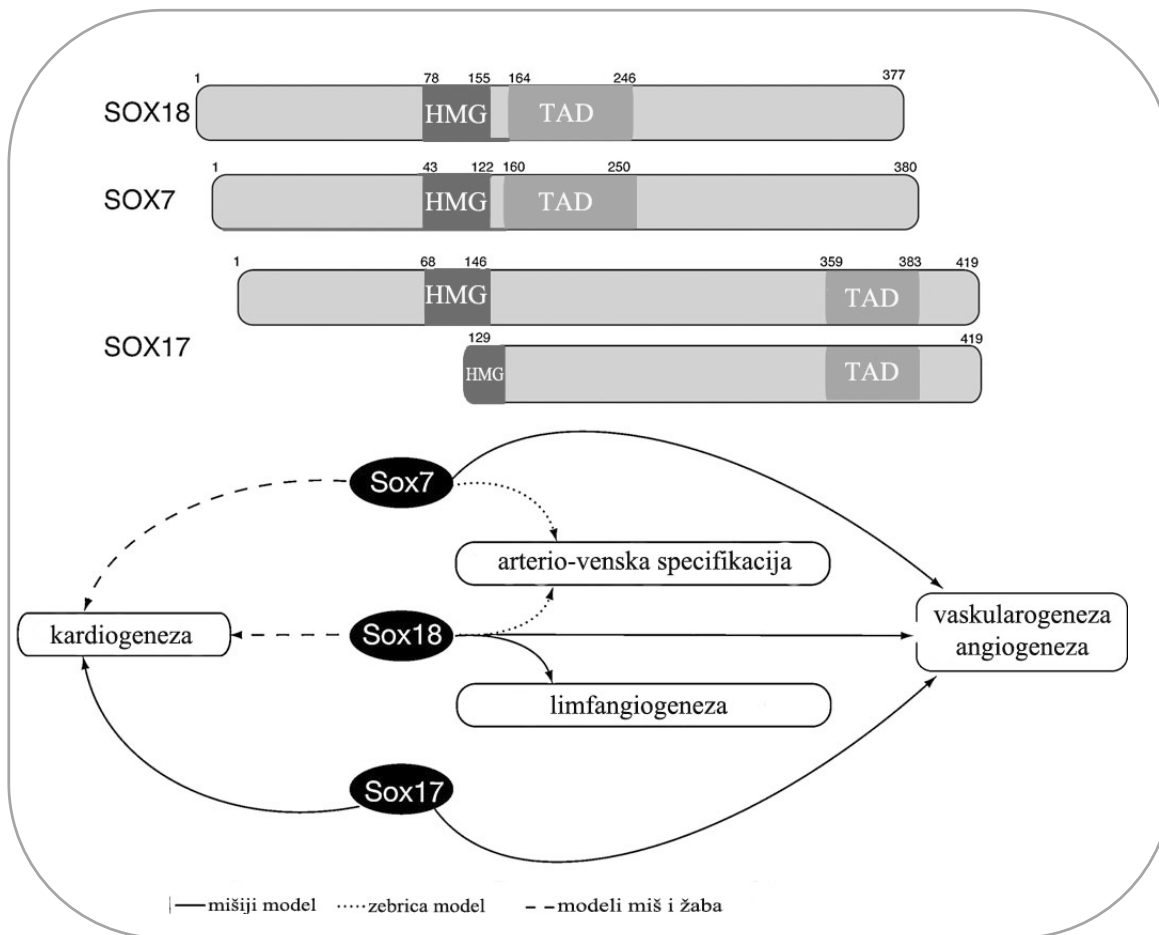
Interakcija sa partnerskim proteinima je glavni mehanizam koji moduliše transkripcionu aktivnost SOXF transkripcionih faktora. MEF2C („myocyte enhancer factor-2”) direktno interaguje sa HMG boksom SOX18 proteina *in vitro* (Hosking et al., 2001). Ova dva transkripciona faktora su koeksprimirana u endotelijalnim ćelijama tokom embrionalnog razvića miša (Lin et al., 1998; Pennisi et al., 2000b), a *in vitro* sinergistički aktiviraju transkripciju u luciferaznom eseju (Hosking et al., 2001). Ciljana delecija Mef2C gena kod miša dovodi do ozbiljnih poremećaja u vaskularnom razviću, a homozigoti umiru tokom embrionalnog razvića (Lin et al., 1998). Za miševe sa mutacijama u *Sox18* genu je takođe pokazano da imaju problema u vaskularnom razviću (Pennisi et al., 2000b). Ovi podaci ukazuju da ova dva transkripciona faktora kooperativno kontrolišu morfogenezu krvnih sudova.

### 1.4.2 SOXF u razviću srca, krvnih i limfnih sudova

Detaljna analiza SOXF ekspresije tokom rane organogeneze otkriva da su *Sox7* i *Sox18* eksprimirani u perikardialnom regionu 8,25 dpc (eng. days post-coitum), odnosno 8,5 dpc u srčanoj cevi, dok *Sox17* transkripti nisu primećeni (Sakamoto et al., 2007). Kod žabe, *xSox7* je maternalno eksprimiran i detektovan je tokom razvića u perikardialnom region (Fawcett SR, Gene Expr Patterns 2004;4:29–33), a takođe i *xSox18 $\beta$*  (Hasegawa M, Gene 2002;290:163–72.). Ciljana mutageneza *Sox17* kod miševa i RNK interferencija u diferencirajućim embrionalnim ćelijama dovode do blokiranja miogeneze sprečavanjem signala koji vode ka specifikaciji srca u primitivnom mezodermu (Liu Y, Proc Natl Acad Sci USA 2007;104:3859–64.; Sakamoto Y, Biochem Biophys Res Commun 2007;360:539–44.).

Tokom embrionalnog razvića miša *Sox7*, *Sox17* i *Sox18* su eksprimirani tranzijentno u endotelijalnim ćelijama. Ekspresija *Sox18* počinje 7,5 dpc u krvnim ostrvcima žumancetne kese i endotelijalnim ćelijama alantoisa. Oko 8,25-8,5 dpc *Sox7* i *Sox18*, ali ne i *Sox17* su prisutni u dorzalnim aortama u nastajanju (Pennisi et al., 2000b; Sakamoto et al., 2007). Posle 9 dpc *Sox7* i *Sox18* i *Sox17* su eksprimirani u manjim granama krvotoka (Pennisi et al., 2000b; Sakamoto et al., 2007). U toj fazi, koja odgovara primitivnoj limfangiogenezi, eksprimira se *Sox18* u endotelijalnim ćelijama krvnih sudova od kojih se diferenciraju limfni sudovi. Treba napomenuti da se *Sox7* transkripti mogu uočiti pre *Sox18* u prekursorima endotelijalnih ćelija, kao i da *Sox7* ekspresija prestaje ranije u odnosu na *Sox18* ekspresiju u aksijalnoj veni, što odgovara periodu kada je mreža krvnih sudova već formirana. Izgleda da je ekspresija ova dva gena u endotelijalnim ćelijama nezavisno regulisana. Zna se da Sonic hedgehog i VEGF signalni putevi modulišu ekspresiju *Sox7* gena u endotelijalnim ćelijama, dok je signalna kaskada odgovorna za regulaciju *Sox18* ekspresije jos uvek nepoznata (Pendeville et al., 2008).

Funkcija SOXF protein u razviću srca, krvnih i limfnih sudova najbolje je proučena kod prirodnih mutanata kod miša i čoveka, a o tome će detaljnije biti reči u daljem tekstu. Na Slici 5 je dat shematski prikaz funkcija SOXF proteina kod zebrice, žabe i miša.

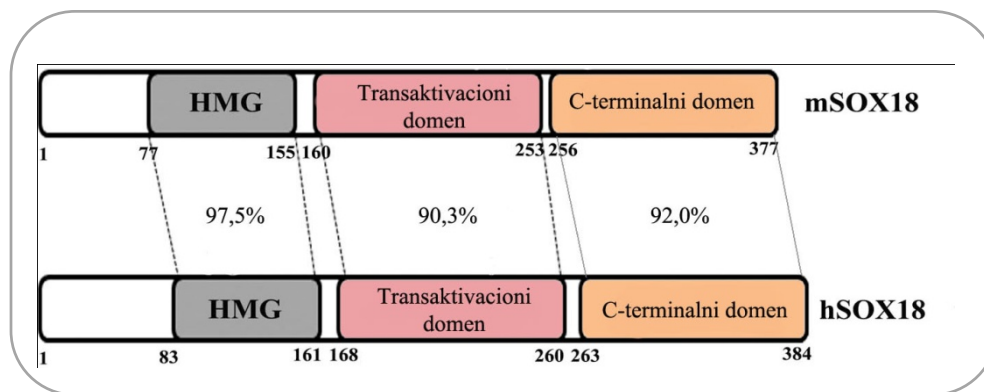


**Slika 5.** SOXF proteini i njihova uloga u kardiovaskularnom razviću. Gornji panel predstavlja shematski prikaz SOXF proteina, sa označenim HMG boks domenom i transaktivacionim domenom (TAD) u svakom proteinu. SOX17 je predstavljen u dve varijante koje nastaju alternativnom obradom (funkcija kraće forme nije poznata). Donji panel predstavlja ulogu SOXF proteina u razviću srca, krvnih i limfnih sudova. Pune i isprekidane linije označavaju model sistem u kome je određena funkcija. Shema je preuzeta (Francois et al., 2010).

### 1.5 SOX18 transkripcioni faktor

SOX18 je transkripcioni faktor koji je tranzijentno eksprimiran u nastajućim endotelijalnim ćelijama tokom embrionalnog razvića i adultne neovaskularizacije i smatra se da determiniše endotelijalnu specifikaciju i/ili diferencijaciju (Downes and Koopman,

2001). Mišiji *Sox18* gen kodira protein dug 377 aminokiselina (ak) koji ima sposobnost vezivanja za DNK sekvencu AACAAAG *in vitro*, kao i sposobnost aktivacije transkripcije u *in vitro* Gal4 eseju (Hosking et al., 1995). Transaktivacioni domen SOX18 proteina kod miša je mapiran u regionu od 160 do 255 ak (Hosking et al., 1995), a kod čoveka u regionu od 168 do 260 ak (Sandholzer et al., 2007). Takođe, Sandholzer i saradnici su pokazali da C-terminalni domen sadrži 9 amino kiselina dug transaktivacioni motiv koji ima transaktivacionu aktivnost, a odgovoran je za interakciju sa transkripcionim kofaktorom TAF9 (Sandholzer et al., 2007). Pomenuti 9 ak dug transaktivacioni motiv je smešten u C-terminalnom regionu proteina koji se kod čoveka nalazi od 263 do 384 ak, pa se može reći da pored centralnog transaktivacionog domena, postoji i tzv C-terminalni transaktivacioni domen proteina. Delecija tog regiona značajno smanjuje transaktivacionu aktivnost SOX18 proteina, što je pokazano u *in vitro* esejima (Sandholzer et al., 2007).



**Slika 6.** Poređenje SOX18 ortologa miša i čoveka. Funkcionalni domeni proteina su označeni. Procenat sličnosti aminokiselinske sekvence važnih domena SOX18 proteina između čoveka i miša prikazan je brojevima između linija koje definišu svaki region.

HMG domen i transaktivacioni domen imaju jasno definisane funkcije i dobro su očuvani između čoveka i miša (Azuma et al., 2000; Pennisi et al., 2000c; Stanojčić and Stevanović, 2000) (Slika 6).

Ekspresija *Sox18* gena je ispitivana *in situ* hibridizacijom i detektovana tokom razvića kardiovaskularnog sistema kod embriona miša (Pennisi et al., 2000b). Već je napomenuto da se transkripti *Sox18* gena detektuju veoma rano tokom embriogeneze, i bivaju prisutni sve do formiranja periferne mikrocirkulacije (Downes and Koopman, 2001).

Pored embrionalnog razvića, *Sox18* se eksprimira i u endotelijalnim ćelijama tokom zarastanja rana i reparacije tkiva (Darby et al., 2001). Dakle, ovaj gen se tranzijentno eksprimira na mestima razvijanja krvnih sudova, bez obzira da li je reč o *de novo* vaskularogenezi ili angiogenetskom širenju već postojećih krvnih sudova.

Transkripcioni faktori koji učestvuju u razviću su uglavnom ekspimirani na više mesta i u više faza tokom embrionalnog razvića. Pored ekspresije tokom razvića krvnog i limfnog sistema, tranzijentna ekspresija *Sox18* primećena je i tokom razvića folikula dlake i pera, kod miša odnosno pileta (Pennisi et al., 2000b; Olsson et al., 2001). Ova uloga SOX18 proteina je najbolje uočena kod miševa koji imaju mutacije u *Sox18* genu i fenotipske promene krzna, što će naknadno biti detaljnije objašnjeno.

### 1.5.1 Mutacije u *Sox18/SOX18* genu

Uloga *Sox18* u vaskularnom razviću je upravo otkrivena zahvaljujući poremećajima u razvoju vaskularnog sistema i dlake koji su primećeni kod prirodnih mutanata miša koji su imali mutaciju u *Sox18* genu. Postoje četiri aleleske vrste prirodnih mutanata, označene kao „ragged“ (Ra) miševi, a sve imaju delecionu mutaciju koja dovodi do promene u okviru čitanja (eng. frameshift) tokom translacije i kao rezultat dovodi do siteze skraćenog protein (James et al., 2003). Tri forme mutacije označene kao Ra (ragged), Ra<sup>J</sup> (ragged Jackson) i Rag<sup>l</sup> (raggedlike) u heterozigotnoj formi daju fenotip kojeg karakteriše samo promena u krznu (jedinke imaju “čupav” izgled). Međutim homozigoti razvijaju edem, nakupljanje tečnosti u peritoneumu i cijanozu, tako da veoma rano umiru (Carter T, 1954). Četvrta forma Ra<sup>op</sup> (ragged opossum) i u heterozigotnoj formi daje izražene fenotipske promene, kao Ra, Ra<sup>J</sup> i Rag<sup>l</sup> homozigoti, dok homozigoti umiru *in utero* zbog ozbiljne kardiovaskularne dismorfogeneze (Green E, 1961). Ra<sup>op</sup> miševi ekspimiraju dominantno-negativnu formu SOX18 proteina, koja se vezuje za DNK, ali ne može da ostvari proteinsku interakciju sa endotelijalnim partnerskim proteinom Mef2C čime je sprečeno da SOX18 aktivira target gene odgovorne za kontrolu vaskularnog razvića (Green E, 1961).

Sa druge strane, “*Sox18* null” miševi, kod kojih ne postoje *Sox18* transkripti, nemaju fenotip Ra miševa, iako se prvobitno to očekivalo. *Sox18*<sup>+/+</sup> i *Sox18*<sup>-/-</sup> miševi su

vijabilni, fertilni i ne pokazuju nikakve defekte u kardiovaskularnom sistemu. Jedina uočljiva fenotipska promena u odnosu na *wild type* miševе je nešto tamnije krzno (Pennisi et al., 2000a). Ovakav fenotip nedvosmisleno upućuje na funkcionalnu redundantnost između proteina iste grupe, SOX7, SOX17 i SOX18. Funkcionalna redundantnost je pokazana između *Sox18* i *Sox7* tokom vaskularnog razvića zebrice (Cermenati et al., 2008). Takođe, Sakamoto i saradnici su pokazali redundantnu ulogu *Sox17* i *Sox18* tokom ranog kardiovaskularnog razvića kod miša (Sakamoto et al., 2007).

Kod čoveka detektovane su tri prirodne mutacije u *SOX18* genu povezane sa Hypotrichosis-Lymphedema-Talangiectasia sindromom (skraćeno HLT) (Irrthum et al., 2003). Dve recesivne mutacije, koje dovode do aminokiselinske zamene A104P i W95R, mapirane su u HMG boks domenu proteina, što dovodi do promena u prvoj zavojnici DNK vezivnog domena, destabilizacije proteina i nemogućnosti vezivanja za DNK. Treća mutacija mapira u region koji korespondira regionu sa Ra mutacijama kod miša. Reč je o mutaciji koja dovodi do stvaranja preuranjenog stop kodona, što za posledicu ima stvaranje skraćenog proteina od 240 ak. Ova mutacija pogađa transaktivacioni domen proteina i daje dominantnu formu sindroma. Takođe, ova mutacija nije detektovana kod roditelja pacijenata, ukazujući da je nastala *de novo*.

Prva karakteristika sindroma je hipotrihoza, redukovana maljavost sa nedostatkom obrva i trepavica (Irrthum et al., 2003), i u skladu je sa ulogom *SOX18* gena u razviću dlake. Potom, limfedem, koji se javlja usled nepravilnog razvoja limfnog sistema, u čijem razviću *SOX18* ima važnu ulogu. Poslednja karakteristika ovog sindroma je talengiktazija, koja nastaje kao posledica anomalija u perifernom krvnom sistemu. Sindrom je detektovan u tri familije i obuhvata fenotipske karakteristike koje su u direktnoj vezi sa funkcijom *SOX18* gena u procesima razvića dlake, krvnog i limfnog sistema.

### **1.5.2 SOX18, vaskularne bolesti i kancerogeneza**

Molekularni mehanizmi koji regulišu migraciju i proliferaciju adultnih vaskularnih ćelija leže u osnovi patofiziologije vaskularnih bolesti, kao što je na primer ateroskleroza. Pojačana sekrecija faktora rasta i citokina dovodi do aktivacije vaskularnih glatko-mišićnih



ćelija (VSMC) koje prelaze iz stanja potpuno diferenciranih, kontraktilnih ćelija u proliferativne, migrirajuće, dediferencirane glatko-mišićne ćelije (SMC) (Ross, 1999). Tokom neovaskularizacije, koja dovodi do progresije aterosklerotskog plaka (Moulton, 2001), endotelijalne ćelije migriraju i proliferišu pod dejstvom vaskularnog endotelijalnog faktora rasta (VEGF) i drugih faktora rasta (Inoue et al., 1998). Ovi ćelijski procesi dovode do promena u ekspresiji brojnih gena koji ih regulišu. Garcia-Ramirez i saradnici su pokazali da se *SOX18* gen eksprimira u endotelijalnim ćelijam, kao i u VSMC u podmakloj humanoj koronarnoj aterosklerotskoj leziji, ukazujući na moguću ulogu ovog gena u nastajanju ateroskleroze (Garcia-Ramirez et al., 2005). Uloga *SOX18* u ovom procesu može biti vezana za regulaciju zadebljanja zida arterija (zadebljanje *tunica intima* i *tunica media*) i neovaskularizacije. Tačnije, zadebljanje arterijskog zida i neovaskularizacija lezije su veoma povezani procesi s obzirom da su novi krvni sudovi neophodni za rast ćelija intime tzv. hiperplaziju (Moulton, 2001). Hosking i saradnici su pokazali da je vaskularni adhezioni molekul-1 (VCAM-1), koji je pojačano ekspimiran u aterosklerotskim lezijama, upravo target *SOX18* transkripcionog faktora (Hosking et al., 2004).

Mnogi proteini koji su uključeni u process razvića, imaju funkciju i u malignoj transformaciji ćelija. Tim proteinima pripadaju različiti faktori rasta, transmembranski proteini, komponente uključene u signalne puteve i transkripcioni faktori. Kada ćelija uđe u tumorsku transformaciju nalazi se u fazi nekontrolisanog deljenja i mehanizmi odgovorni za prirodnu ćelijsku smrt više nisu aktivni. Karakteristika takvih "besmrtnih" ćelija jeste amplifikacija gena kao posledica hromozomske nestabilnosti. Mesta amplifikacije u genomu mogu ukazati na regione gde se potencijalno nalaze onkogeni uključeni u tumorogenezu (Savelieva et al., 1997). U hromozomskom regionu 20q13.2, gde mapira humani *SOX18* gen, detektovana je amplifikacija povezana sa kancerom dojke (Collins et al., 1998), kancerom kolona (Schlegel et al., 1995) i kancerom ovarijuma (Iwabuchi et al., 1995). Osim mapiranja u istom regionu, ne zna se direktna uloga *SOX18* gena u ovim bolestima.

Ekspresija *SOX18* gena analizirana je u različitim tumorskim ćelijskim linijama. *SOX18* transkripti pronađeni su u 7 tumorskih linija želudca, 7 tumorskih linija pankreasa,

3 ćelijske linije kancera dojke i 5 embrionalnih tumorskih linija (Saitoh and Katoh, 2002). Takođe, EST (eng. expressed sequence tag) analiza je pokazala da se *SOX18* eksprimira u melanomima, neuroblastomima, kancerima pankreasa, ovariuma i uterusa (Dong et al., 2004).

Novija istraživanja pokazuju da su transkripti SOXF grupe gena u povišenom nivou prisutni u kanceru želudca, u poređenju sa normalnim tkivom želudca. Kod tumora želudca koji ekspimiraju *SOX18* gen postoji i veća verovatnoća invazije tumora limfnim putevima i metastaza u limfnim čvorovima, nego kod istog tipa tumora kod koga nije detektovana povećana ekspresija *SOX18* gena (Eom et al., 2012). Zbog toga, autori ističu da bi *SOX18* mogao da bude prognostički marker i potencijalni terapijski target.

Takođe, analiziran je metilacioni status odabranih gena, među njima i *SOX18* gena, u uzorcima NSCLC (eng. non-small cell lung cancer), jednog oblika kancera pluća, i ustanovljeno je da je metilacioni status promotora analiziranih gena veoma heterogen u tumoru i okolnom, normalnom tkivu (Azhikina et al., 2011). Suprotno, u zdravom tkivu pluća, promotori ovih gena su ili nemetilovani ili hipometilovani, i heterogenost skoro da ne postoji (Azhikina et al., 2011). Povećana heterogenost u metilaciji u normalnom tkivu koje okružuje tumor možda ukazuje na ranu fazu epigenetske kontrole procesa koji dovodi do tumorske transformacije i može biti upotrebljeno kao biomarker prekancerogeneze i stoga može imati koristi u kliničkoj praksi.

Konačno, treba napomenuti da je funkcija *SOX18* gena u kancerogenezi, poslednjih godina, usmerena na njegovu potencijalnu ulogu u širenju tumora, obezbeđivanjem okolne krvne i limfne cirkulacije koje služe za rast tumora i migraciju tumorskih ćelija dovodeći do metastaza. Zato se *SOX18* gen češće pominje u kontekstu tumorske angiogeneze i/ili limfangiogeneze. Young i saradnici su prikazali da heterozigotni  $Ra^{op}$  miševi, koji ekspimiraju dominantno-negativnu formu SOX18, slabije razvijaju tumor kada im se ubrizgaju kultivisane ćelije poreklom od mišije B16 melanoma linije (Young et al., 2006). Redukcija u veličini tumora direkto je povezana sa slabije razvijenom lokalnom mikrocirkulacijom. Takođe, ekspresija dominantno-negativnog SOX18 redukuje proliferaciju i migraciju HUVEC i MCF-7 ćelija, a takođe narušava formiranje krvnog suda (eng. tube formation) *in vitro* (Young et al., 2006).

### 1.5.3 SOX18 target geni

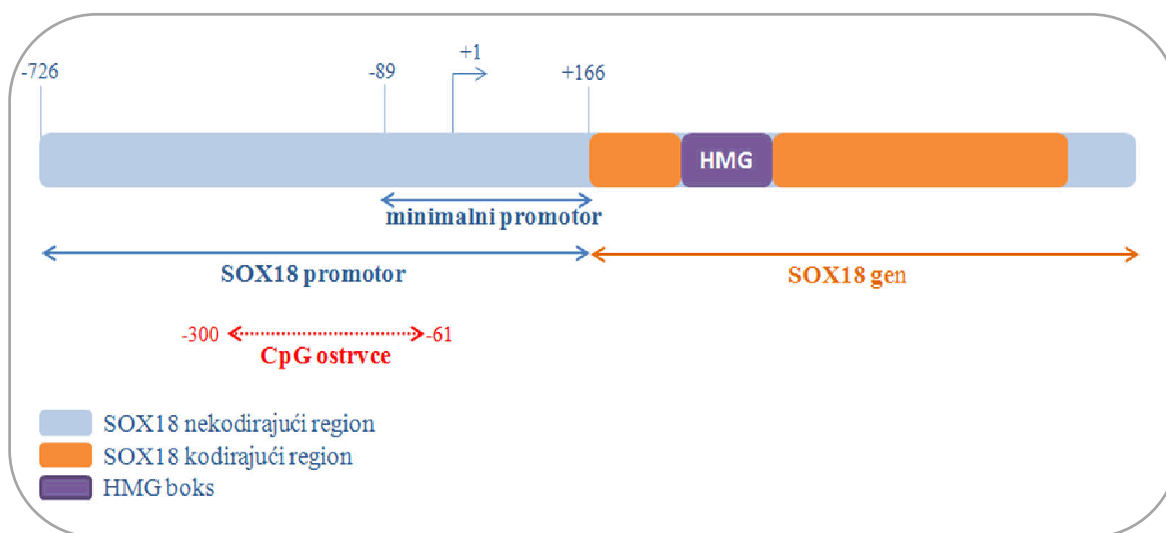
Do danas je otkriveno nekoliko direktnih SOX18 target gena. Kod zebrice je definisan jedan SOX18 target gen. Reč je o genu *robo4* (eng. roundabout 4), koji je kod zebrice odgovoran za angiogenezu. *In situ* hibridizacijom je pokazano da *robo4*, *Sox7* i *Sox18* transkripti kolokalizuju u intersomitskim krvnim sudovima tokom razvića (Samant et al., 2011). Isti autori su pokazali da *Sox18* učestvuje u njegovoj transkripcionoj regulaciji tokom razvića embrionalnog krvnog sistema.

Kod miša su otkrivna tri ciljna gena čiju ekspresiju reguliše SOX18 transkripcioni faktor. Prvi otkriveni gen je za  $\mu$ -opioidni receptor za koga je pokazano da ga SOX18 direktno, specifično i dozno-zavisno aktivira preko ponovljenih SOX vezivnih mesta u distalnom promotorskom elementu (Im et al., 2001). Dalje, VCAM-1 (eng. vascular endothelial adhesion molecule 1), važan adhezioni molekul eksprimiran na endotelijalnim ćelijama koji učestvuje u endotelijalnoj aktivaciji, inflamaciji, aterogenezi, je još jedan ciljni gen koga SOX18 direktno aktivira (Hosking et al., 2004). Hosking i saradnici su pokazali da je SOX18 esencijalan za ekspresiju VCAM-1 gena i u ćelijskoj kulturi i u animalnom modelu. Poznato je da je *Sox18* gen direktno uključen u razviće limfnog sistema koji nastaje od endotelijalnih prekursora pod uticajem *Prox1* gena (eng. prospero homeobox 1). SOX18 direktno aktivira *Prox1* transkripciju vezujući se u okviru proksimalnog promotorskog regiona ovog gena (Francois et al., 2008).

Kod čoveka je microarray analizom identifikovano više SOX18 target gena. Među njima, targeti koji su potom potvrđeni "real time PCR" metodom obuhvataju gene za: DKK (eng. dickkopf -*Xenopus laevis*) homolog 2, efrinski receptor (eng. ephrin receptor A7), interleukin 7 receptor, hemokinski receptor 7, receptor za neuropeptid Y, efrin B2, matriks metaloproteinazu 7, kanabinoidni receptor CB1, semaphorin 3G (Hoeth et al., 2012). Takođe, pokazano je da SOX18 reguliše ekspresiju gena za kladin -5 (Fontijn et al., 2008). Reč je o genu koji kodira protein kladin-5, specifičan za endotelijalne ćelije, koji pripada proteinima koji učestvuju u formiranju (čvrstih međućelijskih) adhezivnih veza i formiranju endotelijalne barijere.

### 1.5.4 Analiza promotora humanog *SOX18* gena

U našoj laboratoriji je predhodno kloniran i okarakterisan promotor humanog *SOX18* gena i definisan je start transkripcije 172 nukleotida uzvodno od ATG kodona (Slika 7). U funkcionalnim esejima je pokazano da region uzvodno od kodirajuće sekvence *SOX18* gena, koji obuhvata sekvencu od -726 do +166 bp u odnosu na start transkripcije, poseduje promotorsku aktivnost, odnosno omogućava transkripciju reporter gena ispred koga je kloniran (Petrovic and Stevanovic, 2007). Delecionom analizom ovog regiona pokazano je da fragment od -726 do -89 bp u odnosu na start transkripcije, sadrži pozitivne *cis*-regulatorne elemente odgovorne za stimulaciju *SOX18* promotorske aktivnosti (Petrovic et al., 2010). Takođe, utvrđeno je da region -89 do +166 bp u odnosu na start transkripcije, nosi regulatorne elemente neophodne i dovoljne za transkripciju reporter gena i da predstavlja minimalni promotorski region *SOX18* gena (Petrovic et al., 2010).



**Slika 7.** Shematski prikaz *SOX18* gena i njegovog promotora. Start transkripcije je označen sa +1, a brojevi iznad sheme označavaju poziciju određenih promotorskih fragmenata relativno u odnosu na start transkripcije.

Dalje, kompjuterska analiza *SOX18* promotora pokazala je da se radi o promotoru bez TATA domena, a nisu prepoznati ni drugi klasični regulatorni elementi karakteristični za promotore bez TATA domena. Podaci iz literature ukazuju da se, u takvim slučajevima,

često radi o GC-bogatim promotorima gde ulogu u regulaciji transkripcije gena imaju transkripcioni faktori koji se vezuju za GC-bogate sekvence (Deaton and Bird, 2011).

GC-boksovi predstavljaju veoma važne *cis*-regulatorne elemente neophodne za transkripciju mnogih gena. Nalaze se u promotorima većine „housekeeping“ gena, kao i u promotorima tkivno–specifičnih, inducibilnih i virusnih gena (Philipsen and Suske, 1999; Bouwman and Philipsen, 2002; Zhu et al., 2008). CpG ostrvca predstavljaju sekvence koje su najmanje duge oko 200 bp i sadrže 50% i više GC nukleotida, a nalaze se u blizini starta transkripcije gena (Gardiner-Garden and Frommer, 1987). Program za predikciju CpG ostrvaca (EMBOSS CpGplot softver) je identifikovao jedno CpG ostrvce u okviru *SOX18* promotora, dužine 239 bp u regionu od -300 do -61 u odnosu na ATG (Slika 7) (Petrovic and Stevanovic, 2007). U okviru tog regiona postoje predviđena mesta vezivanja za transkripcione faktore koji se vezuju za GC-bogate sekvence. Ranije je određeno da transkripcioni faktor iz Sp familije transkripcionih faktora ima ulogu u regulaciji aktivnosti *SOX18* promotora (Petrovic, 2005). Ova teza, između ostalog, predstavlja nastavak u istraživanju uloge različitih transkripcionih faktora koji učestvuju u regulaciji aktivnosti *SOX18* promotora, a posebna pažnja je posvećena GC-vezujućim transkripcionim faktorima.

## 1.6 Angiogeneza

Angiogeneza predstavlja fiziološki proces koji obuhvata nastajanje novih krvnih sudova od već postojećih i esencijalna je za embrionalni razvoj, formiranje organa, remodelovanje tkiva, zarastanje rana i reprodukciju (Folkman and Shing, 1992; Risau, 1997). Proces angiogeneze je regulisan veoma složenim međudejstvom faktora rasta, adhezionih molekula, morfogena i endogenih inhibitora, a promene u njihovom međusobnom odnosu dovode do premećaja u regulaciji angiogeneze i razvoja bolesti (Felmeden et al., 2003).

Endotelijalne ćelije imaju izvanrednu sposobnost da se brzo dele pod dejstvom različitih fizioloških stimulusa kao što su: hipoksija, inflamacija ili povreda tkiva. Upravo je to preduslov za angiogenezu (ili limfangiogenezu-stvaranje novih limfnih sudova), kada

fiziološki postoji potreba za tim procesima, kao kod zarastanja rana i reparacije tkiva. Međutim, kod mnogih bolesti, ti fiziološki stimulusi prelaze normalnu, potrebnu količinu, i dolazi do promene u odnosu između proangiogenetskih faktora i inhibitora. Posledica je patološka angiogeneza, kao kod malignih i zapaljenskih bolesti (Carmeliet, 2005a). Kod nekih drugih bolesti, kao što su ishemijske bolesti srca ili preeklampsija, angiogenetski „prekidač“ je isključen, dovodeći do malformacija krvnih sudova, onemogućene revaskularizacije i regeneracije.

Zbog svega navedenog, kontrola angiogeneze, bilo pozitivno ili negativno, se smatra dobrim pristupom za tretman različitih bolesti. Poslednjih decenija se ulažu veliki naponi u cilju razvijanja terapijskih pristupa koji će promovisati revaskularizaciju ishemičnih tkiva ili inhibirati angiogenezu kod tumora i različitih zapaljenskih bolesti.

### **1.6.1 Proangiogenetski faktori**

Brojni proangiogenetskih molekuli su identifikovani i njihova funkcija je opisana u regulaciji procesa angiogeneze. Među njima su različiti faktori rasta, kao što je faktor rasta vaskularnog endotela (eng. vascular endothelial growth factor-VEGF), faktor rasta poreklom od trombocita (eng. platelet derived growth factor-PDGF), faktor rasta poreklom od fibrocita (eng. fibroblast growth factor-FGF), transformišući faktor rasta (eng. transforming growth factor-TGF), angiopoetini kao i različiti adhezioni molekuli i citokini (Papetti and Herman, 2002; Presta et al., 2005). Takođe, mnogi drugi faktori utiču na proces angiogeneze, kao što su membranski proteini, međucelijske interakcije, interakcije ćelija sa proteinima matriksa (Papetti and Herman, 2002).

Među faktorima rasta, najvažniji molekul koji reguliše morfogenezu krvnih sudova je, svakako, faktor rasta vaskularnog endotela A (VEGFA), koji pripada većoj familiji proteina koji regulišu angiogenezu, a kojoj pripadaju faktor rasta placente (eng. placental growth factor-PlGF), VEGFB, VEGFC i VEGFD (Ferrara et al., 2003; Shibuya, 2006). VEGFA je neophodan za diferencijaciju endotelijalnih prekursorskih ćelija (EPCs; angioblasti), proliferaciju endotelijalnih ćelija (EC), direktno povezivanje endotelijalnih ćelija u vaskularne strukture (vaskularogeneza) i nastajanje novih krvnih sudova u procesu

angiogeneze. Pored VEGF, kiseli i bazni faktori rasta poreklom od fibroblasta (eng. acidic and basic fibroblast growth factors-aFGF i bFGF) predstavljaju mitogene važne za proces angiogeneze (Thomas, 1987). *In vitro*, i aFGF i bFGF indukuju mnoge procese u EC koji su bitni za proces angiogeneze, stimulišu EC proliferaciju (Gospodarowicz et al., 1989) i migraciju (Terranova et al., 1985). Dalje, za PDGF je pokazano da stimuliše angiogenezu *in vivo* (Risau et al., 1992; Oikawa et al., 1994). Pokazano je da PDGF utiče na regrutovanje pericita, ćelija koji okružuju endotel kapilarnih sudova u mozgu i koje su neophodne za stabilnost kapilarne mreže krvnih sudova (Oikawa et al., 1994). TGF- $\beta$  ima i pro- i anti- angiogenetsko dejstvo, ostvarujući ulogu delujući na endotelijalne ćelije, ali i na druge tipove ćelija. U malim dozama TGF- $\beta$  doprinosi angiogenezi pozitivno regulišući angiogenetske faktore i proteinaze, dok u visokim dozama, inhibira EC rast, a promovise remodelovanje bazalne membrane, diferencijaciju i regrutovanje glatko-mišićnih ćelija (Carmeliet, 2003).

Mnogi membranski proteini igraju važnu ulogu u angiogenezi. Integrini, efrini i kadherini, predstavljaju membranske proteine koji imaju ulogu u formiranju krvnih sudova, a među njima  $\alpha\beta 3$ -integrin, ephrin-2B, and VE-cadherin su važni za kontrolu procesa angiogeneze (Otrock et al., 2007).

Patološka angiogeneza, na primer tokom zarastanja rana, dešava se posle inflamatornog odgovora koji uključuje lučenje citokina, kao što je tumorski faktor nekroze (eng tumor necrosis factor-TNF). Aktivnost TNF-a u angiogenezi je dvostruka: *in vivo* uglavnom pokazuje proangiogenetsko dejstvo, a *in vitro* je antiangiogenetski (Frater-Schroder et al., 1987). Pokazano je, međutim, da dugoročno izlaganje uticaju TNF-a ima inhibitorni efekat i *in vivo* i *in vitro*, a da kratkoročno izlaganje od 2-3 dana stimuliše angiogenezu (Sainson et al., 2008). Naime, u angiogenezi, vremenski koordinisana ekspresija TNF-a je presudna za regulaciju ovog procesa. Inicijalno, TNF odlaže angiogenezu, blokirajući VEGFR2 receptor, ali potom, po prolasku inflamatornog odgovora, stimuliše širenje endotelijalnih ćelija (Sainson et al., 2008).

### 1.6.2 Antiangiogenetski faktori

Kao što je već napomenuto, angiogeneza predstavlja strogo regulisan proces koji kontrolišu pozitivni i negativni regulatorni faktori. Veliko interesovanje za vaskularnu biologiju i angiogenezu je u velikoj meri uzrokovano potrebom za pronalaženjem aktivnih supstanci koje bi mogle da se koriste u terapijske svrhe kod bolesti koje zavise od angiogeneze, kao što su kanceri i hronične inflamatorne bolesti (Folkman, 1995; Folkman, 2002). Identifikovano je više različitih inhibitora angiogeneze, a među njima su: trombospondin (DiPietro, 1997), endostatin (O'Reilly et al., 1997), tumstatin (Sund et al., 2005), vazostatin (Pike et al., 1998), vazohibin (Watanabe et al., 2004). Pored napomenutih, endogenih inhibitora angiogeneze, postoje i egzogeni, sintetski inhibitori koji se godinama testiraju u kliničkim studijama. Trenutno, najviše su razvijeni inhibitori VEGF signalnog puta, a bevacizumab, anti VEGFA antitelo, je jedini registrovani lek u terapiji kancera (Ferrara, 2004). Takođe, postoje brojni podaci o anti angiogenetskom dejstvu nesteroidnih antiinflamatornih lekova (eng. nonsteroidal antiinflammatory drugs-NSAID) i selektivnih COX-2 inhibitora (COXIB) (Gately, 2000; Monnier et al., 2005), koji blokirajući sintezu prostanglandina ostvaruju i svoje antiangiogenetsko delovanje inhibiranjem signalnih puteva koji taj proces kontrolišu (Monnier et al., 2005).



## 2. CILJ RADA

Uprkos činjenici da je *SOX18* gen uključen u regulaciju veoma važnih procesa tokom embrionalnog razvića, kao i u adultnom organizmu, malo se zna o regulaciji ekspresije ovog gena. Poslednjih godina velika pažnja je posvećena ulozi *SOX18* gena u regulaciji procesa angiogeneze, limfangiogeneze, kao i u metastatskom širenju tumora koji se oslanja na ova dva procesa (Young). Takođe, otkriveni su različiti *SOX18* tražet geni kod čoveka, miša i zebrice, a među identifikovanim genima se nalaze i geni uključeni u kontrolu procesa angiogeneze i limfangiogeneze. Već je napomenuto da je u dosadašnjem ispitivanju u našoj laboratoriji definisan promotor *SOX18* gena, kao i minimalni promotor, te da je analiza promotora ukazala da se radi GC-bogatoj sekvenci bez karakterističnih promotorskih elemenata kao što je TATA boks.

Predmet ovog rada je rasvetljavanje mehanizama transkripcione regulacije ekspresije humanog *SOX18* gena, a posebna pažnja je posvećena vezi sa procesom angiogeneze u čijoj regulaciji *SOX18* gen učestvuje.

U istraživanjima koja su predstavljena u ovoj tezi postavljeni su sledeći osnovni ciljevi:

I) Identifikacija transkripcionih faktora koji učestvuju u regulaciju aktivnosti *SOX18* gena u endotelijalnim ćelijama i ćelijama kancera, a koja je uključivala:

Ia) *In silico* analizu *SOX18* promotora u cilju identifikacije potencijalnih vezivnih mesta za transkripcione faktore.

Ib) Ispitivanje vezivanja transkripcionih faktora za potencijalna vezivna mesta *in vitro*.

Ic) Funkcionalnu analizu odabranih transkripcionih faktora.

II) Ispitivanje uloge proangiogenetskih faktora i farmakoloških inhibitora angiogeneze na *SOX18* ekspresiju u endotelijalnim ćelijama, koje je obuhvatalo:

IIa) Ispitivanje uloge angiogenetskih faktora rasta, ekstraćelijskih proteina matriksa i citokina na nivo *SOX18* proteina u primarnim endotelijalnim ćelijama.

IIb) Ispitivanje uloge nesteroidnih antiinflamatornih lekova, koji predstavljaju farmakološke inhibitore angiogeneze, na nivo SOX18 proteina u primarnim endotelijalnim ćelijama.

### 3. MATERIJAL I METODE

#### 3.1 Eksperimentalni materijal

##### 3.1.1 Bakterijski sojevi korišćeni u radu

Soj	Karakteristike -genotip	Referenca
XL1Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F' <i>proAB lacI<sup>q</sup>ZDM15 Tn10</i> (Tet <sup>r</sup> )]	Stratagene®
BL21(DE3)pLysS	F <sup>-</sup> <i>ompT gal dcm lon hsdS<sub>B</sub>(r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>) λ(DE3) pLysS(cm<sup>R</sup>)</i>	Stratagene®

##### 3.1.2 Vektori korišćeni u radu

Plazmid	Veličina	Karakteristike	Referenca
pBLCAT6	4.25 kb	Vektor za analizu promotora u ćelijama sisara, koji poseduje reporterski gen za hloramfenikol-acetiltransferazu (CAT)	(Boshart et al., 1992)
pBS II KS+	2.96 kb	Prokariotski fagemidni vektor sa <i>amp</i> rezistencijom	Stratagen®
pcDNA3.1	5.4 kb	Eukariotski ekspresioni vektor koji poseduje <i>amp</i> i <i>neo</i> rezistenciju	Invitrogen®
pCH110	7.1 kb	Eukariotski vektor koji eksprimira β-galaktosidazu i služi za normalizaciju ekspresije	Am.Pharmacia Biotech®

## 3.1.3 Plazmidni konstrukti korišćeni u radu

Plazmid	Veličina	Karakteristike	Referenca
892pCAT6	5.1 kb	Sadrži 892 bp 5' regulatornog regiona <i>SOX18</i> gena	(Petrovic and Stevanovic, 2007)
255pCAT6	4.5 kb	Sadrži 255 bp 5' regulatornog regiona <i>SOX18</i> gena	(Petrovic et al., 2010)
255mutCAT6	4.5 kb	Sadrži 255 bp 5' regulatornog regiona <i>SOX18</i> gena sa tačkastim mutacijama u EGR1 vezivnim mestima	(Petrovic et al., 2010)
YA13	6.0 kb	Eukariotski ekspresioni vektor; korišćen za ekspresiju NF-YA proteina	Poklon od prof. Roberto Mantovani, Department of Biomolecular Science and Biotechnology, University of Milano
pcDNA3.1-EGR1	6.8 kb	Eukariotski ekspresioni vektor; korišćen za ekspresiju EGR1 proteina	Poklon od prof Abdulkadir Sarki A., Department of Pathology, University of Alabama
pN3-Sp3FL	6.8 kb	Eukariotski ekspresioni vektor; korišćen za ekspresiju Sp3 proteina	Poklon od prof. Guntram Suske, Institut für Molecularbiologie und Tumorforschung, Marburg, Germany
pcDNA3 ZBP-89	8.1 kb	Eukariotski ekspresioni vektor; korišćen za ekspresiju ZBP-89 proteina	Poklon prof. Juanite Merchant, Division of Gastroenterology, University of Michigan Health System

pGEX-KG-ZBP-89	8.5 kb	Prokariotski ekspresioni vektor; korišćen za ekspresiju ZBP-89 proteina vezanog za glutation S transferazu (GST-ZBP-89)	Poklon prof. Juanite Merchant, Division of Gastroenterology, University of Michigan Health System, (Merchant et al., 1996)
----------------	--------	---	--

### 3.1.4 Ćelijske linije korišćene u radu

U ovom radu je korišćena permanentna ćelijska linija HeLa poreklom iz humanog adenokarcinoma cerviksa koja je komercijalno dostupna (American Type Culture collection, Manassas, VA 20108, USA - ATCC br. CCL2). HeLa ćelije su gajene u standardnim uslovima, u DMEM-u sa niskim sadržajem glukoze, 10% FBS-a i 1x neesencijalnim aminokiselinama (Gibco BRL) na 37°C i 10% CO<sub>2</sub>. Potom, korišćene su primarne HUVEC (eng. human umbilical vein endothelial cells) ćelije poreklom od endotela humane umbiliklane vene, koje su komercijalno dostupne (American Type Culture collection, Manassas, VA 20108, USA - ATCC br CRL-1730). HUVEC ćelije su gajene u M199 bazalnom medijumu (Invitrogen, Carlsbad, CA), sa 12 µg/ml BBE (eng. bovine brain extract) (Clonetics, Walkersville, MA), 10 ng/ml humanog rekombinantnog EGF (eng. epidermal growth factor) (Genzyme, Cambridge, MA), 25 U/ml heparina, i 1 µg/ml hidrokortizona (Sigma Aldrich, St Louis, MO). Takođe, korišćena je hibridoma ćelijska linija EA.hy926 koja je nastala fuzijom permanentne adenokarcinoma ćelijske linije i primarnih HUVEC ćelija (*Edgell et al., 1983*). EA.hy926 ćelije su gajene u DMEM-u sa visokim sadržajem glukoze, 10% FBS-a i 8x hypoxanthine/aminopterin/thymidine (HAT suplement) (Gibco BRL) na 37°C u 5% CO<sub>2</sub>.

### 3.1.5 Antitela korišćena u radu

U „superšift“ eksperimentima korišćena su sledeća antitela:

- na Sp3 protein (sc-644, Santa Cruz Biotechnology)
- na ZBP-89 protein (sc-19408, Santa Cruz Biotechnology)
- na NF-Y protein, subjedinicu B (sc-7711, Santa Cruz Biotechnology)
- na EGR1 protein (#4154, Cell Signaling Technology)

U “Western blot” eksperimentima korišćena su sledeća primarna antitela:

- na SOX18 protein (sc-20100, Santa Cruz Biotechnology)
- na  $\alpha$ -tubulin (CP06, Calbiochem)
- na  $\beta$ -aktin (A3853, Sigma)

### 3.1.6 Oligonukleotidi korišćeni u radu

Oligonukleotidi u ovom radu su korišćeni za potrebe RT-PCR-a, qRT-PCR-a i generisanje oligonukleotidnih proba za EMSA eksperimente.

Prajmeri korišćeni za RT-PCR i qRT-PCR su:

SOX18F: 5' TTCCATGTCACAGCCCCCTAG 3'

SOX18R: 5' GACACGTGGGAACTCCAG3'

GAPDHF: 5' GGACCTGACCTGCCGTCTAG 3'

GAPDHR: 5' CCACCACCCTGTTGCTGTAG 3'

Prajmeri korišćeni za generisanje oligonukleotidnih proba za EMSA eseje su:

EGR proba IF: 5' CAAGGGCCCTTGGGGGGCAGGGAGGACG 3'

EGR proba IR: 5' GGCGTCCTCCCTGCCCCCAAGGGCCCTTG3'

EGR proba IIF: 5' GAGCCTCCCAGCGGGGGGCGGGGAACGGCAA 3'

EGR proba IIR: 5' GGTTGCCGTTCCCCGCCCCCGCTGGGAGGCTC 3'

EGR proba IIIF: 5' GGGGGAGGTGGGGGGGCTGTGCGCGGGGGAGG 3'

EGR proba IIIR: 5' CCTCCCCGCGCACAGCCCCCCCACCTCCC3'

EGR proba IVF: 5' GACCCGCCCCCGCCCGCCCGCCCGCCGCGATTGG 3'

EGR proba IVR: 5' AGGGCCAATCGGCGGCGGGGCGGGGCGGGGCGGGGCGGGGTC3'

KonsenzusEGR1F: 5' GGATCCAGCGGGGGCGAGCGGGGGCGA 3'

KonsenzusEGR1R: 5' GGTCGCCCCGCTCGCCCCCGCTGGATCC 3'

### 3.1.7 Komercijalni kitovi

Plazmidna DNK je izolovana i prečišćena upotrebom "Endofree plasmid Maxi Kit"-a (Qiagen). Totalna RNK iz HeLa i EAhy926 ćelija je izolovana korišćenjem kita "TRI-Reagent" (Ambion). Za sintezu cDNK je korišćena MuLV reverzna transkriptaza (Applied Biosystems). RT-PCR je urađen pomoću "KAPA 2G Fast HotStart Ready mix" PCR kita (Biosystems). Kvantitativni, qRT-PCR je rađen pomoću „Power SYBR Green PCR master mix“ reagensa (Applied Biosystems). Tranzijentne transfekcije EA.hy926 ćelija su rađene reagensom „LIPOFECTAMINE“ (Invitrogen). Merenje  $\beta$ -gal aktivnosti je rađeno pomoću "β-galactosidase Enzyme Assay System" (Promega). CAT aktivnost je određena "CAT ELISA" kitom, (Roche Pharmaceuticals).

### 3.1.8 Farmakološki agensi

U cilju promovisanja procesa angiogeneze korišćeni su proangiogenetski molekuli za tretman HUVEC ćelija u sledećim koncentracijama:

Faktori rasta: VEGF (100 ng/ml); bFGF (5 ng/ml ) i TGF- $\beta$  (20 ng/ml ).

Ekstraćelijski proteini matriksa: kolagen I (10  $\mu$ g/ml) i fibronektin (3  $\mu$ g/ml).

Citokini: TNF (200 ng/ml).

U cilju inhibicije angiogeneze, korišćeni su nesteroidni antiinflamatorni lekovi u sledećim koncentracijama:

NSAID: ibuprofen (10  $\mu$ M) i NS398 (50  $\mu$ M).

### 3.1.9 Kompjuterski programi

Pretraživanje baze podataka i poređenje nukleotidnih sekvenci je urađeno pomoću NCBI (eng. National Center for Biotechnology Information) i ClustalW softvera (EMBL-EBI). Pretraživanje potencijalnih mesta za vezivanje transkripcionih faktora je urađeno pomoću MatInspector softvera (Genomatix), a uslov za pretraživanje je bio da verovatnoća vezivanja transkripcionog faktora za jezgro vezivnog mesta bude jednaka 1. Analiza prisustva CpG ostrva je urađena pomoću EMBOSS CpGplot programa. Imunoreaktivni signali detektovani primenom Western blot metode su digitalizovani i kvantifikovani pomoću ImageQuant Version 5.2 kompjuterskog programa.

## 3.2 Eksperimentalne metode

### 3.2.1 *In silico* analiza humanog *SOX18* promotorskog regiona i poređenje sa ortologom sekvencom miša

Sekvenca humanog *SOX18* promotorskog regiona je ekstrahovana iz genomske sekvence NT\_011333.5- klon AL355803, objavljene na NCBI i poređena je sa ortologom sekvencom miša, koja je takođe ekstrahovana iz genomske sekvence NT\_039212.5. Međusobno poređenje ovih sekvenci je urađeno pomoću GlustalW programa.

MatInspector program je korišćen za identifikaciju potencijalnih mesta za vezivanje poznatih transkripcionih faktora u okviru optimalnih promotora *SOX18* ortologa čoveka i miša. Prilikom ove analize korišćeni su sledeći kriterijumi: verovatnoća vezivanja za jezgro konsenzusne sekvence vezivnog mesta (core similarity)-1.0, a odgovarajući kontekst nukleotida u sekvencama koje okružuju vezivno mesto (matrix similarity)-optimizovan.



### 3.2.2 Generisanje mutiranog promotorskog konstrukt 255mutCAT6

DNK fragment dužine 255 bp sa tačkastim mutacijama u tri ponovljena EGR1 vezivna mesta (od -20 do -7 u odnosu na start transkripcije), koji predstavlja mutirani analog minimalnog promotorskog regiona humanog *SOX18* gena (od -89 do +166), je komercijalno sintetisan i kloniran u pUC57 vektor (GeneScript Corporation). Potom je, za potrebe tranzijentnih transfekcija, subkloniran u pBLCAT6 vektor u *HindIII/BamHI* mesta.

### 3.2.3 Izolacija plazmidne DNK “Qiagen EndoFree® Plasmid” kitom

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

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

Prilikom izolacije plazmidne DNK pomenutim kitom, strogo su poštovana uputstva proizvođača. U radu je korišćen “EndoFree Maxi Kit“. Plazmidni izolat je čuvan na -20°C do upotrebe u eksperimentima tranzijentne transfekcije.

### 3.2.4 Tranzijentna transfekcija HeLa ćelija kalcijum fosfatnom precipitacijom

U eksperimentima tranzijentne transfekcije po  $1.1 \times 10^6$  ćelija je zasejavano u dve Petri šolje prečnika 10 cm. Nakon 24 h rasta, ćelije su prane dva puta HEPES rastvorom (6.7 mM KCl, 142 mM NaCl, 10mM HEPES) i gajene još 2h u svežem medijumu.

Po isteku ovog vremena na ćelije je dodat kalcijum-fosfatni precipitat DNK koji je napravljen na sledeći način. Rastvoru DNK u 1 ml 2 x HEBS rastvora (HEPES buffered saline; 274 mM NaCl, 42 mM HEPES, 9.6 mM KCl, 1.5 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ; pH 7.15 - 7.30), koji je neprekidno aerisan, nakapavanjem je dodavan 1 ml 250 mM rastvora  $\text{CaCl}_2$ . Ovako formiran kalcijum-fosfatni precipitat dodavan je na ćelije i inkubiran 5-6 h u standardnim uslovima za gajenje HeLa ćelija. Nakon inkubacije precipitati su uklonjeni sa ćelija pranjem 2 puta rastvorom HEPES-a i dodavan je svež medijum za gajenje HeLa ćelija. Po isteku 48 h od uklanjanja precipitata pravljeni su ćelijski ekstrakti.

U eksperimentima tranzijentne transfekcije promotor-zavisnim reporterskim konstruktima HeLa ćelije su transfektovane sa 10  $\mu\text{g}$  892pCAT6 ili 255pCAT6 (ili 255mutCAT6), 4  $\mu\text{g}$  pBS II KS+ i 3  $\mu\text{g}$  pCH110 vektora (Amersham Pharmacia). U eksperimentima kotransfekcija HeLa ćelije su transfektovane sa 10  $\mu\text{g}$  892pCAT6 ili 255pCAT6 konstrukta i 2  $\mu\text{g}$  ili praznog vektora (pcDNA3) ili odgovajućim ekspresionim vektorom, zajedno sa 4  $\mu\text{g}$  pBS II KS+ i 3  $\mu\text{g}$  pCH110 vektora.

### 3.2.5 Tranzijentna transfekcija EA.hy926 ćelija LIPOFEKTAMINE reagensom

Dan pre transfekcije  $2 \times 10^6$  EA.hy926 ćelija je sađeno u 60mm Petri šolji. Sutradan je promenjen medijum i ćelijama je dodat medijum bez seruma. Transfekcija je rađena u minimalnom OPTI-MEM (Invitrogen) medijumu u odsustvu seruma. U svakoj transfekciji ćelije su transfektovane sa 4  $\mu\text{g}$  892pCAT6 ili 255pCAT6 (ili 255mutCAT6), 0.8  $\mu\text{g}$  pBS II KS+ i 1.2  $\mu\text{g}$  pCH110 vektora, odnosno u eksperimentima kotransfekcija je dodavano 0.8  $\mu\text{g}$  odgovarajućeg ekspresionog vektora umesto pBS II KS+. Ukupno 6  $\mu\text{g}$  DNK je rastvoreno u 500  $\mu\text{l}$  OPTI-MEM-a, takođe 16  $\mu\text{l}$  LIPOFEKTAMINE reagensa je rastvoreno u 500  $\mu\text{l}$  OPTI-MEM-a. Potom su ti sadržaji spojeni i inkubirani 30 minuta. Pošto su se

formirali kompleksi, u ukupnom volumenu od 1 ml za svaku pojedinačnu transfekciju, kompleksi su sipani na ćelije i ćelije su inkubirane 2.5 h. Nakon tog vremena, ćelije su ispirane 1 x PBS rastvorom, i dodavan im je svež, kompletan medijum koji se koristi za gajenje EA.hy926 ćelija. 48 sati nakon transfekcije izolovani su ćelijski ekstrakti.

### 3.2.6 Priprema ćelijskih ekstrakata

Ćelijski ekstrakti su pripremani 48 h nakon transfekcije. Ćelije su oprane hladnim PBS-om, struganjem odvojene od podloge u 1 ml TEN rastvora (Tris-EDTA-NaCl; 40 mM Tris-HCl pH 7.4, 1 mM EDTA, 150 mM NaCl) i istaložene centrifugiranjem na 13000 rpm, 2 min na +4°C. Talog ćelija je resuspendovan u 100 µl 0.25 M Tris-HCl (pH 7.8 na 37°C). Liza ćelija je urađena kroz tri ciklusa zamrzavanja i odmrzavanja (3 min u tečnom azotu praćeno inkubacijom na 37°C do otapanja ćelijskih taloga). Ćelijski talog je uklonjen centrifugiranjem na 13200 rpm, 10 min na +4°C, a supernatant (ćelijski ekstrakt) je korišćen u β-galaktozidaznom i CAT eseju.

### 3.2.7 β-galaktozidazni esej

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

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

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

### 3.2.8 CAT esej

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

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

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

Absorbanca je merena na Microplate reader aparatu tipa Multiskan RC (Labsystems) na talasnim dužinama 405/492 nm. Kao standardi za određivanje aktivnosti CAT-a u ispitivanim ćelijskim lizatima (za konstrukciju standardne kalibracione krive) korišćena su sledeća razblaženja CAT enzima *E. coli*: 3,125 pg, 6,25 pg, 12,5 pg, 25 pg, 50 pg, 100 pg, 200 pg. Vrednosti dobijenih CAT aktivnosti normalizovane su prema efikasnosti transfekcije, odnosno prema izmerenoj  $\beta$ -gal aktivnosti za dati uzorak.

### 3.2.9 Izolovanje jedarnih proteina iz HeLa i EAhy926 ćelija

Jedarni proteini iz HeLa i EA.hy926 ćelija su izolovani po modifikovanoj proceduri *Dignama* i saradnika (Dignam et al., 1983). HeLa i EA.hy926 ćelije su gajene da dostignu broj od  $1 \times 10^9$  ćelija. Ćelije su sakupljene i, posle taloženja i pranja u PBS-u, resuspendovane u puferu A (0.25 M saharoza, 10 mM HEPES pH 7.9, 10 mM KCl, 1.5 mM  $MgCl_2$ , 0.2 mM EDTA) i inkubirane 10 minuta na ledu. Od ovog koraka, ostatak procedure je rađen na ledu u hladnoj sobi (+4°C). Nakon taloženja centrifugiranjem (1300 rpm, 5 min) ćelije su resuspendovane u 2 volumena pufera A. Ćelije su lizirane homogenizacijom u staklenom homogenizeru uz dodavanje NP-40 (0.05%). Jedra su staložena centrifugiranjem (2000 rpm, 10 minuta, +4°C) i zatim resuspendovana i homogenizovana u puferu C (20 mM HEPES pH 7.9, 25% glicerol, 0.42 M NaCl, 1.5 mM  $MgCl_2$ , 0.2 mM EDTA). Nakon mešanja 30 min na +4°C suspenzija je centrifugirana (20000 rpm, 30 min, +4°C). Supernatant je dijaliziran u puferu D (20 mM HEPES pH 7.9, 20% glicerol, 0.1 M KCl, 0.2 mM EDTA) 4-5 h na +4°C. Nakon dijalize rastvor je centrifugiran (20,000 rpm, 20 min, +4°C). Dobijeni supernatant koji sadrži jedarne proteine je odvojen u nove epruvete i čuvan u tečnom azotu. Puferi A i C sadrže inhibitore proteaza u sledećim koncentracijama: 0.5 mM DTT, 0.5 mM PMSF, 1 µg/ml leupeptina, 1 µg/ml pepstatina i 1 µg/ml antipaina, a pufer D 0.5 mM DTT i 0.5 mM PMSF.

### 3.2.10 Izolovanje bakterijski eksprimiranih rekombinantnih proteina

Rekombinantni GST-ZBP-89 protein je eksprimiran u BL21(DE3) pLysS bakterijskom soju. Protein ima za sebe vezanu glutathion S transferazu (GST). Urađena je 2% inokulacija transformisanih bakterija iz prekonoćne kulture. Bakterije su gajene na 25°C do postizanja  $OD_{600} = 0.4$ . Tada su indukovane 0.4 mM IPTG-om u trajanju od 1 h na 25°C. Dalja izolacija i prečišćavanje rekombinantnih proteina je urađena po proceduri proizvođača Glutathione-S-transferase (GST) Gene Fusion System i Glutathione Sepharose<sup>®</sup> 4B (Amersham Pharmacia Biotech).

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

Dvolančane probe su generisane reakcijama hibridizacije komplementarnih F i R oligonukleotida (2 nmol svakog oligonukleotida) u 1 x STE puferu (0.1 M NaCl, 10 mM Tris-Cl pH 8.0, 1 mM EDTA pH 8.0) nakon 10 min denaturacije na 98°C i postepenog hlađenja do sobne temperature. Dvolančane oligonukleotidne probe su istaložene etanolnom precipitacijom.

R ili F oligonukleotidi su dizajnirani tako da sadrže 1-3 nesparena guanozina na 5' kraju (izuzev NF-Y probe) koji obezbeđuju obeležavanje probe ugrađivanjem [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] dCTP-a na komplementarnom lancu u reakciji sa Klenow-im fragmentom. Reakcija obeležavanja je sadržala: 50 ng oligonukleotida, 0.5  $\mu$ l 40 mM dNTPmix, 2  $\mu$ l *Eco*Pol pufera (10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 7.5 mM DTT), 1  $\mu$ l Klenow fragmenta DNK polimeraze (New England Biolabs) (5U) i ddH<sub>2</sub>O do 20  $\mu$ l. Nakon inkubacije od 60 min na 37°C i dodavanja 30  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O, reakcija je propuštena kroz G-50 kolonu (Amersham Pharmacia Biotech).

EMSA reakcije su rađene sa 2.5  $\mu$ g jedarnih proteina iz HeLa, odnosno EA.hy926 ćelija i 1 ng obeležene probe, u reakcionom puferu koji sadrži 10 mM HEPES pH 7.9, 15 mM KCl, 0.25 mM ZnSO<sub>4</sub>, 0.25 mM EDTA, 3% glicerol, 0.25mM DTT i 50 ng/ $\mu$ l poly (dI-dC) u volumenu od 20  $\mu$ l, 30 minuta na 37°C. Za kompeticiju ("hlađenje") su korišćeni neobeleženi oligonukleotidi u molarnom višku od 100 puta. U esejima smanjene elektroforetske pokretljivosti u prisustvu antitela ("superšift") proteini su, pre dodavanja DNK probe, inkubirani sa antitelima na ZBP-89 I EGR1 30 minuta na +37°C, odnosno 30 minuta na +4°C a sa antitelima na NF-Y. Sp3 antitela su dodavana u reakciju pošto su formirani protein-DNK kompleksi i inkubirana 30 minuta na +37°C.

Reakcije su elektroforetski razdvajane u 6% nativnom poliakrilamidnom gelu sa 0.5 X TBE puferom (Tris-borat-EDTA; 45 mM Tris-borat, 1 mM Na<sub>2</sub>-EDTA).

### 3.2.12 Izolacija ukupnih ćelijskih proteina iz HeLa, EA.hy926 i HUVEC ćelija

Nakon transfekcije HeLa i EA.hy926 ćelija sa ekspresionim vektorima za transkripcione faktore Sp3, ZBP-89, NF-Y i EGR1, odnosno nakon tretmana HUVEC ćelija sa različitim proangiogenetskim agensima ili farmakološkim inhibitorima angiogeneze, izolovani su ukupni ćelijski proteini koji su potom korišćeni u „Western blot“ eseju.

Proteini su izolovani iz približno  $1 \times 10^7$  HeLa i EA.hy926 ćelija koje su transfektovane sa 4  $\mu\text{g}$  pojedinačnog ekspresionog vektora, odnosno iz HUVEC ćelija posle odgovarajućeg tretmana.

HeLa i EA.hy926 ćelije su sakupljene tripsinizacijom, isprane dva puta u 1 x PBS-u i lizirane u puferu koji sadži 50 mM Tris Cl pH 8.0, 150 mM NaCl, 1% NP40, 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  PMSF, 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  aprotinin, 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  leupeptin i 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  pepstatin A. Posle centrifugiranja pokupljeni su ukupni ćelijski proteini koji su u supernatantu i čuvani su na  $-80^\circ\text{C}$ .

HUVEC ćelije su isprane dva puta u 1 x PBS-u i sakupljene mehanički u RIPA puferu za lizu koji sadži 25 mM Tris HCl pH7.6, 150 mM NaCl, 1% NP40, 1% natrijum deoksiholat i 0.1% SDS. Posle centrifugiranja pokupljeni su ukupni ćelijski proteini koji su u supernatantu i čuvani su na  $-80^\circ\text{C}$ .

### 3.2.13 Imunološka detekcija protein (eng. Western blot)

Uzorci ukupnih ćelijskih proteina (30  $\mu\text{g}$ ) su razdvajani na 12% SDS-PAGE i elektrotransferom prebačeni na nitroceluloznu membranu. Posle blokade u 5% nemasnom mleku, preko noći na  $+4^\circ\text{C}$ , membrane su inkubirane sa primarnim antitelima na SOX18,  $\alpha$ -tubulin ili  $\beta$ -aktin protein, 1 h na sobnoj temperaturi. Membrane su zatim inkubirane sa odgovarajućim HRP-konjugovanim sekundarnim antitelima 1h na sobnoj temperaturi, a imunoblotovi su vizuelizovani ECL sistemom (Amersham Pharmacia Biotech) i SuperSignal West Femto Trial Kit (Pierce). Kvantifikacija rezultata dobijenih Western blot analizom vršena je u programu ImageQuant Version 5.2, a statistička obrada uz pomoć Student *t* testa.

### 3.2.14 Izolacija RNK

Za potrebe RT-PCR metode i kvantitativnog qRT-PCR-a, RNK je izolovana iz 1 petri šolje konfluentnih HeLa, Eahy926 ili HUVEC ćelija u prisustvu TRI reagent® (Ambion) prema uputstvu proizvođača. TRI Reagent je rastvor fenola i guanin-izotiocijanata koji efikasno izoluje ukupnu RNK iz ćelija. Nakon dodavanja 1ml reagensa u petri šolju, lizati su pokupljeni i prebačeni u ependorficu. Zatim je na svaki ml korišćenog reagensa dodato 200µl hloroforma i centrifugirano 15min na +4°C/12000g. Dodavanjem hloroforma i centrifugiranjem izdvaja se vodena faza od organske faze u kojoj se nalazi RNK. Nakon odvajanja vodene faze RNK se precipitira izopropanolom (500µl izopropanola na 1ml korišćenog reagensa, zatim centrifugira 10 min na +4°C/12000g. Dobijeni talog RNK je u završnoj fazi opran 75% etanolom, kratko osušen na sobnoj temperaturi, rastvoren u 75 µl DEPC tretirane bidestilovane vode i inkubiran 10 minuta na 55 °C kako bi se RNK dobro rastvorila. Kvalitet ovako dobijene RNK je proveren na agaroznom gelu, a spektrofotometrijski je određena koncentracija. Ovako dobijen uzorak je zatim čuvan na -80°C do korišćenja.

### 3.2.15 Reverzna transkripcija

Reverzna transkripcija na dobijenoj RNK urađena je u prisustvu MuLV reverzne transkriptaze (Applied Biosystems) koja koristi jednolančanu RNK matricu za sintezu cDNK. U prisustvu 2.5 µM prajmera (Random hexamers, Applied Biosystems), 2.5U MuLV reverzne transkriptaze, 10U RNaznog inhibitora, 4mM dNTPmixa (svaki 1mM), 1x pufera i 5mM MgCl<sub>2</sub>, 1µg ukupne RNK je preveden u cDNK, inkubacijom 10min na sobnoj temperaturi a zatim u PCR aparatu, 15 min na 42°C, 5 min na 99°C i 5min na 5°C. Ovako sintetisanoj cDNK određena je koncentracija na nano-drop apartu (Pharmacia) a zatim je čuvana na -20°C do korišćenja.



### 3.2.12 RT-PCR

Dobijena cDNK korišćena je kao matrica u semi-kvantitativnoj PCR reakciji za umnožavanje SOX18 sekvence, uporedo sa kontrolnom GAPDH. Korišćen je "KAPA 2G Fast HotStart Ready mix" 2x (Biosystems), i 100ng cDNK kao matrica.

Profil PCR reakcije bio je:

1. Početna denaturacija 98<sup>0</sup>C 5 min, 95<sup>0</sup>C 1 min
2. 40 ciklusa umnožavanja:
  1. denaturacija 96<sup>0</sup>C 30sec
  2. sparivanje prajmera 57<sup>0</sup>C 30sec
  3. polimerizacija 72<sup>0</sup>C 30sec
  3. završna sinteza 72<sup>0</sup>C 7min

Produkti PCR reakcija razdvajani su na 2% agaroznom gelu.

### 3.2.12 Kvantitativni-RT-PCR (q RT-PCR)

Totalna RNK je izolovana iz HeLa i EA.hy926 ćelija, lažno transfektovanih, odnosno transfektovanih sa određenim ekspresionim vektorom i konvertovana reverznom transkripcijom u cDNK. cDNK je korišćena kao matrica za qRT-PCR koji je rađen sa „Power SYBR Green PCR master mix“-om u ukupnom volumenu od 20 µl u aparatu 7500 Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems). Svaka PCR reakcija je rađena u triplikatu i uzimana je u obzir srednja vrednost za svaki uzorak. Relativni nivo *SOX18* ekspresije je određen pomoću komparativnog algoritma za kvantifikaciju, gde je  $\Delta\Delta C_t$  vrednost inkorporisana u formulu  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  čime se dobija stepen razlike u ekspresiji između dva uzorka. Relativna ekspresija *SOX18* gena je predstavljena kao procenat u odnosu na *SOX18* ekspresiju u lažno transfektovanim ćelijama, kome je dodeljena vrednost 100%, a statistička obrada je urađena uz pomoć Student *t* testa.

## 4. REZULTATI

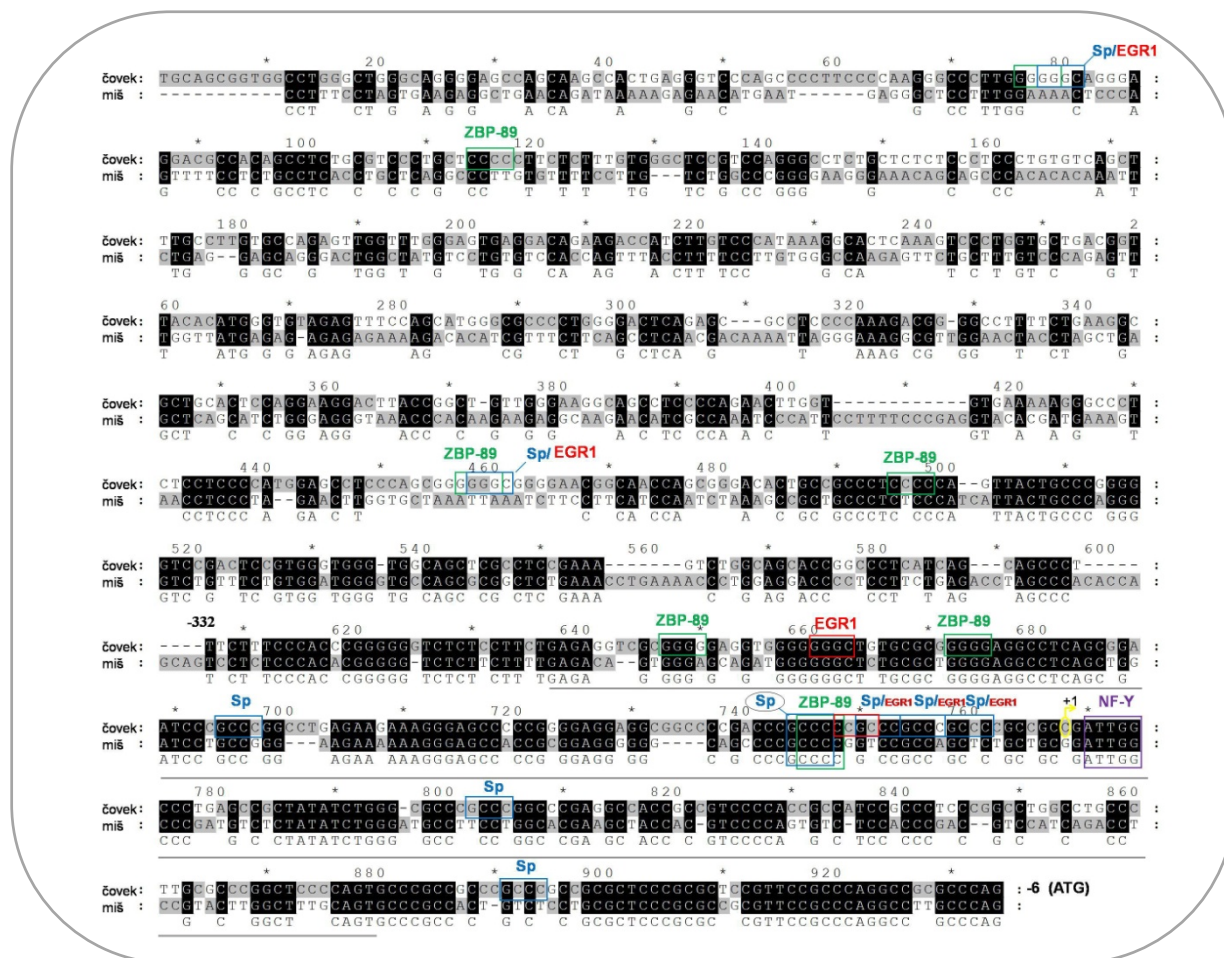
### 4.1. *In silico* analiza promotorskog regiona *SOX18* gena i poređenje sa ortologom sekvencom kod miša

Osnovni cilj istraživanja u ovom radu predstavlja ispitivanje transkripcione regulacije humanog *SOX18* gena. Prvi korak je bila kompjuterska analiza promotorskog regiona, uključujući analizu strukture promotora i potencijalnih vezivnih mesta za transkripcione faktore (TF), kao i poređenje sa ortologom promotorskom sekvencom kod miša. Ranije je napomenuto da je promotor *SOX18* gena bez TATA boksa, a literaturni podaci govore da se u takvim slučajevima često radi o GC-bogatim sekvencama gde ulogu u regulaciji transkripcije gena imaju transkripcioni faktori koji se vezuju za GC-bogate sekvence (Deaton and Bird, 2011). Promotorski region *SOX18* gene jeste GC-bogat, a program za predikciju CpG ostrvaca (EMBOSS CpGplot softver) je identifikovao jedno CpG ostrvce u okviru *SOX18* promotora, dužine 239 bp u regionu od -300 do -61 u odnosu na ATG, što je predstavljeno na Slici 8 (isprekidanom linijom ispod sekvence).

MatInspector, program za predikciju vezivnih mesta za transkripcione faktore, je u uslovima koji su definisani u odeljku Materijal i metode, identifikovao veliki broj potencijalnih vezivnih mesta kako za opšte, tako i za specifične transkripcione faktore. Među brojnim predviđenim mestima nalaze se vezivna mesta za transkripcione faktore iz Sp, EGR, ETS i Gli proteinskih familija kao i transkripcione faktore ZBP-89, CREB, NF-Y, Ap2 i druge. Na Slici 8 su u okviru nukleotidne sekvence ucrtana potencijalna vezivna mesta za transkripcione faktore iz Sp proteinske familije, ZBP-89, EGR1 i NF-Y.

Uporedo sa ovom analizom, promotorski region humanog *SOX18* gena upoređen je sa ortologom sekvencom kod miša. Ovo poređenje je pokazalo da homologija između nukleotidnih sekvenci *SOX18* promotora čoveka i miša nije visoka i iznosi 35% (Clustal W). Ipak, izvesna potencijalna vezivna mesta za određene transkripcione faktore su pokazala očuvanost u sekvenci i poziciji. To su vezivna mesta za transkripcione faktore

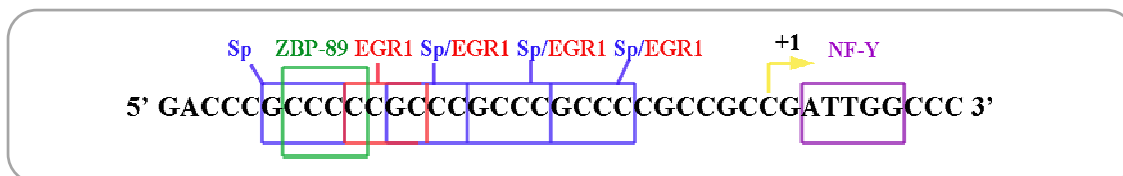
NF-Y, ZBP-89, kao i transkripcione faktore iz Sp i EGR proteinskih familija čija se vezivna mesta i preklapaju.



**Slika 8.** Nukleotidna sekvenca promotorskog regiona humanog *SOX18* gena i poređenje sa ortologom sekvencom kod miša. Start transkripcije gena označen je sa +1. Zasenčeni delovi sekvenci pokazuju nukleotidnu identičnost. Pozicije vezivnih mesta za transkripcijske faktore koji su očuvani kod čoveka i miša su označene pravugaonicima koji uokviruju obe sekvence. Pozicije ostalih vezivnih mesta označene su pravougaonicima koji uokviruju samo sekvencu čoveka. Imena transkripcionih faktora su obeležena iznad sekvence. CpG ostrvo je podvučeno.

Evolutivna očuvanost vezivnih mesta za transkripcijske faktore ukazuje na njihov potencijalni funkcionalni značaj u regulaciji ekspresije analiziranog gena. Na osnovu dobijenih rezultata, dalji cilj je bio detaljno ispitivanje uloge Sp, ZBP-89, NF-Y i EGR1

transkripcionih faktora u transkripcionoj regulaciji *SOX18* gena. Na Slici 9 je shematski predstavljen deo sekvence u okviru koje se nalaze potencijalna vezivna mesta za pomenute transkripcione faktore, a data sekvenca predstavlja DNK probu koja je potom korišćena u esejima smanjene elektroforetske pokretljivosti (EMSA).



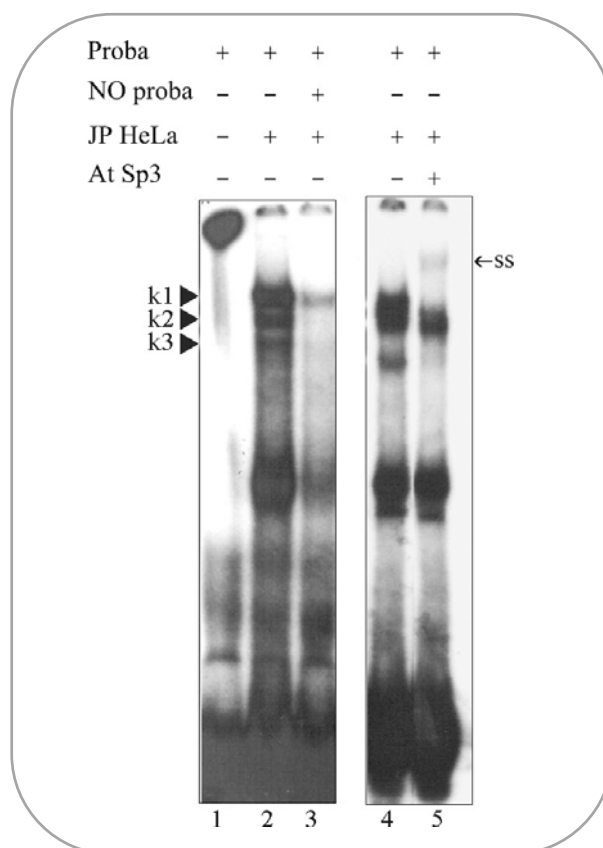
**Slika 9.** Shematski prikaz *SOX18* DNK probe I (pozicija od -29 do +10 u odnosu na start transkripcije gena) korišćene u EMSA esejima sa potencijalnim vezivnim mestima za transkripcione faktore koji su očuvani kod čoveka i miša.

#### 4.2. Uloga transkripcionog faktora Sp3 u regulaciji transkripcije *SOX18* gena

Kao što je predstavljeno na slici 8, potencijalna vezivna mesta za proteine iz Sp familije transkripcionih faktora su prisutna duž celog promotorskog regiona *SOX18* gena, a na poziciji od -24 do -7 u odnosu na start transkripcije su prepoznata četiri potencijalna vezivna mesta. Istovremeno, data sekvenca je veoma očuvana između čoveka i miša (77%). U odeljku Uvod je istaknuto da se Sp familija transkripcionih faktora sastoji od nekoliko članova, među kojima su Sp1 i Sp3 proteini eksprimirani u većini sisarskih ćelija. Sp1 transkripcioni faktor se često navodi kao konstitutivni aktivator, odnosno uključen je u regrutovanje opšte transkripcione mašinerije na promotorima bez TATA motiva (kakav je i promotor *SOX18* gena) (Pugh and Tjian, 1990). Sa druge strane, Sp3 transkripcioni faktor može da ostvari i aktivatorsku i represorsku funkciju i njegova uloga u regulaciji transkripcije *SOX18* gena je ispitivana u ovom radu.

Predstavljena DNK proba I (Slika 9) je upotrebljena za ispitivanje vezivanja Sp3 proteina u EMSA esej. Preciznije, interakcija jedarnih proteina izolovani iz HeLa ćelija sa DNK probom I dovela je do pojave tri protein-DNK kompleksa označenih kao k1, k2 i k3 (Slika 10, linije 2 i 4). Specifičnost formiranih kompleksa proverena je u reakciji kompeticije sa 100 puta molarnim viškom neobeležene probe I. U datoj reakciji je došlo do

smanjenja u formiranju kompleksa, tzv. „hlađenja“, čime smo potvrdili da su nastali kompleksi posledica specifičnog vezivanja jedarnih proteina za probu I (Slika 10, linija 3). U cilju identifikacije proteina prisutnih u formiranim protein-DNK kompleksima, na odgovarajućoj probi I urađena je reakcija vezivanja u prisustvu antitela za Sp3 transkripcioni faktor. Primenom Sp3 antitela, došlo je do gubitka protein-DNK kompleksa k1 i k3 i formiranja novog kompleksa promenjene elektroforetske pokretljivosti-“supershift” kompleksa (Slika 10, linija 5).

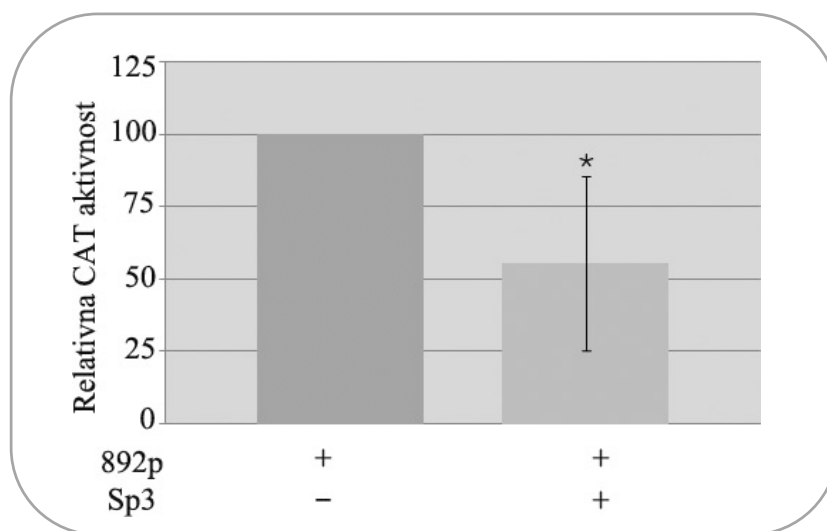


**Slika 10.** EMSA reakcija sa *SOX18* DNK probom I i jedarnim proteinima iz HeLa ćelija (JP HeLa). Kompeticija je urađena sa neobeleženom probom I (NO proba) (linija 3). Formirani protein-DNK kompleksi označeni su sa k1, k2 i k3 (linija 2). “Supershift” sa Sp3 antitelima (linija 5) je označen strelicom i ss.

Na ovaj način je utvrđeno da se za DNK probu I, poreklom iz promotora *SOX18* gena, u *in vitro* uslovima vezuje Sp3 transkripcioni faktor.

Sledeći korak je bila analiza uticaja povećane ekspresije Sp3 transkripcionog faktora na aktivnost *SOX18* promotora u HeLa ćelijama. U funkcionalnim esejima je korišćen promotor-reporter konstrukt koji je sadržavao ceo *SOX18* promotor (892 bp uzvodno od ATG kodona) i ekspresioni vektor za Sp3 transkripcioni faktor.

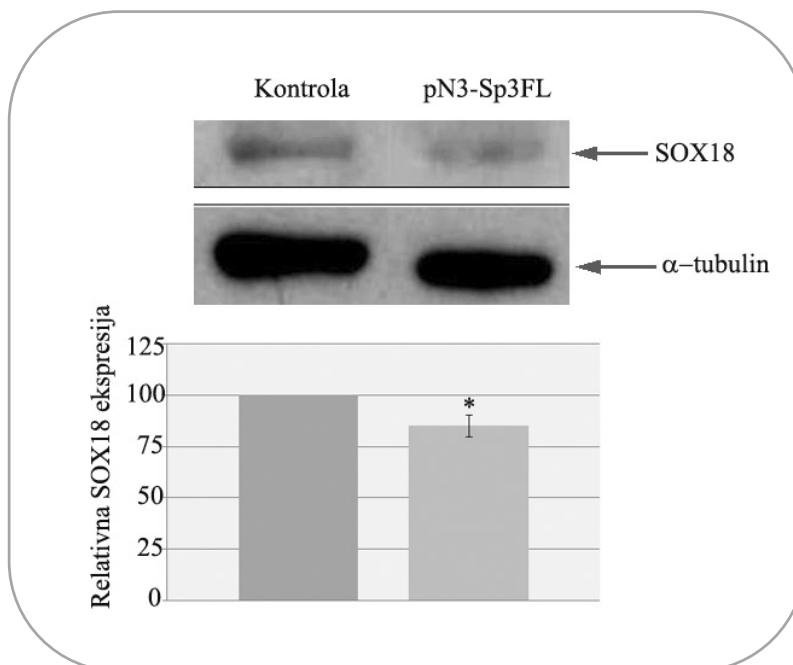
Na Slici 11. su predstavljeni rezultati funkcionalnih esejja gde je pokazano da pojačana ekspresija Sp3 transkripcionog faktora dovodi do smanjenja aktivnosti *SOX18* promotorskog konstrukta 892p na približno 55%. Predstavljeni rezultati pokazuju da se Sp3 transkripcioni faktor ponaša kao represor promotorske aktivnosti *SOX18* gena u HeLa ćelijskoj liniji.



**Slika 11.** Efekat pojačane ekspresije Sp3 na aktivnost *SOX18* promotorskog konstrukta 892p. Hela ćelije su transfektovane sa *SOX18* promotorskim konstruktom 892pCAT6 u kombinaciji sa odgovarajućim ekspresionim vektorom. Normalizovane CAT vrednosti su predstavljene kao procenat aktivnosti 892p konstrukta kojoj je dodeljena vrednost 100%. Vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost  $\pm$  SD (standard deviation) iz najmanje tri nezavisna eksperimenta. Relativne CAT vrednosti su upoređene u Studentovom *t*-testu i vrednosti za koje je  $p \leq 0.05$  su predstavljene zvezdicom (\*)

S obzirom da predhodni rezultati ukazuju na represorsku ulogu Sp3 proteina, sledeći cilj je bio ispitivanje njegovog uticaja na endogeni nivo *SOX18* ekspresije u HeLa ćelijama. Posle tranzijentne transfekcije HeLa ćelija sa ekspresionim vektorom za transkripcioni faktor Sp3 (pN3-Sp3FL), praćena je promena u nivou SOX18 proteina u odnosu na ćelije

koje su „lažno“ transfektovane i koje su služile kao kontrola (Slika 12). Povećana ekspresija Sp3 dovodi do umerenog smanjenja u nivou SOX18 proteina na približno 80%, ukazujući da Sp3 transkripcioni faktor pokazuje inhibitory efekat i u nativnim uslovima, ali da njegov uticaj na ekspresiju SOX18 proteina nije dominantan u ispitivanom model sistemu.



**Slika12.** Uticaj povećane ekspresije Sp3 transkripcionog faktora na nivo SOX18 proteina u HeLa ćelijama. Rezultati tri nezavisna eksperimenta su predstavljeni u vidu histograma. Jedna reprezentativna hibridizacija sa antitelima za SOX18 i  $\alpha$ -tubulin je predstavljena iznad histograma. Imunoreaktivni signali su digitalizovani i kvantifikovani pomoću ImageQuant Version 5.2 kompjuterskog programa i normalizovani su na vrednosti  $\alpha$ -tubulina. Količina SOX18 proteina u ćelijama koje pojačano ekspimiraju određeni transkripcioni faktor je izračunata kao procenat u odnosu na količinu SOX18 proteina u kontrolnim HeLa ćelijama kojoj je dodeljena vrednost 100%. Vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost  $\pm$  SD (standard deviation) iz najmanje tri nezavisna eksperimenta. Relativne vrednosti su upoređene u Studentovom *t*-testu i vrednosti za koje je  $p \leq 0.05$  su predstavljene zvezdicom (\*).

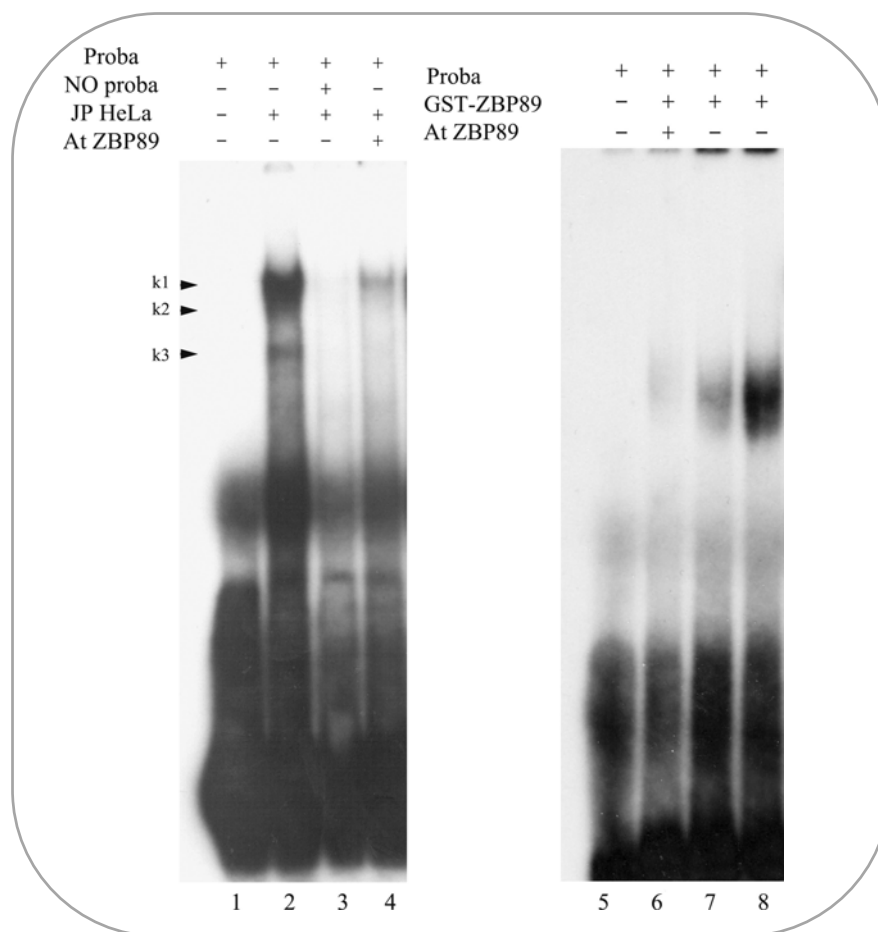
### 4.3. Uloga transkripcionog faktora ZBP-89 u regulaciji transkripcije *SOX18* gena

Pored potencijalnih vezivnih mesta za Sp transkripcione faktore, duž *SOX18* promotora se nalaze i višestruka potencijalna vezivna mesta za još jedan GC-vezujući transkripcioni faktor, ZBP-89 (Slika 8). Od šest predviđenih vezivnih mesta, samo jedno mesto je očuvano i u sekvenci i u poziciji kod čoveka i miša (Slika 9).

U EMSA eseju je analizirano vezivanje ZBP-89 transkripcionog faktora za DNK probu I, koja sadrži jedno evolutivno očuvano ZBP-89 vezivno mesto. Jedarni proteini iz HeLa ćelija, vezujući se za DNK probu I, dovode do formiranja tri DNK-proteinska kompleksa, kao što je već objašnjeno. U cilju identifikacije proteina prisutnih u formiranim kompleksima, na odgovarajućoj probi I urađena je reakcija vezivanja sa antitelima za ZBP-89 transkripcioni faktor. Upotrebom ZBP-89 antitela došlo je do inhibicije formiranja sva tri kompleksa, odnosno do tzv. efekta “hlađenja”, bez formiranja novog kompleksa otežane elektroforetske pokretljivosti (Slika 13, linija 4). Iako upotreba antitela obično dovodi do formiranja novog “supershift” kompleksa, u literaturi su zabeleženi i slučajevi inhibicije formiranja kompleksa (Kovacevic Grujicic et al., 2005). U takvim slučajevima, najverovatnije, antitelo specifično prepoznaje DNK-vezujući domen transkripcionog faktora, sprečavajući na taj način njegovo vezivanje za DNK. Usled toga izostaje formiranje protein-DNK kompleksa.

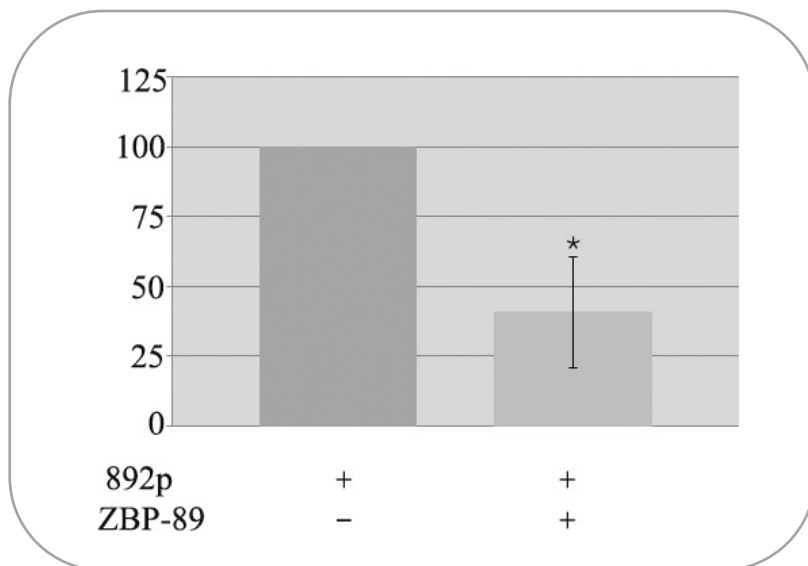
Da bi se dodatno potvrdilo vezivanje ZBP-89 proteina za *SOX18* probu I, u EMSA eseju je korišćen rekombinantni ZBP-89 protein. Pokazano je da se rekombinantni ZBP-89 specifično vezuje za probu I, u *in vitro* uslovima, formirajući jedan kompleks (Slika 13, linije 7 i 8). Upotrebom ZBP-89 antitela došlo je do “hlađenja” ovog kompleksa u “supershift” reakciji (Slika 13, linija 6), isto kao i u reakciji vezivanja sa jedarnim proteinima. Na ovaj način je ustanovljeno da se i transkripcioni faktor ZBP-89 vezuje za *SOX18* promotor, u okviru *SOX18* DNK probe I.





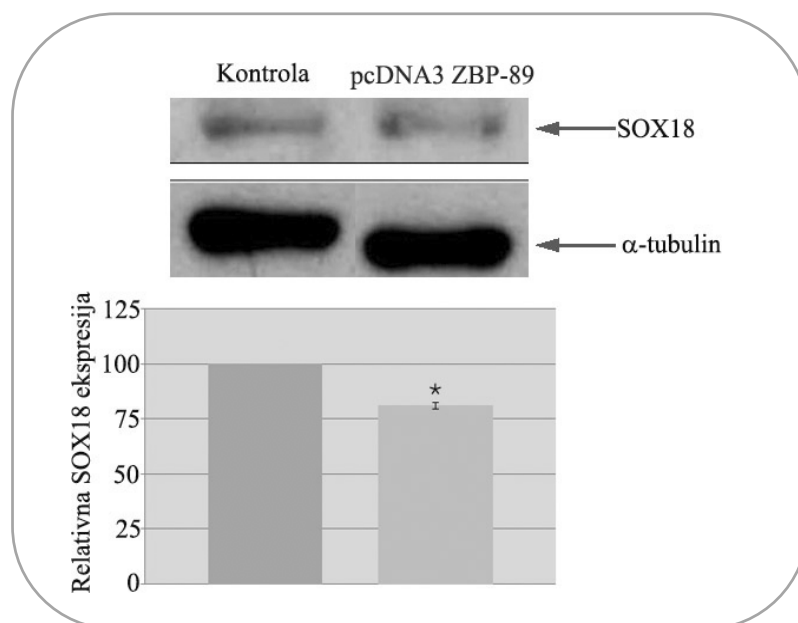
**Slika 13.** EMSA reakcija sa *SOX18* DNK probom I i jedarnim proteinima iz HeLa ćelija (JP HeLa). Kompeticija je urađena sa neobeleženom probom I (NO proba) (linija 3). Formirani protein-DNK kompleksi označeni su sa k1, k2 i k3 (linija 2). “Supershift” sa ZBP-89 antitelima (linije 4 i 6). Vezivanje 400 i 800 ng rekombinantnog GST-ZBP-89 proteina (linije 7 i 8).

U funkcionalnim esejima je pokazano da pojačana ekspresija ZBP-89 dovodi do smanjenja aktivnosti 892p promotorskog *SOX18* konstrukta na oko 40%, u HeLa ćelijama (Slika 14). Time je pokazano da je ZBP-89 transkripcioni faktor, kao i Sp3, inhibitor promotorske aktivnosti *SOX18* gena u korišćenom model sistemu.



**Slika 14.** Efekat pojačane ekspresije ZBP-89 na aktivnost *SOX18* promotorskog konstrukta 892p. HeLa ćelije su transfektovane sa *SOX18* promotorskim konstruktom 892pCAT6 u kombinaciji sa odgovarajućim ekspresionim vektorom. Normalizovane CAT aktivnosti su predstavljene kao procenat aktivnosti 892p konstrukta kojoj je dodeljena vrednost 100%. Vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost  $\pm$  SD (standard deviation) iz najmanje tri nezavisna eksperimenta. Relativne CAT vrednosti su upoređene u Studentovom *t*-testu i vrednosti za koje je  $p \leq 0.05$  su predstavljene zvezdicom (\*).

Na kraju je analiziran uticaj pojačane ekspresije ZBP-89 transkripcionog faktora na endogeni nivo SOX18 proteina. HeLa ćelije su transfektovane ekspresionim vektorom za ZBP-89 transkripcioni faktor (pcDNA3 ZBP-89), a potom je praćena promena u nivou SOX18 proteina u odnosu na kontrolne HeLa ćelije koje su „lažno“ transfektovane (praznim ekspresionim vektorom). Rezultat je predstavljen na Slici 15, gde se uočava da ovaj transkripcioni faktor smanjuje nivo SOX18 proteina na približno 80% ukazujući na represorsku funkciju i u nativnom kontekstu. Tako je i ZBP-89 transkripcioni faktor označen kao inhibitor i *SOX18* promotorske aktivnosti i endogene ekspresije u HeLa model sistemu.



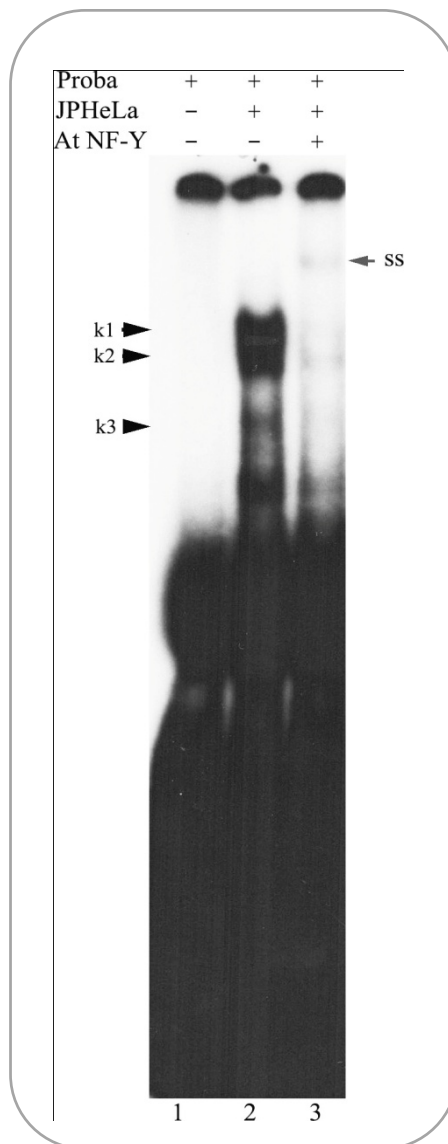
**Slika 15.** Uticaj povećane ekspresije ZBP-89 transkripcionog faktora na nivo SOX18 proteina u HeLa ćelijama. Rezultati tri nezavisna eksperimenta su predstavljani u vidu histograma. Jedna reprezentativna hibridizacija sa antitelima za SOX18 i  $\alpha$ -tubulin je predstavljena iznad histograma. Imunoreaktivni signali su digitalizovani i kvatifikovani pomoću ImageQuant Version 5.2 kompjuterskog programa i normalizovani su na vrednosti  $\alpha$ -tubulina. Količina SOX18 proteina u ćelijama koje pojačano ekspimiraju određeni transkripcioni faktor je izračunata kao procenat u odnosu na količinu SOX18 proteina u kontrolnim HeLa ćelijama kojoj je dodeljena vrednost 100%. Vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost  $\pm$  SD (standard deviation) iz najmanje tri nezavisna eksperimenta. Relativne vrednosti su upoređene u Studentovom *t*-testu i vrednosti za koje je  $p \leq 0.05$  su predstavljene zvezdicom (\*).

#### 4.4. Uloga transkripcionog faktora NF-Y u regulaciji transkripcije *SOX18* gena

U promotoru *SOX18* gena je prepoznato jedno potencijalno vezivno mesto za transkripcioni faktor NF-Y, očuvano u sekvenci i poziciji kod čoveka i miša (Slike 8 i 9). Vezivno mesto za NF-Y je obično u promotorima pozicionirano 60-100 bp uzvodno od starta transkripcije, međutim u *SOX18* promotoru se nalazi neposredno posle starta transkripcije.

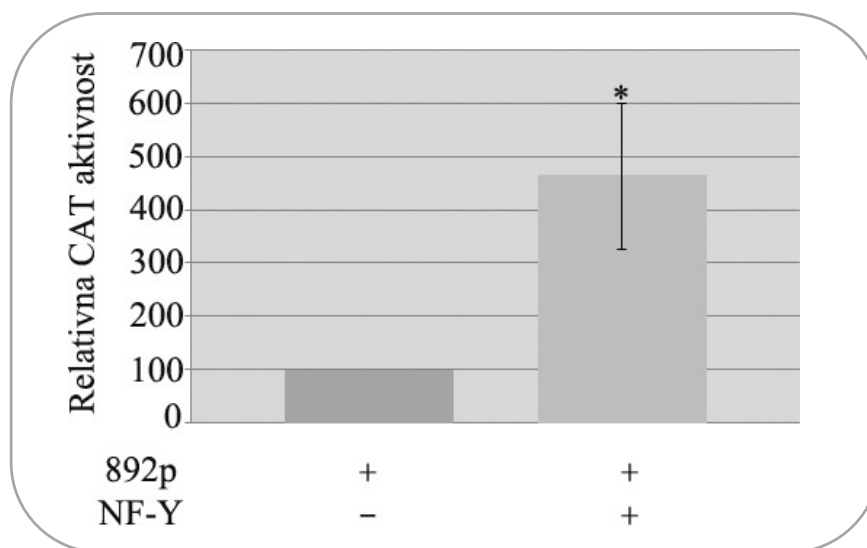
EMSA esejima je pokazano da se u DNK-proteinskim kompleksima formiranim u interakciji jedarnih proteina sa *SOX18* DNK probom I, nalazi i NF-Y protein. Tačnije,

anitela na NF-Y protein su dovela do značajnog smanjenja inteziteta kompleksa k1, k2 i k3 što je praćeno formiranjem novog “supershift” kompleksa (Slika 16, linija 3).



**Slika 16.** EMSA reakcija sa *SOX18* DNK probom I i jedarnim proteinima iz HeLa ćelija (JP HeLa). Formirani protein-DNK kompleksi označeni su sa k1, k2 i k3 (linija 2). “Supershift” sa NF-Y antitelima (linija 3) je označen strelicom i ss.

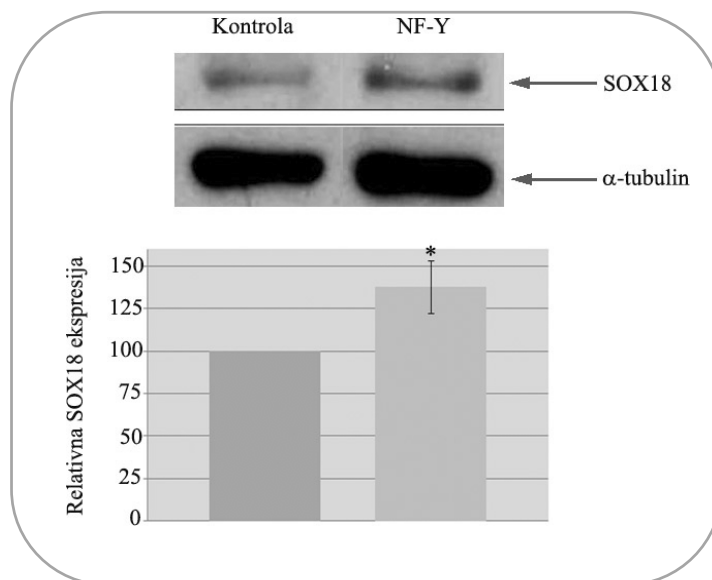
Pošto je pokazano da se NF-Y protein vezuje za DNK probu iz *SOX18* promotora u *in vitro* uslovima, sledeći korak je bio ispitivanje njegove uloge u funkcionalnim esejima. Pojačana ekspresija transkripcionog faktora NF-Y u HeLa ćelijama dovodi do pojačanja aktivnosti *SOX18* promotorskog konstrukta više od 4 puta (Slika 17). Dakle, za razliku od inhibitornog efekta Sp3 i ZBP-89, NF-Y transkripcioni faktor je potentan aktivator promotorske aktivnosti *SOX18* gena.



**Slika 17.** Efekat pojačane ekspresije NF-Y na aktivnost *SOX18* promotorskog konstrukta 892p. HeLa ćelije su transfektovane sa *SOX18* promotorskim konstruktom 892pCAT6 u kombinaciji sa odgovarajućim ekspresionim vektorom. Normalizovane CAT aktivnosti su predstavljene kao procenat aktivnosti 892p konstrukta kojoj je dodeljena vrednost 100%. Vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost  $\pm$  SD (standard deviation) iz najmanje tri nezavisna eksperimenta. Relativne CAT vrednosti su upoređene u Studentovom *t*-testu i vrednosti za koje je  $p \leq 0.05$  su predstavljene zvezdicom (\*).

Finalno, HeLa ćelije su transfektovane sa ekspresionim vektorom za NF-Y transkripcioni faktor (YA13) i promena u nivou SOX18 proteina je analizirana Western blot metodom. Slično kao i u funkcionalnom esejima sa *SOX18* promotorskim konstruktom, i u nativnom kontekstu NF-Y je pokazao aktivatorsku funkciju, povećavajući nivo SOX18 proteina za oko 40% (Slika 18). Kao što je predstavljeno, NF-Y na proteinskom nivou ne dovodi do jake aktivacije, kao što je to slučaj na nivou promotorskog konstrukta, ali

svakako zadržava svoj aktivatorski potencijal. Na ovaj način je potvrđena aktivatorska uloga NF-Y transkripcionog faktora u regulaciji transkripcione aktivnosti *SOX18* gena.



**Slika 18.** Uticaj povećane ekspresije NF-Y transkripcionog faktora na nivo SOX18 proteina u HeLa ćelijama. Rezultati tri nezavisna eksperimenta su predstavljeni u vidu histograma. Jedna reprezentativna hibridizacija sa antitelima za SOX18 i  $\alpha$ -tubulin je predstavljena iznad histograma. Imunoreaktivni signali su digitalizovani i kvatifikovani pomoću ImageQuant Version 5.2 kompjuterskog programa i normalizovani su na vrednosti  $\alpha$ -tubulina. Količina SOX18 proteina u ćelijama koje pojačano ekspimiraju određeni transkripcioni faktor je izračunata kao procenat u odnosu na količinu SOX18 proteina u kontrolnim HeLa ćelijama kojoj je dodeljena vrednost 100%. Vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost  $\pm$  SD (standard deviation) iz najmanje tri nezavisna eksperimenta. Relativne vrednosti su upoređene u Studentovom *t*-testu i vrednosti za koje je  $p \leq 0.05$  su predstavljene zvezdicom (\*).

#### 4.5. Uloga transkripcionog faktora EGR1 u regulaciji transkripcije *SOX18* gena

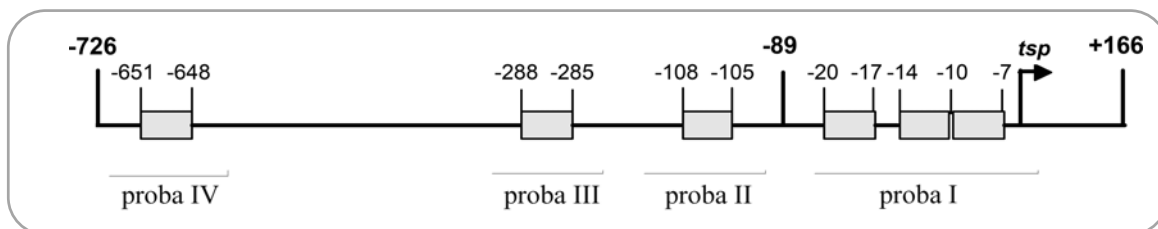
Od ranije je poznato da EGR1 transkripcioni faktor ima važnu ulogu u transkripcionom odgovoru endotelijalnih ćelija na angiogenetske faktore rasta, kao i da reguliše ekspresiju različitih gena koji su uključeni u regulaciju procesa angiogeneze. Uzimajući u obzir njegovu ulogu u ovim procesima, kao i činjenicu da je humani *SOX18* gen već povezan sa procesima vaskularogeneze, limfangiogeneze i angiogeneze, u ovom

radu je posebna pažnja posvećena funkcionalnoj analizi uloge EGR1 u transkripcionoj regulaciji humanog *SOX18* gena.

Kompjuterska predikcija je ukazala na šest potencijalnih vezivnih mesta za EGR1 transkripcioni faktor u okviru *SOX18* promotora (Slika 8). Vezivna mesta za EGR1 transkripcioni faktor često se preklapaju u sekvenci i poziciji sa vezivnim mestima za transkripcione faktore iz Sp familije. Na Slici 8 su predstavljena sva potencijalna vezivna mesta za EGR1 transkripcioni faktor, i kao što je predstavljeno, većina se preklapa sa vezivnim mestima za Sp transkripcione faktore.

#### 4.5.1 *In vitro* vezivanje EGR1 transkripcionog faktora za potencijalna vezivna mesta u *SOX18* promotoru

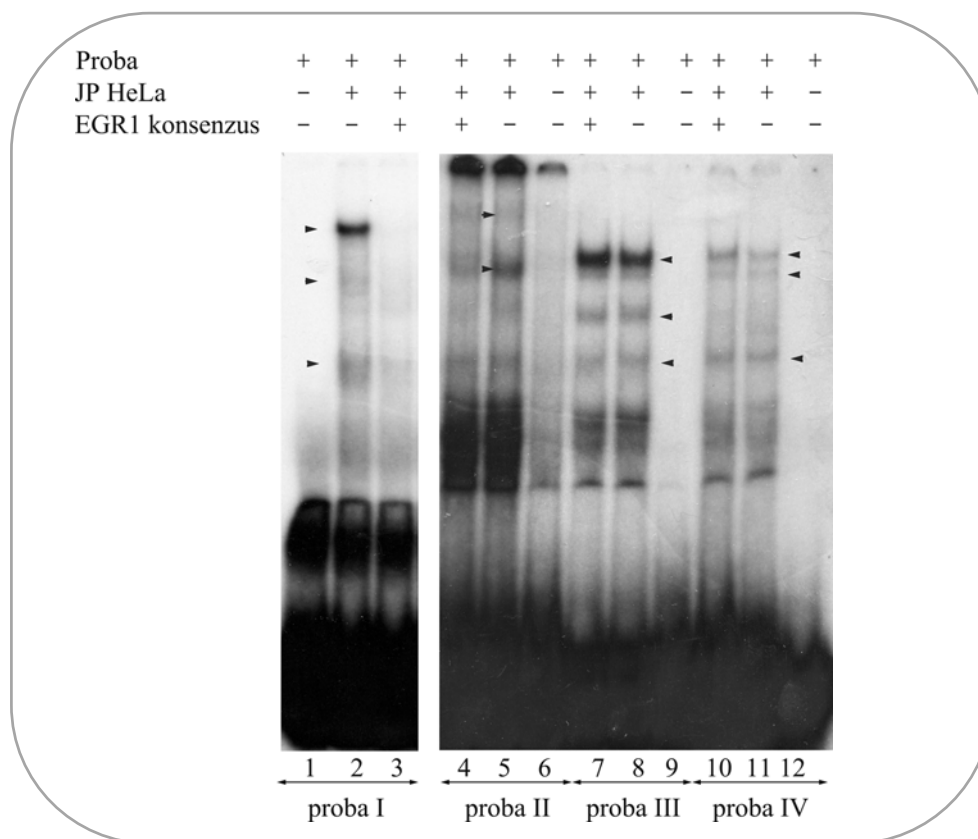
U cilju dokazivanja vezivanja EGR1 transkripcionog faktora u okviru *SOX18* promotora, pored *SOX18* DNK probe I, generisane su još tri *SOX18* DNK probe (II-IV) koje obuhvataju potencijalna EGR1 vezivna mesta (Slika 19).



**Slika 19.** Shematski prikaz *SOX18* promotora sa potencijalnim vezivnim mestima za EGR1 (označeno sivim pravougaonicima). Tačne pozicije potencijalnih vezivnih mesta označene su iznad pravougaonika, a relativne pozicije DNK proba koje su korišćene u EMSA eseju označene su punim, sivim linijama. Brojevi u podebljanom fontu označavaju pozicije optimalnog *SOX18* promotora (-726 do +166), odnosno minimalnog promotorskog regiona (-89 do +166) u odnosu na start transkripcije (*tsp*).

U EMSA eseju, jedarni proteini iz HeLa ćelija su se specifično vezali za sve četiri *SOX18* DNK probe (I-IV) formirajući protein-DNK komplekse (Slika 20, linije 2, 5, 8 i 11). Da bi ispitali da li se u okviru formiranih protein-DNK kompleksa nalazi EGR1 protein, urađene su reakcije kompeticije vezivanja jedarnih proteina sa 100 x molarnim

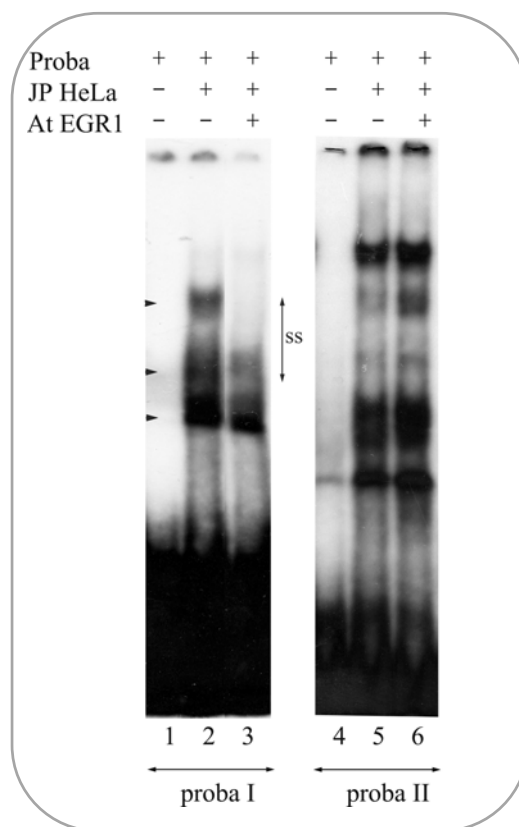
viškom neobeleženeog specifičnog kompetitora. Kao specifični kompetitor upotrebljena je oligonukleotidna proba koja sadrži EGR1 vezivno mesto. Kao što je predstavljeno na Slici 20, kompeticija sa EGR1 konsensus probom nije dovela do gubitka protein-DNA kompleksa koji su formirani sa probama III i IV (linije 7 i 10). U slučaju probe II, došlo je do smanjenja u intezitetu formiranih kompleksa (Slika 20, linija 4), dok je kod probe I došlo do potpunog inhibiranja formiranja protein-DNK kompleksa (Slika 20, linija 3). Na osnovu ovih rezultata, zaključeno je da u formiranju protein-DNK kompleksa sa probama III i IV ne učestvuje EGR1 transkripcioni faktor čime je odbačena mogućnost da se za ta dva potencijalna vezivna mesta vezuje EGR1.



**Slika 20.** EMSA reakcija sa odgovarajućim *SOX18* probama (I-IV) i jedarnim proteinima iz HeLa (JP HeLa) ćelija. Specifični protein-DNK kompleksi su obeleženi strelicama. Kompeticija sa 100 x molarnim viškom neobeležene oligonukleotidne probe koja nosi konsenzusna vezivna mesta za EGR1(EGR1 konsenzus) predstavljena je u linijama 3, 4, 7 i 10.

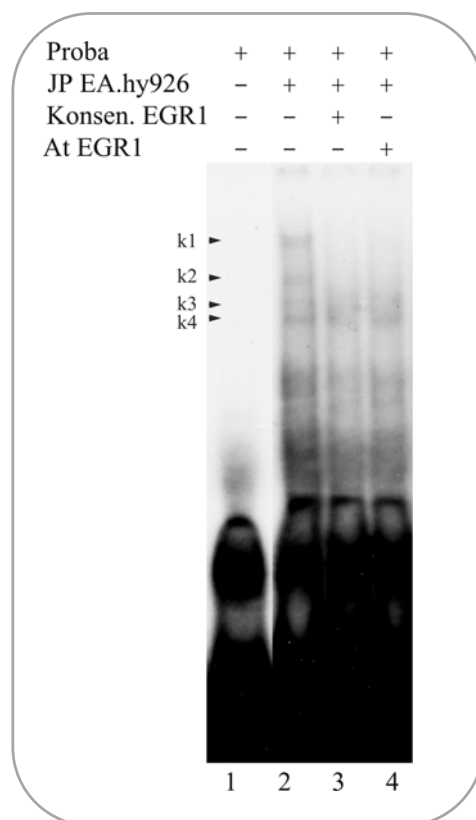


Da bi dalje ispitali da li EGR1 učestvuje u formiranju kompleksa sa probama I i II, upotrebljena su specifična EGR1 antitela u EMSA "supershift" reakciji. Kod probe I je u "supershift" reakciji došlo do potpune inhibicije formiranja protein-DNK kompleksa, čime je potvrđeno da u formiranju tih kompleksa učestvuje EGR1 transkripcioni faktor (Slika 21, linija 3). Efekat "hlađenja" protein-DNK kompleksa pri upotrebi specifičnih antitela je ranije objašnjen kod „supershift“ reakcije sa antitelima za ZBP-89 protein. Sa probom II izostaje promena u elektroforetskoj pokretljivosti kompleksa, odnosno nema "supershift" kompleksa, niti dolazi do značajnog "hlađenja" postojećih kompleksa, što ukazuje da se za ovu probu ne vezuje EGR1 (Slika 21, linija 6).



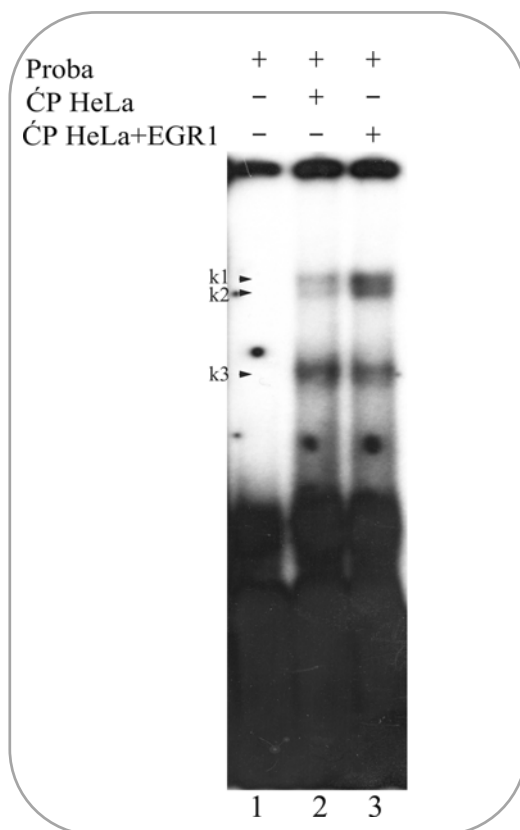
**Slika 21.** EMSA reakcija sa *SOX18* probama I i II i jedarnim proteinima iz HeLa (JP HeLa) i "supershift" sa anti EGR1 antitelima – ss (linije 3 i 6).

Uzimajući u obzir činjenicu da SOX18 i EGR1 pripadaju transkripcionim faktorima koji se eksprimiraju u endotelijalnim ćelijama i imaju ulogu u procesu angiogeneze, sledeći cilj je bio da se ispita da li se EGR1 vezuje za *SOX18* DNK probu I kada se u EMSA esejima koriste jedarni proteini iz endotelijalnih ćelija. U ovom slučaju korišćeni su jedarni proteini izolovani iz EA.hy926 ćelija. Reč je o hibridoma ćelijskoj liniji koja vodi poreklo od primarnih endotelijalnih ćelija izolovanih iz vene pupčane vrpce (HUVEC ćelije), i koriste se kao endotelijalni model sistem. U EMSA esejima jedarni proteini iz EA.hy926 ćelija se vezuju za SOX18 DNK probu I (Slika 22, linija 2), i dolazi do formiranja četiri kompleksa (k1-4). Kompeticija sa specifičnim kompetitorom, kao i upotreba specifičnih antitela, dovode do inhibicije formiranja protein-DNK kompleksa k1 i k2, ukazujući da se i u slučaju proteina iz endotelijalnih ćelija EGR1 transkripcioni faktor vezuje za probu I (Slika 22, linije 3 i 4).



**Slika 22.** EMSA reakcija sa *SOX18* DNK probom I i jedarnim proteinima iz EA.hy926 ćelija. Formirani specifični protein-DNK kompleksi označeni sa k1-4 (linija 2), hlađenje sa specifičnim kompetitorom - Konsen. EGR1 (linija 3) i "supershift" sa anti EGR1 antitelima (linija 4).

EMSA esejima je pokazano da jedini region iz *SOX18* promotora koji vezuje EGR1 transkripcioni faktor obuhvata fragment -29 do +10 u odnosu na start transkripcije i nalazi se u okviru *SOX18* minimalnog promotorskog regiona (od -89 do +166 u odnosu na start transkripcije). Reč je o regionu za koji je pokazano da vezuje Sp3, ZBP-89 i NF-Y transkripcione faktore. Da bi dodatno potvrdili da je ovaj region važan za vezivanje EGR1, u EMSA reakciji su korišćeni ćelijski proteini izolovani iz HeLa ćelija koje su transfektovane praznim pcDNA3.1 vektorom ili ekspresionim vektorom za EGR1. Kada su korišćeni ćelijski proteini koji su “obogaćeni” EGR1 proteinom, afinitet za vezivanje ovih proteina za probu se značajno povećao što se uočava povećanjem inteziteta protein-DNK kompleksa k1 i k2 (Slika 23, linija 3). Ovim je dodatno potvrđeno da EGR1 transkripcioni faktor učestvuje u formiranju protein-DNK kompleksa sa *SOX18* DNK probom I.



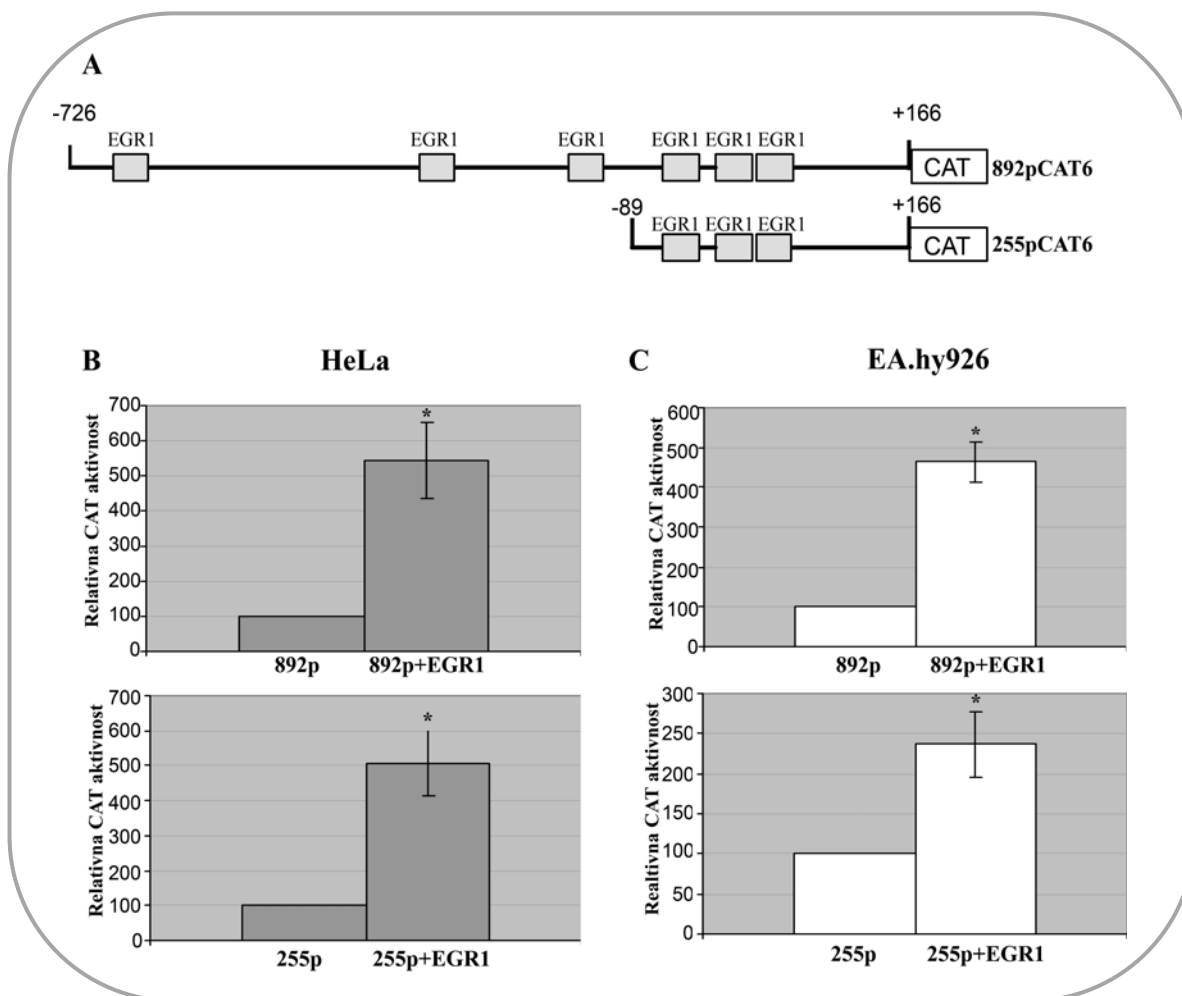
**Slika 23.** EMSA reakcija sa *SOX18* DNK probom I i ćelijskim proteinima iz HeLa ćelija lažno transfektovanih (ĆP HeLa) i HeLa tranfektovanih sa EGR1 ekspresionim vektorom (ĆP HeLa + EGR1).

#### 4.5.2 Analiza uloge pojačane ekspresije EGR1 na aktivnost *SOX18* promotorskih konstrukata u HeLa i EA.hy926 ćelijama

Sledeći korak je bio ispitivanje uloge EGR1 transkripcionog faktora u regulaciji aktivnosti promotora *SOX18* gena. U funkcionalnu analizu su uključena dva promotorska konstrukta, jedan koji obuhvata region od -726 do +166 u odnosu na start transkripcije i predstavlja optimalni *SOX18* promotor (konstrukt 892pCAT6) i drugi koji obuhvata region od -89 do +166 u odnosu na start transkripcije i označen je kao minimalni promotorski region (konstrukt 255pCAT6). Na Slici 24A, prikazana su oba konstrukta sa relativnim položajem potencijalnih vezivnih mesta za EGR1 transkripcioni faktor.

U funkcionalnim esejima su korišćene HeLa ćelije, kao tumorski model sistem i EA.hy926 ćelije, kao endotelijalni model sistem. Kao što je predstavljeno na Slici 24B i C, tranzijentno povećanje ekspresije EGR1 transkripcionog faktora dovodi do povećanja aktivnosti optimalnog *SOX18* promotora (892pCAT6) od približno 5 puta u obe ćelijske linije. Sa druge strane, odgovor minimalnog promotorskog regiona (255pCAT6) na povećanu ekspresiju EGR1 se razlikovao između HeLa i EA.hy926 ćelija. Tačnije, aktivnost 255pCAT6 konstrukta bila je povećana 5 puta u HeLa ćelijama, a 2.5 puta u EA.hy926 ćelijama. Dakle, na odgovor u EA.hy926 ćelijama je uticala delecija promotorskog regiona od -726 do -89. Ova razlika u odgovoru može da ukazuje na značaj uzvodnih sekvenci *SOX18* promotora u endotelijalnom model sistemu, za koje se mogu vezivati neki drugi, specifični faktori i time pozitivno uticati na odgovor promotorskog konstrukta na povećanu ekspresiju EGR1.

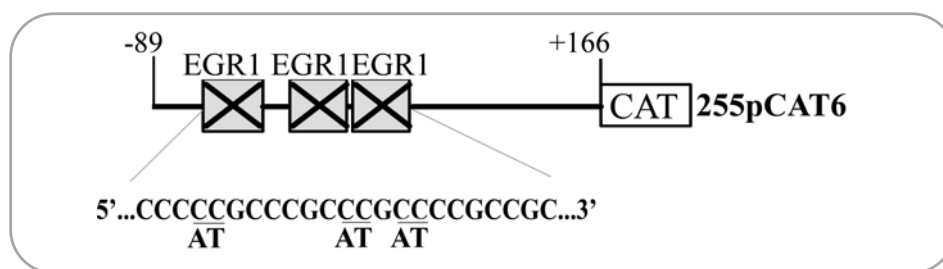
Prikazani eksperimenti pokazuju da su tri EGR1 vezivna mesta u okviru minimalnog promotorskog regiona dovoljna da EGR1 transkripcioni faktor ostvari svoju transaktivatorsku funkciju u oba model sistema. Takođe, može se pretpostaviti da je odgovor u endotelijalnim ćelijama možda specifičniji i da zavisi ne samo od raspoloživih EGR1 mesta u minimalnom promotoru, već i od uzvodne promotorske sekvence, na šta ukazuju rezultati dobijeni sa minimalnim promotorskim konstruktom.



**Slika 24.** Efekat povećane ekspresije EGR1 na aktivnost *SOX18* promotora. **A)** Shematski prikaz 892pCAT6 i 255pCAT6, promotor-reporter konstrukata. Sivi prvougaonici predstavljaju potencijalna EGR1 vezivna mesta i njihovu relativnu poziciju u okviru *SOX18* promotora i minimalnog promotorskog regiona. **B)** Efekat pojačane ekspresije EGR1 na aktivnost 892pCAT6 i 255pCAT6 konstrukata u HeLa ćelijama. **C)** Efekat pojačane ekspresije EGR1 na aktivnost 892pCAT6 i 255pCAT6 konstrukata u EA.hy926 ćelijama. Normalizovane CAT aktivnosti su predstavljene kao procenat aktivnosti promotor-reporter konstrukta kojoj je dodeljena vrednost 100%. Vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost  $\pm$  SD (standard deviation) iz najmanje tri nezavisna eksperimenta. Relativne CAT vrednosti su upoređene u Studentovom *t*-testu i vrednosti za koje je  $p \leq 0.05$  su predstavljene zvezdicom (\*).

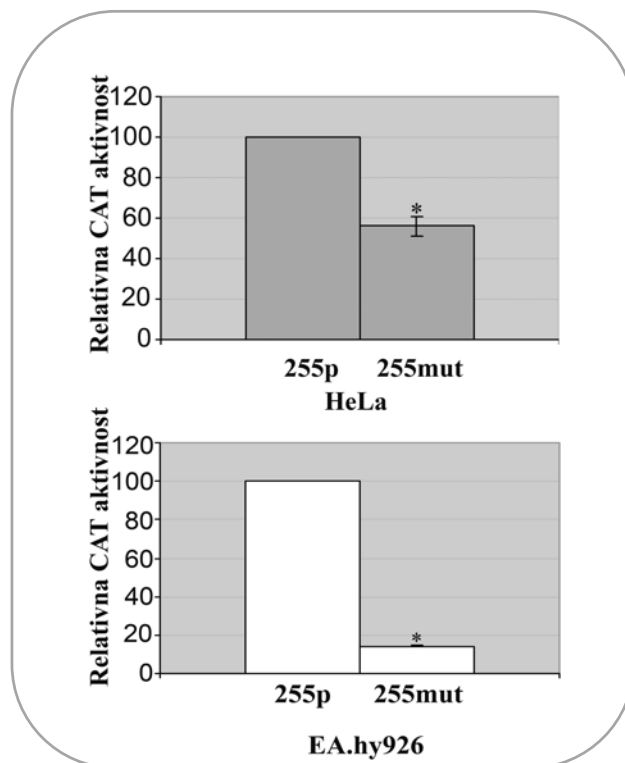
### 4.5.3 Analiza uticaja mutacija u vezivnim mesta za EGR1 na aktivnost *SOX18* minimalnog promotorskog regiona

U cilju boljeg razumevanja uloge EGR1 u regulaciji ekspresije *SOX18* gena, u istraživanje je uključena funkcionalna analiza promotor-reporter konstrukta koji nosi mutacije u vezivnim mestima za EGR1 transkripcioni faktor. S obzirom da se u okviru minimalnog promotorskog regiona nalaze tri preklapajuća EGR1 vezivna mesta, u okviru konstrukta 255pCAT6 uvedene su po dve nukleotidne zamene u jezgro svakog vezivnog mesta i na taj način su mutirana sva tri vezivna mesta za EGR1 (Slika 25).



**Slika 25.** Shematski prikaz mutiranog konstrukta 255pCAT6. Nukleotidne zamene uvedene mutagenезom su označene ispod sekvence u podebljanom fontu.

Efekat mutacija tri vezivna mesta za EGR1 u okviru minimalnog promotorskog konstrukta ispitivan je u HeLa i EA.hy926 ćelijama. Mutacije u EGR1 vezivnim mestima dovode do smanjenja aktivnosti minimalnog promotorskog konstrukta na 56% i 14% u HeLa, odnosno EA.hy926 ćelijama (Slika 26). Ovi rezultati potvrđuju funkcionalni značaj EGR1 vezivnih mesta koja su grupisana neposredno uzvodno od starta transkripcije *SOX18* gena. Značajniji efekat je uočen u EA.hy926 ćelijama, ukazujući na važnost ovog transkripcionog faktora u regulaciji *SOX18* promotora u endotelijalnom model sistemu. Na ovaj način je nedvosmisleno pokazano da EGR1 transkripcioni faktor pozitivno reguliše aktivnost *SOX18* promotora.

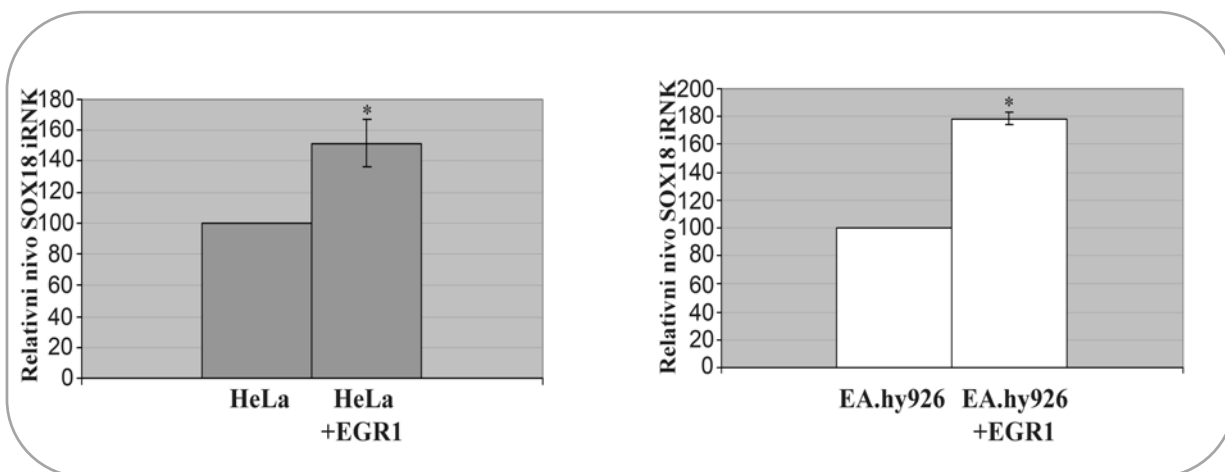


**Slika 26.** Efekat mesto-specifične mutageneze EGR1 vezivnih mesta u okviru *SOX18* minimalnog promotorskog regiona. HeLa i EA.hy926 ćelije su tranzijentno transfektovane sa nemutiranim (255p) ili mutiranim (255mut) minimalnim promotorskim konstruktom. Normalizovane CAT aktivnosti su predstavljene kao procenat aktivnosti nemutiranog promotor-reporter konstrukta kojoj je dodeljena vrednost 100%. Vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost  $\pm$  SD (standard deviation) iz najmanje tri nezavisna eksperimenta. Relativne CAT vrednosti su upoređene u Studentovom *t*-testu i vrednosti za koje je  $p \leq 0.05$  su predstavljene zvezdicom (\*).

#### 4.5.4 Analiza uticaja povećane ekspresije EGR1 na nivo endogene *SOX18* ekspresije

Sledeća analiza je podrazumevala ispitivanje uticaja povećane ekspresije EGR1 na nivo *SOX18* ekspresije u HeLa i EA.hy926 ćelijama. Posle tranzijentne transfekcije HeLa i EA.hy926 ćelija ekspresionim vektorom za EGR1, izolovani su RNK i proteini i ispitivana je promena u nivou ekspresije *SOX18* gena na nivou transkripcije, kvantitativnom “qRT-PCR” metodom, i na nivou translacije, “Western blot” metodom.

Kvantitativnom “qRT-PCR” metodom je pokazano da povećana ekspresija EGR1 dovodi do povećanja transkripcije *SOX18* gena u HeLa, odnosno EA.hy926 ćelijama, na 150%, odnosno 180 % (Slika 27).

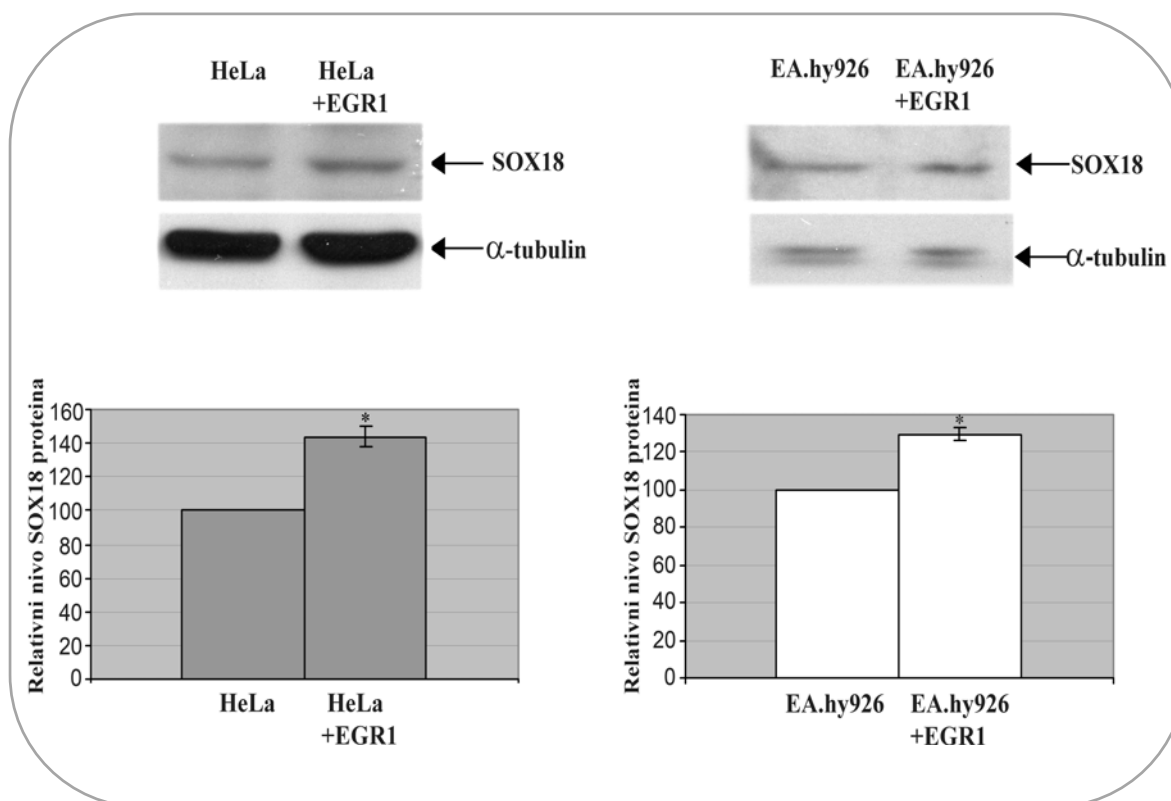


**Slika 27.** Efekat povećane ekspresije EGR1 na nivo transkripcije *SOX18* gena. HeLa, odnosno EA.hy926 ćelije su transfektovane sa praznim pcDNA3.1 vektorom ili ekspresionim vektorom za EGR1, pcDNA3.1-EGR1. Relativni nivo *SOX18* ekspresije je određen pomoću komparativnog algoritma za kvantifikaciju, gde je rezultujuća  $\Delta\Delta C_t$  vrednost uključena u formulu  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  za izračunavanje opsega promene u transkripciji. Relativna *SOX18* ekspresija je predstavljena kao procenat ekspresije u ćelijama transfektovanim sa praznim vektorom i ta vrednost je određena kao 100%. Vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost  $\pm$  SD (standard deviation) iz najmanje tri nezavisna eksperimenta. Relativne vrednosti su upoređene u Studentovom *t*-testu i vrednosti za koje je  $p \leq 0.05$  su predstavljene zvezdicom (\*).

Na ovaj način je potvrđeno da je transkripcioni faktor EGR1 pozitivan regulator ekspresije *SOX18* gena u obe ispitivane ćelijske linije.

Potom je ispitivan uticaj pojačane ekspresija EGR1 na nivo SOX18 proteina u obe ćelijske linije. Primenom “Western blot” metode, pokazano je da posle transfekcije HeLa i EA.hy926 ćelija EGR1 ekspresionim vektorom dolazi do porasta u nivou SOX18 proteina na 140%, odnosno 130% (Slika 28).





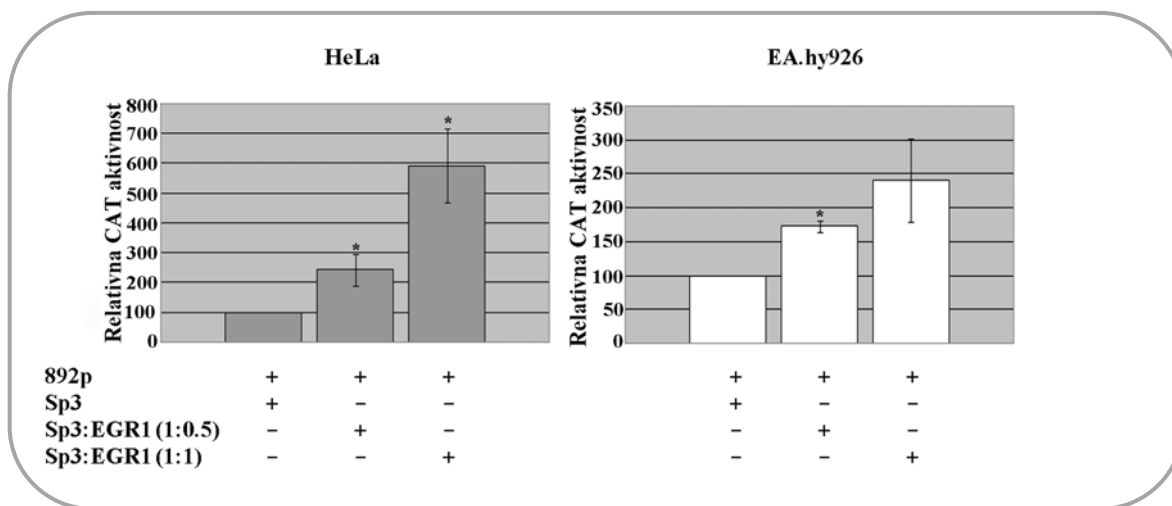
**Slika 28.** Efekat povećane ekspresije EGR1 na nivo SOX18 proteina. HeLa, odnosno EA.hy926 ćelije su transfektovane sa praznim pcDNA3.1 vektorom ili ekspresionim vektorom za EGR1, pcDNA3.1-EGR1. Iz ćelija su izolovani ukupni ćelijski proteini koji su korišćeni za “Western blot” analizu. Detektovani proteini su označeni strelicama. Jedna reprezentativna hibridizacija sa antitelima za SOX18 i  $\alpha$ -tubulin je predstavljena iznad histograma. Imunoreaktivni signali su digitalizovani i kvatifikovani pomoću ImageQuant Version 5.2 kompjuterskog programa i normalizovani su na vrednosti  $\alpha$ -tubulina. Količina SOX18 proteina u ćelijama koje pojačano ekspimiraju EGR1 transkripcioni faktor je izračunata kao procenat u odnosu na količinu SOX18 proteina u ćelijama koje su transfektovane praznim pcDNA3.1 vektorom kojoj je dodeljena vrednost 100%. Vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost  $\pm$  SD (standard deviation) iz najmanje tri nezavisna eksperimenta. Relativne vrednosti su upoređene u Studentovom *t*-testu i vrednosti za koje je  $p \leq 0.05$  su predstavljene zvezdicom (\*).

Predstavljeni rezultati ukazuju na funkcionalni značaj EGR1 transkripcionog faktora u aktivaciji ekspresije *SOX18* gena u *in vivo* uslovima.

#### 4.6. Funkcionalna kompeticija između EGR1 i Sp3 u regulaciji aktivnosti *SOX18* promotora

Predhodno je pokazano da transkripcijski faktor Sp3 u funkcionalnim esejima ima ulogu represora *SOX18* promotorske aktivnosti (Slika 11). Takođe, vezivna mesta za Sp i EGR1 transkripcijske faktore duž *SOX18* promotora se na većini mesta preklapaju, s obzirom da ovi transkripcijski faktori prepoznaju iste ili slične GC-bogate sekvence (Slika 8). S obzirom da su predhodni funkcionalni eseji sa EGR1 transkripcijskim faktorom pokazali da je reč o potentnom aktivatoru *SOX18* promotorske aktivnosti, nametnulo se pitanje: da li povećana ekspresija EGR1 može da “nadjača” inhibicioni efekat Sp3 transkripcijskog faktora?

U skladu sa pretpostavkama, postavljen je funkcionalni esej kompeticije u kome je na konstantnu količinu Sp3 ekspresionog vektora, koja bi trebalo da ima inhibicioni efekat na promotorsku aktivnost *SOX18* gena, sukcesivno dodavana rastuća količina EGR1 ekspresionog vektora. Kao što se može videti na Slici 29, posle inicijalne inhibicije promotora sa Sp3, dodavanje EGR1 dovodi do dozno-zavisne reaktivacije promotorske aktivnosti.



**Slika 29.** Funkcionalna kompeticija između EGR1 i Sp3 u regulaciji aktivnosti *SOX18* promotora. HeLa i EA.hy926 ćelije su tranfektovane sapromotorskim konstruktom 892pCAT6 i kotranfektovane fiksnom količinom Sp3 ekspresionog vektora i rastućom količinom EGR1 ekspresionog vektora, kao što je

predstavljeno ispod histograma. Normalizovane CAT aktivnosti su predstavljene kao procenat aktivnosti konstrukta 892p u ćelijama koje su kotransfektovane sa Sp3 i kojoj je dodeljena vrednost 100%. Vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost  $\pm$  SD (standard deviation) iz najmanje tri nezavisna eksperimenta. Relativne CAT vrednosti su upoređene u Studentovom *t*-testu i vrednosti za koje je  $p \leq 0.05$  su predstavljene zvezdicom (\*).

Nakon inhibicije promotorske aktivnosti usled povećane ekspresije Sp3 transkripcionog faktora, dodavanjem EGR1 transkripcionog faktora došlo je do porasta aktivnosti promotorskog konstrukta, za oko 6 puta u Hela, odnosno 2.5 puta u EAhy.926 ćelijama.

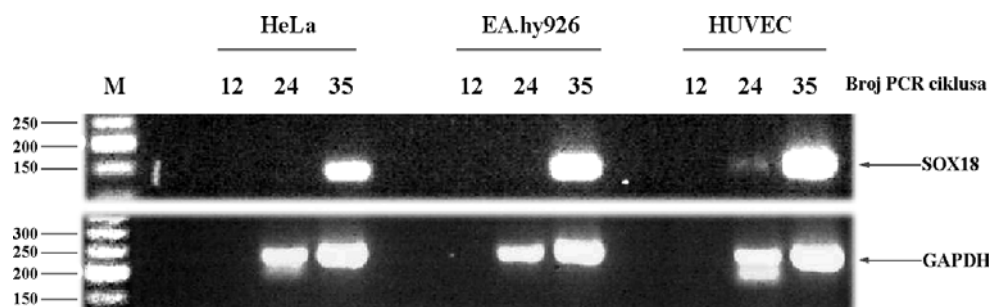
Prikazani rezultati pokazuju da povećana ekspresija EGR1 transkripcionog faktora uspešno prevazilazi inhibicioni efekat transkripcionog faktora Sp3. Na ovaj način, dodatno je istaknuta važna uloga EGR1 u procesu transaktivacije *SOX18* promotorske aktivnosti.

#### **4.7. Ekspresija *SOX18* gena u primarnim humanim endotelijalnim ćelijama**

Transkripciona regulacija humanog *SOX18* gena ispitivana je u HeLa i EAhy926 ćelijama, za koje je predhodno pokazano da eksprimiraju ovaj humani gen. Takođe, reč je o permanentnim ćelijskim linijama koje je moguće efikasno tranzijentno transfektovati i stoga uspešno koristiti u funkcionalnim esejima. Sa druge strane, uzimajući u obzir da je humani *SOX18* gen tranzijentno eksprimiran u endotelijalnim ćelijama tokom embrionalnog razvića i postnatalne angiogeneze, deo istraživanja bio je usmeren na analizu uticaja različitih angiogenetskih faktora i farmakoloških inhibitora angiogeneze na ekspresiju *SOX18* gena u endotelijalnom model sistemu. Danas je široko prihvaćeno da je jedan od najadekvatnijih endotelijalnih model sistema primarna endotelijalna ćelijska linija HUVEC (“human umbilical vein endothelial cells”). Ova primarna linija se pravi od endotela venskog krvnog suda pupčane vrpce dobrovoljnih davalaca, te je dostupnost ovih ćelija ograničena. Takođe, ove ćelije se pouzdano mogu koristiti kao endotelijalni model sistem do 5-6 pasaža, nakon čega ćelije gube proliferativni potencijal i umiru. Pored toga, tranfekcija ovih ćelija nije dovoljno efikasna, te nisu idealan model sistem za funkcionalne eseje. Sa druge strane, veoma uspešno se koriste za različite fiziološke i farmakološke

tretmane, te predstavljaju odličan *in vitro* model sistem za praćenje uticaja tih tretmana na angiogenetski potencijal endotelijalnih ćelija, signalne puteve i ekspresiju različitih ciljnih gena.

Prvi korak u istraživanjima uticaja različitih pro- i anti- angiogenetskih agenasa na nivo SOX18 proteina u endotelijalnom model sistemu, bio je da se odredi da li se u HUVEC ćelijama eksprimira *SOX18* gen. Kao pozitivna kontrola korišćene su ćelijske linije HeLa i EA.hy926, za koje je predhodno pokazano da ekspimiraju *SOX18* gen čoveka. Kao unutrašnja kontrola korišćen je konstitutivno ekspimiran GAPDH gen. Pomoću RT-PCR metode detektovana je ekspresija *SOX18* gena u sve tri analizirane ćelijske linije (Slika 30). Rezultati ovih analiza pokazuju da HUVEC ćelije ekspimiraju humani *SOX18* gen, kao i da je relativni nivo ekspresije u HUVEC ćelijama viši u odnosu na HeLa i EA.hy926 ćelije, na šta ukazuje činjenica da se produkt *SOX18* gena kod HUVEC ćelija uočava posle 24 ciklusa amplifikacije, što nije slučaj kod HeLa i EA.hy926 ćelija. Ovim eksperimentom smo potvrdili da HUVEC ćelije mogu da se koriste kao model sistem za istraživanje uticaja različitih angiogenetskih i anti-angiogenetskih faktora na nivo ekspresije *SOX18*.



**Slika 30.** Analiza *SOX18* ekspresije RT-PCR metodom. cDNA iz HeLa, EA.hy926 i HUVEC ćelija je korišćena kao matrica u PCR reakciji sa specifičnim *SOX18* prajmerima, odnosno GAPDH prajmerima (GAPDH transkripti su amplifikovani kao endogena kontrola). Ekspresija *SOX18* gena je testirana posle 12, 24 i 35 ciklusa amplifikacije kao što je naznačeno iznad slike. Specifični produkti (*SOX18* odnosno GAPDH) su označeni strelicama. M-DNK marker sa dužinama označenim sa strane.

#### 4.8. Odabir angiogenetskih i anti-angiogenetskih faktora čiji će uticaj na *SOX18* ekspresiju biti ispitan

Proces angiogeneze kontroliše veliki broj različitih molekula uključujući faktore rasta, adhezivne molekule, citokine, morfogene, endogene inhibitore itd (Otrock et al., 2007). Sa druge strane, malo se zna o transkripcionim faktorima koji regulišu angiogenezu. *SOX18* je jedan od transkripcionih faktora za koji postoje brojni dokazi koji upućuju na njegovu ulogu u procesima regulacije angiogeneze (Downes and Koopman, 2001). Stoga, bilo je interesantno ispitati da li neki od molekula koji regulišu proces angiogeneze, utiču na ekspresiju *SOX18* gena u endotelijalnim ćelijama, preciznije na nivo *SOX18* proteina u njima.

Faktori rasta, ekstracelularni proteini matriksa, citokini i nesteroidni antiinflamatorni lekovi (NSAID) su četiri klase molekula čiji je uticaj praćen analizom nivoa *SOX18* proteina u HUVEC ćelijama. Od faktora rasta za analizu su odabrani VEGF, bFGF i TGF- $\beta$ , za koje je pokazano da imaju važnu ulogu u procesu angiogeneze (ref CEJB). Među njima, VEGF se smatra najvažnijim faktorom koji regulišu angiogenezu kao i tumorsku angiogenezu, a anti-VEGF terapija se već koristi u onkologiji u lečenju metastatskih kancera (Ferrara, 2005).

Proces angiogeneze zavisi od sposobnosti endotelijalnih ćelija da migriraju i adheriraju, a ti procesi zavise od interakcije ćelijskih integrina sa ekstraćelijskim proteinima matriksa. U tu svrhu, HUVEC ćelije su sadene na podloge obložene kolagenom I ili fibronektinom, koji bi trebalo da interaguju sa ćelijskim integrinima  $\alpha_2\beta_1$ , odnosno  $\alpha_5\beta_1/\alpha_v\beta_3$  i iniciraju signalne puteve odgovorne za ćelijsku migraciju (Leavesley et al., 1993).

Od citokina, analiziran je uticaj tumorskog faktora nekroze (TNF), za koji se pokazalo da može da stimuliše angiogenezu *in vivo* i formiranje tuba *in vitro* (Frater-Schroder et al., 1987; Leibovich et al., 1987).

Takođe, u analizu su uključena i dva farmakološka inhibitora angiogeneze, ibuprofen i NS398. Reč je o nesteroidnim antiinflamatornim lekovima (NSAID), inhibitorima ciklooksigenaze, enzima koji učestvuje u biosintetskom putu prostanglandina.

Prostaglandini mogu da stimulišu angiogenezu *in vivo* i *in vitro*, pa njihov nedostatak dovodi do inhibicije ovog procesa (Form and Auerbach, 1983; Cheng et al., 1998; Dubois et al., 1998).

Sve klase molekula koje su korišćene u ovim eksperimentima, kao i njihove količine, sumirane su u Tabeli 5.

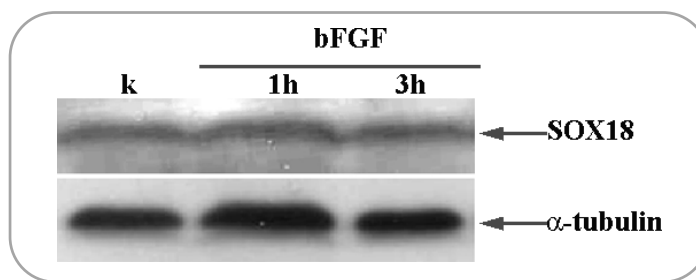
**Tabela 5.** Pregled različitih klasa molekula koji su korišćeni za tretman HUVEC ćelija u cilju praćenja njihovog uticaja na ekspresiju humanog *SOX18* gena.

KLASA MOLEKULA	VRSTA MOLEKULA KORIŠĆENA U TRETMANU	FINALNA KONCENTRACIJA U TRETMANU
FAKTORI RASTA	VEGF	100 ng/ml
	TGF-β	5 ng/ml
	bFGF	20 ng/ml
EKSTRAĆELIJSKI PROTEINI MATRIKSA	Kolagen I	10 µg/ml
	Fibronektin	3 µg/ml
CITOKINI	TNF	200 ng/ml
NSAID	Ibuprofen	10 µM
	NS398	50 µM

#### 4.9. Uticaj angiogenetskih faktora rasta na nivo SOX18 proteina u HUVEC ćelijama

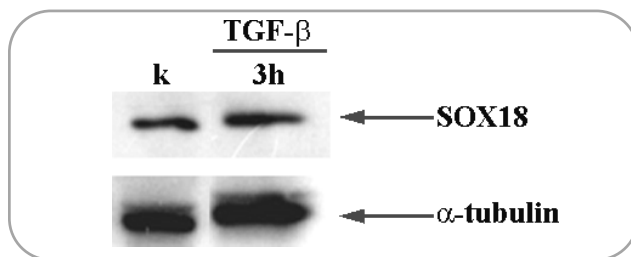
Prvi korak u ispitivanju uticaja proangiogenetskih faktora na nivo SOX18 proteina u HUVEC ćelijama je bio ispitivanje uticaja angiogenetskih faktora rasta, VEGF, bFGF i TGF-β. Posle tretmana odabranim faktorom, izolovani su ukupni ćelijski proteini, a razlika u nivou SOX18 proteina je praćena “Western blot” metodom. Iz literature je poznato da većina faktora rasta ostvari svoje dejstvo u veoma krakom vremenskom intervalu, pobuđujući signalnu kaskadu koja je odgovorna za finalni efekat. Uzimajući u obzir ovu činjenicu, većina tretmana je trajala 1h ili 3h izuzev za VEGF gde je interval bio širi (0.5h, 1h, 3h i 24 h).

Rezultati ovih tretmana predstavljeni su na slikama 31,32 i 33. Kao što se može videti na slici 31, tretman HUVEC ćelija sa fibroblastnim faktorom rasta (bFGF) u trajanju od 1 i 3h nije doveo do promena u nivou SOX18 proteina, analizirano Western blot metodom. Imunoreaktivni signali su digitalizovani i kvatifikovani pomoću ImageQuant Version 5.2 kompjuterskog programa i normalizovani su na vrednosti  $\alpha$ -tubulina. Na osnovu ove kvantifikacije zaključeno je da fibroblastni faktor rasta ne dovodi do promena u nivou SOX18 proteina.



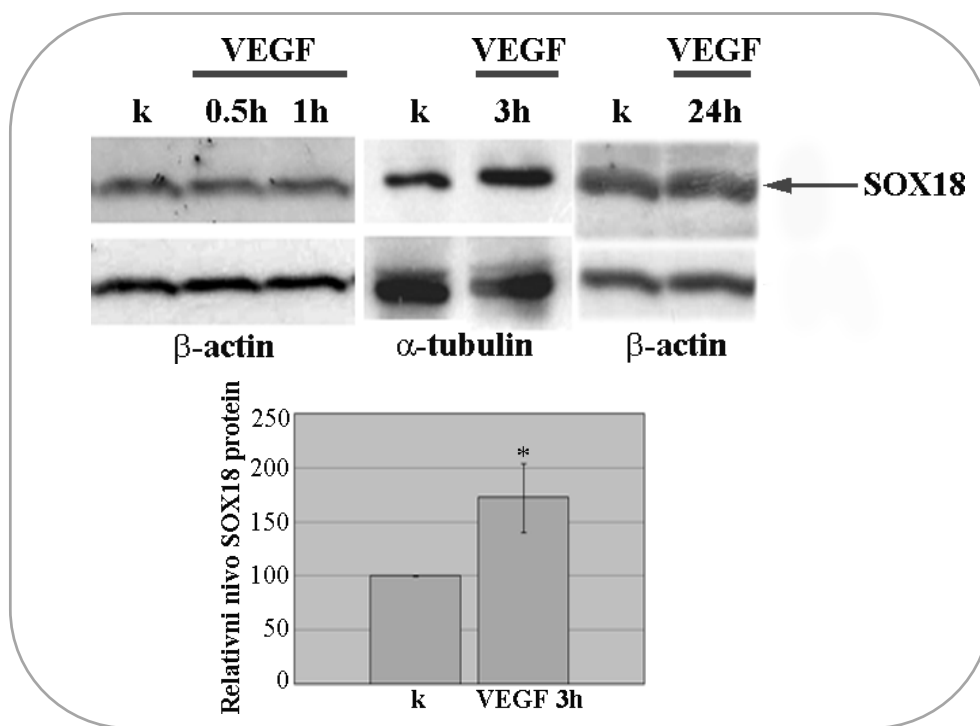
**Slika 31.** Efekat bFGF tretmana na količinu SOX18 proteina u HUVEC. k-HUVEC ćelije koje nisu tretirane. Dužina tretmana je predstavljena iznad slike, a detektovani proteini, SOX18 i  $\alpha$ -tubulin, su označeni strelicama. Jedna reprezentativna hibridizacija je prikazana, od najmanje dva nezavisna eksperimenta.

Tretman HUVEC ćelija sa TGF- $\beta$  u trajanju od 3h, takođe nije doveo do promena u nivou SOX18 proteina, što je analizirano pomoću ImageQuant Version 5.2 kompjuterskog programa. Reprezentativna hibridizacija je predstavljena na slici 32.



**Slika 32.** Efekat TGF- $\beta$  tretmana na količinu SOX18 proteina u HUVEC. k-HUVEC ćelije koje nisu tretirane. Dužina tretmana je predstavljena iznad slike, a detektovani proteini, SOX18 i  $\alpha$ -tubulin, su označeni strelicama. Jedna reprezentativna hibridizacija je prikazana, od najmanje dva nezavisna eksperimenta.

Potom je testiran uticaj vaskularnog endotelijalnog faktora rasta (VEGF) u vremenskim intervalima od 0.5, 1, 3 i 24 sata. Kao što se vidi na slici 33, tretmani u trajanju od 0.5, 1 i 24 h nisu doveli do promena u nivou SOX18 proteina, dok je tretman od 3h doveo do promena, povećavajući nivo SOX18 proteina. Na histogramu je predstavljeno da VEGF tretman od 3h dovodi do povećanja u nivou SOX18 proteina na približno 170%, što je kvantifikovano ImageQuant Version 5.2 kompjuterskim programom.



**Slika 33.** Efekat VEGF tretmana na količinu SOX18 proteina HUVEC. k-HUVEC ćelije koje nisu tretirane. Dužina tretmana je predstavljena iznad slike, a detektovani proteini, SOX18 i  $\alpha$ -tubulin, su označeni strelicama. Količina SOX18 proteina u ćelijama tretiranim 3h sa VEGF je izražena kao procenat u odnosu na količinu SOX18 u netretiranim HUVEC koja je određena za 100%. Vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost  $\pm$  SD (standard deviation) iz najmanje tri nezavisna eksperimenta. Relativne vrednosti su upoređene u Studentovom *t*-testu i vrednosti za koje je  $p \leq 0.05$  su predstavljene zvezdicom (\*).

Ovim eksperimentima je pokazano da od tri analizirana faktora rasta samo VEGF utiče na nivo SOX18 proteina u endotelijalnim ćelijama i to pri tretmanu od 3h.



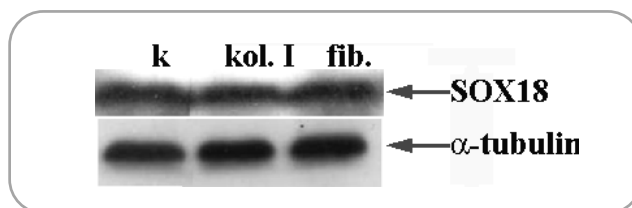
Predstavljeni rezultati ukazuju na funkcionalnu vezu *SOX18* sa jednim od najvažnih angiogenetskih signalnih puteva.

#### **4.10. Uticaj ekstraćelijskih proteina matriksa na nivo SOX18 proteina u HUVEC ćelijama**

Integrini predstavljaju ćelijske receptore odgovorne za posredovanje u interakciji između ćelija kao i u interakciji sa spoljašnjim proteinima matriksa. Te interakcije su od presudnog značaja za ćelijsku pokretljivost i predstavljaju važan mehanizam u procesu angiogeneze. U ovom radu je ispitivano da li će aktiviranje integrina, gajenjem HUVEC ćelija na podlogama obloženim odabranim proteinima matriksa, dovesti do promene u ekspresiji *SOX18*.

HUVEC ćelije su gajene u sudovima koji su predhodno obloženi kolagenom I ili fibronektinom. Na ovaj način se postiže aktivacija ćelijskih integrina  $\alpha_2\beta_1$ , odnosno  $\alpha_5\beta_1/\alpha_v\beta_3$  koji su uključeni u procese ćelijske adhezije, širenja i migracije. Pošto su ćelije zasađene na tako pripremljene podloge, čekalo se da se sve ćelije zalepe za podlogu, što je u slučaju HUVEC ćelija trajalo oko 3h. Potom su izolovani ukupni ćelijski proteini iz ćelija koje su bile u suspenziji i nemaju aktivirane integrine (te ćelije služe kao kontrola) i iz ćelija sađenih na odgovarajuće ekstraćelijske proteine matriksa.

“Western blot” metodom je analizirana količina *SOX18* proteina u ćelijama koje su gajene na odgovarajućim podlogama u odnosu na ćelije u suspenziji i nije primećena razlika u količini *SOX18* proteina pre i posle aktivacije integrinskih receptora (Slika 34). Može se zaključiti da ekspresija *SOX18* gena nije pod uticajem signalnih puteva koji se aktiviraju preko integrinskih receptora.

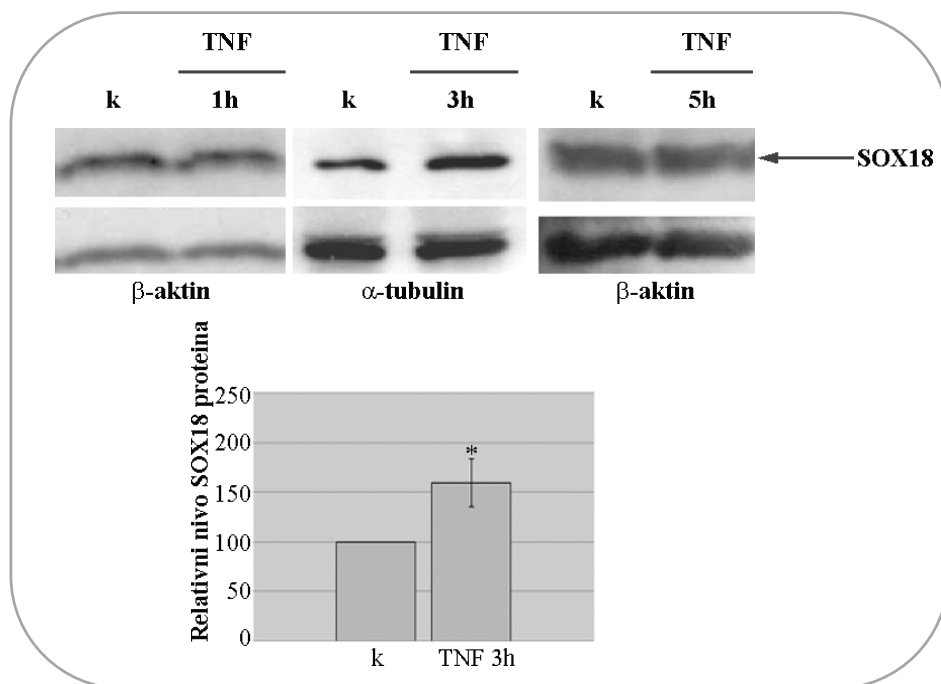


**Slika 34.** Efekat ekstraćelijskih proteina matriksa na količinu SOX18 proteina u HUVEC. k-HUVEC ćelije koje su 3h bile u suspenziji, kol I-HUVEC gajene na kolagenu I, fib- HUVEC gajene na fibronektinu. Detektovani proteini, SOX18 i  $\alpha$ -tubulin, su označeni strelicama. Jedna reprezentativna hibridizacija je prikazana, od najmanje dva nezavisna eksperimenta.

#### 4.11. Uticaj TNF-a na nivo SOX18 proteina u HUVEC ćelijama

TNF predstavlja potentan citokin koga pretežno proizvode makrofagi u inflamatornim procesima, ali je pokazano da ovaj citokin može da učestvuje i u stimulaciji angiogeneze *in vivo* (Frater-Schroder et al., 1987). Zato je, pored faktora rasta i ekstraćelijskih proteina matriksa, u analizu uključen i TNF, odnosno praćen je uticaj TNF-a na nivo SOX18 proteina u HUVEC. HUVEC ćelije su tretirane 1, 3 i 5h ovim citokinom i posle izolovanja ukupnih ćelijskih proteina, nivo SOX18 proteina je praćen “Western blot” metodom.

Kao što je predstavljeno na Slici 35, posle 3h tretmana, primećena je promena u nivou SOX18 proteina. Tačnije, došlo je do povećanja u nivou SOX18, što je kvantifikovano i predstavljeno u formi histograma. Dok tretmani od 1 i 5h nisu doveli do promene na proteinskom nivou, TNF tretman od 3h je doveo do povećanja nivoa SOX18 proteina za oko 60% (Slika 35).



**Slika 35.** Efekat TNF tretmana na količinu SOX18 proteina u HUVEC. k-HUVEC ćelije koje nisu tretirane. Dužina tretmana je predstavljena iznad slike, a detektovani proteini, SOX18 i  $\alpha$ -tubulin, su označeni strelicama. Promena na nivou SOX18 proteina posle 3h tretmana predstavljena je histogramom ispod reprezentativnog blota. Količina SOX18 proteina u ćelijama tretiranim 3h sa TNF je izražena kao procenat u odnosu na količinu SOX18 u netretiranim HUVEC koja je određena za 100%. Vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost  $\pm$  SD (standard deviation) iz najmanje tri nezavisna eksperimenta. Relativne vrednosti su upoređene u Studentovom *t*-testu i vrednosti za koje je  $p \leq 0.05$  su predstavljene zvezdicom (\*).

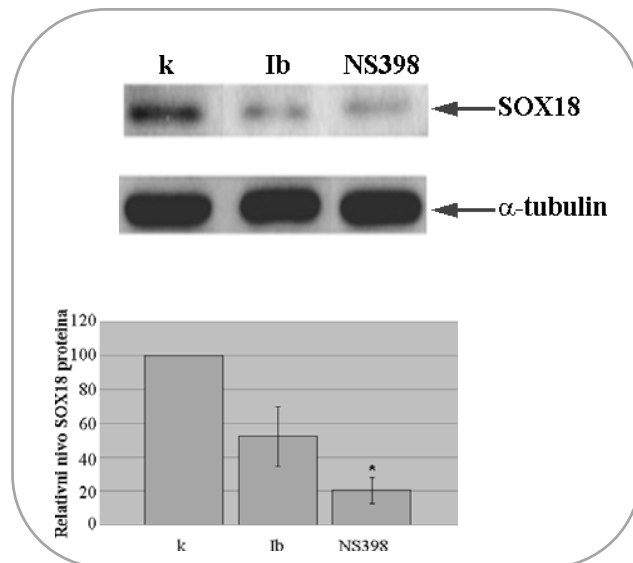
Ovim eksperimentom je pokazano da, pored VEGF-a, i TNF ima sposobnost da poveća nivo SOX18 proteina u HUVEC ćelijama.

#### 4.12. Uticaj NSAID na nivo SOX18 proteina u HUVEC ćelijama

Nesteroidni antiinflamatorni lekovi (NSAID), inhibitori ciklooksigenaze (COX), sprečavaju sintezu prostaglandina, koji imaju pozitivan uticaj na angiogenezu (Monnier et al., 2005). Stoga, može se reći da ovi lekovi imaju anti-angiogenetski potencijal. U ovom

istraživanju je ispitivan uticaj ibuprofena i NS398, odnosno efekat COX inhibicije na nivo SOX18 proteina u HUVEC ćelijama.

HUVEC ćelije su tretirane 3h sa ibuprofenom, odnosno NS398, potom su izolovani ukupni ćelijski proteini i “Western blot” metodom je praćena promena na nivou SOX18 proteina. Oba ispitivana leka su dovela do smanjenja u nivou SOX18 proteina (Slika 36).



**Slika 36.** Efekat NSAID tretmana na količinu SOX18 proteina u HUVEC. k-HUVEC ćelije koje nisu tretirane, Ib-tretman HUVEC sa ibuprofenom, NS398-tretman HUVEC sa NS398. Detektovani proteini, SOX18 i α-tubulin, su označeni strelicama. Promena na nivou SOX18 proteina posle 3h tretmana predstavljena je histogramom ispod reprezentativnog blota. Količina SOX18 proteina u ćelijama tretiranim 3h sa ibuprofenom, odnosno NS398 je izražena kao procenat u odnosu na količinu SOX18 u netretiranim HUVEC koja je određena za 100%. Vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost ± SD (standard deviation) iz najmanje dva nezavisna eksperimenta. Relativne CAT vrednosti su upoređene u Studentovom *t*-testu i vrednosti za koje je  $p \leq 0.05$  su predstavljene zvezdicom (\*).

Preciznije, tretman sa ibuprofenom je doveo do smanjenja nivoa SOX18 proteina na 50%, a sa NS398 na 25% (Slika 36, histogramski prikaz). Ovim eksperimentima je pokazano da nesteroidni antiinflamatorni lekovi, tačnije ispitivana dva NSAID, imaju potentan inhibitorski efekat na nivo SOX18 proteina u endotelijalnim ćelijama.

Na ovaj način, otvorena je mogućnost farmakološke manipulacije ekspresijom *SOX18* gena. Uzimajući u obzir ulogu ovog gena u regulaciji procesa angiogeneze, uz činjenicu da je *SOX18* već obeležen kao potencijalni target u antiangiogenetskoj terapiji tumora, ovi rezultati pružaju značajnu informaciju o mogućnostima inhibicije ekspresije *SOX18* gena.

## 5. DISKUSIJA

Humani *SOX18* gen ima važnu ulogu u regulaciji razvića dlake, vaskularnog i limfnog sistema (Downes and Koopman, 2001; James et al., 2003). U literaturi ima dosta podataka o ulozi ovog gena u specifikaciji i diferencijaciji endotelijalnih ćelija, angiogenezi, aterosklerozi i tumorskoj angiogenezi (Downes and Koopman, 2001; Young et al., 2006; Sakamoto et al., 2007). Sa druge strane, veoma malo se zna o transkripcionoj regulaciji ovog humanog gena, kao i o signalnim putevima koji kontrolišu njegovu ekspresiju.

Cilj našeg istraživanja bio je detaljna funkcionalna analiza uzvodnog 5' regulatornog regiona *SOX18* gena u cilju rasvetljavanja mehanizama koji učestvuju u njegovoj transkripcionoj regulaciji. Ranije su definisani start transkripcije gena, kao i regulatorne sekvence koje nose promotorsku aktivnost (Petrovic, 2005). Takođe, okarakterisan je minimalni promotorski region, dovoljan za regulaciju transkripcije reporter gena u funkcionalnim esejima (Petrovic, 2005). U ovom radu prikazan je nastavak proučavanja transkripcione regulacije humanog *SOX18* gena. Cilj je bio identifikacija transkripcionih faktora odgovornih za regulaciju promotorske aktivnosti, kao i za regulaciju endogene ekspresije u analiziranim model sistemima. Takođe, ispitivan je uticaj određenih angiogenetskih i anti-angiogenetskih faktora u cilju razumevanja uticaja različitih signalnih puteva na regulaciju *SOX18* ekspresije u endotelijalnim ćelijama.

U ovom radu je opisana uloga transkripcionih faktora Sp3, NF- $\kappa$ B, ZBP-89 i EGR1 u transkripcionoj regulaciji *SOX18* gena. Takođe, predstavljeni su rezultati koji pokazuju da VEGF i TNF signalni putevi menjaju nivo SOX18 proteina u endotelijalnim ćelijama, ukazujući da je ovaj transkripcioni faktor regulisan molekulima koji učestvuju u regulaciji angiogeneze. Pored toga, dva nesteroidna antiinflamatorna leka, ibuprofen i NS398, su identifikovani kao negativni regulatori pod čijim dejstvom dolazi do značajnog smanjenja u nivou SOX18 proteina u endotelijalnim ćelijama.

Predstavljeni rezultati omogućavaju bolje razumevanje regulacije ekspresije ovog humanog gena, na nivou transkripcije sa jedne strane i u okviru signalnih puteva, sa druge

strane, čija je uloga u važnim biološkim procesima učinila da bude prepoznat kao jedan od potencijalnih tarгета u terapiji bolesti povezanih sa angiogenetskim poremećajima.

### **5.1. *In silico* analiza potencijalnih vezivnih mesta za transkripcione faktore u *SOX18* promotoru i odabir transkripcionih faktora za dalju analizu**

Kompjuterska analiza promotorskog regiona pomoću MatInspector softvera pruža informaciju o tome koji transkripcioni faktori mogu da se vežu u okviru analiziranog promotorskog regiona. Tačnije, prepoznaju se konsenzusne sekvence vezivnih mesta i daje verovatnoća vezivanja za određeni transkripcioni faktor. Uslovi koje su korišćeni za ovo pretraživanje jesu da verovatnoća vezivanja za jezgro vezivnog mesta (najčešće sekvenca od četiri nukleotida) bude maksimalna, odnosno iznosi 1, a to znači da je konzerviranost nukleotida u okviru jezgra vezivnog mesta potpuna. Drugi uslov koji je zadat bio je da verovatnoća za matriks vezivnog mesta (sekvenca koja uokviruje jezgro) bude optimizovana, a to znači da program sam procenjuje okolnu sekvencu i smanjuje mogućnost lažno pozitivnih sekvenci, odnosno selektuje iz baze podataka samo one sekvence koje zaista pripadaju matriksu vezivnog mesta za određeni faktor. Pomoću ovakvog pretraživanja moguće je dobiti veoma opsežnu predikciju vezivanja transkripcionih faktora, kako opštih, tako i tkivno specifičnih.

Slična ili funkcionalno povezana vezivna mesta za transkripcione faktore program grupiše u takozvane matriks familije. Tako je pretraživanjem *SOX18* promotora identifikovan veliki broj vezivnih mesta za različite familije kao što su: Sp, EGR, ETS i Gli i druge. Svaka familija se sastoji od dva ili više članova koji prepoznaju isto vezivno mesto, a moguće je i da različite familije prepoznaju ista ili slična vezivna mesta. Stoga se odabir transkripcionih faktora koji će biti dalje analizirani ne oslanja samo na kompjutersku predikciju. Transkripcioni faktori se dodatno selektuju u zavisnosti od evolutivne očuvanosti predviđenih vezivnih mesta, biološke uloge i potencijalne zajedničke veze sa procesima u kojima analizirani gen učestvuje.

Na osnovu pomenutih parametara, odlučeno je da se proučava uloga transkripcionih faktora Sp3, NF-Y, ZBP-89 i EGR1 u transkripcionoj regulaciji humanog *SOX18* gena.

Promotor *SOX18* gena je GC-bogat, a u skladu sa tim, program MatInspector je prepoznao veliki broj vezivnih mesta za GC-vezujuće transkripcione faktore kojima pripadaju Sp3, ZBP-89 i EGR1. Takođe, vezivna mesta za ove transkripcione faktore, kao i za transkripcioni faktor NF-Y, evolutivno su očuvana između čoveka i miša (Slika 8). Već je istaknuto da evolutivna očuvanost potencijalnog vezivnog mesta ukazuje na mogući funkcionalni značaj u regulaciji transkripcije gena. Pored svega napomenutog, za ove transkripcione faktore se zna da učestvuju u procesima angiogeneze (Sp, ZBP-89 i EGR1) ili regulišu transkripciju drugih članova iz *SOX* familije (NF-Y).

## 5.2. Uloga transkripcionog faktora Sp3 u transkripcionoj regulaciji *SOX18* gena

Kompjuterska predikcija je pokazala da u okviru *SOX18* promotorskog regiona postoji više vezivnih mesta za transkripcione faktore iz Sp proteinske familije (slika 8). U ovom radu je analiziran funkcionalni značaj transkripcionog faktora Sp3 u regulaciji transkripcije *SOX18* gena. U odeljku Rezultati predstavljena je serija funkcionalnih esejaja i *in vitro* esejaja za vezivanje proteina za DNK sekvencu, gde je pokazano da se Sp3 vezuje za *SOX18* promotor u okviru regiona od -29 do +10 u odnosu na start transkripcije i ima ulogu negativnog regulatora promotorske aktivnosti *SOX18* gena. Inhibitorni efekat ostvaruje i u nativnom kontekstu, gde snižava nivo SOX18 proteina u HeLa ćelijama.

Sp familiji transkripcionih faktora (Sp1, Sp2, Sp3 i Sp4), pripadaju proteini koji prepoznaju i vezuju se za GC-bogate sekvence u promotorima gena- GGGGCGGGG (Suske, 1999). Takve sekvence su zastupljene u promotorima različitih gena, a posebno onih koji učestvuju u regulaciji ćelijskog ciklusa i razvića. U okviru pomenute proteinske familije, Sp1 i Sp3 su široko eksprimirani u većini sisarskih ćelija i najčešće se Sp1 transkripcioni faktor javlja kao pozitivni regulator genske ekspresije, a Sp3 kao represor, odnosno negativni regulator (Birnbaum et al., 1995; Chu et al., 1999). Uloga transkripcionog faktora Sp1 je ranije ispitivana u našoj laboratoriji i rezultati istraživanja su ukazali da je reč o umerenom pozitivnom regulatoru promotorske aktivnosti *SOX18* gena (Petrovic, 2005). U sisarskim ćelijama u kojima je Sp1 protein konstitutivno eksprimiran, pojačanje njegove ekspresije u funkcionalnim esejajima ne daje efekat na nivou ekspresije



gena, kao kada je u pitanju neki potentni aktivator. Naime, poznato je da je ovaj transkripcioni faktor je često uključen u regrutovanje opšte transkripcione mašinerije na promotorima bez TATA-motiva (kakav jeste promotor *SOX18* gena), te predstavlja tzv. konstitutivni aktivator (Pugh and Tjian, 1990). U ćelijama koje ga endogeno ekspimiraju, ostvaruje svoju funkciju omogućavajući bazalnu transkripciju gena. Takođe, prisustvo Sp1 na promotoru sprečava *de novo* metilaciju CpG ostrvaca, održavajući na taj način aktivnost gena (Brandeis et al., 1994). Zbog toga, uticaj egzogeno ekspimiranog Sp1 ne mora imati značajan efekat na aktivnost promotora, što su i naši ekperimenti pokazali (rezultati nisu prikazani). Sa druge strane Sp3, koji prepoznaje ista vezivna mesta, ukoliko je dodatno ekspimiran, kompetira za ta mesta i finalno dovodi do suprotnog efekta, odnosno reprimira promotorsku aktivnost (Hagen et al., 1994). Da li će se Sp3 ponašati kao aktivator ili represor Sp1-kontrolisane promotorske aktivnosti, zavisi od ćelijskog konteksta. Mi smo pokazali da transkripcioni faktor Sp3 predstavlja represor promotorske aktivnosti u HeLa i EA.hy926 ćelijama. Drugi autori su, takodje, pokazali represorsku funkciju u HeLa i insektnim SL2 ćelijama, dok je aktivatorska uloga ovog transkripcionog faktora pokazana u Ntera2-D1 ćelijama (Sjottem et al., 1996; Tsika et al., 2004; Xue et al., 2004). U endotelijalnim ćelijama, koje poseduju visok nivo oba transkripciona faktora, odnos između Sp1 i Sp3 je u korist Sp1 transkripcionog faktora, čime izgleda da se obezbeđuje ekspresija gena bitnih za održavanje endotelijalnih ćelija (Hata et al., 1998). Može se pretpostaviti da je na ovaj način regulisana i ekspresija *SOX18* gena. Takođe, u ovom radu je predstavljen veoma značajan uticaj funkcionalne kompeticije između Sp3 i EGR1 u endotelijalnim ćelijama, što će biti detaljnije opisano kasnije u tekstu. Ovde je važno istaći da postoji veliki broj drugih transkripcionih faktora koji svoje delovanje ostvaruju vezujući se za GC-bogate sekvence, a vezivna mesta za neke, kao što su ZBP-89 i EGR1, se preklapaju sa vezivnim mestima za Sp proteinsku familiju. Stoga, treba uzeti u obzir mogućnost uticaja različitih transkripcionih faktora koji kompetiraju za vezivna mesta prepoznata kao Sp vezivna mesta.

### 5.3. Uloga transkripcionog faktora ZBP-89 u transkripcionoj regulaciji *SOX18* gena

Kao što je predstavljeno u rezultatima, pored Sp3 transkripcionog faktora, represorsku ulogu u regulaciji *SOX18* promotorske aktivnosti ima i transkripcioni faktor ZBP-89. ZBP-89 se vezuje za *SOX18* promotor u istom regionu kao i Sp3 protein (-29 do +10 u odnosu na start transkripcije) i inhibira aktivnost *SOX18* promotorskog konstrukta i endogenu ekspresiju *SOX18* gena u HeLa ćelijama. Reč je o transkripcionom faktoru sa cinkanim prstićima koji pripada Kruppel-tipu transkripcionih faktora i najčešće predstavlja represor transkripcije gena (Law et al., 1998b). Vezivanje ZBP-89 za GC-bogate elemente u promotorima humanih gena za gastrin, ornitin-dekarboksilazu i vimentin, dovodi do represije njihove ekspresije (Merchant et al., 1996; Law et al., 1998b; Wieczorek et al., 2000). Svoju represorsku funkciju ZBP-89 najčešće ostvaruje kompeticijom za ista ili preklapajuća vezivna mesta sa Sp1, Sp3, Sp4, WT1 (Wilms tumor 1) i cKrox (collagen-Krüppel box) transkripcionim faktorima (Merchant et al., 1996; Moshier et al., 1996; Hasegawa et al., 1997). Nešto drugačiji mehanizam represije je uočen pri ispitivanju regulacije ekspresije gena za vimentin, gde je pokazano da ZBP-89 direktno interaguje sa Sp1 transkripcionim faktorom, iako su vezivna mesta ova dva faktora međusobno udaljena 235 bp (Zhang et al., 2003). Na taj način onemogućena je interakcija Sp1 sa transkripcionom mašinerijom čime je inhibirana transkripcija gena za vimentin.

U promotoru *SOX18* gena postoji više potencijalnih ZBP-89 vezivnih mesta, ali je upravo mesto koje je evolutivno očuvano preklapljeno sa mestom za Sp transkripcione faktore (Slika 8). Ovaj podatak još jednom upućuje na pretpostavku da Sp1 omogućava konstitutivnu ekspresiju *SOX18* gena, dok Sp3 i ZBP-89, kada su pojačano eksprimirani, u kompeticiji za ista mesta ostvaruju represiju *SOX18* promotorske aktivnosti.

ZBP-89 je uključen u regulaciju mnogih ćelijskih funkcija koje su u korelaciji i sa razvojem kancera, kao što su rast, diferencijacija, transformacija, starenje (Zhang et al., 2010). Takođe, povećava efekat nekih anti-kancer lekova, pa je razmatran kao potencijalni target u anticancer terapiji (Zhang et al., 2010). Funkcionalna veza između ZBP-89 transkripcionog faktora i *SOX18* koja je prikazana u ovom radu omogućava bolje

razumevanje događaja koji dovode do razvoja bolesti, a u vezi su sa procesima rasta i diferencijacije.

#### **5.4. Uloga transkripcionog faktora NF-Y u transkripcionoj regulaciji *SOX18* gena**

Među vezivnim mestima za transkripcione faktore, u okviru *SOX18* promotora, koji su pokazali evolutivnu očuvanost, identifikovan je i transkripcioni faktor NF-Y. Pokazano je da se NF-Y specifično vezuje za *SOX18* promotor u *in vitro* uslovima, a funkcionalnom analizom je ustanovljeno da je reč o potentnom aktivatoru *SOX18* promotorske aktivnosti.

NF-Y transkripcioni faktor prepoznaje CCAAT motiv u promotorima gena, ima sposobnost da savije DNK molekul i na taj način remodeluje lokalnu strukturu hromatina i stupa u interakcije sa nukleozomima (Ronchi et al., 1995; Romier et al., 2003). U najvećem broju promotora eukariota, CCAAT boks koga prepoznaje NF-Y smešten je 60-100 nukleotida uzvodno od starta transkripcije, međutim postoje i atipična mesta vezivanja, čak i izvan promotorskog regiona, u intronima ili udaljenim 3' ili 5' regionima gena (Testa et al., 2005). U okviru *SOX18* promotora, CCAAT boks koga prepoznaje NF-YA subjedinica, smešten je u region od +3 do +7 u odnosu na start transkripcije, što takođe predstavlja netipičnu poziciju za mesto vezivanja.

Za ovaj transkripcioni faktor je već pokazano da učestvuje u regulaciji ekspresije nekoliko gena iz *Sox/SOX* genske familije. Mišiji *Sox2* (Wiebe et al., 2000) i *Sox9* (Colter et al., 2005), kao i humani *SOX14* (Djurovic and Stevanovic, 2004) i *SOX3* (Djurovic and Stevanovic, 2004), su pozitivno regulisani sa NF-Y transkripcionim faktorom. Kao i na primerima drugih *Sox/SOX* gena, NF-Y se pokazao kao potentan aktivator promotorske aktivnosti *SOX18* gena. Činjenica da je otkriven još jedan član *SOX* genske familije čija je ekspresija pod kontrolom NF-Y proteina, ukazuje na mogućnost da članovi *Sox/SOX* genske familije imaju jedan zajednički mehanizam transkripcione regulacije koji se oslanja na NF-Y transkripcioni faktor.

### 5.5. Uloga transkripcionog faktora EGR1 u transkripcionoj regulaciji *SOX18* gena

U ovom radu posebna pažnja je posvećena analizi uticaja transkripcionog faktora EGR1 na transkripcionu regulaciju humanog *SOX18* gena. Na osnovu EMSA eseja, funkcionalnih/mutacionih analiza, i funkcionalnih analiza u nativnom kontekstu, pokazano je da je reč o značajnom aktivatoru kako *SOX18* promotorske aktivnosti, tako i same *SOX18* ekspresije u HeLa i EA.hy926 ćelijama. Takođe, pokazano je da ovaj transkripcioni faktor funkcionalno kompetira sa transkripcionim faktorom Sp3 i ima potencijal da prevaziđe inhibitoryni efekat Sp3, čime smo dodatno istakli važnu ulogu EGR1 u procesu transaktivacije *SOX18* promotorske aktivnosti.

Ranije smo istakli značaj *SOX18* u vaskularnom razviću, aterogenezi i angiogenezi. Uprkos ulozi u tako važnim biološkim procesima, dugo se ništa nije znalo o njegovoj transkripcionoj regulaciji. Kao što je već predstavljeno, prvi pokušaji da se objasni transkripciona regulacija humanog *SOX18* gena bili su usmereni na ispitivanja uloge Sp3, ZBP-89 i NF-Y transkripcionih faktora. Međutim, cilj je bio da se, pored uloge opštih transkripcionih faktora, ispita i uticaj onih transkripcionih faktora za koje postoje podaci da su uključeni u regulaciju angiogeneze. Od posebne važnosti je bilo da se uticaj odabranog faktora ispita ne samo u HeLa ćelijama, već i u endotelijalnom model sistemu. Za endotelijalni model sistem je odabrana permanentnu ćelijsku liniju EA.hy926. Reč je o hibridoma ćelijskoj liniji koja vodi poreklo od primarne endotelijalne linije HUVEC, i time pokazuje brojne karakteristike vaskularnih endotelijalnih ćelija (Edgell et al., 1983). Ova ćelijska linija se, za razliku od primarnih HUVEC ćelija, efikasnije transfektuje i stoga predstavlja bolji model sistem za funkcionalne eseje.

Pokazano je da transkripcioni faktor EGR1 ima fundamentalnu ulogu u tzv. „transkripcionom odgovoru“ endotelijalnih ćelija na angiogenetske faktore rasta čija je uloga da aktiviraju mirujuću endotelijalnu ćeliju i stimulišu njen angiogenetski potencijal (Lucerna et al., 2006). EGR1 („early growth response“) pripada EGR familiji transkripcionih faktora zajedno sa EGR2,3 i 4 i predstavlja tzv. protein ranog odgovora čija se ekspresija efikasno i brzo menja u odnosu na različite stimulse kao što su faktori rasta, hormoni i neurotransmiteri (Thiel and Cibelli, 2002). Reč je o transkripcionom faktoru sa

cinkanim-prstićima koji se vezuje za GC-bogate *cis*-aktivne promotorske elemente i kontroliše ekspresiju velikog broja gena koji su uključeni u angiogenezu i tumorogenezu kao što su faktori rasta, citokini i različiti receptori (Fahmy et al., 2003; Lucerna et al., 2003). Inače, mnogi geni su identifikovani kao potencijalni EGR1 targeti, a među njima su geni koji učestvuju u regulaciji diferencijacije i razvića, kao i različitih patofizioloških stanja (Silverman and Collins, 1999).

U rezultatima je pokazano da u okviru *SOX18* promotorskog regiona postoji veliki broj potencijalnih vezivnih mesta za transkripcioni faktor EGR1 (Slika 8). Preciznije, u okviru *SOX18* promotora identifikovano je šest potencijalnih vezivnih mesta za EGR1 transkripcioni faktor, od kojih se tri nalaze u okviru minimalnog promotorskog regiona, u vidu ponovaka koji se preklapaju sa vezivnim mestima za Sp transkripcione faktore (Slika 8). Uobičajeno je za GC-bogate promotore da poseduju veći broj vezivnih mesta za transkripcione faktore iz EGR familije i ta vezivna mesta su često preklapljenjena sa vezivnim mestima za druge transkripcione faktore sa cinkanim prstićima kao što su Sp1 i WT1 (Silverman and Collins, 1999). Naš cilj je bio da se prvo ispita vezivanje EGR1 za svako pojedinačno potencijalno vezivno mesto, u *in vitro* uslovima, a potom da se u različitim funkcionalnim esejima ispita njegov funkcionalni značaj u regulaciji transkripcije *SOX18* gena.

U *in vitro* esejima interakcije jedarnih proteina iz HeLa i EA.hy926 ćelija sa odgovarajućim DNK probama, ustanovljeno je da se ovaj transkripcioni faktor specifično vezuje samo za klaster od tri ponovljena EGR1 vezivna mesta u okviru fragmenta od -29 do +10 u odnosu na start transkripcije i nalazi se u okviru *SOX18* minimalnog promotorskog regiona. Ovaj klaster je smešten neposredno uz start transkripcije gena. Za ostala potencijalna vezivna mesta nije došlo do vezivanja EGR1 iz jedarnih proteina u *in vitro* uslovima.

Funkcionalni eseji pokazuju da povećana ekspresija EGR1 dovodi do pojačanja *SOX18* promotorske aktivnosti i u HeLa i u EA.hy926 ćelijama. Međutim, primećena je razlika u odgovoru minimalnog promotorskog regiona između dve ćelijske linije. Dok kod HeLa ćelija 5' delecija optimalnog promotora do -89 relativno u odnosu na start transkripcije nije značajno promenila odgovor fragmenta na pojačano eksprimiran EGR1,

ova delecija je kod EA.hy926 ćelija dovela do smanjenja odgovora deletiranog fragmenta u odnosu na optimalni promotorski fragment. Ovaj rezultat može da ukazuje na značaj uzvodnih sekvenci, u endotelijalnom model sistemu, za odgovor na aktivatorsku ulogu EGR1 transkripcionog faktora. Sa druge strane, mutacija EGR1 ponovaka u minimalnom promotorskom regionu značajno narušava *SOX18* promotorsku aktivnost, a to je posebno izraženo kod EA.hy926 ćelija, ukazujući na značaj ovog regulatornog regiona za EGR1-posredovanu aktivaciju *SOX18* genske transkripcije u endotelijalnom sistemu. Funkcionalna analiza je potvrdila da vezivna mesta za koja je pokazano u *in vitro* esejima da vezuju EGR1, imaju i značajnu funkcionalnu ulogu u regulaciji promotorske aktivnosti *SOX18* gena.

U vaskularnim ćelijama EGR1 je brzo i tranzijentno eksprimiran pod dejstvom različitih faktora kao što su mehanički stres (Akai et al., 1994), hipoksija (Yan et al., 1999), akutne povrede tkiva (Khachigian et al., 1996). Vezivna mesta za ovaj transkripcioni faktor su pronađena u promotorima mnogih gena koji učestvuju u procesu angiogeneze, a među njima su fibroblastni faktor rasta 2-FGF-2 (Biesiada et al., 1996), transformišući faktor rasta -TGF- $\beta$ 1 (Kim et al., 1989), interćelijski adhezioni molekul 1-ICAM-1 (Maltzman et al., 1996), VEGF receptor Flt-1 (Vidal et al., 2000), tumorski faktor nekroze  $\alpha$ -TNF $\alpha$  (Yao et al., 1997) i drugi.

Za nas je od posebnog značaja činjenica da je i za *SOX18* i za EGR1 transkripcioni faktor pokazano da imaju važnu ulogu u angiogenezi i rastu tumora (Lucerna et al., 2006; Young et al., 2006). Literaturni podaci ukazuju na sličan profil ekspresije u određenim biološkim procesima. Tačnije, *Sox18* gen miša je pojačano eksprimiran u endotelijalnim ćelijama na marginama povreda i pokazano je da on učestvuje u indukciji angiogeneze tokom zarastanja rana (Darby et al., 2001). Značajna ekspresija EGR1 je takođe primećena u endotelijalnim ćelijama tokom zarastanja rana (Khachigian et al., 1996). Pored toga, značajan nivo ekspresije oba transkripciona faktora primećen je u okviru aterosklerotskih lezija ukazujući da pomenuti faktori možda imaju ulogu u formiranju ovog patološkog stanja krvnih sudova (McCaffrey et al., 2000; Garcia-Ramirez et al., 2005).

Uloga u istim biološkim procesima dodatno ističe značaj razumevanja funkcionalne veze između pomenutih transkripcionih faktora. U ovom radu je prvi put pokazana

funkcionalna veza na nivou transkripcione regulacije *SOX18* gena. Pored pozitivnog odgovora *SOX18* promotorskih konstrukata na povećanu ekspresiju EGR1 transkripcionog faktora, pokazano je da svoju aktivatorsku ulogu ovaj protein ostvaruje i na ekspresiju *SOX18* gena u nativnom kontekstu, kako u HeLa, tako i u endotelijalnim EA.hy926 ćelijama.

Proces angiogeneze se dešava tokom normanih, fizioloških procesa u organizmu, ali ovaj proces može biti i idukovan u nekim patološkim stanjima. Angiogeneza koju idukuju faktori koje proizvode ćelije tumora dovodi do rasta tumora i njegove metastaze (Carmeliet, 2005b). Pokazano je da je *SOX18* eksprimiran tokom inicijalnih faza tumorske vaskularizacije i zbog toga je prepoznat kao potencijalni ciljni gen za razvoj anti-angiogenetske terapije (Young et al., 2006). Druge studije pružaju dokaze o važnoj ulozi EGR1 u neovaskularizaciji, tumorskoj angiogenezi i konačno rastu tumora, pa je i ovaj protein identifikovan kao potencijalni ciljni gen u anti-angiogenetskoj terapiji tumora (Fahmy et al., 2003). Zbog svega pomenutog, njihova funkcionalna veza, koja je u ovom radu predstavljena, može da pomogne u razumevanju važnih bioloških procesa u kojima ovi proteini učestvuju.

### **5.6. Uloga funkcionalne kompeticije između transkripcionih faktora EGR1 i Sp3 u transkripcionoj regulaciji *SOX18* gena**

Već smo istakli da se vezivna mesta za Sp i EGR1 transkripcione faktore duž *SOX18* promotora na većini mesta preklapaju, s obzirom da ova dva transkripciona faktora sa cinkanim prstićima prepoznaju iste ili slične GC-bogate promotorske sekvence (Slika 8). Funkcionalni eseji sa EGR1 transkripcionim faktorom pokazali su da je reč o potentnom stimulatoru *SOX18* promotorske aktivnosti, dok se za Sp3 pokazalo da je reč o inhibitoru. Stoga, cilj je bio da se analizira da li u funkcionalnim esejima ova dva transkripciona faktora zaista kompetiraju za ista vezivna mesta u *SOX18* promotoru. S obzirom da je reč o transkripcionim faktorima koji ostvaruju različito dejstvo na aktivnost *SOX18* promotora, cilj je bio da se u funkcionalnim esejima prati kompeticija između inhibirorne aktivnosti

Sp3 i aktivatorke funkcije EGR1. Rezultat funkcionalnih eseja bio je da EGR1 prevazilazi inhibitorni efekat Sp3 transkripcionog faktora zadržavajući svoju aktivatorsku funkciju.

Transkripcioni faktori Sp1 i Sp3 su konstitutivno eksprimirani u većini sisarskih ćelija i pokazuju slični afinitet za isto GC-bogato vezivno mesto (Hagen et al., 1992). Za razliku od njih sinteza EGR1 je skoro zanemarljiva u nestimulisanim ćelijama, dok različiti spoljašnji signali ne dovedu do tranzijentnog povećanja njegove ekspresije. Pokazano je da su u mirujućim vaskularnim endotelijalnim ćelijama GC-bogati promotorski elementi gena za PDGF-A lanac (eng. platelet-derived growth factor A) okupirani Sp1 transkripcionim faktorom. Međutim, stimulacija ovih ćelija forbol estrom pokreće biosintezu EGR1 transkripcionog faktora, koji kompetira sa Sp1, istiskuje ga sa promotora i vezuje se za njegova vezivna mesta (Khachigian et al., 1995). Preklapajuća Sp1/EGR1 vezivna mesta su prijavljena i za promotore drugih gena kao što su PDGF-B lanac (eng. platelet-derived growth factor B), TF (eng. tissue factor), ABCA2 transporter (eng. ATP-binding cassette sub-family A member 2),  $\beta$ -adrenergični receptor (Cui et al., 1996; Khachigian et al., 1996; Davis et al., 2003). Kod PDGF-B gena, Sp1 održava bazalni nivo transkripcije, dok EGR1 funkcioniše kao aktivator, stimulisan vaskularnom povredom (Khachigian et al., 1996).

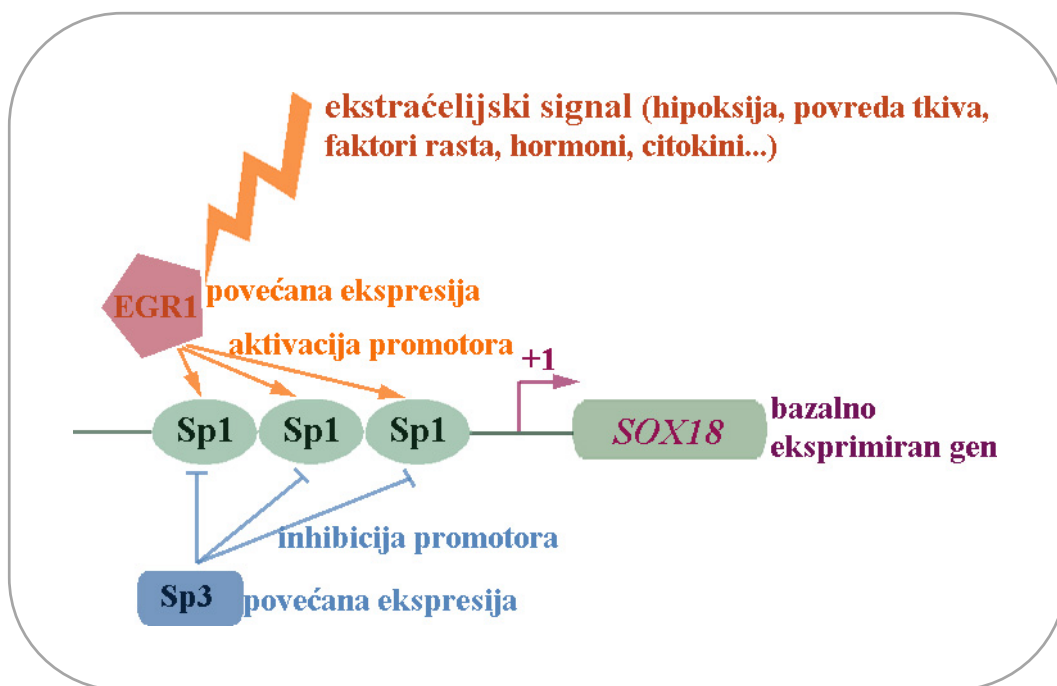
U ovom radu smo pokazali da povećana ekspresija EGR1 uspešno prevazilazi inhibitorni efekat Sp3 na promotorsku aktivnost *SOX18* gena. Stoga, možemo pretpostaviti da kompeticija između Sp3 i EGR1 ima značajnu ulogu u regulaciji ekspresije *SOX18* gena. Dalje, moguće je da povećana ili smanjena ekspresija ovog humanog gena zavisi upravo od količine pomenutih proteina u nukleusu, a sve pod uticajem različitih stimulusa. Već smo istakli da se ekspresija EGR1, u endotelijalnim ćelijama, značajno povećava pod dejstvom različitih stimulusa kao što su hipoksija, povrede tkiva, mehanički stres (Akai et al., 1994; Khachigian et al., 1996; Yan et al., 1999). Takođe, povrede tkiva povećavaju i ekspresiju *SOX18* gena u endotelijalnim ćelijama. Postoji mogućnost da se je u mirujućim endotelijalnim ćelijama bazalna ekspresija *SOX18* gena pod kontrolom GC-vezujućeg transkripcionog faktora iz Sp-proteinske familije, najverovatnije pod kontrolom konstitutivno eksprimiranog transkripcionog faktora Sp1. Posle stimulacije spoljnim signalima koji promovišu angiogenetski potencijal ćelija, EGR1 preuzima ulogu potentnog trans-aktivatora *SOX18* transkripcije. Ovde je važno istaći da su slični mehanizmi



transkripcione regulacije već opisani u vaskularnim sistemima (Silverman and Collins, 1999).

Kompeticija za ista ili bliska vezivna mesta u promotorima gena između članova Sp i EGR1 proteinskih familija, očigledno ima regulatorni značaj. Rezultat kompeticije zavisi od stanja ćelije, odnosno fizioloških potreba u datom sistemu, jer promena u količini ovih transkripcionih faktora u nukleusu zavisi od većeg broja različitih spoljnih signala.

Transkripcioni faktor Sp1 se vezuje u okviru *SOX18* promotora *in vitro* (rezultati nisu prikazani), međutim, kao što smo već napomenuli njegova uloga je najverovatnije ograničena na održavanje bazalnog nivoa transkripcije. Sa druge strane, Sp3 i EGR1, u uslovima povećane ekspresije, ostvaruju svoje inhibitoryno, odnosno, aktivatorsko dejstvo. Na Slici 37 je prikazan predloženi model regulacije ekspresije humanog *SOX18* gena, koji se zasniva na kompeticiji između ove dve proteinske familije za vezivanje za preklapajuća vezivna mesta u minimalnom promotorskom regionu.



**Slika 37.** Shematski prikaz modela regulacije *SOX18* gena preko preklapajućih vezivnih mesta za Sp/EGR1 transkripcione faktore. Bazalni nivo ekspresije omogućen je Sp1 transkripcionom faktorom koji se vezuje za svoja mesta u proksimalnom promotoru i regrutuje opštu transkripcionu mašineriju. Pod dejstvom različitih

spoljnih signala dolazi do povećanja ekspresije transkripcionog faktora EGR1, koji kompetira za GC-bogata vezivna mesta, istiskuje Sp1 i stimuliše ekspresiju *SOX18* gena. Suprotno, promene u stanju ćelije, dovode do povećanja Sp3 transkripcionog faktora, koji kompetira za za GC-bogata vezivna mesta, istiskuje Sp1 i inhibira ekspresiju *SOX18* gena.

### **5.7. Značaj ispitivanja uloge angiogenetskih faktora i farmakoloških inhibitora angiogeneze na *SOX18* ekspresiju**

Angiogeneza, proces formiranja novih krvnih sudova, predstavlja fundamentalni biološki proces neophodan za reprodukciju, embrionalno razviće, zarastanje povreda, ali je i ključni proces koji obezbeđuje progresiju tumora (Folkman and Shing, 1992; Folkman and D'Amore, 1996; Hanahan and Folkman, 1996; Risau, 1997; Stolt et al., 2006). Ispitivanje molekularne osnove regulacije ovog procesa podrazumeva, između ostalog, i otkrivanje uloge transkripcionih faktora koji će u daljoj konsekvenci regulisati ključne gene uključene u kontrolu angiogenetskih procesa. Ekspresija transkripcionih faktora je modulirana ekstraćelijskim signalima, a potom ti transkripcioni faktori regulišu ekspresiju finalnih efektoru signalne kaskade. Zbog toga, transkripcioni faktori predstavljaju veoma interesantne potencijalne targete u terapiji različitih bolesti, u ovom slučaju u anti-angiogenetskoj terapiji. Podaci o ulozi određenih transkripcionih faktora u regulaciji vaskulogeneze i angiogeneze se neprekidno uvećavaju. Zna se da ulogu u ovom procesu imaju: HIF (eng. hypoxia-inducible factor), HOX D3 (eng. homeobox protein D3), ETS-1 (eng. erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 1), MEF2C (eng. myocyte-specific enhancer factor 2C), PPAR $\gamma$  (eng. peroxisome proliferator-activated receptor) i drugi (Sato, 2000). Istovremeno, veliki broj signalnih puteva je uključen u procese regulacije angiogeneze, signalni putevi koje pokreću faktori rasta (među njima najpotentniji je VEGF), membranski proteini (integrini, efrini i kadherini), inflamatorni molekuli, endogeni inhibitori. Stoga, za potpuno razumevanje regulacije angiogeneze, neophodno je razumeti i signalne puteve i transkripcionu regulaciju, kao i vezu između ova dva procesa. Zbog toga, jedan od ciljeva našeg istraživanja je i bilo rasvetljavanje uloge nekoliko važnih angiogenetskih signalnih puteva na ekspresiju *SOX18* gena u endotelijalnim ćelijama.

### 5.8. Uticaj faktora rasta VEGF na nivo SOX18 proteina u HUVEC ćelijama

Prva grupa molekula čiji smo uticaj na SOX18 ekspresiju ispitivali bili su faktori rasta, koji predstavljaju široku grupu molekula koji stimulišu rast, proliferaciju i diferencijaciju ćelija. VEGF, bFGF (poznat i kao FGF-2), i TGF- $\beta$  imaju, u literaturi široko opisanu, ulogu u angiogenezi (Massague et al., 2000; Presta et al., 2005; Otrrock et al., 2007). Među njima, VEGF predstavlja glavni i najpotentniji regulator angiogeneze, čija je ekspresija, takođe, u korelaciji sa vaskularizacijom tumora i njihovom progresijom (Ferrara, 2004). Inhibicija VEGF-a dovodi do smanjenja rasta tumora putem redukcije vaskularizacije, a anti-VEGF terapija se trenutno koristi u onkologiji za tretmane metastatskih kancera (Ferrara et al., 2004).

Naši rezultati pokazuju da, od svih analiziranih faktora rasta, samo VEGF dovodi do promena, tako što dovodi do povećanja nivoa SOX18 proteina za oko 70%, posle tretmana HUVEC ćelija od 3 h (Slika 17).

Brzina odgovora na stimulaciju VEGF faktorom varira, ali podaci ukazuje da oko 45% gena biva idukovano u okviru prvih 2-6 h od početka tretmana (Abe and Sato, 2001). Ovako brzi odgovor upravo i čini VEGF tako efikasnim aktivatorom angiogenetskog procesa.

Ekspresija *Sox18* gena miša, ispitivana *in vivo*, počinje posle ekspresije gena za *Vegf*, a otprilike u isto vreme kada ekspresija za *Vegf* receptor *Flk1*, odnosno pre ekspresije za drugi receptor *Flt1*, u mišijem embrionu (Dumont et al., 1995; Pennisi et al., 2000b). Isti profil ekspresije je uočen i kod adulta u okviru povređenog tkiva, odnosno tokom zarastanja rana (Darby et al., 2001). Ovi podaci ukazuju da se ekspresija mišijeg *Sox18* dešava nizvodno od *Vegf*, odnosno otvara mogućnost da je *Sox18* target *Vegf* signalne kaskade. U ovom radu je pokazano da je humani SOX18 pod uticajem VEGF signalnog puta *in vitro*, što je od velikog funkcionalnog značaja uzimajući u obzir da oba proteina predstavljaju medijatore u procesima angiogeneze, uključujući proliferaciju, migraciju i formiranje tuba od strane endotelijalnih ćelija (Darby et al., 2001; Young et al., 2006; Otrrock et al., 2007).

Da je nivo SOX18 transkripcionog faktora pod pozitivnim uticajem VEGF signalne kaskade, pokazano je na proteinskom nivou u ovom radu. Pored toga, ranije je i na

transkripcionom nivou pokazano da VEGF indukuje ekspresiju *SOX18* gena posle dva sata tretmana (Garcia-Ramirez et al., 2005). Međutim, na koji način se ostvaruje ovaj aktivatorski uticaj ostaje nepoznato. S obzirom da je reč o veoma kompleksnom signalnom putu, bilo koji intermedijerni signalni molekul može transdukovati signal koji će finalno dovesti do povećanja *SOX18* transkripcije. Među mnogim transkripcionim faktorima koji su idukovani od strane VEGF signalnog puta, postoje podaci da se ekspresija EGR1 naglo povećava već u prvih 30 minuta po tretmanu VEGF proteinom (Abe and Sato, 2001). Takođe, VEGF stimuliše akumulaciju EGR1 u nukleusu već u prvom satu tretmana, omogućavajući da EGR1 brzo ostvari svoje dejstvo (Sassa et al., 2002). Ova funkcionalna veza između VEGF i EGR1 je veoma interesantna, s obzirom da je u ovom radu pokazano da je EGR1 pozitivni regulator *SOX18* ekspresije. Zbog toga, možemo pretpostaviti da je EGR1 jedan od faktora koji omogućava aktivaciju *SOX18* ekspresije pod dejstvom VEGF-a tokom angiogeneze. Bilo bi veoma interesantno ispitati ovu funkcionalnu vezu, čime bi se dodatno razjasnila transkripciona regulacija *SOX18* gena u vaskularnom endotelu.

### **5.9. Uticaj citokina TNF na nivo SOX18 proteina u HUVEC ćelijama**

Tumorski faktor nekroze predstavlja inflamatorni citokin koji može da idukuje ćelijsku smrt, inhibira tumorogenezu i replikaciju virusa (Zhao et al., 2001; Williams, 2008). Pored toga, postoje podaci koji govore o njegovoj ulozi u procesu angiogeneze. Pokazano je da TNF ima sposobnost da stimuliše angiogenezu *in vivo* (Frater-Schroder et al., 1987) i formiranje tuba od strane endotelijalnih ćelija *in vitro* (Leibovich et al., 1987). U ovom radu je pokazano da TNF ima pozitivan uticaj na nivo SOX18 proteina u HUVEC ćelijama, povećavajući nivo ovog proteina za oko 60%.

Na transkripcionom nivou ova regulacija može biti ostvarena putem transkripcionih faktora koji reaguju na TNF signalni put. Ranije je pokazano da TNF ima sposobnost da inhibira vezivanje Sp1 i Sp3 za njihova konsezusna vezivna mesta u promotorima gena (Denson et al., 2001). Ovo može uticati na *SOX18* ekspresiju na dva načina. Prvo, sprečavanjem vezivanja Sp1 za promotorske sekvence, omogućava se da se za te sekvence vežu aktivatrski transkripcioni faktori (kao što je pokazano to može biti EGR1), koji će

umesto bazalnog nivoa ekspresije dovesti do povećanja ekspresije *SOX18* gena. Ovde je važno napomenuti da literaturni podaci ukazuju da je ekspresija transkripcionog faktora EGR1, takođe stimulisana TNF-om (Goetze et al., 2001). Drugo, *SOX18* ekspresija indukovana TNF-om, može delom biti rezultat sprečavanja vezivanja transkripcionog faktora Sp3, za koji je pokazano da deluje inhibitory na *SOX18* ekspresiju. Naravno, i drugi transkripcioni faktori, koji nisu ispitivani u ovom radu, mogu posredovati u TNF-posredovanoj indukciji *SOX18* genske ekspresije.

Poznato je da ukoliko ne dovodi do ćelijske smrti, TNF može obezbediti preživljavanje ćelija preko aktivacije transkripcionog faktora NF- $\kappa$ B, oslobađajući ga iz neaktivnog citoplazmatskog kompleksa (Hayden and Ghosh, 2004). *In silico* analiza *SOX18* promotorskog regiona, ukazala je na nekoliko potencijalnih vezivnih mesta za ovaj transkripcioni faktor. Zbog toga bi bilo interesantno ispitati da li identifikovana vezivna mesta imaju funkcionalni značaj za TNF-posredovanu idukciju *SOX18* ekspresije.

### **5.10. Uticaj NSAID na nivo SOX18 proteina u HUVEC ćelijama**

Nesteroidni antiinflamatorni lekovi (NSAID) inhibiraju dve izoforme enzima ciklooksigenaze, COX-1 i COX-2, koji učestvuju u biosintetskom putu prostanglandina. Prostanglandini predstavljaju potentne pro-inflamatorne molekule koji imaju sposobnost da aktiviraju angiogenezu *in vivo* i *in vitro* (Form and Auerbach, 1983; Cheng et al., 1998; Dubois et al., 1998). Zbog toga NSAID, pored antiinflamatornog dejstva koji primarno ostvaruju, imaju i dejstvo anti-angiogenetskih lekova. U ovom radu smo ispitivali uticaj ibuprofena, nespecifičnog COX1/2 inhibitora i NS398, specifičnog COX-2 inhibitora, na nivo SOX18 proteina u HUVEC. Predstavljeni rezultati pokazuju da je reč o dva potentna inhibitora SOX18 proteinske ekspresije u endotelijalnim ćelijama.

Mehanizam dejstva NSAID oslanja se na veliki broj različitih procesa. Oni uključuju: aktivaciju proteinskih kinaza mitogenima, suprimiranje proteina ćelijskog ciklusa, inhibiranje EGR1 ekspresije, inhibiciju proliferacije i migracije endotelijalnih ćelija i indukciju apoptoze endotelijalnih ćelija (Dormond et al., 2001; Tarnawski and Jones, 2003). S obzirom da je pokazano da NSAID inhibiraju aktivaciju EGR1 gena u

mikrovaskularnim endotelijalnim ćelijama (Szabo et al., 2001), može se pretpostaviti da je ova inhibicija od funkcionalnog značaja za redukciju nivoa SOX18 proteina.

Iako su NSAID lekovi sa pleotropnim dejstvom, činjenica da značajno smanjuju nivo SOX18 proteina u endotelijalnim ćelijama otvara mogućnost farmakološke manipulacije ekspresijom ovog gena. Anti-angiogenetska terapija svoje efikasno dejstvo može ostvariti najviše ukoliko je visoko specifična, odnosno usmerena ka supresiji molekula koji angiogenetski potencijal ostvaruju u aktiviranom endotelu, i koji ne utiču na funkciju drugih, važnih biohemijskih procesa. Transkripcioni faktori, u tom smislu, predstavljaju mnogo bolje potencijalne targete od bilo kog drugog uzvodnog molekula iz signalne kaskade (Xie et al., 2006). Već smo istakli da je humani *SOX18* gen, zbog svoje uloge u inicijalnim fazama tumorske vaskularizacije, već prepoznat kao potencijalni ciljni gen u anti-angiogenetskoj terapiji (Young et al., 2006). Uzimajući u obzir da rast i progresija tumora zavise od nutrijenata kojima se snabdeva putem povećanja prokrvljenosti, a takođe duž novonastalih krvnih sudova tumorske ćelije putuju dovodeći do metastaza, razumljivo je da se veliki broj istraživanja bavi ispitivanjima anti-angiogenetskih strategija u terapiji kancera (Feldman and Libutti, 2000).

### **5.11. *SOX18* kao potencijalni target gen u terapiji vaskularnih bolesti i kancera**

Formiranje novih krvnih sudova od već postojećih, odnosno proces angiogeneze, predstavlja normalan fiziološki odgovor organizma u stanjima kao što su zarastanje rana, reparacija endometrijuma ili formiranje placentе. Međutim, ovaj proces može biti presudan u metastatskom širenju tumora, s obzirom da neovaskularizacija obezbeđuje njihov rast i progresiju. Angiogeneza indukovana proangiogenetskim faktorima koje proizvode ćelije kancera (kao što su VEGF i bFGF), je prepoznata kao kritičan momenat za rast i progresiju solidnih tumora (Tortora et al., 2004; Andreasson and Carlsson, 2005; Carmeliet, 2005b; Sun and Schiller, 2007). U odsustvu tumorske angiogeneze, tumor ulazi u stanje tzv. „uspavanosti“, koje karakteriše balans između ćelijske proliferacije i apoptoze, a tumorska masa se stabilise na veličinu od nekoliko kubnih milimetara (Holmgren et al., 1995).

Anti-angiogenetska terapija se u prekliničkim ispitivanjima pokazala kao efikasna strategija za izazivanje tumorske regresije. U kliničke studije je ušlo mnoštvo anti-angiogenetskih agenasa, ali većina nije dala zadovoljavajući rezultat kod pacijenata, posebno ukoliko uporedimo sa rezultatima dobijenim na modelu miša. Za samo nekoliko, kao što su TNF- $\alpha$  i Avastin, su potvrđena antiangiogenetska dejstva i ovi agensi se koriste u terapiji kancera kod čoveka (Ruegg et al., 2006; Vokes et al., 2006). Uzimajući u obzir ulogu SOXF proteina u kardiovaskularnom razviću i adultnoj neovaskularizaciji, ovi transkripcioni faktori potencijalno predstavljaju ciljne molekule koji mogu poslužiti za modulaciju angiogeneze ili limfangiogeneze, kada su ovi procesi stimulisani posebnim stanjima kao što je rast tumora i metastaze.

Young i saradnici su uspešno pokazali da alografi tumora mnogo sporije rastu u mutantnim miševima Ra<sup>op</sup> koji eksprimiraju dominantno negativnu formu SOX18 proteina, u poređenju sa wild type miševima (Young et al., 2006). Takođe, HUVEC ćelije transfektovane sa dominantno negativnom formom SOX18 proteina pokazuju izraženo umanjenju sposobnost formiranja tuba (krvnog suda), u poređenju sa adekvatnom kontrolom (Young et al., 2006). Treba napomenuti da istraživanja ukazuju da gubitak Sox18 funkcije kod miševa ne ukazuje na promene u vaskularnom fenotipu, dok Sox17<sup>(+/-)</sup> - Sox18<sup>(-/-)</sup> dupli mutant, pokazuje smanjenu neovaskularizaciju (Pennisi et al., 2000a; Matsui et al., 2006). I *in vitro* angiogenetski eseji pokazuju da su Sox17<sup>(+/-)</sup> - Sox18<sup>(-/-)</sup> endotelijalne ćelije neefikasne u širenju i remodelovanju vaskulature (Matsui et al., 2006). Ovi podaci nedvosmisleno ukazuju da SOX17 i SOX18 proteini pokazuju funkcionalnu redundanciju, kao i da se SOX18 Ra<sup>op</sup> mutant ponaša kao dominantno negativni protein koji onemogućava SOX17 i SOX18 wt proteinima da ostvare svoju funkciju.

U skladu sa navedenim podacima, još 2006. godine su Young i saradnici istakli da SOX18 gen može biti potencijalni target u anti-angiogenetskoj terapiji tumora (Young et al., 2006). Dve godine kasnije Min Luo sa saradnicima predstavlja rad koji govori o mogućnostima inhibicije tumorske angiogeneze upotrebom dominantno negativne forme SOX18 proteina (Luo et al., 2008). Osnova ideje leži u činjenici da takav protein zauzima svoje vezivno mesto na promotorima ciljnih gena, ali zbog nedostatka transaktivacionog domena ne može da ostvari svoju funkciju u regulaciji njihove transkripcije. Istovremeno,

sprečava da drugi proteini iz SOXF grupe, ostvare svoju funkciju preko istih vezivnih mesta. Osnovni tehnički problem predstavlja nemogućnost SOX18 mutantnog proteina da prođe ćelijsku membranu i stigne u nukleus gde bi trebalo da ostvari svoju funkciju. Autori, međuti, pronalaze rešenje korišćenjem rekombinantnog, ćelijski permeabilnog SOX18 mutanta, konstruisanog tako da nosi domen za proteinsku transdukciju od HIV TAT i HSV-1 VP22, koji bi se uspešno koristio za proteinsku transdukciju. (Luo et al., 2008). Ovo nije nov pristup, naprotiv, već postoje radovi koji predlazu primenu proteinske transdukcije kao nove perspektive u terapiji bolesti (Noguchi and Matsumoto, 2006).

Imunohistohemijskim pristupom je detektovana povećana ekspresija *SOX18* gena u uznapredovalim aterosklerotskim lezijama, i ta ekspresija kolokalizuje sa markerima ćelijske proliferacije (Garcia-Ramirez et al., 2005). Rezultati ove studije ukazuju da bi SOX18 protein mogao igrati važnu ulogu u aterogenezi u onim procesima koji obuhvataju ćelijski rast, kao što je proces zadebljanja zida arterija i neovaskularizacija. Takođe, Hosking i saradnici su pokazali da SOX18 reguliše ekspresiju VCAM-1 gena, adhezionog molekula koji je pojačano eksprimiran u aterosklerotskim lezijama kod individua koje pate od hiperholesterolemije (Hosking et al., 2004). Stoga, Garcia-Ramirez i saradnici ukazuju na mogućnost da *SOX18* potencijalno može biti ciljani gen u terapiji koja bi sprečila progresiju ateroskleroze (Garcia-Ramirez et al., 2005).

Treba napomenuti da se promene u regulaciji procesa angiogeneze dešavaju i kao posledica nekih drugih bolesti. Tako su mnoge kliničke manifestacije dijabetesa tipa II posledica nepravilnosti u regulaciji procesa angiogeneze i posebno pogađaju organe kao što su bubrezi ili retina (Martin et al., 2003). Dijabetičari često imaju i problem sa zarastanjem rana, proces u kome *SOX18* gena ima važnu ulogu, te je ovo oboljenje takođe kandidat za razmatranje novih terapijskih pristupa koji uključuju kontrolu angiogeneze.

Zbog svega navedenog, razumevanje složenih mehanizama koji učestvuju u regulaciji ekspresije humanog *SOX18* gena, omogućiće bolje razumevanje važnih fizioloških i patofizioloških procesa u kojima ovaj transkripcioni faktor aktivno učestvuje.



## 6. ZAKLJUČCI

U ovoj tezi su prikazana ispitivanja kontrolnih mehanizama uključenih u regulaciju ekspresije *SOX18* gena. Regulacija *SOX18* ekspresije ispitivana je u tri različita model sistema: tumorskoj ćelijskoj liniji HeLa, hibridoma ćelijskoj liniji EA.hy926 i primarnim endotelijalnim ćelijama HUVEC. Analizirana je uloga odabranih transkripcionih faktora u regulaciji transkripcije *SOX18* gena i otkriveni su i pozitivni i negativni regulatori *SOX18* promotorske aktivnosti i ekspresije *SOX18* gena u nativnom kontekstu. Takođe, ispitivan je uticaj proangiogenetskih signalnih molekula, kao i dejstvo nesteroidnih antiinflamatornih lekova, na nivo SOX18 proteina u HUVEC ćelijama. Rezultati ovih ispitivanja su ukazali koji signalni putevi, uljučeni u kontrolu angiogeneze, mogu uticati na ekspresiju *SOX18* gena u endotelijalnim ćelijama. Na osnovu rezultata prikazanih u ovoj tezi mogu se izvesti sledeći zaključci:

1. *In silico* analizom potencijalnih vezivnih mesta za transkripcione faktore u okviru optimalnog promotora *SOX18* gena i poređenjem sa ortologom sekvencom miša, identifikovana su potencijalna vezivna mesta za transkripcione faktore Sp proteinske familije, EGR1, ZBP-89 i NF-Y, koja su evolutivno očuvana i u poziciji i po nukleotidnom sastavu.
2. Analizom interakcija jedarnih proteina izolovanih iz HeLa ćelija sa DNK probom poreklom iz minimalnog promotora *SOX18* gena i korišćenjem specifičnih antitela, pokazano je da se Sp3, ZBP-89, NF-Y i EGR1 specifično vezuju za konsenzusna mesta u okviru *SOX18* promotora. Za transkripcioni faktor EGR1 je potvrđeno da se specifično vezuje i u slučaju kada jedarni proteini vode poreklo iz endotelijalnih ćelija, EA.hy926, ukazujući da i u endotelijalnom model sistemu ovaj transkripcioni faktor može imati važnu ulogu u regulaciji ekspresije *SOX18* gena.
3. Funcionalnom analizom je pokazano da povećana ekspresija transkripcionih faktora Sp3 i ZBP-89 dovodi do smanjenja aktivnosti *SOX18* promotor-reporter konstrukta u HeLa ćelijama, ukazujući da se radi o negativnim regulatorima aktivnosti *SOX18* promotora.

Takođe, povećana ekspresija ovih transkripcionih faktora dovela je do smanjenja u nivou SOX18 proteina u HeLa ćelijama, potvrđujući njihov represorski uticaj na SOX18 ekspresiju i u nativnom kontekstu. Na ovaj način identifikovana su dva negativna regulatora ekspresije *SOX18* gena.

4. Funcionalnom analizom je pokazano da povećana ekspresija transkripcionog faktora NF-Y dovodi do povećanja aktivnosti *SOX18* promotor-reporter konstrukta u HeLa ćelijama. Dalje, pokazano je da povećana ekspresija transkripcionog faktora EGR1 dovodi do povećanja aktivnosti *SOX18* promotor-reporter konstrukta u HeLa i u EA.hy926 ćelijama. Takođe, povećana ekspresija ovih transkripcionih faktora dovodi do povećanja nivoa SOX18 proteina u ispitivanim ćelijskim linijama, potvrđujući aktivatorski uticaj na SOX18 ekspresiju i u nativnom kontekstu. Na ovaj način identifikovana su dva pozitivna regulatora ekspresije *SOX18* gena.

5. Mutacije u vezivnim mestima za EGR1 transkripcioni faktor dovela je do značajnog smanjenja promotorske aktivnosti *SOX18* promotor-reporter konstrukta, a njihov uticaj na aktivnost promotora je bio izraženiji u endotelijalnom model sistemu. Ovi rezultati ukazuju da mehanizam regulacije *SOX18* ekspresije koji se oslanja na transkripcioni faktor EGR1, ima veći uticaj u endotelijalnim ćelijama i verovatno predstavlja glavni vid regulacije u ćelijama koje karakteriše brz odgovor na različite spoljašnje stimulse.

6. Tretmani HUVEC ćelija proangiogenetskim signalnim molekulima uključujući različite faktore rasta, ekstraćelijske proteine matriksa i citokine, pokazali su da VEGF i TNF povećavaju nivo SOX18 proteina u HUVEC ćelijama. Na ovaj način je, prvi put, pokazana funkcionalna veza između transkripcionog faktora SOX18 i signalnih molekula VEGF, odnosno TNF, koji imaju važnu ulogu u regulaciji procesa angiogeneze.

7. Testiranjem uticaja nesteroidnih antiinflamatornih lekova na nivo SOX18 proteina, ustanovljeno je da su ibuprofen i NS398 potentni inhibitori koji značajno snižavaju nivo SOX18 proteina u HUVEC ćelijama, što predstavlja prve identifikovane farmakološke inhibitore ekspresije *SOX18* gena.

## LITERATURA

- Abe, M., Sato, Y., 2001. cDNA microarray analysis of the gene expression profile of VEGF-activated human umbilical vein endothelial cells. *Angiogenesis* 4, 289-298.
- Aida, M., Chen, Y., Nakajima, K., et al., 2006. Transcriptional pausing caused by NELF plays a dual role in regulating immediate-early expression of the junB gene. *Mol Cell Biol* 26, 6094-6104.
- Akai, Y., Homma, T., Burns, K.D., et al., 1994. Mechanical stretch/relaxation of cultured rat mesangial cells induces protooncogenes and cyclooxygenase. *Am J Physiol* 267, C482-490.
- Alberts, B., *Molecular biology of the cell*: 1994 New York, Garland Pub., xliii, 1294, [1267] p. p.
- Andreasson, P., Carlsson, R., 2005. Targeting angiogenesis with antibodies for the treatment of cancer. *IDrugs* 8, 730-733.
- Arnone, M.I., Davidson, E.H., 1997. The hardwiring of development: organization and function of genomic regulatory systems. *Development* 124, 1851-1864.
- Arnosti, D.N., Kulkarni, M.M., 2005. Transcriptional enhancers: Intelligent enhanceosomes or flexible billboards? *J Cell Biochem* 94, 890-898.
- Avilion, A.A., Nicolis, S.K., Pevny, L.H., et al., 2003. Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. *Genes Dev* 17, 126-140.
- Azhikina, T., Kozlova, A., Skvortsov, T., et al., 2011. Heterogeneity and degree of TIMP4, GATA4, SOX18, and EGFL7 gene promoter methylation in non-small cell lung cancer and surrounding tissues. *Cancer Genet* 204, 492-500.
- Azuma, T., Seki, N., Yoshikawa, T., et al., 2000. cDNA cloning, tissue expression, and chromosome mapping of human homolog of SOX18. *J Hum Genet* 45, 192-195.
- Bai, L., Logsdon, C., Merchant, J.L., 2002. Regulation of epithelial cell growth by ZBP-89: potential relevance in pancreatic cancer. *Int J Gastrointest Cancer* 31, 79-88.
- Bai, L., Merchant, J.L., 2000. Transcription factor ZBP-89 cooperates with histone acetyltransferase p300 during butyrate activation of p21waf1 transcription in human cells. *J Biol Chem* 275, 30725-30733.
- Bai, L., Merchant, J.L., 2007. ATM phosphorylates ZBP-89 at Ser202 to potentiate p21waf1 induction by butyrate. *Biochem Biophys Res Commun* 359, 817-821.
- Bajic, V.B., Tan, S.L., Christoffels, A., et al., 2006. Mice and men: their promoter properties. *PLoS Genet* 2, e54.
- Bellorini, M., Lee, D.K., Dantonel, J.C., et al., 1997. CCAAT binding NF-Y-TBP interactions: NF-YB and NF-YC require short domains adjacent to their histone fold motifs for association with TBP basic residues. *Nucleic Acids Res* 25, 2174-2181.
- Beranger, F., Mejean, C., Moniot, B., et al., 2000. Muscle differentiation is antagonized by SOX15, a new member of the SOX protein family. *J Biol Chem* 275, 16103-16109.
- Berk, A.J., 2000. TBP-like factors come into focus. *Cell* 103, 5-8.
- Bernadt, C.T., Nowling, T., Wiebe, M.S., et al., 2005. NF-Y behaves as a bifunctional transcription factor that can stimulate or repress the FGF-4 promoter in an enhancer-dependent manner. *Gene Expr* 12, 193-212.

- Biesiada, E., Razandi, M., Levin, E.R., 1996. Egr-1 activates basic fibroblast growth factor transcription. Mechanistic implications for astrocyte proliferation. *J Biol Chem* 271, 18576-18581.
- Biggin, M.D., McGinnis, W., 1997. Regulation of segmentation and segmental identity by *Drosophila* homeoproteins: the role of DNA binding in functional activity and specificity. *Development* 124, 4425-4433.
- Birnbaum, M.J., van Wijnen, A.J., Odgren, P.R., et al., 1995. Sp1 trans-activation of cell cycle regulated promoters is selectively repressed by Sp3. *Biochemistry* 34, 16503-16508.
- Blackwood, E.M., Kadonaga, J.T., 1998. Going the distance: a current view of enhancer action. *Science* 281, 60-63.
- Blake, M.C., Jambou, R.C., Swick, A.G., et al., 1990. Transcriptional initiation is controlled by upstream GC-box interactions in a TATAA-less promoter. *Mol Cell Biol* 10, 6632-6641.
- Boshart, M., Kluppel, M., Schmidt, A., et al., 1992. Reporter constructs with low background activity utilizing the cat gene. *Gene* 110, 129-130.
- Botquin, V., Hess, H., Fuhrmann, G., et al., 1998. New POU dimer configuration mediates antagonistic control of an osteopontin preimplantation enhancer by Oct-4 and Sox-2. *Genes Dev* 12, 2073-2090.
- Bouwman, P., Philipsen, S., 2002. Regulation of the activity of Sp1-related transcription factors. *Mol Cell Endocrinol* 195, 27-38.
- Bowles, J., Schepers, G., Koopman, P., 2000. Phylogeny of the SOX family of developmental transcription factors based on sequence and structural indicators. *Dev Biol* 227, 239-255.
- Brandeis, M., Frank, D., Keshet, I., et al., 1994. Sp1 elements protect a CpG island from de novo methylation. *Nature* 371, 435-438.
- Breathnach, R., Chambon, P., 1981. Organization and expression of eucaryotic split genes coding for proteins. *Annu Rev Biochem* 50, 349-383.
- Burke, T.W., Kadonaga, J.T., 1997. The downstream core promoter element, DPE, is conserved from *Drosophila* to humans and is recognized by TAFII60 of *Drosophila*. *Genes Dev* 11, 3020-3031.
- Burley, S.K., Roeder, R.G., 1996. Biochemistry and structural biology of transcription factor IID (TFIID). *Annu Rev Biochem* 65, 769-799.
- Carmeliet, P., 2003. Angiogenesis in health and disease. *Nat Med* 9, 653-660.
- Carmeliet, P., 2005a. Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature* 438, 932-936.
- Carmeliet, P., 2005b. VEGF as a key mediator of angiogenesis in cancer. *Oncology* 69 Suppl 3, 4-10.
- Carter T, P.R., 1954. Ragged, a semidominant coat texture mutant in the house mouse. *J Hered* 45, 151-154.
- Cermenati, S., Moleri, S., Cimbri, S., et al., 2008. Sox18 and Sox7 play redundant roles in vascular development. *Blood* 111, 2657-2666.
- Chen, L., Widom, J., 2005. Mechanism of transcriptional silencing in yeast. *Cell* 120, 37-48.
- Cheng, P.Y., Kagawa, N., Takahashi, Y., et al., 2000. Three zinc finger nuclear proteins, Sp1, Sp3, and a ZBP-89 homologue, bind to the cyclic adenosine monophosphate-

- responsive sequence of the bovine adrenodoxin gene and regulate transcription. *Biochemistry* 39, 4347-4357.
- Cheng, T., Cao, W., Wen, R., et al., 1998. Prostaglandin E2 induces vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor mRNA expression in cultured rat Muller cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 39, 581-591.
- Chu, S., Blaisdell, C.J., Liu, M.Z., et al., 1999. Perinatal regulation of the ClC-2 chloride channel in lung is mediated by Sp1 and Sp3. *Am J Physiol* 276, L614-624.
- Claessens, F., Gewirth, D.T., 2004. DNA recognition by nuclear receptors. *Essays Biochem* 40, 59-72.
- Collins, C., Rommens, J.M., Kowbel, D., et al., 1998. Positional cloning of ZNF217 and NABC1: genes amplified at 20q13.2 and overexpressed in breast carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 8703-8708.
- Colter, D.C., Piera-Velazquez, S., Hawkins, D.F., et al., 2005. Regulation of the human Sox9 promoter by the CCAAT-binding factor. *Matrix Biol* 24, 185-197.
- Conaway, J.W., Florens, L., Sato, S., et al., 2005. The mammalian Mediator complex. *FEBS Lett* 579, 904-908.
- Conkright, M.D., Canettieri, G., Screaton, R., et al., 2003. TORCs: transducers of regulated CREB activity. *Mol Cell* 12, 413-423.
- Cui, M.Z., Parry, G.C., Oeth, P., et al., 1996. Transcriptional regulation of the tissue factor gene in human epithelial cells is mediated by Sp1 and EGR-1. *J Biol Chem* 271, 2731-2739.
- Czerny, T., Schaffner, G., Busslinger, M., 1993. DNA sequence recognition by Pax proteins: bipartite structure of the paired domain and its binding site. *Genes Dev* 7, 2048-2061.
- Daniel, J.A., Pray-Grant, M.G., Grant, P.A., 2005. Effector proteins for methylated histones: an expanding family. *Cell Cycle* 4, 919-926.
- Darby, I.A., Bisucci, T., Raghoenath, S., et al., 2001. Sox18 is transiently expressed during angiogenesis in granulation tissue of skin wounds with an identical expression pattern to Flk-1 mRNA. *Lab Invest* 81, 937-943.
- Darnell, J.E., Jr., 1982. Variety in the level of gene control in eukaryotic cells. *Nature* 297, 365-371.
- Davis, W., Jr., Chen, Z.J., Ile, K.E., et al., 2003. Reciprocal regulation of expression of the human adenosine 5'-triphosphate binding cassette, sub-family A, transporter 2 (ABCA2) promoter by the early growth response-1 (EGR-1) and Sp-family transcription factors. *Nucleic Acids Res* 31, 1097-1107.
- de la Cruz, X., Lois, S., Sanchez-Molina, S., et al., 2005. Do protein motifs read the histone code? *Bioessays* 27, 164-175.
- Deaton, A.M., Bird, A., 2011. CpG islands and the regulation of transcription. *Genes Dev* 25, 1010-1022.
- Dennig, J., Beato, M., Suske, G., 1996. An inhibitor domain in Sp3 regulates its glutamine-rich activation domains. *EMBO J* 15, 5659-5667.
- Denny, P., Swift, S., Brand, N., et al., 1992. A conserved family of genes related to the testis determining gene, SRY. *Nucleic Acids Res* 20, 2887.

- Denson, L.A., Menon, R.K., Shaufli, A., et al., 2001. TNF-alpha downregulates murine hepatic growth hormone receptor expression by inhibiting Sp1 and Sp3 binding. *J Clin Invest* 107, 1451-1458.
- Dignam, J.D., Lebovitz, R.M., Roeder, R.G., 1983. Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei. *Nucleic Acids Res* 11, 1475-1489.
- DiPietro, L.A., 1997. Thrombospondin as a regulator of angiogenesis. *EXS* 79, 295-314.
- Discher, D.J., Bishopric, N.H., Wu, X., et al., 1998. Hypoxia regulates beta-enolase and pyruvate kinase-M promoters by modulating Sp1/Sp3 binding to a conserved GC element. *J Biol Chem* 273, 26087-26093.
- Djurovic, J., Stevanovic, M., 2004. Structural and functional characterization of the human SOX14 promoter. *Biochim Biophys Acta* 1680, 53-59.
- Dong, C., Wilhelm, D., Koopman, P., 2004. Sox genes and cancer. *Cytogenet Genome Res* 105, 442-447.
- Dormond, O., Foletti, A., Paroz, C., et al., 2001. NSAIDs inhibit alpha V beta 3 integrin-mediated and Cdc42/Rac-dependent endothelial-cell spreading, migration and angiogenesis. *Nat Med* 7, 1041-1047.
- Downes, M., Koopman, P., 2001. SOX18 and the transcriptional regulation of blood vessel development. *Trends Cardiovasc Med* 11, 318-324.
- Dubois, R.N., Abramson, S.B., Crofford, L., et al., 1998. Cyclooxygenase in biology and disease. *FASEB J* 12, 1063-1073.
- Dumont, D.J., Fong, G.H., Puri, M.C., et al., 1995. Vascularization of the mouse embryo: a study of flk-1, tek, tie, and vascular endothelial growth factor expression during development. *Dev Dyn* 203, 80-92.
- Dvir, A., Conaway, J.W., Conaway, R.C., 2001. Mechanism of transcription initiation and promoter escape by RNA polymerase II. *Curr Opin Genet Dev* 11, 209-214.
- Edgell, C.J., McDonald, C.C., Graham, J.B., 1983. Permanent cell line expressing human factor VIII-related antigen established by hybridization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80, 3734-3737.
- Eom, B.W., Jo, M.J., Kook, M.C., et al., 2012. The lymphangiogenic factor SOX 18: a key indicator to stage gastric tumor progression. *Int J Cancer* 131, 41-48.
- Evans, R., Fairley, J.A., Roberts, S.G., 2001. Activator-mediated disruption of sequence-specific DNA contacts by the general transcription factor TFIIB. *Genes Dev* 15, 2945-2949.
- Fahmy, R.G., Dass, C.R., Sun, L.Q., et al., 2003. Transcription factor Egr-1 supports FGF-dependent angiogenesis during neovascularization and tumor growth. *Nat Med* 9, 1026-1032.
- Farnham, P.J., 2009. Insights from genomic profiling of transcription factors. *Nat Rev Genet* 10, 605-616.
- Feldman, A.L., Libutti, S.K., 2000. Progress in antiangiogenic gene therapy of cancer. *Cancer* 89, 1181-1194.
- Felmeden, D.C., Blann, A.D., Lip, G.Y., 2003. Angiogenesis: basic pathophysiology and implications for disease. *Eur Heart J* 24, 586-603.
- Ferrara, N., 2004. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocr Rev* 25, 581-611.

- Ferrara, N., 2005. VEGF as a therapeutic target in cancer. *Oncology* 69 Suppl 3, 11-16.
- Ferrara, N., Gerber, H.P., LeCouter, J., 2003. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 9, 669-676.
- Ferrara, N., Hillan, K.J., Gerber, H.P., et al., 2004. Discovery and development of bevacizumab, an anti-VEGF antibody for treating cancer. *Nat Rev Drug Discov* 3, 391-400.
- Ferrell, R.E., Kimak, M.A., Lawrence, E.C., et al., 2008. Candidate gene analysis in primary lymphedema. *Lymphat Res Biol* 6, 69-76.
- Folkman, J., 1995. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med* 1, 27-31.
- Folkman, J., 2002. Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis. *Semin Oncol* 29, 15-18.
- Folkman, J., D'Amore, P.A., 1996. Blood vessel formation: what is its molecular basis? *Cell* 87, 1153-1155.
- Folkman, J., Shing, Y., 1992. Angiogenesis. *J Biol Chem* 267, 10931-10934.
- Fontijn, R.D., Volger, O.L., Fledderus, J.O., et al., 2008. SOX-18 controls endothelial-specific claudin-5 gene expression and barrier function. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 294, H891-900.
- Form, D.M., Auerbach, R., 1983. PGE2 and angiogenesis. *Proc Soc Exp Biol Med* 172, 214-218.
- Fourel, G., Magdinier, F., Gilson, E., 2004. Insulator dynamics and the setting of chromatin domains. *Bioessays* 26, 523-532.
- Francois, M., Caprini, A., Hosking, B., et al., 2008. Sox18 induces development of the lymphatic vasculature in mice. *Nature* 456, 643-647.
- Francois, M., Koopman, P., Beltrame, M., 2010. SoxF genes: Key players in the development of the cardio-vascular system. *Int J Biochem Cell Biol* 42, 445-448.
- Frater-Schroder, M., Risau, W., Hallmann, R., et al., 1987. Tumor necrosis factor type alpha, a potent inhibitor of endothelial cell growth in vitro, is angiogenic in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 5277-5281.
- Frontini, M., Imbriano, C., diSilvio, A., et al., 2002. NF-Y recruitment of TFIID, multiple interactions with histone fold TAF(II)s. *J Biol Chem* 277, 5841-5848.
- Garcia-Ramirez, M., Martinez-Gonzalez, J., Juan-Babot, J.O., et al., 2005. Transcription factor SOX18 is expressed in human coronary atherosclerotic lesions and regulates DNA synthesis and vascular cell growth. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25, 2398-2403.
- Gardiner-Garden, M., Frommer, M., 1987. CpG islands in vertebrate genomes. *J Mol Biol* 196, 261-282.
- Gashler, A., Sukhatme, V.P., 1995. Early growth response protein 1 (Egr-1): prototype of a zinc-finger family of transcription factors. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 50, 191-224.
- Gashler, A.L., Swaminathan, S., Sukhatme, V.P., 1993. A novel repression module, an extensive activation domain, and a bipartite nuclear localization signal defined in the immediate-early transcription factor Egr-1. *Mol Cell Biol* 13, 4556-4571.
- Gately, S., 2000. The contributions of cyclooxygenase-2 to tumor angiogenesis. *Cancer Metastasis Rev* 19, 19-27.

- Gilchrist, D.A., Nechaev, S., Lee, C., et al., 2008. NELF-mediated stalling of Pol II can enhance gene expression by blocking promoter-proximal nucleosome assembly. *Genes Dev* 22, 1921-1933.
- Gill, G., Pascal, E., Tseng, Z.H., et al., 1994. A glutamine-rich hydrophobic patch in transcription factor Sp1 contacts the dTAFII110 component of the Drosophila TFIID complex and mediates transcriptional activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 192-196.
- Goetze, S., Kintscher, U., Kaneshiro, K., et al., 2001. TNFalpha induces expression of transcription factors c-fos, Egr-1, and Ets-1 in vascular lesions through extracellular signal-regulated kinases 1/2. *Atherosclerosis* 159, 93-101.
- Gospodarowicz, D., Abraham, J.A., Schilling, J., 1989. Isolation and characterization of a vascular endothelial cell mitogen produced by pituitary-derived folliculo stellate cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 7311-7315.
- Gowri, P.M., Yu, J.H., Shaubl, A., et al., 2003. Recruitment of a repressosome complex at the growth hormone receptor promoter and its potential role in diabetic nephropathy. *Mol Cell Biol* 23, 815-825.
- Green E, M.S., 1961. Opossum, a semi-dominant lethal mutation affecting hair and other characteristics of mice. *J Hered* 52, 223-227.
- Gubbay, J., Collignon, J., Koopman, P., et al., 1990. A gene mapping to the sex-determining region of the mouse Y chromosome is a member of a novel family of embryonically expressed genes. *Nature* 346, 245-250.
- Guth, S.I., Wegner, M., 2008. Having it both ways: Sox protein function between conservation and innovation. *Cell Mol Life Sci* 65, 3000-3018.
- Hagen, G., Muller, S., Beato, M., et al., 1992. Cloning by recognition site screening of two novel GT box binding proteins: a family of Sp1 related genes. *Nucleic Acids Res* 20, 5519-5525.
- Hagen, G., Muller, S., Beato, M., et al., 1994. Sp1-mediated transcriptional activation is repressed by Sp3. *EMBO J* 13, 3843-3851.
- Hahn, S., 1993. Structure(?) and function of acidic transcription activators. *Cell* 72, 481-483.
- Hanahan, D., Folkman, J., 1996. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 86, 353-364.
- Harris, M.B., Mostecky, J., Rothman, P.B., 2005. Repression of an interleukin-4-responsive promoter requires cooperative BCL-6 function. *J Biol Chem* 280, 13114-13121.
- Hasegawa, T., Takeuchi, A., Miyaishi, O., et al., 1997. Cloning and characterization of a transcription factor that binds to the proximal promoters of the two mouse type I collagen genes. *J Biol Chem* 272, 4915-4923.
- Hasegawa, T., Takeuchi, A., Miyaishi, O., et al., 2000. PTRF (polymerase I and transcript-release factor) is tissue-specific and interacts with the BFCOL1 (binding factor of a type-I collagen promoter) zinc-finger transcription factor which binds to the two mouse type-I collagen gene promoters. *Biochem J* 347 Pt 1, 55-59.
- Hata, Y., Duh, E., Zhang, K., et al., 1998. Transcription factors Sp1 and Sp3 alter vascular endothelial growth factor receptor expression through a novel recognition sequence. *J Biol Chem* 273, 19294-19303.
- Hayden, M.S., Ghosh, S., 2004. Signaling to NF-kappaB. *Genes Dev* 18, 2195-2224.



- Heintzman, N.D., Ren, B., 2007. The gateway to transcription: identifying, characterizing and understanding promoters in the eukaryotic genome. *Cell Mol Life Sci* 64, 386-400.
- Hiraoka, Y., Ogawa, M., Sakai, Y., et al., 1998. The mouse Sox5 gene encodes a protein containing the leucine zipper and the Q box. *Biochim Biophys Acta* 1399, 40-46.
- Hoeth, M., Niederleithner, H., Hofer-Warbinek, R., et al., 2012. The transcription factor SOX18 regulates the expression of matrix metalloproteinase 7 and guidance molecules in human endothelial cells. *PLoS One* 7, e30982.
- Hoey, T., Weinzierl, R.O., Gill, G., et al., 1993. Molecular cloning and functional analysis of Drosophila TAF110 reveal properties expected of coactivators. *Cell* 72, 247-260.
- Hokamp, K., McLysaght, A., Wolfe, K.H., 2003. The 2R hypothesis and the human genome sequence. *J Struct Funct Genomics* 3, 95-110.
- Hokari, R., Kitagawa, N., Watanabe, C., et al., 2008. Changes in regulatory molecules for lymphangiogenesis in intestinal lymphangiectasia with enteric protein loss. *J Gastroenterol Hepatol* 23, e88-95.
- Holmgren, L., O'Reilly, M.S., Folkman, J., 1995. Dormancy of micrometastases: balanced proliferation and apoptosis in the presence of angiogenesis suppression. *Nat Med* 1, 149-153.
- Hosking, B.M., Muscat, G.E., Koopman, P.A., et al., 1995. Trans-activation and DNA-binding properties of the transcription factor, Sox-18. *Nucleic Acids Res* 23, 2626-2628.
- Hosking, B.M., Wang, S.C., Chen, S.L., et al., 2001. SOX18 directly interacts with MEF2C in endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 287, 493-500.
- Hosking, B.M., Wang, S.C., Downes, M., et al., 2004. The VCAM-1 gene that encodes the vascular cell adhesion molecule is a target of the Sry-related high mobility group box gene, Sox18. *J Biol Chem* 279, 5314-5322.
- Huang, D.Y., Kuo, Y.Y., Lai, J.S., et al., 2004. GATA-1 and NF-Y cooperate to mediate erythroid-specific transcription of Gfi-1B gene. *Nucleic Acids Res* 32, 3935-3946.
- Ihn, H., Trojanowska, M., 1997. Sp3 is a transcriptional activator of the human alpha2(I) collagen gene. *Nucleic Acids Res* 25, 3712-3717.
- Im, H.J., Smirnov, D., Yuhi, T., et al., 2001. Transcriptional modulation of mouse mu-opioid receptor distal promoter activity by Sox18. *Mol Pharmacol* 59, 1486-1496.
- Inoue, M., Itoh, H., Ueda, M., et al., 1998. Vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in human coronary atherosclerotic lesions: possible pathophysiological significance of VEGF in progression of atherosclerosis. *Circulation* 98, 2108-2116.
- Irrthum, A., Devriendt, K., Chitayat, D., et al., 2003. Mutations in the transcription factor gene SOX18 underlie recessive and dominant forms of hypotrichosis-lymphedema-telangiectasia. *Am J Hum Genet* 72, 1470-1478.
- Iwabuchi, H., Sakamoto, M., Sakunaga, H., et al., 1995. Genetic analysis of benign, low-grade, and high-grade ovarian tumors. *Cancer Res* 55, 6172-6180.
- Jager, M., Queindec, E., Houliston, E., et al., 2006. Expansion of the SOX gene family predated the emergence of the Bilateria. *Mol Phylogenet Evol* 39, 468-477.
- James, K., Hosking, B., Gardner, J., et al., 2003. Sox18 mutations in the ragged mouse alleles ragged-like and opossum. *Genesis* 36, 1-6.

- Jimenez-Sanchez, G., Childs, B., Valle, D., 2001. Human disease genes. *Nature* 409, 853-855.
- Jump, D.B., Thelen, A.P., Mater, M.K., 2001. Functional interaction between sterol regulatory element-binding protein-1c, nuclear factor Y, and 3,5,3'-triiodothyronine nuclear receptors. *J Biol Chem* 276, 34419-34427.
- Kaczynski, J., Cook, T., Urrutia, R., 2003. Sp1- and Kruppel-like transcription factors. *Genome Biol* 4, 206.
- Kadonaga, J.T., 2002. The DPE, a core promoter element for transcription by RNA polymerase II. *Exp Mol Med* 34, 259-264.
- Kamachi, Y., Uchikawa, M., Kondoh, H., 2000. Pairing SOX off: with partners in the regulation of embryonic development. *Trends Genet* 16, 182-187.
- Kamachi, Y., Uchikawa, M., Tanouchi, A., et al., 2001. Pax6 and SOX2 form a co-DNA-binding partner complex that regulates initiation of lens development. *Genes Dev* 15, 1272-1286.
- Kaufmann, K., Thiel, G., 2001. Epidermal growth factor and platelet-derived growth factor induce expression of Egr-1, a zinc finger transcription factor, in human malignant glioma cells. *J Neurol Sci* 189, 83-91.
- Keates, A.C., Keates, S., Kwon, J.H., et al., 2001. ZBP-89, Sp1, and nuclear factor-kappa B regulate epithelial neutrophil-activating peptide-78 gene expression in Caco-2 human colonic epithelial cells. *J Biol Chem* 276, 43713-43722.
- Keaveney, M., Struhl, K., 1998. Activator-mediated recruitment of the RNA polymerase II machinery is the predominant mechanism for transcriptional activation in yeast. *Mol Cell* 1, 917-924.
- Kennett, S.B., Udvardia, A.J., Horowitz, J.M., 1997. Sp3 encodes multiple proteins that differ in their capacity to stimulate or repress transcription. *Nucleic Acids Res* 25, 3110-3117.
- Kennison, J.A., Southworth, J.W., 2002. Transvection in *Drosophila*. *Adv Genet* 46, 399-420.
- Khachigian, L.M., Collins, T., 1997. Inducible expression of Egr-1-dependent genes. A paradigm of transcriptional activation in vascular endothelium. *Circ Res* 81, 457-461.
- Khachigian, L.M., Lindner, V., Williams, A.J., et al., 1996. Egr-1-induced endothelial gene expression: a common theme in vascular injury. *Science* 271, 1427-1431.
- Khachigian, L.M., Williams, A.J., Collins, T., 1995. Interplay of Sp1 and Egr-1 in the proximal platelet-derived growth factor A-chain promoter in cultured vascular endothelial cells. *J Biol Chem* 270, 27679-27686.
- Kilbourne, E.J., Widom, R., Harnish, D.C., et al., 1995. Involvement of early growth response factor Egr-1 in apolipoprotein AI gene transcription. *J Biol Chem* 270, 7004-7010.
- Kim, I.S., Sinha, S., de Crombrughe, B., et al., 1996. Determination of functional domains in the C subunit of the CCAAT-binding factor (CBF) necessary for formation of a CBF-DNA complex: CBF-B interacts simultaneously with both the CBF-A and CBF-C subunits to form a heterotrimeric CBF molecule. *Mol Cell Biol* 16, 4003-4013.

- Kim, S.J., Jeang, K.T., Glick, A.B., et al., 1989. Promoter sequences of the human transforming growth factor-beta 1 gene responsive to transforming growth factor-beta 1 autoinduction. *J Biol Chem* 264, 7041-7045.
- Kim, T.H., Barrera, L.O., Zheng, M., et al., 2005. A high-resolution map of active promoters in the human genome. *Nature* 436, 876-880.
- King, N., Westbrook, M.J., Young, S.L., et al., 2008. The genome of the choanoflagellate *Monosiga brevicollis* and the origin of metazoans. *Nature* 451, 783-788.
- Kingsley, C., Winoto, A., 1992. Cloning of GT box-binding proteins: a novel Sp1 multigene family regulating T-cell receptor gene expression. *Mol Cell Biol* 12, 4251-4261.
- Koopman, P., 2005. Sex determination: a tale of two Sox genes. *Trends Genet* 21, 367-370.
- Kovacevic Grujicic, N., Mojsin, M., Krstic, A., et al., 2005. Functional characterization of the human SOX3 promoter: identification of transcription factors implicated in basal promoter activity. *Gene* 344, 287-297.
- Kutach, A.K., Kadonaga, J.T., 2000. The downstream promoter element DPE appears to be as widely used as the TATA box in *Drosophila* core promoters. *Mol Cell Biol* 20, 4754-4764.
- Lagrange, T., Kapanidis, A.N., Tang, H., et al., 1998. New core promoter element in RNA polymerase II-dependent transcription: sequence-specific DNA binding by transcription factor IIB. *Genes Dev* 12, 34-44.
- Lamb, P., McKnight, S.L., 1991. Diversity and specificity in transcriptional regulation: the benefits of heterotypic dimerization. *Trends Biochem Sci* 16, 417-422.
- Lander, E.S., Linton, L.M., Birren, B., et al., 2001. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409, 860-921.
- Larroux, C., Luke, G.N., Koopman, P., et al., 2008. Genesis and expansion of metazoan transcription factor gene classes. *Mol Biol Evol* 25, 980-996.
- Latchman, D.S., 1998. Eukaryotic transcription factors. Academic Press, San Diego.
- Law, D.J., Du, M., Law, G.L., et al., 1999. ZBP-99 defines a conserved family of transcription factors and regulates ornithine decarboxylase gene expression. *Biochem Biophys Res Commun* 262, 113-120.
- Law, D.J., Tarle, S.A., Merchant, J.L., 1998a. The human ZBP-89 homolog, located at chromosome 3q21, represses gastrin gene expression. *Mamm Genome* 9, 165-167.
- Law, G.L., Itoh, H., Law, D.J., et al., 1998b. Transcription factor ZBP-89 regulates the activity of the ornithine decarboxylase promoter. *J Biol Chem* 273, 19955-19964.
- Leavesley, D.I., Schwartz, M.A., Rosenfeld, M., et al., 1993. Integrin beta 1- and beta 3-mediated endothelial cell migration is triggered through distinct signaling mechanisms. *J Cell Biol* 121, 163-170.
- Lefebvre, V., Dumitriu, B., Penzo-Mendez, A., et al., 2007. Control of cell fate and differentiation by Sry-related high-mobility-group box (Sox) transcription factors. *Int J Biochem Cell Biol* 39, 2195-2214.
- Lefebvre, V., Li, P., de Crombrughe, B., 1998. A new long form of Sox5 (L-Sox5), Sox6 and Sox9 are coexpressed in chondrogenesis and cooperatively activate the type II collagen gene. *Embo J* 17, 5718-5733.
- Leibovich, S.J., Polverini, P.J., Shepard, H.M., et al., 1987. Macrophage-induced angiogenesis is mediated by tumour necrosis factor-alpha. *Nature* 329, 630-632.

- Lemon, B., Tjian, R., 2000. Orchestrated response: a symphony of transcription factors for gene control. *Genes Dev* 14, 2551-2569.
- Lewis, M.K.a.B., R.R. , 1982. Eukaryotic RNA polymerases, In: *The Enzymes* 3rd ed.(Eds. Boyer P.D.). Academic Press, New York., 109-153. .
- Li, L., He, S., Sun, J.M., et al., 2004. Gene regulation by Sp1 and Sp3. *Biochem Cell Biol* 82, 460-471.
- Li, Q., Johnston, S.A., 2001. Are all DNA binding and transcription regulation by an activator physiologically relevant? *Mol Cell Biol* 21, 2467-2474.
- Li, Y., Flanagan, P.M., Tschochner, H., et al., 1994. RNA polymerase II initiation factor interactions and transcription start site selection. *Science* 263, 805-807.
- Lim, C.Y., Santoso, B., Boulay, T., et al., 2004. The MTE, a new core promoter element for transcription by RNA polymerase II. *Genes Dev* 18, 1606-1617.
- Lin, Q., Lu, J., Yanagisawa, H., et al., 1998. Requirement of the MADS-box transcription factor MEF2C for vascular development. *Development* 125, 4565-4574.
- Liu, C., Rangnekar, V.M., Adamson, E., et al., 1998. Suppression of growth and transformation and induction of apoptosis by EGR-1. *Cancer Gene Ther* 5, 3-28.
- Locker, J., *Transcription factors: 2001 Chichester*, BIOS, xvi, 336 p. p.
- Lucerna, M., Mechtcheriakova, D., Kadl, A., et al., 2003. NAB2, a corepressor of EGR-1, inhibits vascular endothelial growth factor-mediated gene induction and angiogenic responses of endothelial cells. *J Biol Chem* 278, 11433-11440.
- Lucerna, M., Pomyje, J., Mechtcheriakova, D., et al., 2006. Sustained expression of early growth response protein-1 blocks angiogenesis and tumor growth. *Cancer Res* 66, 6708-6713.
- Luo, M., Guo, X.T., Yang, W., et al., 2008. Inhibition of tumor angiogenesis by cell-permeable dominant negative SOX18 mutants. *Med Hypotheses* 70, 880-882.
- Lynch, M., Force, A., 2000. The probability of duplicate gene preservation by subfunctionalization. *Genetics* 154, 459-473.
- Macleod, D., Charlton, J., Mullins, J., et al., 1994. Sp1 sites in the mouse *aprt* gene promoter are required to prevent methylation of the CpG island. *Genes Dev* 8, 2282-2292.
- Maldonado, E., Ha, I., Cortes, P., et al., 1990. Factors involved in specific transcription by mammalian RNA polymerase II: role of transcription factors IIA, IID, and IIB during formation of a transcription-competent complex. *Mol Cell Biol* 10, 6335-6347.
- Malik, S., Roeder, R.G., 2005. Dynamic regulation of pol II transcription by the mammalian Mediator complex. *Trends Biochem Sci* 30, 256-263.
- Malo, M.S., Mozumder, M., Zhang, X.B., et al., 2006. Intestinal alkaline phosphatase gene expression is activated by ZBP-89. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 290, G737-746.
- Maltzman, J.S., Carmen, J.A., Monroe, J.G., 1996. Transcriptional regulation of the *Icam-1* gene in antigen receptor- and phorbol ester-stimulated B lymphocytes: role for transcription factor EGR1. *J Exp Med* 183, 1747-1759.
- Mantovani, R., 1998. A survey of 178 NF-Y binding CCAAT boxes. *Nucleic Acids Res.* 26, 1135-1143.

- Martin, A., Komada, M.R., Sane, D.C., 2003. Abnormal angiogenesis in diabetes mellitus. *Med Res Rev* 23, 117-145.
- Massague, J., Blain, S.W., Lo, R.S., 2000. TGFbeta signaling in growth control, cancer, and heritable disorders. *Cell* 103, 295-309.
- Massari, M.E., Murre, C., 2000. Helix-loop-helix proteins: regulators of transcription in eucaryotic organisms. *Mol Cell Biol* 20, 429-440.
- Maston, G.A., Evans, S.K., Green, M.R., 2006. Transcriptional regulatory elements in the human genome. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 7, 29-59.
- Matsui, T., Kanai-Azuma, M., Hara, K., et al., 2006. Redundant roles of Sox17 and Sox18 in postnatal angiogenesis in mice. *J Cell Sci* 119, 3513-3526.
- Mavrich, T.N., Jiang, C., Ioshikhes, I.P., et al., 2008. Nucleosome organization in the *Drosophila* genome. *Nature* 453, 358-362.
- McCaffrey, T.A., Fu, C., Du, B., et al., 2000. High-level expression of Egr-1 and Egr-1-inducible genes in mouse and human atherosclerosis. *J Clin Invest* 105, 653-662.
- Melichar, H.J., Narayan, K., Der, S.D., et al., 2007. Regulation of gammadelta versus alphabeta T lymphocyte differentiation by the transcription factor SOX13. *Science* 315, 230-233.
- Merchant, J.L., Iyer, G.R., Taylor, B.R., et al., 1996. ZBP-89, a Kruppel-like zinc finger protein, inhibits epidermal growth factor induction of the gastrin promoter. *Mol Cell Biol* 16, 6644-6653.
- Merika, M., Orkin, S.H., 1995. Functional synergy and physical interactions of the erythroid transcription factor GATA-1 with the Kruppel family proteins Sp1 and EKLF. *Mol Cell Biol* 15, 2437-2447.
- Mertin, S., McDowall, S.G., Harley, V.R., 1999. The DNA-binding specificity of SOX9 and other SOX proteins. *Nucleic Acids Res* 27, 1359-1364.
- Mitchell, P.J., Tjian, R., 1989. Transcriptional regulation in mammalian cells by sequence-specific DNA binding proteins. *Science* 245, 371-378.
- Monnier, Y., Zaric, J., Ruegg, C., 2005. Inhibition of angiogenesis by non-steroidal anti-inflammatory drugs: from the bench to the bedside and back. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 4, 31-38.
- Moran, A., Iniesta, P., de Juan, C., et al., 2005. Impairment of stromelysin-1 transcriptional activity by promoter mutations in high microsatellite instability colorectal tumors. *Cancer Res* 65, 3811-3814.
- Moshier, J.A., Skunca, M., Wu, W., et al., 1996. Regulation of ornithine decarboxylase gene expression by the Wilms' tumor suppressor WT1. *Nucleic Acids Res* 24, 1149-1157.
- Moulton, K.S., 2001. Plaque angiogenesis and atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep* 3, 225-233.
- Murakami, A., Ishida, S., Thurlow, J., et al., 2001. SOX6 binds CtBP2 to repress transcription from the Fgf-3 promoter. *Nucleic Acids Res* 29, 3347-3355.
- Niimi, T., Hayashi, Y., Futaki, S., et al., 2004. SOX7 and SOX17 regulate the parietal endoderm-specific enhancer activity of mouse laminin alpha1 gene. *J Biol Chem* 279, 38055-38061.

- Nishimoto, M., Fukushima, A., Okuda, A., et al., 1999. The gene for the embryonic stem cell coactivator UTF1 carries a regulatory element which selectively interacts with a complex composed of Oct-3/4 and Sox-2. *Mol Cell Biol* 19, 5453-5465.
- Noguchi, H., Matsumoto, S., 2006. Protein transduction technology: a novel therapeutic perspective. *Acta Med Okayama* 60, 1-11.
- Nowling, T., Bernadt, C., Johnson, L., et al., 2003. The co-activator p300 associates physically with and can mediate the action of the distal enhancer of the FGF-4 gene. *J Biol Chem* 278, 13696-13705.
- O'Reilly, M.S., Boehm, T., Shing, Y., et al., 1997. Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell* 88, 277-285.
- Ogryzko, V.V., Schiltz, R.L., Russanova, V., et al., 1996. The transcriptional coactivators p300 and CBP are histone acetyltransferases. *Cell* 87, 953-959.
- Ohler, U., Liao, G.C., Niemann, H., et al., 2002. Computational analysis of core promoters in the Drosophila genome. *Genome Biol* 3, RESEARCH0087.
- Oikawa, T., Onozawa, C., Sakaguchi, M., et al., 1994. Three isoforms of platelet-derived growth factors all have the capability to induce angiogenesis in vivo. *Biol Pharm Bull* 17, 1686-1688.
- Olsson, J.E., Kamachi, Y., Penning, S., et al., 2001. Sox18 expression in blood vessels and feather buds during chicken embryogenesis. *Gene* 271, 151-158.
- Orphanides, G., Lagrange, T., Reinberg, D., 1996. The general transcription factors of RNA polymerase II. *Genes Dev* 10, 2657-2683.
- Orphanides, G., Reinberg, D., 2002. A unified theory of gene expression. *Cell* 108, 439-451.
- Osaki, E., Nishina, Y., Inazawa, J., et al., 1999. Identification of a novel Sry-related gene and its germ cell-specific expression. *Nucleic Acids Res* 27, 2503-2510.
- Otrock, Z.K., Mahfouz, R.A., Makarem, J.A., et al., 2007. Understanding the biology of angiogenesis: review of the most important molecular mechanisms. *Blood Cells Mol Dis* 39, 212-220.
- Pabo, C.O., Sauer, R.T., 1992. Transcription factors: structural families and principles of DNA recognition. *Annu Rev Biochem* 61, 1053-1095.
- Papetti, M., Herman, I.M., 2002. Mechanisms of normal and tumor-derived angiogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol* 282, C947-970.
- Pendeville, H., Winandy, M., Manfroid, I., et al., 2008. Zebrafish Sox7 and Sox18 function together to control arterial-venous identity. *Dev Biol* 317, 405-416.
- Pennisi, D., Bowles, J., Nagy, A., et al., 2000a. Mice null for sox18 are viable and display a mild coat defect. *Mol Cell Biol* 20, 9331-9336.
- Pennisi, D., Gardner, J., Chambers, D., et al., 2000b. Mutations in Sox18 underlie cardiovascular and hair follicle defects in ragged mice. *Nat Genet* 24, 434-437.
- Pennisi, D.J., James, K.M., Hosking, B., et al., 2000c. Structure, mapping, and expression of human SOX18. *Mamm Genome* 11, 1147-1149.
- Petrovic, I., 2005. Ekspresija i analiza promotorskog regiona humanog SOX18 gena. Magistarski rad Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu.
- Petrovic, I., Kovacevic-Grujicic, N., Stevanovic, M., 2010. Early growth response protein 1 acts as an activator of SOX18 promoter. *Exp Mol Med* 42, 132-142.

- Petrovic, I., Stevanovic, M., 2007. The human SOX18 gene: Expression analysis and characterization of its 5' flanking region. *Arch. Biol. Sci., Belgrade* 59, 267-272.
- Pevny, L.H., Lovell-Badge, R., 1997. Sox genes find their feet. *Curr Opin Genet Dev* 7, 338-344.
- Philipsen, S., Suske, G., 1999. A tale of three fingers: the family of mammalian Sp/XKLF transcription factors. *Nucleic Acids Res* 27, 2991-3000.
- Pike, S.E., Yao, L., Jones, K.D., et al., 1998. Vasostatin, a calreticulin fragment, inhibits angiogenesis and suppresses tumor growth. *J Exp Med* 188, 2349-2356.
- Popescu, N.C., Zimonjic, D.B., 2002. Chromosome-mediated alterations of the MYC gene in human cancer. *J Cell Mol Med* 6, 151-159.
- Presta, M., Dell'Era, P., Mitola, S., et al., 2005. Fibroblast growth factor/fibroblast growth factor receptor system in angiogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev* 16, 159-178.
- Ptashne, M., Gann, A., 1997. Transcriptional activation by recruitment. *Nature* 386, 569-577.
- Pugh, B.F., Tjian, R., 1990. Mechanism of transcriptional activation by Sp1: evidence for coactivators. *Cell* 61, 1187-1197.
- Rasmussen, E.B., Lis, J.T., 1993. In vivo transcriptional pausing and cap formation on three *Drosophila* heat shock genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 7923-7927.
- Reed, G.E., Kirchner, J.E., Carr, L.G., 1995. NF-Y activates mouse tryptophan hydroxylase transcription. *Brain Res* 682, 1-12.
- Risau, W., 1997. Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 386, 671-674.
- Risau, W., Drexler, H., Mironov, V., et al., 1992. Platelet-derived growth factor is angiogenic in vivo. *Growth Factors* 7, 261-266.
- Roder, K., Wolf, S.S., Sickinger, S., et al., 1999. FIRE3 in the promoter of the rat fatty acid synthase (FAS) gene binds the ubiquitous transcription factors CBF and USF but does not mediate an insulin response in a rat hepatoma cell line. *Eur J Biochem* 260, 743-751.
- Roder, K.H., Wolf, S.S., Schweizer, M., 1997. Interaction of Sp1 and NF-Y in the diet-induced regulation of the rat fatty acid synthase (FAS) gene. *Biochem Soc Trans* 25, 72S.
- Romier, C., Cocchiarella, F., Mantovani, R., et al., 2003. The NF-YB/NF-YC structure gives insight into DNA binding and transcription regulation by CCAAT factor NF-Y. *J Biol Chem* 278, 1336-1345.
- Ronchi, A., Bellorini, M., Mongelli, N., et al., 1995. CCAAT-box binding protein NF-Y (CBF, CP1) recognizes the minor groove and distorts DNA. *Nucleic Acids Res.* 23, 4565-4572.
- Ross, R., 1999. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med* 340, 115-126.
- Rougvie, A.E., Lis, J.T., 1988. The RNA polymerase II molecule at the 5' end of the uninduced hsp70 gene of *D. melanogaster* is transcriptionally engaged. *Cell* 54, 795-804.
- Ruegg, C., Hasmmim, M., Lejeune, F.J., et al., 2006. Antiangiogenic peptides and proteins: from experimental tools to clinical drugs. *Biochim Biophys Acta* 1765, 155-177.
- Russo, M.W., Severson, B.R., Milbrandt, J., 1995. Identification of NAB1, a repressor of NGFI-A- and Krox20-mediated transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 6873-6877.

- Ryu, S., Zhou, S., Ladurner, A.G., et al., 1999. The transcriptional cofactor complex CRSP is required for activity of the enhancer-binding protein Sp1. *Nature* 397, 446-450.
- Sainson, R.C., Johnston, D.A., Chu, H.C., et al., 2008. TNF primes endothelial cells for angiogenic sprouting by inducing a tip cell phenotype. *Blood* 111, 4997-5007.
- Saitoh, T., Katoh, M., 2002. Expression of human SOX18 in normal tissues and tumors. *Int J Mol Med* 10, 339-344.
- Sakamoto, Y., Hara, K., Kanai-Azuma, M., et al., 2007. Redundant roles of Sox17 and Sox18 in early cardiovascular development of mouse embryos. *Biochem Biophys Res Commun* 360, 539-544.
- Salmon, M., Owens, G.K., Zehner, Z.E., 2009. Over-expression of the transcription factor, ZBP-89, leads to enhancement of the C2C12 myogenic program. *Biochim Biophys Acta* 1793, 1144-1155.
- Samant, G.V., Schupp, M.O., Francois, M., et al., 2011. Sox factors transcriptionally regulate ROBO4 gene expression in developing vasculature in zebrafish. *J Biol Chem* 286, 30740-30747.
- Sandholzer, J., Hoeth, M., Piskacek, M., et al., 2007. A novel 9-amino-acid transactivation domain in the C-terminal part of Sox18. *Biochem Biophys Res Commun* 360, 370-374.
- Sassa, Y., Hata, Y., Murata, T., et al., 2002. Functional role of Egr-1 mediating VEGF-induced tissue factor expression in the retinal capillary endothelium. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 240, 1003-1010.
- Sato, Y., 2000. Molecular mechanism of angiogenesis transcription factors and their therapeutic relevance. *Pharmacol Ther* 87, 51-60.
- Savelieva, E., Belair, C.D., Newton, M.A., et al., 1997. 20q gain associates with immortalization: 20q13.2 amplification correlates with genome instability in human papillomavirus 16 E7 transformed human uroepithelial cells. *Oncogene* 14, 551-560.
- Schlegel, J., Stumm, G., Scherthan, H., et al., 1995. Comparative genomic in situ hybridization of colon carcinomas with replication error. *Cancer Res* 55, 6002-6005.
- Serova, M., Calvo, F., Lokiec, F., et al., 2006. Characterizations of irifolven cytotoxicity in combination with cisplatin and oxaliplatin in human colon, breast, and ovarian cancer cells. *Cancer Chemother Pharmacol* 57, 491-499.
- Shibuya, M., 2006. Differential roles of vascular endothelial growth factor receptor-1 and receptor-2 in angiogenesis. *J Biochem Mol Biol* 39, 469-478.
- Shingu, T., Bornstein, P., 1994. Overlapping Egr-1 and Sp1 sites function in the regulation of transcription of the mouse thrombospondin 1 gene. *J Biol Chem* 269, 32551-32557.
- Sieweke, M.H., Graf, T., 1998. A transcription factor party during blood cell differentiation. *Curr Opin Genet Dev* 8, 545-551.
- Silverman, E.S., Collins, T., 1999. Pathways of Egr-1-mediated gene transcription in vascular biology. *Am J Pathol* 154, 665-670.
- Silverman, E.S., Du, J., Williams, A.J., et al., 1998. cAMP-response-element-binding-protein-binding protein (CBP) and p300 are transcriptional co-activators of early growth response factor-1 (Egr-1). *Biochem J* 336 ( Pt 1), 183-189.



- Sinclair, A.H., Berta, P., Palmer, M.S., et al., 1990. A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature* 346, 240-244.
- Sinner, D., Rankin, S., Lee, M., et al., 2004. Sox17 and beta-catenin cooperate to regulate the transcription of endodermal genes. *Development* 131, 3069-3080.
- Sjottem, E., Anderssen, S., Johansen, T., 1996. The promoter activity of long terminal repeats of the HERV-H family of human retrovirus-like elements is critically dependent on Sp1 family proteins interacting with a GC/GT box located immediately 3' to the TATA box. *J Virol* 70, 188-198.
- Skerka, C., Decker, E.L., Zipfel, P.F., 1995. A regulatory element in the human interleukin 2 gene promoter is a binding site for the zinc finger proteins Sp1 and EGR-1. *J Biol Chem* 270, 22500-22506.
- Smale, S.T., Baltimore, D., 1989. The "initiator" as a transcription control element. *Cell* 57, 103-113.
- Smale, S.T., Kadonaga, J.T., 2003. The RNA polymerase II core promoter. *Annu Rev Biochem* 72, 449-479.
- Smale, S.T., Schmidt, M.C., Berk, A.J., et al., 1990. Transcriptional activation by Sp1 as directed through TATA or initiator: specific requirement for mammalian transcription factor IID. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 4509-4513.
- Soullier, S., Jay, P., Poulat, F., et al., 1999. Diversification pattern of the HMG and SOX family members during evolution. *J Mol Evol* 48, 517-527.
- Srinivasan, L., Atchison, M.L., 2004. YY1 DNA binding and PcG recruitment requires CtBP. *Genes Dev* 18, 2596-2601.
- Stanojic, S., Stevanovic, M., 2000. The human SOX18 gene: cDNA cloning and high resolution mapping. *Biochim Biophys Acta* 1492, 237-241.
- Stolt, C.C., Schlierf, A., Lommes, P., et al., 2006. SoxD proteins influence multiple stages of oligodendrocyte development and modulate SoxE protein function. *Dev Cell* 11, 697-709.
- Strasberg Rieber, M., Zangemeister-Wittke, U., Rieber, M., 2001. p53-Independent induction of apoptosis in human melanoma cells by a bcl-2/bcl-xL bispecific antisense oligonucleotide. *Clin Cancer Res* 7, 1446-1451.
- Strobl, L.J., Eick, D., 1992. Hold back of RNA polymerase II at the transcription start site mediates down-regulation of c-myc in vivo. *Embo J* 11, 3307-3314.
- Sun, J.M., Chen, H.Y., Moniwa, M., et al., 2002. The transcriptional repressor Sp3 is associated with CK2-phosphorylated histone deacetylase 2. *J Biol Chem* 277, 35783-35786.
- Sun, S., Schiller, J.H., 2007. Angiogenesis inhibitors in the treatment of lung cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* 62, 93-104.
- Sund, M., Hamano, Y., Sugimoto, H., et al., 2005. Function of endogenous inhibitors of angiogenesis as endothelium-specific tumor suppressors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 2934-2939.
- Suske, G., 1999. The Sp-family of transcription factors. *Gene* 238, 291-300.
- Szabo, I.L., Pai, R., Soreghan, B., et al., 2001. NSAIDs inhibit the activation of egr-1 gene in microvascular endothelial cells. A key to inhibition of angiogenesis? *J Physiol Paris* 95, 379-383.

- Szutorisz, H., Dillon, N., Tora, L., 2005. The role of enhancers as centres for general transcription factor recruitment. *Trends Biochem Sci* 30, 593-599.
- Takahashi, K., Yamanaka, S., 2006. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126, 663-676.
- Taniuchi, T., Mortensen, E.R., Ferguson, A., et al., 1997. Overexpression of ZBP-89, a zinc finger DNA binding protein, in gastric cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 233, 154-160.
- Tarnawski, A.S., Jones, M.K., 2003. Inhibition of angiogenesis by NSAIDs: molecular mechanisms and clinical implications. *J Mol Med (Berl)* 81, 627-636.
- Terranova, V.P., DiFlorio, R., Lyall, R.M., et al., 1985. Human endothelial cells are chemotactic to endothelial cell growth factor and heparin. *J Cell Biol* 101, 2330-2334.
- Testa, A., Donati, G., Yan, P., et al., 2005. Chromatin immunoprecipitation (ChIP) on chip experiments uncover a widespread distribution of NF-Y binding CCAAT sites outside of core promoters. *J Biol Chem* 280, 13606-13615.
- Thiel, G., Cibelli, G., 2002. Regulation of life and death by the zinc finger transcription factor Egr-1. *J Cell Physiol* 193, 287-292.
- Thomas, K.A., 1987. Fibroblast growth factors. *FASEB J* 1, 434-440.
- Tjian, R., 1995. Molecular machines that control genes. *Sci Am* 272, 54-61.
- Tortora, G., Melisi, D., Ciardiello, F., 2004. Angiogenesis: a target for cancer therapy. *Curr Pharm Des* 10, 11-26.
- Tran, D.P., Kim, S.J., Park, N.J., et al., 2001. Mechanism of poly(A) signal transduction to RNA polymerase II in vitro. *Mol Cell Biol* 21, 7495-7508.
- Tsika, G., Ji, J., Tsika, R., 2004. Sp3 proteins negatively regulate beta myosin heavy chain gene expression during skeletal muscle inactivity. *Mol Cell Biol* 24, 10777-10791.
- Tsuda, M., Takahashi, S., Takahashi, Y., et al., 2003. Transcriptional co-activators CREB-binding protein and p300 regulate chondrocyte-specific gene expression via association with Sox9. *J Biol Chem* 278, 27224-27229.
- Turner, B.M., Birley, A.J., Lavender, J., 1992. Histone H4 isoforms acetylated at specific lysine residues define individual chromosomes and chromatin domains in *Drosophila polytene* nuclei. *Cell* 69, 375-384.
- Uchikawa, M., Kamachi, Y., Kondoh, H., 1999. Two distinct subgroups of Group B Sox genes for transcriptional activators and repressors: their expression during embryonic organogenesis of the chicken. *Mech Dev* 84, 103-120.
- Udvardi, A.J., Templeton, D.J., Horowitz, J.M., 1995. Functional interactions between the retinoblastoma (Rb) protein and Sp-family members: superactivation by Rb requires amino acids necessary for growth suppression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 3953-3957.
- Vidal, F., Aragonés, J., Alfranca, A., et al., 2000. Up-regulation of vascular endothelial growth factor receptor Flt-1 after endothelial denudation: role of transcription factor Egr-1. *Blood* 95, 3387-3395.
- Vilar, J.M., Saiz, L., 2005. DNA looping in gene regulation: from the assembly of macromolecular complexes to the control of transcriptional noise. *Curr Opin Genet Dev* 15, 136-144.

- Vokes, E., Herbst, R., Sandler, A., 2006. Angiogenesis inhibition in the treatment of lung cancer. *Clin Adv Hematol Oncol* 4, 1-10; quiz 11-12.
- Wallrath, L.L., Lu, Q., Granok, H., et al., 1994. Architectural variations of inducible eukaryotic promoters: preset and remodeling chromatin structures. *Bioessays* 16, 165-170.
- Wang, Y., Kobori, J.A., Hood, L., 1993. The ht beta gene encodes a novel CACCC box-binding protein that regulates T-cell receptor gene expression. *Mol Cell Biol* 13, 5691-5701.
- Watanabe, K., Hasegawa, Y., Yamashita, H., et al., 2004. Vasohibin as an endothelium-derived negative feedback regulator of angiogenesis. *J Clin Invest* 114, 898-907.
- Wegner, M., 1999. From head to toes: the multiple facets of Sox proteins. *Nucleic Acids Res.* 27, 1409-1420.
- Wegner, M., 2010. All purpose Sox: The many roles of Sox proteins in gene expression. *Int J Biochem Cell Biol* 42, 381-390.
- Weiss, M.A., 2001. Floppy SOX: mutual induced fit in hmg (high-mobility group) box-DNA recognition. *Mol Endocrinol* 15, 353-362.
- West, A.G., Fraser, P., 2005. Remote control of gene transcription. *Hum Mol Genet* 14 Spec No 1, R101-111.
- Wiebe, M.S., Wilder, P.J., Kelly, D., et al., 2000. Isolation, characterization, and differential expression of the murine Sox-2 promoter. *Gene* 246, 383-393.
- Wieczorek, E., Lin, Z., Perkins, E.B., et al., 2000. The zinc finger repressor, ZBP-89, binds to the silencer element of the human vimentin gene and complexes with the transcriptional activator, Sp1. *J Biol Chem* 275, 12879-12888.
- Williams, G.M., 2008. Antitumor necrosis factor-alpha therapy and potential cancer inhibition. *Eur J Cancer Prev* 17, 169-177.
- Wilson, M., Koopman, P., 2002. Matching SOX: partner proteins and co-factors of the SOX family of transcriptional regulators. *Curr Opin Genet Dev* 12, 441-446.
- Wolffe, A.P., Pruss, D., 1996. Targeting chromatin disruption: Transcription regulators that acetylate histones. *Cell* 84, 817-819.
- Wray, G.A., Hahn, M.W., Abouheif, E., et al., 2003. The evolution of transcriptional regulation in eukaryotes. *Mol Biol Evol* 20, 1377-1419.
- Wunderle, V.M., Critcher, R., Ashworth, A., et al., 1996. Cloning and characterization of SOX5, a new member of the human SOX gene family. *Genomics* 36, 354-358.
- Xie, K., Wei, D., Huang, S., 2006. Transcriptional anti-angiogenesis therapy of human pancreatic cancer. *Cytokine Growth Factor Rev* 17, 147-156.
- Xu, Q., Springer, L., Merchant, J.L., et al., 2006. Identification of zinc finger binding protein 89 (ZBP-89) as a transcriptional activator for a major bovine growth hormone receptor promoter. *Mol Cell Endocrinol* 251, 88-95.
- Xue, L., Wu, J., Zheng, W., et al., 2004. Sp1 is involved in the transcriptional activation of p16(INK4) by p21(Waf1) in HeLa cells. *FEBS Lett* 564, 199-204.
- Yamada, A., Takaki, S., Hayashi, F., et al., 2001. Identification and characterization of a transcriptional regulator for the lck proximal promoter. *J Biol Chem* 276, 18082-18089.
- Yan, S.F., Lu, J., Zou, Y.S., et al., 1999. Hypoxia-associated induction of early growth response-1 gene expression. *J Biol Chem* 274, 15030-15040.

- Yao, J., Mackman, N., Edgington, T.S., et al., 1997. Lipopolysaccharide induction of the tumor necrosis factor- $\alpha$  promoter in human monocytic cells. Regulation by Egr-1, c-Jun, and NF- $\kappa$ B transcription factors. *J Biol Chem* 272, 17795-17801.
- Young, N., Hahn, C.N., Poh, A., et al., 2006. Effect of disrupted SOX18 transcription factor function on tumor growth, vascularization, and endothelial development. *J Natl Cancer Inst* 98, 1060-1067.
- Yuan, H., Corbi, N., Basilico, C., et al., 1995. Developmental-specific activity of the FGF-4 enhancer requires the synergistic action of Sox2 and Oct-3. *Genes Dev* 9, 2635-2645.
- Yuan, X., Lu, M.L., Li, T., et al., 2001. SRY interacts with and negatively regulates androgen receptor transcriptional activity. *J Biol Chem* 276, 46647-46654.
- Zeitlinger, J., Stark, A., Kellis, M., et al., 2007. RNA polymerase stalling at developmental control genes in the *Drosophila melanogaster* embryo. *Nat Genet* 39, 1512-1516.
- Zhang, C.Z., Chen, G.G., Lai, P.B., 2010. Transcription factor ZBP-89 in cancer growth and apoptosis. *Biochim Biophys Acta* 1806, 36-41.
- Zhang, X., Diab, I.H., Zehner, Z.E., 2003. ZBP-89 represses vimentin gene transcription by interacting with the transcriptional activator, Sp1. *Nucleic Acids Res* 31, 2900-2914.
- Zhao, L., Chang, L.S., 1997. The human POLD1 gene. Identification of an upstream activator sequence, activation by Sp1 and Sp3, and cell cycle regulation. *J Biol Chem* 272, 4869-4882.
- Zhao, X., Bausano, B., Pike, B.R., et al., 2001. TNF- $\alpha$  stimulates caspase-3 activation and apoptotic cell death in primary septo-hippocampal cultures. *J Neurosci Res* 64, 121-131.
- Zhu, J., Giannola, D.M., Zhang, Y., et al., 2003. NF- $\kappa$ B cooperates with USF1/2 to induce the hematopoietic expression of HOXB4. *Blood* 102, 2420-2427.
- Zhu, J., He, F., Hu, S., et al., 2008. On the nature of human housekeeping genes. *Trends Genet* 24, 481-484.

## BIOGRAFIJA

Mr Isidora Petrović je rođena 4. marta 1976. godine u Beogradu. Diplomirala je 2000. godine na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, studijska grupa Molekularna biologija i fiziologija, sa prosečnom ocenom 9.23. Iste godine upisala je posle diplomanske studije na smeru Molekularna genetika i genetičko inženjerstvo. Magistarski rad pod nazivom: „Ekspresija i analiza promotorskog regiona humanog *SOX18* gena“, odbranila je 12. jula 2005. godine. Magistarski rad je urađen u Institutu za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, u Laboratoriji za humanu molekularnu genetiku, pod rukovodstvom dr Milene Stevanović.

Mr Isidora Petrović je od 2001. godine zaposlena u Institutu za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo. Zvanje istraživač saradnik stekla je 2005. godine odlukom Naučnog veća IMGGI, a ponovni izbor u zvanje istraživač saradnik potvrđen je 2008 godine. Dobitnik je nagrade fondacije „Goran Ljubijankić“ za najbolji magistarski rad odbranjen u 2005. godini. Doktorsku tezu je najvećim delom realizovala u Laboratoriji za humanu molekularnu genetiku, Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo. Deo doktorske disertacije je urađen u Laboratoriji za eksperimentalnu onkologiju, koja je deo Univerzitetske bolnice, Univerziteta u Lozani, Švajcarska. U svom dosadašnjem radu učestvovala je u tri nacionalna i jednom međunarodnom projektu. Rezultate svog dosadašnjeg rada je objavila u osam naučnih radova u međunarodnim časopisima.

Прилог 1.

## Изјава о ауторству

Потписани-Исидора Петровић

број индекса \_\_\_\_\_

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Транскрипциона регулације експресије хуманог *SOX18* гена

---

---

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

Потпис докторанда

У Београду, 24.10.2012.

*Isidora Petrović*

Прилог 2.

## Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Исидора Петровић

Број индекса \_\_\_\_\_

Студијски програм \_\_\_\_\_

Наслов рада Транскрипциона регулације експресије хуманог SOX18 гена

Ментор др Милена Стевановић

Потписани/а \_\_\_\_\_ Исидора Петровић

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

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

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

Потпис докторанда

У Београду, 24.10.2012.

Isidora Petrovic'

Прилог 3.

### Изјава о коришћењу

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

Транскрипциона регулације експресије хуманог *SOX18* гена

---

која је моје ауторско дело.

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

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

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

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

Потпис докторанда

У Београду, 24.10.2012.

*Indira Petrović*



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

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

5. Ауторство – без прераде. Дозвољаваате 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. Дозвољаваате 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.