

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Milena C. Milivojević

Uloga *Sonic Hedgehog* signalnog puta u regulaciji ekspresije *SOX18* gena u HeLa ćelijama, kao model sistemu karcinoma grlića materice

doktorska disertacija

Beograd, 2014

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF BIOLOGY

Milena C. Milivojević

**The role of *Sonic Hedgehog* signaling
pathway in the regulation of *SOX18*
gene expression in HeLa cells, model
system of cervical carcinoma**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2014

MENTORI:

dr Isidora Petrović, naučni saradnik

Univerzitet u Beogradu,

Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo

dr Dušanka Savić Pavićević, vanredni profesor

Univerzitet u Beogradu,

Biološki fakultet

KOMISIJA:

dr Milena Stevanović, naučni savetnik,

dopisni član SANU

Univerzitet u Beogradu,

Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo

Datum odbrane _____

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

Ovom prilikom se zahvaljujem dr Mileni Stevanović na spremnosti da svoje znanje i iskustvo podeli sa mnom. Zahvaljujem se na ukazanom poverenju i prilici da radim u Laboratoriji za humanu molekularnu genetiku.

Posebno se zahvaljujem svom mentoru, dr Isidori Petrović, na nesebičnoj pomoći i posvećenosti bez čega ovaj rad ne bi bio ostvaren. Isidora, hvala ti na savetima, sugestijama i podršci prilikom izrade ove teze. Hvala ti pre svega na entuzijazmu koji me je vodio u vrlo teškim trenucima.

Dr Dušanki Savić Pavićević se zahvaljujem za prihvatanje mentorstva kao i na svim savetima i kritičkoj oceni ove teze.

Zahvaljujem se svojim kolegama iz Laboratorije za humanu molekularnu genetiku, onim mlađim i onim malo starijim, bez kojih bi ovaj posao bio nezamisliv.

Zahvaljujem se svim kolegama iz Instituta, koji su učinili da svakodnevni rad predstavlja zadovoljstvo.

Najveću zahvalnost dugujem svojoj porodici, čije su mi razumenavje, podrška a pre svega ljubav bili od neprocenjivog značaja i njima posvećujem ovaj rad.

Uloga *Sonic hedgehog* signalnog puta u regulaciji ekspresije *SOX18* gena u HeLa ćelijama, kao model sistemu karcinoma grlića materice

REZIME

Sonic Hedgehog (SHH) signalni put ima važnu ulogu u procesima koji se odvijaju tokom embrionalnog razvića u kojima kontroliše proliferaciju i diferencijaciju ćelija i učestvuje u održavanju polarnosti tkiva. Poslednjih godina mnogobrojni literaturni podaci pokazuju da promena u regulaciji SHH signalnog puta dovodi do nastanka i progresije različitih vrsta tumora kod čoveka. SHH signalni put je povezan sa meduloblastomom, leukemijom, karcinomom bazalnih ćelija, tumorima pluća, prostate, pancreasa, dojke i jajnika. Takođe, povećana ekspresija komponenti SHH signalnog puta je primećena u premalignim lezijama i ćelijama karcinoma grlića materice.

SOX18 gen pripada familiji *SOX* gena koji kodiraju transkripcione faktore uključene u kontrolu različitih procesa tokom embrionalnog razvića. *SOX18* protein ima važnu ulogu u razviću vaskularnog sistema kao i u adultnoj neovaskularizaciji. Uloga *SOX18* proteina u vaskularnom razviću otkrivena je na osnovu poremećaja u razvoju vaskularnog sistema koji su uočeni kod prirodnih mutanata miša i čoveka. Osim toga, kod adultnog organizma *SOX18* protein učestvuje u regulaciji angiogeneze i limfangiogeneze kako u fiziološkim stanjima organizma, tako i tokom patofizioloških promena kao što su zarastanje rana i tumorska angiogeneza. Takođe, pokazano je da se inhibicijom *SOX18* funkcije utiče na limfangiogenezu čime se sprečava metastaza ćelija tumora. Najnoviji podaci pokazuju da je ekspresija *SOX18* gena, detektovana u ćelijama invazivnog karcinoma dojke i tumora jajnika, a nivo ekspresije je u direktnoj korelaciji sa stadijumom tumora i može predstavljati prognostički marker.

Predmet istraživanja prikazanog u ovom radu je bila analiza uloge SHH signalnog puta u regulaciji ekspresije *SOX18* gena u HeLa ćelijama, *in vitro* model sistemu karcinoma grlića materice. Prvo je analizirana uloga GLI regulatornih proteina, finalnih efektoru SHH signalne kaskade, u regulaciji transkripcije *SOX18* gena. Prikazani rezultati su pokazali da su GLI1 i GLI2 pozitivni regulatori promotorske aktivnosti *SOX18* gena kao i da povećavaju endogenu ekspresiju *SOX18* gena, dok

GLI3 transkripcioni faktor nije uticao na aktivnost *SOX18* promotorskog konstrukta niti na nivo endogene ekspresije *SOX18* gena u HeLa ćelijama. U eksperimentima smanjene elektroforetske pokretljivosti pokazano je da se GLI1 transkripcioni faktor specifično vezuje za tri od ukupno sedam identifikovanih potencijalnih vezivnih mesta za GLI proteine u okviru promotora *SOX18* gena. Rezultati su takođe pokazali da promena aktivnosti SHH signalnog puta upotrebom specifičnih aktivatora i inhibitora dovodi do promena u nivou proliferacije, vijabilnosti i migracije HeLa ćelija. Najbitnije, modulacija aktivnosti SHH signalnog puta dovodi do promena u nivou ekspresije *SOX18* gena, tako što se nivo ekspresije smanjuje tokom inhibicije SHH signalne kaskade, odnosno povećava tokom njegove aktivacije. Osim toga, u radu je analiziran uticaj povećane ekspresije *SOX18* gena u HeLa ćelijama i pokazano je da nema uticaja na proliferaciju i vijabilnost, dok je zapažen značajan uticaj na migraciju HeLa ćelija. Takođe, rezultati pokazuju da *SOX18* smanjuje ekspresiju GLI1, GLI2, GLI3 transkripcionih faktora i SHH proteina.

SOX18 gen je identifikovan kao novi ciljni gen čiju ekspresiju reguliše SHH signalna kaskada u HeLa ćelijama. Prikazani rezultati omogućiće bolje razumevanje molekularnih mehanizama uključenih u regulaciju transkripcije *SOX18* gena. Na osnovu prikazanih rezultata možemo zaključiti da njegova uloga u HeLa ćelijama može biti u regulisanju procesa migracije gde pokazuje promigratorni potencijal. Modulacija aktivnosti SHH signalnog puta malim, aktivnim molekulima za posledicu ima i promene u regulaciji *SOX18* ekspresije, čime se otvara mogućnost za potencijalnu farmakološku manipulaciju ekspresijom *SOX18* gena u tumorskim ćelijama.

KLJUČNE REČI: SHH signalni put, *SOX18*, transkripcioni faktor, transkripciona regulacija, migracija, proliferacija

NAUČNA OBLAST: Biologija

UŽA NAUČNA OBLAST: Molekularna biologija

UDK BROJ: 577.21:577.218 (043.3)

The role of *Sonic Hedgehog* signaling pathway in the regulation of *SOX18* gene expression in HeLa cells, model system of cervical carcinoma

ABSTRACT

The *Sonic Hedgehog* (SHH) signaling pathway plays important role in embryonic development directing cell proliferation and differentiation and maintaining tissue polarity. In adults, this signaling pathway is rather suppressed. SHH signaling pathway has been associated with medulloblastoma, leukemia, basal cell carcinoma and lung, prostate, pancreatic, breast and ovarian cancers. In the last years, numerous data show that deregulation of SHH signaling pathway has been associated with onset and progression of various types of human cancer. It was shown that increased expression of HH-signaling molecules was seen in precancerous lesions and in cervical cancer.

SOX18 gene is a member of *SOX* gene family that encodes transcription factors implicated in the control of various developmental processes. *SOX18* protein plays important roles in vascular development and postnatal neovascularization. The functional importance of *SOX18* protein in vascular development is revealed by the vascular defects caused by mutation in mice and humans. Also, in adults *SOX18* is involved in the regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis in physiological and pathophysiological condition such in wound healing or tumor growth. Furthermore, it has been reported that interfere with *SOX18* function impairs tumor lymphangiogenesis which decreases the rate of cancer cell metastasis. In past two years, literature data show *SOX18* expression in invasive ductal breast carcinoma and ovarian carcinoma and that level of expression correlates with poor prognosis suggesting that a *SOX18* expression may serve as a prognostic marker.

The aim of this study was to investigate the role of *Sonic Hedgehog* signaling pathway in the regulation of *SOX18* gene expression in HeLa cells, *in vitro* model system of cervical cancer. We were analyzing the effect of GLI regulator proteins, final effectors of SHH signaling pathway, on transcriptional regulation of *SOX18* gene expression. Presented results have shown that GLI1 and GLI2 are potent activators of

SOX18 promoter activity as well as *SOX18* expression in HeLa cells, while *GLI3* had no effect. By *in vitro* binding assays we show binding of *GLI1* protein to three out of seven predicted binding sites within *SOX18* promoter. Presented results also show that modulation of pathway using inhibitors and activators of SHH signaling pathway affected cell proliferation, viability and migration of HeLa cells. More importantly, modulation of SHH signaling pathway affected *SOX18* gene expression, presenting that cyclopamine treatment of HeLa cells decreased *SOX18* gene expression while purmorphamine treatment of HeLa cells increased *SOX18* gene expression. Furthermore, we have shown that overexpression of *SOX18* caused no significant change in cell proliferation and viability while had considerable effect on HeLa cell's migratory potential. Also, *SOX18* overexpression resulted in down regulation of *GLI1*, *GLI2*, *GLI3* and *SHH* gene expression.

SOX18 was identified as a novel target gene regulated by SHH signaling in HeLa cells. Presented results will help in better understanding of molecular mechanisms involved in transcriptional regulation of *SOX18* gene expression. Presented results also show that *SOX18* is involved in the regulation of HeLa cells migration. Applying small molecules inhibitors and activators for SHH signaling, it was possible to affect *SOX18* gene expression, opening a new possibilities for pharmacological manipulation with *SOX18* gene expression in cancer cells.

KEY WORDS: SHH signaling pathway, *SOX18*, transcription factor, transcription regulation, migration, proliferation

SCIENTIFIC FIELD: Biology

SCIENTIFIC DISCIPLINE: Molecular biology

UDC NUMBER: 577.21:577.218 (043.3)

SADRŽAJ:

1.UVOD	1
1.1. Regulacija ekspresije gena kod eukariota	2
1.2. Molekularni mehanizam prenosa signala kroz ćeliju	5
1.3. <i>Hedgehog</i> signalni put	8
1.3.1. Komponente HH signalnog puta	12
1.3.1.1. Ligandi HH signalnog puta	12
1.3.1.2. Patched protein	13
1.3.1.3. Smoothened protein	14
1.3.1.4. GLI familija proteina	15
1.3.2. Uloga SHH signalnog puta u embriogenezi sisara	16
1.3.3. Uloga SHH signalnog puta kod adulta	17
1.3.4. Uloga SHH signalnog puta u kancerogenezi	18
1.4. <i>SOX</i> geni	19
1.4.1. Osnovne osobine <i>SOX</i> proteina	22
1.4.2. Funkcije <i>SOX</i> proteina	24
1.5. <i>SOXF</i> geni / <i>SOXF</i> proteini	26
1.6. <i>SOX18</i> gen	28
1.6.1 Regulacija ekspresije <i>SOX18</i> gena	29
1.6.2. Funkcije <i>SOX18</i> gena	30
1.6.3. <i>SOX18</i> u kancerogenezi	31
1.7. Karcinom grlića materice	33
2. CILJ RADA	36
3. MATERIJAL I METODE	38
3.1. Eksperimentalni material	38
3.1.1. Bakterijski soj korišćen u radu	38
3.1.2. Vektori korišćeni u radu	38
3.1.3. Plazmidni konstrukti korišćeni u radu	39
3.1.4. Ćelijska linija korišćena u radu	40
3.1. 5. Antitela korišćena u radu	40

3.1. 6. Oligonukleotidi korišćeni u radu	41
3.1.7. Komercijalni kitovi	43
3.1.8. Komercijalni agensi korišćeni u radu	43
3.1.9. Kompjuterski program	43
3.2. Eksperimentalne metode	44
3.2.1. Enzimaska reakcija isecanja DNK restrikcionim enzimima	44
3.2.2. Liganje fragmenata DNK	44
3.2.3. Kultivacija bakterija	44
3.2.4. Priprema bakterija za elektroporaciju (elektro-transformaciju) i transformacija	44
3.2.5. <i>In silico</i> analiza humanog <i>SOX18</i> promotora i poređenje sa ortologom sekvencom miša	45
3.2.6. Izolacija plazmidne DNK “EndoFree ^R Plasmid” kitom	46
3.2.7. Tranzijentna transfekcija HeLa ćelija kalcijum fosfatnom precipitacijom	46
3.2.8. Tranzijentna transfekcija HeLa ćelija LIPOFECTAMINE reagensom	47
3.2.9. Priprema ćelijskih ekstrakata	47
3.2.10. β -galaktozidazni esej	48
3.2.11. CAT esej	48
3.2.12. Izolacija jedarnih proteina iz HeLa ćelija	49
3.2.13. Izolacija ukupnih ćelijskih proteina iz HeLa ćelija	49
3.2. 14. Esej smanjene elektroforetske pokretljivosti	50
3.2.15. Imunološka detekcija proteina (eng. Western blot)	51
3.2.16. Imunofluorescentna citohemijska analiza	51
3.2.17. Tretmani ćelija	52
3.2.18. MTT test vijabilnosti	52
3.2.19. “Wound scratch” esej	53
3.2.20. Izolacija RNK	53
3.2.21. Oslobađanje totalne RNK od ostataka genomske DNK	53
3.2.22. Sinteza komplementarne DNK (cDNK)	54

3.2.23. RT-PCR	54
3.2.24. Kvantitativni RT-PCR (qRT-PCR)	55
3.2.25. Kvantifikacija luminiscentnih signala luciferaza primenom "Dual-Luciferase Reporter Assay" sistemom	56
4. REZULTATI	57
4.1. HeLa ćelije kao model sistem za ispitivanje uloge SHH puta u regulaciji ekspresije <i>SOX18</i> gena	57
4.2. Bioinformatička (<i>in silico</i>) analiza promotorskog regiona <i>SOX18</i> gena	58
4.3. Analiza uloge povećane ekspresije GLI 1-3 transkripcionih faktora na aktivnost optimalnog promotora <i>SOX18</i> gena u HeLa ćelijama	61
4.4. <i>In vitro</i> vezivanje GLI transkripcionih faktora za potencijalna vezivna mesta u okviru optimalnog promotora <i>SOX18</i> gena	63
4.5. Analiza efekta pojačane ekspresije GLI transkripcionih faktora na endogenu ekspresiju <i>SOX18</i> gena	69
4.6. Modulacija SHH signalnog puta ciklopaminom u HeLa ćelijama	71
4.6.1. Uticaj ciklopamina na proliferaciju i vijabilnost Hela ćelija	74
4.6.2. Uticaj ciklopamina na migraciju HeLa ćelija	76
4.6.3. Uticaj ciklopamina na endogenu <i>SOX18</i> ekspresiju	77
4.7. Modulacija SHH signalnog puta purmofaminom u HeLa ćelijama	80
4.7.1. Uticaj purmorfamina na proliferaciju i vijabilnost HeLa ćelijama	81
4.7.2. Uticaj purmorfamina na migraciju HeLa ćelija	83
4.7.3. Uticaj purmorfamina na endogenu <i>SOX18</i> ekspresiju	84
4.8. Konstruisanje i funkcionalna analiza <i>wild-type</i> i dominantno-negativnog <i>SOX18</i> ekspresionih konstrukata	86
4.8.1. Konstruisanje pCISOX18 <i>wt</i> i pCISOX18DN ekspresionih konstrukata	88
4.8.2. Ekspresija <i>wild-type</i> i dominantno-negativnog <i>SOX18</i> proteina u HeLa ćelijama	89
4.8.3. <i>In vitro</i> vezivanje <i>wild type</i> i dominantno -negativnog	

SOX18 mutanta	90
4.8.4. Funkcionalna analiza pCISOX18 _{wt} i pCISOX18 ekspresionih konstrukata	93
4.9. Uticaj SOX18 proteina na proliferaciju i vijabilnost HeLa ćelija	96
4.10. Uticaj SOX18 proteina na migraciju HeLa ćelija	99
4.11. Uticaj SOX18 proteina na ekspresiju komponenti SHH signalnog puta u HeLa ćelijama	100
5. DISKUSIJA	103
5.1. Kompjuterska analiza potencijalnih vezivnih mesta za GLI transkripcione faktore u okviru promotorskog regiona <i>SOX18</i> gena	105
5.2. Uloga GLI transkripcionih faktora u regulaciji transkripcije <i>SOX18</i> gena u HeLa ćelijama	107
5.3. Efekat modulacije SHH signalnog puta ciklopaminom u HeLa ćelijama	109
5.4. Efekat modulacije SHH signalnog puta purmorfaminom u HeLa ćelijama	112
5.5. Strategija primenjena za generisanje konstrukata koji eksprimira dominantno negativni SOX18 protein	113
5.6. Uticaj SOX18 proteina na proliferaciju, vijabilnost, migraciju HeLa ćelija kao i na komponente SHH signalnog puta	117
6. ZAKLJUČCI	122
7. LITERATURA	124

1. UVOD

Kao rezultat vremenski i prostorno strogo kontrolisane ekspresije gena nastaje veliki broj različitih, specijalizovanih tipova ćelija koje formiraju tkiva i organe tokom razvića višćelijskog organizma. Sa stanovišta evolucije, stvaranje složenijih bioloških sistema nije teklo u pravcu nastajanja većeg broju novih gena, već su se usložnjavali mehanizmi kojima su ekspresije već postojećih gena regulisane. Regulacija ekspresije gena kod eukariota predstavlja vrlo kompleksan proces koji iziskuje kontrolisanu interakciju opštih i tkivno-specifičnih transkripcionih faktora kao i *cis* regulatornih elemenata. O važnosti regulacije ekspresije gena govori i činjenica da poremećaji u regulaciji gena uključenih u važne procese tokom razvića dovode do maligne transformacije ćelija.

Ovaj rad se bavi analizom transkripcione regulacije humanog *SOX18* gena pod uticajem *Hedgehog* signalne kaskade u ćelijskom model sistemu koji vodi poreklo od karcinoma grlića materice. Funkcionalna veza između pomenutog signalnog puta i humanog *SOX18* gena, koja je prikazana u ovom radu, predstavlja doprinos u boljem razumevanju uloge *SOX18* gena u regulaciji procesa koji su uključeni u nastanak i napredovanje tumora.

1. Regulacija ekspresije gena kod eukariota

Poznato je da regulacija ekspresije gena i sinteza proteina kod eukariota predstavljaju složene procese koji su kontrolisani na više nivoa. Proces regulacije podrazumevaju transkripcionu kontrolu, posttranskripcionu kontrolu (regulacija obrade pre-iRNK i transport iz jedra), kontrolu degradacije iRNK, translacionu i posttranslacionu kontrolu (modifikacija proteina posle nakon čega se oni aktiviraju) (Darnell, 1982). Pre samog procesa transkripcije eukariotskih gena dolazi do remodelovanja hromatina na ciljnom lokusu, modifikacije histona, vezivanja aktivatora za regulatorne elemente (promotor, enhenser) i vezivanja transkripcione mašinerije za jezgro promotora (Smale and Kadonaga, 2003). Za otpočinjanje transkripcije neophodno je otvaranje kondenzovanog hromatina u regionima koji obuhvataju promotor ali i sam gen. U sastav hromatina ulaze DNK i histonski protein, koji sačinjavaju visoko organizovanu i gusto pakovanu strukturu. Proces dekondenzacije otpočinje u okviru velikih hromatinskih domena, nakon čega dolazi do remodelovanja hromatina u okviru promotora koje je praćeno kovalentnim modifikacijama histona u okviru nukleozoma (Turner et al., 1992; Wallrath et al., 1994). Nakon modifikacija dolazi do promena u strukturi i poziciji nukleozoma na promotorima koji su transkripciono aktivni.

Eukariotski geni kodiraju informacione RNK molekule (iRNK) koji nose informaciju za sintezu proteina, ali i ne-kodirajuće RNK molekule u koje spadaju transportna RNK (tRNK), ribozomalna RNK (rRNK), mikro RNK (miRNK), mala-nuklearna RNK, mala-interferirajuća RNK. Prokarioti imaju jednu RNK polimerazu kojom se transkribuju protein-kodirajući geni, dok kod eukariota postoje: RNK polimeraza I koja prepisuje gene za rRNK, RNK polimeraza II koja prepisuje gene koji kodiraju proteine i neke jedarne RNK, i RNK polimeraza III koja je uključena u sintezu tRNK i 5S RNK (Lewis and Burgess, 1982).

Eukariotski promotor gena se sastoji od jezgra promotora koje okružuje mesto inicijacije transkripcije koji predstavlja minimalnu sekvencu neophodnu za vezivanje transkripcione mašinerije i otpočinjanje bazalne transkripcije. U sastav promotora

eukariotskih gena ulaze i uzvodne sekvence udaljene nekoliko stotina baznih parova, koje sadrže vezivna mesta za opšte i tkivno-specifične transkripcione faktore koji imaju aktivatorsku ili represorsku ulogu u transkripcionoj regulaciji gena (Maston et al., 2006). TATA boks (TATAWAAR; W-A/T, R- A/G) je prvi identifikovani promotorski element lokalizovan 25 do 30 baznih parova uzvodno od starta transkripcije (Breathnach and Chambon, 1981). Ipak, veliki broj promotora ne sadrži TATA motiv, već sadrže druge konsenzusne elemente, kao što je inicijatorski element (Inr, YYANWYY, Y-C/T, N-A/C/G/T) koji okružuje start transkripcije.

Proces transkripcije se sastoji iz nekoliko faza. U prvoj fazi dolazi do dekondezacije hromatina i omogućavanja interakcije DNK sa brojnim transkripcionim faktorima (Ghosh and Van Duyne, 1996). U ovoj fazi se formira preinicijacioni kompleks koji omogućava vezivanje RNK polimeraze II. Formiranje preinicijacionog kompleksa počinje vezivanjem TATA vezujućeg proteina (eng. TATA binding protein-TBP) u vidu sedla za TATAAA sekvencu ostavljajući spoljašnje površine slobodne za interakciju sa oko 13 TAF proteina (eng. TBP associated factors, TBP asociраних proteina) (Sanders and Weil, 2000). Na taj način se formira TFIID kompleks (transkripcioni faktor D RNK polimeraze II) (Ghosh and Van Duyne, 1996). Nakon toga sledi vezivanje TFIIA za TFIID što stabilizuje interakcija između TFIID i DNK (Maldonado et al., 1990). Zatim se vezuje TFIIB koji ima ulogu da stabilizuje vezivanje TBP za DNK (Imbalzano et al, 1994). RNK polimeraza II se preko TFIIB vezuje za preinicijacioni kompleks i pravilno se pozicionira u odnosu na start transkripcije (Li et al., 1994). Vezivanjem TFIIIE i TFIIH koji čine holoenzim mase oko 2 MDa preinicijacioni kompleks se finalno formira (Dvir et al., 2001). TFIIH funkcioniše kao helikaza, ATP-azna i protein-kinazna (Flores et al., 1992; Zawel and Reinberg, 1992). Ovaj transkripcioni faktor u prisustvu ATP-a dovodi do razmotavanja DNK u regionu starta transkripcije (Roy et al., 1994). Takođe, dolazi do fosforilacije TBP-a, TFIIIE, TFIIIF i RNK polimeraze II što za posledicu ima oslobađanje RNK polimeraze II iz inicijacionog kompleksa nakon što se transkribuje 30-40 nukleotida.

Posle preinicijacije i inicijacije sledi proces elongacije koji je strogo kontrolisan proces. Naime pokazano je da višćelijski organizmi imaju i još jedan vid regulacije genske ekspresije, post-inicijacijsku regulaciju, pa tako nekih 15% tkivno-specifičnih

gena ima vezanu polimerazu na promotorima u svim tkivima ali je prolazak polimeraze ka startu transkripcije dozvoljen na tkivno specifičan način (Zeitlinger et al., 2007). Kod inducibilnih gena kao što su geni toplotnog šoka (Hsp70 vinske mušice) ili protoonkogeni (c-myc) na promotorima se nalazi već postavljena bazalna transkripciona mašinerija, transkripcija je započeta ali nakon 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 proksimalni promotorski region je uz pomoć regulatornih proteina oslobođen od nukleozoma pa je omogućen brz odgovor na stimulus (Gilchrist et al., 2008; Mavrich et al., 2008)

Terminacija transkripcije predstavlja završnu fazu transkripcije gena. U ovoj fazi RNK polimeraza II stiže do poliadenilacionog signala (AATAA) na kodirajućem lancu DNK. Poliadenilacioni signal prepoznaje poli A polimeraza koja dodaje oko 250 adenina na iRNK na osnovu čega se formira poliadenilacioni rep koji ima bitnu ulogu u transportu iz nukleusa i stabilnosti iRNK u citoplazmi (Tran et al., 2001).

Kako je predhodno napomenuto, regulacija transkripcije gena je strogo kontrolisan proces u kome učestvuju transkripcioni faktori. To su DNK-vezujući proteini koji se vezuju u okviru promotora gena ili enhancerske sekvence i učestvuju u aktivaciji ili inhibiciji ekspresije gena. Broj transkripcionih faktora zavisi od veličine i složenosti genoma, tako da veći genomi imaju i veći broj transkripcionih faktora (van Nimwegen, 2003). Transkripcioni faktori se mogu podeliti na opšte, koji su uključeni u formiranje preinicijacionog i inicijacionog kompleksa i koji su odgovorni za otpočinjanje transkripcije, i specifične koji se vezuju za odgovarajuće DNK sekvence i imaju ulogu aktivatora ili represora transkripcije. Transkripcioni faktori se sastoje iz nekoliko domena među kojima su DNK-vezujući domen, preko koga ostvaruju funkciju vezivanja i domen za protein-protein interakcije koji služi za interakciju sa drugim proteinima. Kod prokariota regulatorni proteini aktiviraju ili reprimiraju gene uglavnom pojedinačno, a kod eukariota uglavnom funkcionišu u određenim kombinacijama. U višćelijskim organizmima, naime, transkripcioni faktori ne obavljaju svoju funkciju pojedinačno već uz pomoć ko-faktora pri čemu stvaraju mrežu regulatornih proteina koja omogućava različite proteinske interakcije.

1.2. Molekularni mehanizmi prenosa signala kroz ćeliju

Jedna od karakteristika koja je zajednička za sve žive organizme je njihova sposobnost da svakodnevno usklađuju svoju aktivnost sa uslovima sredine u kojoj žive. Komunikacija sa sredinom je omogućena zahvaljujući mnogobrojnim signalnim putavima koji primaju i obrađuju signale koji potiču iz spoljašnjeg okruženja, od drugih ćelija unutar samog organizma ili iz različitih delova ćelije. Pored toga, u višćelijskom organizmu u normalnim fiziološkim uslovima procesi u ćeliji su koordinisani sa potrebama organizma kao celine. Formiranje višćelijskog organizma koji sadrže specijalizovana tkiva i organe zavisi od koordinisane regulacije broja ćelija, morfologije, lokalizacije i ekspresije različitih funkcija. Koordinacija velikog broja fizioloških funkcija, među kojima su ćelijski rast, deoba, diferencijacija, razviće, ćelijska kretanja, obrada čulnih informacija, podrazumeva komunikaciju između ćelija istog ili različitog tkiva (Krauss, 2008).

Ćelije mogu da komuniciraju na nekoliko različitih načina prenosom signala. Signali predstavljaju male molekule koji migriraju od ćelije koja ih oslobađa do susednih ili udaljenih ćelija i prenose informacije koje se dešavaju u njihovom okruženju. To su tzv. spoljašnji signali koji se vezuju za receptore na ciljnim ćelijama. Vezivanje signala za receptor dovodi do promene u ćeliji, do obrade signala označenog kao transdukcija signala. Unutarćelijski prenos signala ili signalna transdukcija se sastoji iz više koraka i predstavlja odgovor ćelije na stimulus (Krauss, 2008).

Ćelije koje se nalaze jedna pored druge komuniciraju preko površinskih molekula, kao što su adhezioni proteini (Ahmed and Xiang, 2011). Takođe, ćelije mogu da komuniciraju i direktno, prenosom signalnih molekula i metabolita iz citoplazme jedne ćelije u citoplazmu susedne ćelije kroz pukotinaste veze (eng. gap junction) (De Maio et al., 2002). Poseban vid komunikacije je zapažen kod nervnih ćelija koje pod uticajem električnog stimulusa sa krajeva svojih aksona oslobađaju neurotransmitere koji do ciljne ćelije dospevaju difuzijom kroz sinaptičku pukotinu.

Međućelijska komunikacija je složen proces koji se može podeliti u nekoliko faza. Prvu fazu predstavlja formiranje signala u kojoj se različiti signalni putevi

povezuju i usklađuju. U sledećoj fazi se nastali signalni molekul prenosi do ciljne ćelije. Transport signalnog molekula može biti putem krvi i tada govorimo o endokrinoj kontroli. U krvotoku signalni molekul su vezani za transportne proteine ili su u sastavu većih proteinskih kompleksa da bi bili zaštićeni od degradacije i da bi se dopremili do ciljnih ćelija. Međutim, postoje signalni molekuli koji deluju lokalno putem difuzije kroz vanćelijsku tečnost i tako deluju na ćelije u neposrednoj blizini (parakrina kontrola) ili na samu ćeliju koja ih proizvodi (autokrina kontrola). Treća faza predstavlja prijem signala pomoću receptora, proteina specijalizovanih za ovu funkciju. Vezivanjem signala za receptor dolazi do strukturnih promena u receptoru što se označava kao aktivacija receptora. Samo ćelija koja poseduje odgovarajući receptor može da primi dati signal i da odgovori na njega. Nakon što ćelija primi signal dolazi do obrade signala putem unutarćelijskog prenosa signala (eng. signal transduction pathway). Unutarćelijski prenos signala razlikuje se u zavisnosti od tipa receptora. Tako razlikujemo površinske i unutarćelijske receptore. Kod površinskih receptora koji su transmembranski proteini, signalni molekul ne ulazi u ćeliju već predaje signal vezivanjem za vanćelijski domen receptora. Na taj način se aktivira nizvodni kaskadni prenos signala. Kod unutarćelijskih receptora signali su mali liposolubilni molekuli koji prolaze kroz membranu ćelije i vezuju se za receptore. Kao krajnji ishod prenosa signala kroz ćeliju otpočinju biohemijski procesi koji će dati odgovor ćelije na stimulus (Krauss, 2008).

Unutarćelijski prenos signala je strogo regulisan proces čime se obezbeđuje pravilan i usaglašen odgovor ćelije u određenom trenutku. Kontrola se vrši na nivou biosinteze signala, oslobađanja signalnih molekula iz unutarćelijskih depoa, nivo sekrecije signalnih molekula. Takođe, jedan od važan faktor regulacije predstavlja i dostupnost signala specifičnim receptorima i njihova aktivacija. Mehanizmi putem kojih se kontrolišu koncentracija signala i receptora su negativna i pozitivna povratna sprega kojima se reguliše koncentracija enzima koji su uključeni u sintezu i degradaciju signalnih molekula i receptora. Na ovaj način je međućelijska komunikacija usaglašena sa funkcijama organizma (Krauss, 2008).

U prenosu signala kroz ćeliju učestvuje veliki broj signalnih komponenti. Modularna struktura, mnogobrojne modifikacije i postojanje velikog broja izoformi daju

moćnost da različiti signali budu obrađeni u istom tipu signalnog puta dajući različite ishode. Signalni putevi na osnovu organizacije mogu biti linearni, gde se signal detektuje od uzvodne komponente i prenosi na tačno organizovane nizvodne komponente. Osim linearnih, mnogo je više signalnih puteva koji se granaju i ukrštaju. Zapaženo je da mnogi signalni molekuli mogu da imaju ne jednog već veći broj nizvodnih partnera. Takođe, ćelije istovremeno mogu da obrađuju veliki broj signala koji se prenosi različitim signalnim putevima. Osim toga složenost signalnih mreža proističe i iz činjenice da npr. jedan hormon se može vezati za različite receptore na ćeliji ili unutar nje i na taj način usmeravati isti signal u različite signalne puteve. Takođe, izlazni signal nekog signalnog puta može da zavisi od jaćine i učestalosti ulaznog signala. Na kraju, treba napomenuti i da različiti signalni molekuli i signalni putevi mogu da dovedu do istog ćelijskog odgovora (Krauss, 2008).

1.3. *Hedgehog* signalni put

Hedgehog (HH) signalni put je prvi put opisan kod vinske mušice, *Drosophila melanogaster* (Huangfu and Anderson, 2006; Hausmann et al., 2009; Xie et al., 2013; Zhao et al., 2014). Istraživajući mutacije kod *D. melanogaster*, Christiane Nüsslein-Volhard and Wieschaus su identifikovali oko pedeset gena koji učestvuju u embrionalnom razviću, među kojima je bio i gen *Hedgehog* (HH). Rezultati prikazani u toj studiji su pokazali da mutacije u HH genu dovode do razvoja larve sa bodljikavim omotačem koja podseća na ježa (eng. Hedgehog) pa otuda naziv ovom genu. Eksperimenti na *D. melanogaster* su ukazali da je HH gen važan za pravilnu segregaciju, tj. polarnost organizma. HH gen je veoma evolutivno očuvan počevši od vinske mušice do čoveka te se danas on smatra ključnim regulatorom embrionalnog razvoja (Varjosalo and Taipale, 2008). Prvobitno se uloga HH signalnog puta vezivala za embrionalno razviće, u kojem ima važnu ulogu pri razvoju mnogih tkiva i organa. Međutim, sve je više podataka o njegovoj ulozi u nastanku i progresiji tumora (Taipale and Beachy, 2001).

HH signalni put započinje vezivanjem HH liganda za protein PTCH (eng. Patched) koji poseduje 12 transmembranskih domena i koji je evolutivno veoma očuvan (Marigo et al., 1996a; Stone et al., 1996). Kod *D. melanogaster* HH ligand se vezuje za PTCH receptor koji se nalazi na plazma membrani (Ingham et al., 1991). HH signalna kaskada se kod vertebrata odvija u primarnim cilijama, organelama zaduženim za prijem mehaničkih, hemijskih i termičkih signala, u kojima su smeštene sve komponente HH signalnog puta (Plotnikova et al., 2008; Goetz and Anderson, 2010). Za razliku od *D. melanogaster* kod koje je identifikovan samo jedan HH gen, kod vertebrata HH signalni put uključuje tri liganda: Sonic hedgehog (SHH), Indian hedgehog (IHH) i Desert hedgehog (DHH) (Echelard et al., 1993; Krauss et al., 1993; Riddle et al., 1993; Ingham and McMahon, 2001). Interakcija HH sa receptorom je regulisana ko-receptorima, transmembranskim proteinima Ihog i Boi kod *D. melanogaster* ili Cdo, Boc i Gas1 kod vertebrata (Lum et al., 2003; Okada et al., 2006; Tenzen et al., 2006; Allen et al., 2007; Allen et al., 2011; Izzi et al., 2011; Zhang et al., 2011). Za razliku od PTCH receptora, ovi proteini imaju samo jedan transmembranski

domen i ekstracelularni domen koji sadrži imunoglobulin i fibronektinske ponovke. Genetičke studije kod *D. melanogaster* i miša pokazuju da Ihog, Cdo i Bos pozitivno regulišu HH signalni put (Tenzen et al., 2006; Yao et al., 2006; Robbins et al., 2012) kao i da Cdo i Gas1 zajedno regulišu HH signalni put (Allen et al., 2007). Pretpostavlja se da Ihog/Cdo proteinska familija funkcionira kao HH koreceptor i olakšava vezivanje HH liganda za receptor. Jedinstvena karakteristika PTCH receptora je da se on ne aktivira vezivanjem liganda već je suprimiran ovom interakcijom.

U odsustvu liganda PTCH onemogućava aktivnost drugog proteina SMO (eng. Smoothed), čija aktivacija je neophodna za prenos HH signala kroz plazma membranu u ćeliju. Na ovaj način HH aktivira SMO receptor i signalnu kaskadu vezivanjem i inhibicijom PTCH receptora.

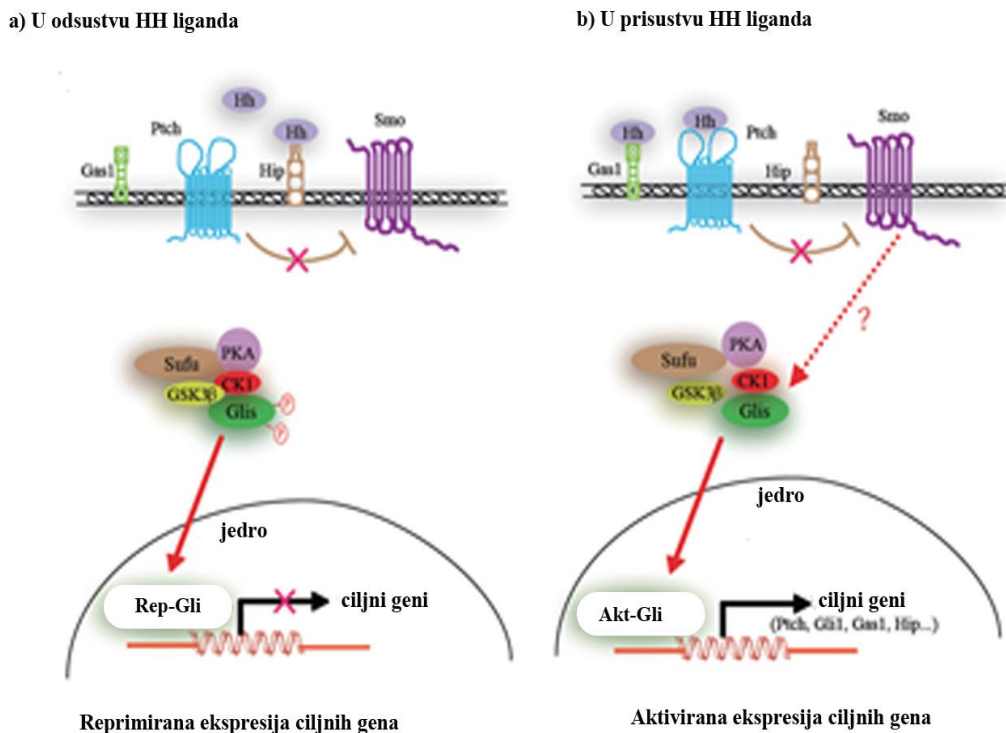
Kod *D. melanogaster*, nizvodno od SMO u signalnoj kaskadi učestvuje citoplazmatski proteinski kompleks HSC (eng. Hedgehog signalling complex) koga čine efektor signalnog puta transkripcijski faktor Ci (eng. Cubitus interruptus), Fu (eng. Fused) serin-treonin kinaza, Cos2 (kinezinu-sličan protein Costal2) i SuFu (eng. Suppressor of fused). U odsustvu HH liganda, PTCH je vezan za SMO sprečavajući ga na taj način da aktivira signalnu kaskadu. HSC je sa jedne strane, vezan za mikrotubule i/ili membranu, a sa druge, preko Cos2 proteina vezan za SMO receptor. Vezivanjem SuFu i Cos2 za Ci sprečava se njegov ulazak u jedro. Nakon vezivanja HH liganda za PTCH, SMO se oslobađa inhibitorynog dejstva i započinje signalna kaskada. Dolazi do disocijacije HSC kompleksa, SMO se fosforiliše na C-kraju proteina, Ci protein nije više inhibiran SuFu proteinom i ulazi u jedro gde funkcionira kao transkripcijski aktivator ciljnih gena. Ci transkripcijski faktor, poseduje trans-aktivacioni i trans-represorni domen, pa tako ima dvojaku funkciju. U odsustvu HH liganda C-terminalni aktivacioni domen je proteolitički isečen što rezultira u formiranju skraćenog proteina koji ulazi u jedro i reprimira ciljne gene. Aktivacija SMO blokira proteolitičku obradu Ci proteina, koji ulazi u jedro i funkcionira kao aktivator.

Sve komponente HH signalnog puta, uključujući SMO i PTCH, kod sisara su lokalizovane su u primarnoj ciliji. U eukariotskim ćelijama funkcija ove organele je u prijemu mehaničkih, hemijskih i fizičkih stimulus (Plotnikova et al., 2008; Goetz and Anderson, 2010). Promena lokalizacije SMO kod sisara predstavlja odgovor na

aktivaciju HH signalnog puta. Kod *D.melanogaster* se nakon aktivacije ovog signalnog puta SMO akumulira u plazma membrani. Pretpostavlja se da je promena u subćelijskoj lokalizaciji SMO proteina, u oba slučaja, važna za njegovu aktivaciju. SMO receptor kod sisara nije u interakciji sa cilijom i u ćeliji postoji u tri različita stanja, u neaktivnoj internalizovanoj formi, u neaktivnoj formi koja je vezana za ciliju i u aktivnoj formi (Corbit et al., 2005; Kim et al., 2009; Rohatgi et al., 2009). Eksperimentalno je potvrđeno da se prenos signala posredstvom SMO receptora kod vertebrata odigrava u dve faze, jedna predstavlja transport do cilija, gde neaktivna forma iz citoplazme dolazi do cilija, i druga, aktivacija SMO. U bazi primarne cilije PTCH receptor inhibira aktivaciju SMO, usled čega GLI transkripcioni faktori, efektori ovog signalnog puta, su u kompleksu sa SUFU proteinom (Kinzler and Vogelstein, 1990; Pearse et al., 1999). Kod kičmenjaka postoje tri GLI transkripciona faktora, GLI1, GLI2 i GLI3, od kojih GLI2 i GLI3 podležu proteolitičkoj degradaciji, dok GLI1 funkcioniše isključivo kao aktivator koji, jednom kada je pokrenuta signalna kaskada, amplifikuje transkripcioni odgovor na stimulus (Ruiz i Altaba, 1998; Ruiz i Altaba, 1999; Bai et al., 2004; Stamatakis et al., 2005). Nakon vezivanja HH liganda, PTCH receptor napušta ciliju i dolazi do njegove degradacije u lizozomima. Zatim se formira aktivna forma SMO proteina i sprečava se proteolitičko isecanje GLI regulatornih proteina. Krajnji ishod HH signalnog puta je aktivacija GLI transkripcionih faktora koji se vezuju za regulatorne sekvence u okviru promotora ciljnih gena i regulišu njihovu transkripciju. Interesantna je činjenica da se među ciljnim genima HH signalnog puta nalaze i komponente samog signalnog puta PTCH i GLI1 koji predstavljaju negativne (PTCH) i pozitivne (GLI1) regulatore ovog signalnog puta regulišući na ovaj način aktivnost HH signalne kaskade (Regl et al., 2002; Ruiz i Altaba et al., 2007).

Nekoliko godina unazad pokazano je da HH proteini mogu da učestvuju u signalnoj transdukciji preko takozvanog GLI-nezavisnog mehanizma koji se još označava i kao nekanonski HH signalni put (Jenkins, 2009; Brennan et al., 2012). Opisane su do sada dva tipa nekanonske HH signalne kaskade. Prvi tip ne zahteva prisustvo SMO receptora, ali zahteva prisustvo HH liganda i PTCH receptora. U odsustvu HH liganda, PTCH interaguje sa ciklinB1 proteinom i proapoptotskim kompleksom koga čine kaspaza -9, Tucan-1 protein i Dral adapterski protein. Ova interakcija inhibira proliferaciju onemogućavajući ciklinB1 proteinu da uđe u jedro. U

prisustvu HH liganda narušavaju se ove interakcije što za posledicu ima proliferaciju ćelija. Drugi tip nekanonskog HH signalnog puta je takođe poznat kao SMO-zavisan GLI-nezavisan signalni put. Ovaj signalni put učestvuje u regulaciji aktinskog citoskeleta aktivacijom malih GTP-aza RhoA i Rac1.



Slika 1. HH signalni put. a) U odsustvu HH liganda Gli regulatorni proteini su u kompleksu sa negativnim regulatorom SuFu i bivaju proteolitički obrađeni od strane proteazoma. Na ovaj način se sprečava transkripcija ciljnih gena. b) U prisustvu HH liganda dolazi do vezivanja za Ptch koji se premešta iz primarne cilije čime je omogućena aktivacija Smo receptora. Sprečava se proteolitičko isecanje Gli regulatornih proteina koji mogu da se vežu za promotore ciljnih gena i aktiviraju transkripciju ciljnih gena. Slika je preuzeta i modifikovana iz (Chen et al., 2013b).

1.3.1. Komponente HH signalnog puta

Komponente HH signalnog puta uključuju ligande (IHH, DHH i SHH) čijim vezivanjem za PTCH receptor otpočinje nizvodni prenos signala. U sastav HH signalne kaskade ulazi SMO receptor čijom se aktivacijom signal prenosi nizvodno posredstvom različitih komponenti signalnog puta (SUFU, COS2, PKA, CK1, CK2, GRK2) kojima se informacija prenosi do krajnjih efektoru GLI transkripcijskih faktora (GLI1, GLI2 i GLI3).

1.3.1.1. Ligandi HH signalnog puta

Kod kičmenjaka su otkrivena tri HH homologa, a nazvani su: Indian hedgehog (IHH) Desert hedgehog (DHH) i Sonic hedgehog (SHH), (Echelard et al., 1993; Krauss et al., 1993; Riddle et al., 1993; Marigo et al., 1996a). Od svih otkrivenih HH proteina najviši stepen sličnosti sa HH ligandom *D. melanogaster* ispoljava DHH (Robbins et al., 2012).

IHH ima ulogu u modulisanju hondrogeneze, učestvujući kao negativni regulator diferencijacije hondrocita (Vortkamp et al., 1995). Takođe, zapaženo je da IHH učestvuje u razvoju gastrointestinalnog trakta i mlečnih žlezda (Lewis and Veltmaat, 2004; van den Brink, 2007). DHH učestvuje u razvoju testis (Bitgood et al., 1996).

Najviše proučavan od svih HH liganada je SHH. SHH protein je uključen u razvoj mnogobrojnih organa tokom embrionalnog razvića. Ekspimiran je između ostalog tokom razvoja udova, centralnih struktura u mozgu, gastrointestinalnog trakta, zuba, prostate, folikula dlake, pluća (Ingham and McMahon, 2001).

Svi HH proteini prisutni kod kičmenjaka prolaze kroz identičan proces maturacije prekursorskog protein pre nego što se njihova aktivna forma oslobodi iz ćelije (Johnson and Scott, 1998). Nakon translacije HH gena, nastaje prekursorški protein dužine ~ 45kDa sa koga se uklanja N terminalna signalna sekvenca (Mann and

Beachy, 2004; Wang et al., 2007). Nakon toga se polipeptid autokatalitički cepa između glicina i cisteina pri čemu nastaje N-terminalni fragment HH polipeptida dužine ~ 19kDa i C-terminalni kraj, dužine ~ 25kDa, koji poseduje intramolekularnu holesterol-transferaznu aktivnost i dodaje holesterol na N-terminalni fragment HH polipeptida (Marti et al., 1995; Mann and Beachy, 2004; Wang et al., 2007). Ovakav polipeptid trpi još jednu posttranslacionu modifikaciju. Na N-kraj polipeptida za koji je vezan holesterol, uz pomoć Hhat (eng. Hedgehog acyl transferase) vezuje se palmitinska kiselina pri čemu nastaje aktivna forma HH proteina (Buglino and Resh, 2008). Proteini koji nastaju kao produkti ekspresije HH gena se vezuju za PTCH receptor što dovodi do aktivacije HH signalne kaskade (Pathi et al., 2001). Sekretija zrelog, funkcionalno aktivnog HH protein regulisana je Dispatched (Disp) proteinom, koji omogućava njegovo otpuštnje iz ćelija u kojima nastaje.

1.3.1.2. Patched protein

Patched (PTCH) protein se, kao ključni HH receptor, aktivira vezivanjem nanomolarnih koncentracija HH liganda (Marigo et al., 1996a; Stone et al., 1996). Kod vertebrata su izolovana dva homologa, PTCH1 i PTCH2 (Zaphiropoulos et al., 1999). Shh, Ihh i Dhh imaju sličan afinitet vezivanja za oba homologa PTCH protein (Hooper and Scott, 1989; Stone et al., 1996). PTCH1 je prvenstveno eksprimiran u mezenhimalnim ćelijama koje reaguju na SHH ligand, dok je PTCH2 eksprimiran u epitelijalnim ćelijama koje proizvode SHH ligand (Motoyama et al., 1998). Ekspresija PTCH2 zapažena je u koži i testisima (Hahn et al., 1996; Motoyama et al., 1998).

Humani *PTCH1* gen je dužine 34 kb i sadrži 23 egzona (Hahn et al., 1996). *PTCH1* gen kodira protein koji ima 12 transmembranskih domena i dve velike vanćelijske petlje (Marigo et al., 1996a). Na osnovu stukture i primarne sekvence PTCH pokazuje visok stepen homologije sa familijom bakterijskih RND (eng. resistance-nodulation-division) transporter (Routh et al., 2011). Ovi protein su pronađeni samo u bakterijama, u kojima imaju ulogu u ispumpavanju lipofilnih toksina i teških metala iz ćelije promenom protonskog gradijenta. Takođe, PTCH sadrži 180

amino kiselinski, sterol-osetljivi domen koji je karakteristika mnogih proteina za koje je vezan holesterol (Martin et al., 2001; Strutt et al., 2001; Johnson et al., 2002; Kuwabara and Labouesse, 2002). Mutacije koje pogađaju ovaj domen utiču na njegovu sposobnost da regulišu ekspresiju HH ciljnih gena, pri čemu se ne menja sposobnost PTCH recetora da veže HH ligand. Pored toga što vezuje HH ligand kako bi otpočela signalizacija, PTCH moduliše vanćelijski gradijent liganda u ćelijskoj okolini tokom razvića funkcionalno drugačijim načinom kojim moduliše HH signalnu kaskadu (Chen and Struhl, 1996).

PTCH protein funkcioniše kao inhibitor HH signalnog puta, jer u nedostatku HH liganda blokira aktivaciju puta blokiranjem drugog transmembranskog proteina SMO. Kada se HH ligand veže za PTCH receptor, aktivira se signalni put i dolazi do nizvodnog prenosa signala, što za posledicu ima aktivaciju transkripcije ciljnih gena. U ciljne gene HH signalnog puta spadaju i *PTCH* gen. Transkripcija *PTCH* gena direktno je regulisana GLI transkripcionim faktorima (Goodrich et al., 1996; Marigo et al., 1996b; Jenkins, 2009). Takođe, treba istaći da pored toga što učestvuje u regulaciji HH signalnog puta, promene u ekspresiji *PTCH*, izazvane mutacijama ovog gena, leže u osnovi različitih oboljenja (Saldanha, 2001).

1.3.1.3. Smoothened protein

Protein Smoothened (SMO) se smatra pozitivnim regulatorom HH signalnog puta, jer se u prisustvu HH liganda ovaj protein oslobađa inhibirajućeg uticaja PTCH receptora, čime se postiže njegova konstitutivna aktivacija i prenos signala (Murone et al., 1999). SMO protein poseduje 7 transmembranskih domena i pripada GPCR (eng. G-protein coupled receptors) familiji proteina (Alcedo et al., 1996). PTCH se u neaktivnom obliku nalazi u ćelijskoj membrani, dok je SMO u unutarćelijskim vezikulama. Nakon aktivacije signalnog puta dolazi do internalizacije PTCH proteina i aktivacije SMO receptora (Incardona et al., 2002). Aktivacija SMO receptora se odigrava u dva koraka, translokacijom iz unutarćelijskih vezikula do plazma membrane i fosforilacijom. Pokazano je da fosforilacija SMO receptora predstavlja najvažniji korak

u njegovoj aktivaciji (Jia et al., 2004). Za razliku od većine proteina GPCR familije, SMO sadrži značajno duži, unutarćelijski C-terminalni domen koji je bitan u HH signalnoj kaskadi (Alcedo et al., 1996; van den Heuvel and Ingham, 1996; Kristiansen, 2004). Ovaj domen sadrži šest Ser-Thr mesta neophodnih za njegovu fosforilaciju. SMO receptor sadrži još i N-terminalni domen koji je bogat cisteinom (CRD) (eng. cysteine rich domain) za koji se pretpostavlja da posreduje u prenosu signala nakon HH liganda i da omogućuje interakciju između PTCH i SMO (Nachtergaele et al., 2013). SMO receptor se kod *D. melanogaster* fosforiliše cAMP zavisnom protein kinazom-PKA (eng. Protein kinase A), kazein kinazom 1 (CK1), kazein kinazom 2 (CK2), GRK2 (eng. G protein-coupled receptor kinase 2) u prisustvu HH liganda (Jia et al., 2004; Apionishev et al., 2005; Chen et al., 2010; Jia et al., 2010). U odsustvu HH liganda različite proteinske fosfataze su uključene u održavanju fosforilacije SMO na niskom nivou (Jia et al., 2009; Su et al., 2011). Kod sisara proteinske kinaze CK1 α i GRK2 su uključene u fosforilaciju SMO receptora (Chen et al., 2010).

1.3.1.4. GLI familija proteina

GLI proteinsku familiju kod vertebrata čine GLI1, GLI2 i GLI3 regulatorni proteini koji su odlikuju evolutivno očuvanim DNK-vezujućim domenom. DNK-vezujući domen se sastoji od pet tandemski ponovljenih C₂ – H₂ Zn-prstiju i konsenzusne sekvence His-Cys između njih. GLI1 protein je otkriven 1987. godine kada je ustanovljeno da je ekspresija jednog proteina do višestruko povećana u glioblastomima (Kinzler et al., 1987), dok su godinu dana kasnije otkivena i ostala dva člana GLI proteinske familije (Ruppert et al., 1988)

Svi GLI proteini sadrže transaktivacioni domen na C-kraju, dok GLI2 i GLI3 sadrže i transrepresorski domen na N-kraju (Villavicencio et al., 2000; Zhu and Lo, 2010). GLI transkripcioni faktori, regulišući transkripciju ciljnih gena prevode ekstracelularni HH signal. U neaktivnom obliku, GLI1 protein je smešten u citoplazmi u kompleksu sa SUFU proteinom koji predstavlja negativni regulator aktivnosti GLI proteina, zadržavajući ih u citoplazmi (Ding et al., 1999; Kogerman et al., 1999;

Dunaeva et al., 2003). Aktivnost GLI2 i GLI3 je, u odsustvu HH liganda, regulisana fosforilacijom, nakon čega se C-terminalni fragment degraduje, a ostaje samo N-terminalni fragment koji ima represorsku aktivnost. GLI2 je primarno aktivator, međutim ima primera gde ovaj transkripcioni faktor funkcioniše kao represor (Ruiz i Altaba, 1999). GLI3 deluje uglavnom kao represor ciljnih gena, mada neki rezultati potvrđuju njegovu aktivatorsku funkciju (Shin et al., 1999; Wang et al., 2000; Buttitta et al., 2003; Motoyama et al., 2003). Vezivanjem HH liganda za PTCH receptor dolazi do aktivacije transkripcije GLI1 gena GLI2 i GLI3 regulatornim proteinima (Dai et al., 1999; Ikram et al., 2004). Smatra se da je povećana ekspresija GLI1 zapravo marker aktivnosti HH signalnog puta (Kasper et al., 2006).

Podaci iz literature pokazuju da su ekspresija GLI transkripcionih faktora i njihova aktivacija regulisane različitim signalnim putevima. U karcinomu ezofarinksa je pokazano da mTOR/S6K1 signalni put aktivira GLI1 fosforilacijom što za posledicu ima otpuštanje GLI1 iz kompleksa sa SUFU proteinom i njegovu translokaciju u jedro (Kogerman et al., 1999). Osim toga pokazano je da TGF- β , EGF, MAPK i FGF signalni putevi takođe mogu da indukuju ekspresiju GLI transkripcionih faktora (Jenkins, 2009).

1.3.2. Uloga SHH signalnog puta u embriogenezi sisara

SHH signalni put igra važnu ulogu tokom embriogeneze. SHH ligand delujući kao morfogen vrši modelovanje mnogobrojnih organa i organskih sistema (Currie and Ingham, 1996). U nervnom sistemu SHH signalni put je bitan za rano modelovanje nervne cevi i razviće dorzalnih struktura mozga. Eksperimentalni rezultati su pokazali da različiti tipovi interneurona i motoneurona nastaju kao posledica gradijenta SHH liganda koji je zapažen u nervnoj cevi (Roelink et al., 1995; Ericson et al., 1997; Stamatakis et al., 2005). Na gradijentnu raspodelu SHH morfogena reaguju ćelije aktivacijom određenih grupa gena što za posledicu ima nastajanje različitih tipova ćelija (Poh et al., 2002). Ericson i saradnici su u *in vitro* uslovima pokazali da različite

koncentracije SHH proteina dovode do indukcije različitih podtipova neurona (Ericson et al., 1996). Kod ljudi mutacije u SHH genu uzrokuju nerazdvajanje prozencefalona u cerebrealne hemisfere i lateralne ventrikule u periodu od četvrte do osme nedelje trudnoće što dovodi do težih malformacija koje često završavaju intrauterinom smrću (Villavicencio et al., 2000).

SHH ima ulogu i u pravilnom pozicioniranju srca tokom razvića (Levin et al., 1995). U eksperimentima na embrionima pileta uočeno je da se SHH eksprimira asimetrično u Hensenovom čvoru tokom gastrulacije na levoj strani (Wang et al., 2004). Kod miševa koji su imali mutacije u SHH nije detektovana ekspresija markera specifičnih za desno-levu simetriju, a takođe su primećeni defekti u morfologiji srca i drugih organa (Tsukui et al., 1999).

SHH je uključen u proces *de novo* vaskularizacije nekih embrionalnih tkiva (Vokes et al., 2004). Pepicelli i saradnici su pokazali da embrioni miševa kojima je ukinuta SHH aktivnost imaju lošu vaskularizaciju pluća. Pokazano je da kod SHH^{-/-} mišijih embriona ne dolazi do formiranja pluća (Grindley et al., 1997). Zapaženo je da promena u SHH signalnoj kaskadi kod pacova uzrokuje da se kod jedinki ne formira jezik (Liu et al., 2004). Pored toga zapažena je uloga ovog signalnog puta u razviću gastrointestinalnog trakta.

1.3.3. Uloga SHH signalnog puta kod adulta

Kao što je u predhodnom odeljku pokazano SHH signalna kaskada ima veoma važne funkcije tokom embriogeneze vertebrata. Nakon rođenja, kod adultnog organizma ovaj signalni put je neaktivan ili slaboaktivan i prema potrebi se ponovo aktivira. Aktivacija SHH signalnog puta u odrasлом organizmu se dešava prilikom zarastanja rana (Le et al., 2008). Važnu ulogu ovaj signalni put ima u normalnoj funkciji folikula dlake (Silva-Vargas et al., 2005).

SHH signalni put je uključen u održanje adultnih matičnih ćelija. Nekoliko grupa je pokazalo da je ovaj signalni put neophodan za održanje neuralnih matičnih ćelija u subgranularnoj zoni (SGZ) i subventrikularnoj zoni (SVZ) mozga, kao i da

ciklopamin koji predstavlja inhibitor SHH signalnog puta blokira proliferaciju neuralnih matičnih ćelija (Lai et al., 2003; Machold et al., 2003; Palma et al., 2005). Do sada se zna da je SHH signalni put važan u održanju adultnih matičnih ćelija kože, pluća, eritroidnih progenitora (Watkins et al., 2003; Detmer et al., 2005; Zhou et al., 2006).

1.3.4. Uloga SHH signalnog puta u kancerogenezi

Prva veza između SHH signalnog puta i razvoja tumora kod čoveka uočena je otkrićem mutacija u humanom *PTCH* genu. Identifikovana mutacija je povezana sa retkom naslednom bolešću pod nazivom Gorlinov sindrom (Hahn et al., 1996; Johnson et al., 1996; Epstein, 2001). Gorlinov sindrom je retko autozomno oboljenje kod koga primećen povećan rizik od razvoja različitih tumora kao što su karcinom bazalnih ćelija, meduloblastom, rabdomiosarkom.

SHH signalni put ima različite uloge u različitim tipovima tumora (Yang et al., 2010). Tako je primećeno da kod SCLC (eng. small cell lung cancer) aktivacija HH signalni put indukuje razvoj tumora, ali nije dovoljna za progresiju (Park et al., 2011). Kod tumora pankreasa inhibicija ovog signalnog puta ne utiče na formiranje tumora, već sprečava metastaze. Kod tumora jetre i mijeloidne leukemije HH signalna kaskada ima ulogu u regulaciji broja matičnih ćelija tumora ili stromi tumora (Xie et al., 2013).

Maligni tumori mogu nastati usled mutacija komponenti HH signalnog puta pri čemu proces transformacije ne zahteva prisustvo liganda. Mutacije koje dovode do inaktivacije PTCH receptora za posledicu imaju konstantnu aktivaciju signalne kaskade. Opisane su takođe i mutacije koje za posledicu imaju gubitak funkcije SUFU proteina. Mutacije koje dovode do aktivacije SMO receptora nezavisno od liganda takođe dovode do nastanka tumora. Kod sporadičnog karcinoma bazalnih ćelija su potvrđene mutacije u genima za PTCH i SMO (Xie et al., 1997). Povećana amplifikacija GLI1 regulatornog proteina primećena je u glioblastomima (Kinzler et al., 1987). Pored mutacija, epigenetske modifikacije mogu poremetiti HH signalni put. Pokazano je da je metilacija

promotora gena PTCH1 povećana u fibromima jajnika (Cretnik et al., 2007) i raku dojke (Wolf et al., 2007).

Neki maligni tumori se formiraju usled ligand-zavisne aktivacije HH signalnog puta. Kod ovog tipa malignih tumora je karakteristično da ligand ostvaruje svoju ulogu posredstvom autokrine komunikacije između ćelija. HH ligand se vezuje za receptore tumorske ćelije u kojoj je sintetisan. Ovakav vid signalizacije je opisan kod tumora pankreasa, pluća, prostate, dojke, želuca, debelog creva, creva jajnika (Onishi and Katano, 2011).

Pretpostavlja se da postoje tri modela koja govore o ulozi HH signalnog puta u malignim oboljenjima (Taipale and Beachy, 2001; Thayer et al., 2003; Rubin and de Sauvage, 2006; Yauch et al., 2008; Dlugosz and Talpaz, 2009; Scales and de Sauvage, 2009; Teglund and Toftgard, 2010). Maligni tumori koji pripadaju vrsti ligand-zavisnih tumora mogu imati i parakrinu komunikaciju sa sredinom koja ih okružuje. Pokazano je da većina malignih tumora povezana sa prekomernom produkcijom HH liganda koji u okolini tumorskih ćelija stimulišu endotelijalne, epitelijalne ćelije imunog sistema. Ove ćelije strome obezbeđuju podršku tumorskim ćelijama, matičnim ćelijama tumora, modulišu ekstraćelijski matriks, stimulišu angiogenezu i stimulišu sekreciju signalnih komponenti (Curran and Ng, 2008; Yauch et al., 2008).

Pored činjenice da je HH signalni put aberantno aktiviran u različitim vrstama tumora, ovaj signalni put je ujedno i povezan sa drugim signalnim putevima koji doprinose razvoju malignih tumora što upućuje da kontrola HH signalnog puta predstavlja novo polje u terapiji malignih poremećaja.

1.4. SOX geni

Familija *SOX/Sox* gena je prvi put identifikovana 1990. godine kod sisara. Ova familija kodira SOX proteine koji pripadaju HMG (**h**igh **m**obility **g**roup) boks superfamiliji DNK vezujućih proteina (Wegner, 1999), pri čemu je njihova zajednička osobina posedovanje HMG boks domen, dužine 79 aminokiselina. Ovim domenom

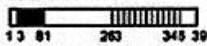
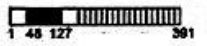
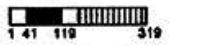
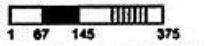
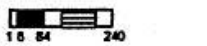

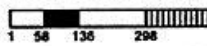
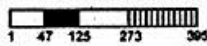
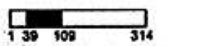
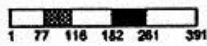
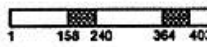
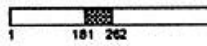
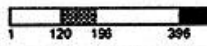
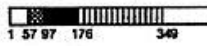
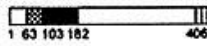
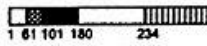
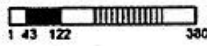
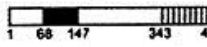
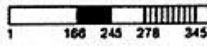
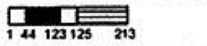
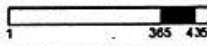
omogućeno je specifično prepoznavanje i vezivanje za heksamernu sekvencu -5' A/TA/TCAAA/T-3'.(Denny et al., 1992; van de Wetering et al., 1993; Harley et al., 1994; Mertin et al., 1999).

Sry (Sex-determining region Y) gen, odgovoran za determinaciju muškog pola, je prvi identifikovani gen iz *Sox* familije (Gubbay et al., 1990; Sinclair et al., 1990). Ostali članovi *SOX/Sox* genske familije otkriveni su na osnovu homologije sa *Sry* genom u okviru HMG boks domena i na osnovu ove sličnosti nastao je akronim *Sox* (S*ry*-related HMG box) (Gubbay et al., 1990; Denny et al., 1992; Wright et al., 1993).

Sox geni su na osnovu poređenja proteinskih sekvenci unutar i van HMG boks domena podeljeni u 8 grupa od A do H, pri čemu je B grupa podeljena na podgrupe B1 i B2 (Lefebvre et al., 2007). Pored *Sox* gena prikazanih u Tabeli 1. u literaturi su opisani i *Sox31* gen žabe (*Xenopus laevis*) i *SoxJ* gen crva (*Caenorhabditis elegans*) koji nemaju ortologe među *Sox* genima kičmenjaka (Bowles et al., 2000). Na Tabeli 1. Prikazano je 8 grupa *Sox/SOX* gena (A-H) koje su prisutne kod miša i čoveka.

SOX proteini iste grupe imaju visok stepen homologije (70-90%) kako u okviru HMG boks domena ali i izvan njega, dok proteini iz različitih grupa pokazuju homologiju samo u okviru HMG boks domena ($\geq 46\%$) (Lefebvre et al., 2007). Većina *Sox* gena ima 1-3 egzona i jednu varijantnu primarnog transkripta, dok *Sox* geni grupe D i H sadrže više egzona koji mogu dati primarne transkripte različitih dužina i promenjenih 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 nemaju introne. *SOX3* gena se nalazi na X hromozomu, *SRY* gen na Y hromozomu, dok svi ostali geni iz *SOX* genske superfamilije su smešteni na autozomima i nisu grupisani već su razbacani po genomu.

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

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

1.4.1. Osnovne osobine SOX proteina

SOX proteini se vezuju specifično za DNK sekvencu uz pomoć HMG boks domena i ostvaruju svoju funkciju kao transkripcioni faktori. Osim toga, HMG boks domen učestvuje u konformacionim promjenama DNK, interakcijama sa drugim proteinima i transportu proteina unutar i van jedra (Lefebvre et al., 2007). HMG boks domen je visoko evolutivno očuvan kod SOX proteina iste grupe, dok stepen očuvanosti u okviru ovog domena između SOX proteina različitih grupa iznosi oko 50% (Lefebvre et al., 2007). Za razliku od većine DNK-vezujućih domena koji ostvaruju interakcije sa DNK preko velikog žljeba, HMG boks domen interaguje sa malim žljebom i dovodi do savijanja DNK zavojnice, pri čemu ugao savijanja može da varira između 30° i 110° (Wegner, 1999; Weiss, 2001). Vezivanjem SOX proteina za manji žljeb DNK, sterički je omogućeno njihovo vezivanje u neposrednoj blizini drugih transkripcionih faktora koji su vezani za veći žljeb DNK (Wegner, 1999). U isto vreme, interakcija sa DNK dovodi do kompletnog savijanja proteina pri čemu on zauzima svoju tercijernu strukturu.

Domeni SOX proteina izvan HMG boks domena kod ortologa su visoko očuvani, dok su potpuno različiti kod pripadnika različitih grupa (Lefebvre et al., 2007). Ovi domeni uključuju transaktivacione, transrepresorske i domene važne za dimerizaciju proteina (Lefebvre et al., 2007). Brojni SOX proteini (SOXB1, C, E, F) sadrže transaktivacione domene locirane na C-terminalnom delu proteina (Bernard and Harley, 2010). SOXB2 proteini poseduju snažan represorski domen C-terminalno u odnosu na HMG boks domen (Uchikawa et al., 1999). Članovi SOXD grupe poseduju HMG boks domen ali nemaju transaktivacione domene (Chew and Gallo, 2009).

SOX proteini poseduju nizak afinitet vezivanja za DNK, tako da se visok afinitet i specifičnost postižu preko interakcije sa drugim transkripcionim faktorima, kao što su homeodomenski proteini, proteini koji poseduju cinkane prstiće, proteini sa strukturom leucinskog rajsferšlusa (Remenyi et al., 2003; Wissmuller et al., 2006). Interakcije SOX proteina i njihovih partnera zavisi od tipa ćelije i promotorske sekvence, odnosno određena je specifičnošću DNK sekvence uz mesto vezivanja SOX proteina i

dostupnošću partnerskih faktora u ćeliji (Wegner, 1999; Kondoh and Kamachi, 2010). U toku embrionalnog razvića transkripciona regulacija, koja se zasniva na kooperaciji SOX proteina i njihovih partnera se menja iz faze u fazu i bitna je ne samo za proces razvića već i za generisanje i održavanje diferenciranih ćelija (Kondoh and Kamachi, 2010).

Proteinska svojstva SOX proteina kao što su stabilnost, aktivnost, intraćelijska lokalizacija i interakcija sa partnerima su regulisana posttranslacionim modifikacijama (Benayoun and Veitia, 2009). Tako je pokazano da fosforilacija SRY i SOX9 proteina povećava efikasnost vezivanja ovih proteina i sposobnost da aktiviraju ili inhibiraju transkripciju ciljnih gena (Desclozeaux et al., 1998; Huang et al., 2000). Zatim pokazano je da acetilacija reguliše ulogu SRY u determinaciji pola (Thevenet et al., 2004). Acetilacija SOX9 je važna za njegovu ulogu u hondrocitima (Bernard and Harley, 2010). Modifikacija SOX proteina sumoilacijom ili ubikvitinacijom *in vitro* je pokazana za SOX3, SOX4, SOX6 i proteine SOXE grupe. Na ovaj način se utiče na njihovu stabilnost, lokalizaciju u ćeliji, transaktivacioni potencijal i afinitet vezivanja za DNK (Savare et al., 2005; Girard and Goossens, 2006; Hattori et al., 2006; Pan et al., 2006).

Proteini SOXD grupe su jedinstveni po prisustvu dva evolutivno očuvana domena po tipu leucinskog rajferšlusa, koji obezbeđuju homodimerizaciju u prisustvu ili u odsustvu DNK i omogućavaju efikasno vezivanje za susedna konsenzusna mesta (Lefebvre et al., 1998). Kako se homodimerizacija ne odvija preko HMG boks domena, omogućene su interakcije i sa drugim transkripcionim faktorima. Osim SOXD i SOXE proteini formiraju homodimere nakon vezivanja za DNK preko očuvanih regiona koji se nalaze na N kraju proteina (Schlierf et al., 2002).

1.4.2. Funkcije SOX proteina

Tokom nekoliko posljednjih godina SOX proteini su prepoznati i okarakterisani kao važni regulatori brojnih procesa tokom razvića. Takođe, poznata je uloga ovih transkripcionih faktora u ključnim fiziološkim procesima tokom adultnog života kičmenjaka. Osim toga, jedan Sox protein može da ostvaruje funkciju na različitim stupnjevima razvića jednog tipa ćelija i/ili u procesima razvića više tipova ćelija (Kiefer, 2007). U Tabeli 2. Sumirana je funkcija *Sox* gena kod miša.

Tabela 2. Pregled funkcija *Sox* gena miša. Preuzeto iz (Lefebvre et al., 2007) i modificovano.

Grupa	Gen	Uloga
A	<i>Sry</i>	Determinacija pola (Polanco and Koopman, 2007)
		Regulacija dopaminergičnih neurona nigrostriatalnog sistema (Dewing et al., 2006)
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) Razviće čulnih kvržica (Okubo et al., 2006)		
B2	<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)

Grupa	Gen	Uloga
	Sox11	Kardiogeneza (Sock et al., 2004) Razviće oka, pluća, pankreasa, skeleta i slezine (Sock et al., 2004) Neurogeneza (Bergsland et al., 2006)
	Sox12	Nepoznata
D	Sox5	Razviće skeleta (Smits et al., 2001) Razviće nervne kreste (Perez-Alcala et al., 2004) Gliogeneza (Stolt et al., 2006)
	Sox6	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)
	Sox13	Limfopoeza (Melichar et al., 2007)
E	Sox8	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)
	Sox9	Determinacija pola (Barrionuevo et al., 2006a; Kobayashi et al., 2005) Hondrogeneza (Bi et al., 1999; Akiyama et al., 2002) Razviće nervne kreste (Cheung et al., 2005) Gliogeneza (Stolt et al., 2003; Wegner and Stolt, 2005) Održavanje ćelija notohorda (Barrionuevo et al., 2006) Kardiogeneza (Akiyama et al., 2004) Formiranje unutrašnjeg uha (Taylor and LaBonne, 2005) Formiranje folikula dlake (Vidal et al., 2005) Razviće pankreasa (Seymour et al., 2007) Razviće epitela creva (Moniot et al., 2004)
	Sox10	Razviće nervne kreste (Wegner and Stolt, 2005; Kelsh et al., 2006) Formiranje unutrašnjeg uha (Taylor and LaBonne, 2005)
F	Sox7	Kardiogeneza (Zhang et al., 2005)
	Sox17	Formiranje endoderma (Kanai-Azuma et al., 2002) Angiogeneza (Matsui et al., 2006)

Grupa	Gen	Uloga
	<i>Sox18</i>	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	<i>Sox15</i>	Regeneracija skeletne muskulature (Lee et al., 2004; Meeson et al., 2007)
H	<i>Sox30</i>	Nepoznata

1.5. SOXF geni / SOXF proteini

Sox7/SOX7, *Sox17/SOX17* i *Sox18/SOX18* geni pripadaju *SoxF/SOXF* podgrupi. Uloga SOXF transkripcionih faktora je visoko očuvana tokom evolucije. Ova grupa gena ima važnu ulogu u razviću kardiovaskularnog i limfnog sistema. Naime, SOXF transkripcioni faktori učestvuju u specifikaciji endotelijalnih ćelija i regulišu diferencijaciju ćelija kako bi došlo do formiranja srca, krvnih i limfnih sudova (Francois et al., 2010).

SOXF transkripcioni faktori, kao ostali SOX proteini, se vezuju za konsenzusnu DNK sekvencu 5'- A/TA/TCAAA/T -3' (Hosking et al., 1995; Niimi et al., 2004). SOXF proteini aktiviraju transkripciju ciljnih gena transaktivacionim domenom koji se nalazi u okviru C-terminalnog domena u odnosu na HMG boks domen (Hosking et al., 1995).

Najbitniji mehanizam koji moduliše transkripcionu aktivnost SOXF transkripcionih faktora je interakcija sa partnerskim proteinima. *In vitro* je pokazano da MEF2C (eng. myocyte enhancer factor-2) direktno interaguje sa HMG boks domenom SOX18 (Hosking et al., 2001). Ova dva transkripciona faktora ko-lokalizuju u endotelijalnim ćelijama tokom embrionalnog razvića miša (Lin et al., 1998; Pennisi et al., 2000a). Mutacije u *Sox18* genu kod miša, kao i delecija *Mef2C* dovode do poremećaja u vaskularnom razviću (Pennisi et al., 2000a). Ovi podaci pokazuju da SOX18 i MEF2C zajedno učestvuju u kontroli morfogeneze krvnih sudova.

Tokom rane organogeneze, *Sox18* ekspresija je detektovana već u 8 dpc (eng. days post-coitum) u ćelijama koje su predodređene da postanu endokardijum (Pennisi et al., 2000a). Detaljna analiza SOXF ekspresije pokazala je da su *Sox7* i *Sox18* eksprimirani u perikardialnom regionu na 8.25 dpci u srčanoj cevi 8.5 dpc, dok ekspresija *Sox17* nije primećena (Sakamoto et al., 2007). Kod žaba, *xSox7* je maternalno eksprimiran i identifikovana je njegova ekspresija tokom perikardijalnog razvića (Fawcett and Klymkowsky, 2004). Tokom kardiogeneze kod žaba je detektovana ekspresija i *xSox18β* (Hasegawa et al., 2002).

Eksperimentalno je pokazano da su *Sox7*, *Sox17* i *Sox18* tranzijentno eksprimirani u endotelijalnim ćelijama tokom embrionalnog razvića miša (Young et al., 2006). Ekspresija *Sox18* najranije je zapažena 7.5 dpc u krvnim ostrvcima žumancetne kese i endotelijalnim ćelijama alantoisa. Oko 8.25 – 8.5 dpc u dorzalnim aortama u nastajanju su detektovani *Sox7* i *Sox18*, ali ne i *Sox17* (Pennisi et al., 2000a; Sakamoto et al., 2007). Već od 9 dpc u manjim granama krvotoka su eksprimirani *Sox 7*, *Sox17* i *Sox18* (Pennisi et al., 2000a; Sakamoto et al., 2007). Ova faza predstavlja primitivnu limfangiogenezu. *Sox18* je u ovoj fazi eksprimiran u endotelijalnim ćelijama limfnih sudova koji nastaju diferencijacijom od krvnih sudova. Kod zebrica *Sox7* transkripti se u endotelijalnim ćelijama detektuju pre *Sox18* (Francois et al., 2010). Izgleda da je ekspresija ova dva gena u endotelijalnim ćelijama nezavisno regulisana.

S obzirom na važnu ulogu SOXF transkripcionih faktora u kardiogenezi, vaskulogenezi i limfangiogenezi, mutacije u genima koji kodiraju ove proteine učestvuju u etiologiji humanih vaskularnih bolesti. Primećeno je da su mutacije u *SOX18* genu povezane sa poremećajima limfnog sistema koji dovode do gastroenteropatija (Hokari et al., 2008). Pokazano je, takođe, da su dominantne i recesivne mutacije u *SOX18* genu uzrok naslednog sindroma označenog kao Hypotrichosis-Lymphedema-Telangiectasia (HLT) (Irrthum et al., 2003). Zatim, pretpostavlja se da je *SOX17* odgovoran za razvoj primarnog limfedema kod čoveka (Ferrell et al., 2008).

1.6. *SOX18* gen

Humani *SOX18* gen kodira transkripcioni faktor koji se tranzijentno eksprimira tokom embrionalnog razvića u endotelijalnim ćelijama. Takođe, ekspresija *SOX18* transkripcionog faktora identifikovana je i tokom adultne neovaskularizacije (Downes and Koopman, 2001). *In situ* hibridizacijom je analizirana ekspresija mišijeg *Sox18* gena i pokazano da se on eksprimira vrlo rana, već tokom embrionalnog razvoja kardiovaskularnog sistema (Pennisi et al., 2000a). Naime, njegova ekspresija je detektovana počev od 7.5 dpc i prisutna sve do formiranja periferne mikrocirkulacije (Downes and Koopman, 2001). Darby i saradnici su pokazali da se *Sox18* eksprimira i tokom adultnog perioda u endotelijalnim ćelijama na mestima zarastanja rana (Darby et al., 2001). Ono što je važno istaći je da ekspresija *Sox18* gena na bilo kom mestu ograničena na period od oko 2 dana (Downes and Koopman, 2001). Studije na embrionima pileta su takođe pokazale tranzijentnu endotelijalnu ekspresiju *Sox18* gena (Olsson et al., 2001).

Humani *SOX18* gen kodira protein dužine 384 amino kiselina. *SOX18* svojim DNK vezujućim domenom (HMG boks domenom) specifično prepoznaje i vezuje za DNK sekvencu 5'- AACAAAG-3' *in vitro* (Hosking et al., 1995). Takođe, u *in vitro* Gal4 eseju *SOX18* je sposoban da aktivira transkripciju (Hosking et al., 1995). Humani *SOX18* poseduje pored HMG boks domena i dva domena koja poseduju transaktivacionu aktivnost (Sandholzer et al., 2007). Jedan transaktivacioni domen je mapiran u regionu protein od 168 do 260 amino kiselina. Drugi transaktivacioni motiv od 9 amino kiselina je lokalizovan u okviru C terminalnog domena i odgovoran je za interakciju sa kofaktorom TAF9 (Sandholzer et al., 2007). U *in vitro* esejima je pokazano da se delecijom ovog regiona značajno smanjuje transaktivaciona aktivnost *SOX18* proteina (Sandholzer et al., 2007). HMG boks domen i transaktivacioni domen imaju tačno određene funkcije i izuzetno su evolutivno očuvani između miša i čoveka (Azuma et al., 2000; Pennisi et al., 2000b; Stanojic and Stevanovic, 2000). Sa druge strane transaktivacioni domen *SOX18* proteina kod pileta se značajno razlikuje što može da ukaže na drugačiju funkciju ili su mu za tu funkciju neophodni različiti kofaktori (Olsson et al., 2001).

Pored ekspresije tokom razvića krvnog i limfnog sistema primećena je tranzijentna ekspresija *Sox18* gena tokom razvića dlake i pera kod miša i pileta (Pennisi et al., 2000a; Olsson et al., 2001).

1.6.1 Regulacija ekspresije *SOX18* gena

Humani *SOX18* gen je kloniran i okarakterisan u Laboratoriji za humanu molekularnu genetiku, Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo. U istoj Laboratoriji analiziran je uzvodni 5' regulatorni region *SOX18* gena sa ciljem rasvetljavanja mehanizama koji učestvuju u regulaciji njegove transkripcije. Naime, okarakterisan je optimalan *SOX18* promotor koji obuhvata region od -726 do +166 bp u odnosu na start transkripcije i minimalni promotor *SOX18* gena koji obuhvata region od -89 do +166 bp u odnosu na start transkripcije (Petrovic and Stevanovic, 2007).

Analizirana je uloga odabranih transkripcionih faktora u regulaciji transkripcije *SOX18* gena. Pokazano je da je Sp1 (eng. specificity protein 1) faktor, koji pripada familiji proteina sa cinkanim prstićima, pozitivan regulator promotorske aktivnosti *SOX18* gena (Petrovic, 2005). Zatim, dokazano je da još jedan član Sp familije transkripcionih faktora, Sp3 (specificity protein 3), ima funkcionalan značaj u transkripcionoj regulaciji *SOX18* gena. Eksperimentalno je pokazano da Sp3 negativan regulator ekspresije *SOX18* gena (Petrovic et al., 2009). Zatim, ZBP-89 (eng. zinc finger binding protein) okarakterisan je kao još jedan negativan regulator *SOX18* genske ekspresije (Petrovic et al., 2009).

Osim negativnih regulatora ekspresije *SOX18* gena, identifikovani su i okarakterisani pozitivni regulatori. Utvrđeno je da NF-Y (eng. nuclear factor Y) transkripcioni faktor dovodi do aktivacije ekspresije *SOX18* gena (Petrovic et al., 2009). Pokazano je da EGR1 (eng. early growth response) transkripcioni faktor koji kontroliše ekspresiju velikog broja gena uključenih u angiogenezu i razvoj tumora značajno aktivira ekspresiju *SOX18* gena (Petrovic et al., 2010a).

Osim toga, ekperimentalno je utvrđeno da VEGF i TNF signalni putevi menjaju nivo SOX18 proteina u endotelijalnim ćelijama kao i da ibuprofen i NS398, steroidni antiinflamatorni lekovi utiču na značajno smanjenje nivoa SOX18 proteina u endotelijalnom model sistemu (Petrovic et al., 2010b).

1.6.2. Funkcije *SOX18* gena

Uloga SOX18 proteina u vaskularnom razviću i razviću folikula dlake otkrivena je na osnovu poremećaja u razvoju vaskularnog sistema i dlake koji su uočeni kod prirodnih mutanata miša i čoveka. Okarakterisane su četiri alelske vrste prirodnih „ragged“ (Ra) mutanata miša: Ra (ragged), RaJ (ragged Jackson), Ragl (raggedlike) i RaOp (ragged opossum) (James et al., 2003). Svi Ra mutanti imaju deleciju jednog baznog para koja dovodi do sinteze skraćenog proteina kao rezultat promene okvira čitanja. Heterozigoti za Ra, RaJ i Ragl mutacije odlikuju se promenama u krznu, imaju tzv. čupav (eng. ragged) izgled, dok homozigoti za navedene mutacije razvijaju edem, nakupljane tečnosti i cijanozu (Carter, 1954). RaOp mišiji mutanti u heterozigotnoj formi pokazuje iste fenotipske karakteristike kao Ra, RaJ i Ragl u homozigotnom stanju. Međutim, RaOp homozigotni embrioni umiru *in utero* usled cijanoze, edema i ozbiljnih kardiovaskularnih poremećaja (Green, 1961). RaOp miševi eksprimiraju dominantno-negativnu formu SOX18 proteina koja se vezuje za DNK, ali ne može da interaguje sa partnerskim proteinima pa izostaje aktivacija SOX18 ciljnih gena koji su uključeni u regulaciju razvića vaskularnog sistema.

HLT sindrom kod ljudi je povezan sa mutacijama u *SOX18* genu (Irrthum et al., 2003). Identifikovane su tri mutacije u okviru *SOX18* gena od kojih su dve mutacije recesivne, mapirane unutar HMG boks domena i dovode do zamene aminokiselina A104P i W95R. Posledice ovih mutacija su promene u DNK vezujućem domenu što destabilizuje protein i onemogućava vezivanje SOX18 transkripcionog faktora za DNK. Treća, *de novo* mutacija je dominantna i mapirana je u okviru transaktivacionog domena SOX18 proteina. Ova mutacija dovodi do stvaranja preuranjenog stop kodona i za

posledicu ima sintezu skraćenog proteina, sa smanjenom transaktivacionom funkcijom (Irrthum et al., 2003).

Jedna karakteristika ovog sindroma je smanjena maljavost i potpuno odsustvo obrva i trepavica. Kod pacijenata sa ovim sindromom javljaju se limfedemi usled nepravilnog razvoja limfnog sistema kao i poremećaji u perifernoj cirkulaciji. Svi navedeni poremećaji potvrđuju važnu ulogu SOX18 gena u razviću dlake, krvnog i limfnog sistema.

Brojni autori ukazuju na moguću ulogu *SOX18* gena u nastanku i progresiji ateroskleroze. Hosking i saradnici su pokazali da SOX18 reguliše ekspresiju VCAM-1 gena (eng. vascular cell adhesionmolecul 1), adhezionoga molekul koji se pojačano eksprimira u aterosklerotskim lezijama (Hosking et al., 2004). Garcia-Ramirez i saradnici su imunohistohemijski detektovali povećanu ekspresiju *SOX18* gena u aterosklerotskim lezijama implicirajući moguću ulogu u nastajanju ateroskleroze (Garcia-Ramirez et al., 2005). Ova grupa naučnika navodi da bi SOX18 mogao ima važnu ulogu u procesima koji uključuju rast ćelija, kao što su zadebljanje unutrašnjeg zida arterija i neovaskularizacija (Garcia-Ramirez et al., 2005).

1.6.3. SOX18 u kancerogenezi

Poznato je da mnogobrojni geni koji imaju važnu ulogu u embrionalnom razviću su uključeni i u proces kancerogeneze. Takav primer predstavljaju članovi *SOX* familije gena koji funkcionišu kao onkogeni ili tumor supresor geni ili mogu da imaju obe uloge u zavisnosti od ćelijskog konteksta. SOX proteini mogu da doprinose malignom fenotipu svojom sposobnošću da regulišu procese kao što su proliferacija ćelija, apoptoza, preživljavanje, diferencijacija, invazija, migracija, angiogeneza (Dong et al., 2004; Castillo and Sanchez-Cespedes, 2012).

Podaci iz literature pokazuju da je ekspresija *SOX18* gena detektovana u različitim ćelijskim linijama poreklom od tumora. Saitoh i Katoh su pronašli *SOX18* transkripte u 7 tumorskih linija želuca, isto toliko tumorskih linija pankreasa, 3 ćelijske

linije karcinoma dojke i 5 embrionalnih tumorskih linija (Saitoh and Katoh, 2002). EST analizom (eng. express sequence tag) je pokazano da je *SOX18* eksprimiran u melanomima, neuroblastomima karcinomu ovarijuma, uterusa i pankreasa (Dong et al., 2004).

Poslednjih godina sve je više radova koji govore o ulozi *SOX18* gena u nastanku i progresiji tumora. Tako su Eom i saradnici pokazali da je *SOX18* pojačano eksprimiran u tumoru želuca u poređenju sa normalnim tkivom (Eom et al., 2012). Osim toga, pokazali su da je verovatnoća invazije putem limfnog sistema povećana ukoliko se radi o tumoru želuca sa povećanom ekspresijom *SOX18* gena u odnosu na tumor istog tipa kod koga nije detektovana promena u ekspresiji ovog gena (Eom et al., 2012). Ova činjenica predstavlja razlog zbog koga autori ove studije smatraju da bi *SOX18* mogao biti prognostički marker ali i ciljni gen u terapiji tumora. Na osnovu analize metilacionog statusa pojedinih gena, među kojima je bio i *SOX18* gen, u uzorcima NSCLC (eng. non small cell lung cancer), koji predstavlja jednu vrstu karcinoma pluća, došlo se do zaključka da je metilacioni status promotora analiziranih gena vrlo heterogen u tumoru i okolnom tkivu (Azhikina et al., 2011). Kod zdravog tkiva gde heterogenost skoro ne postoji, promotori ovih gena su ili nemetilovani ili metilovani (Azhikina et al., 2011). Povećana heterogenost u metilaciji normalnog tkiva koje okružuje tumor mogla bi da predstavlja najraniji stupanj epigenetskih promena koje vode ka tumorskoj transformaciji i može se upotrebiti kao biomarker ranih kanceroznih promena što može imati primenu u kliničkoj praksi.

Uloga *SOX18* gena u kancerogenezi je povezivana sa njegovom ulogom u procesu razvića krvnog i limfnog sistema, koji su neophodni za rast i širenje tumora migracijom tumorski ćelija što konačno dovodi do pojave metastaza. Young i saradnici su pokazali da kod RaOP heterozigotni miševi, koji eksprimiraju dominantno-negativnu formu *SOX18* proteina, nakon ubrizgavanja mišijih B16 melanoma linija dolazi do slabijeg razvoja tumora (Young et al., 2006). Smanjene veličine tumora je direktna posledica slabo razvijene lokalne mikrocirkulacije. Osim toga, ova grupa naučnika je pokazala da HUVEC i MCF-7 ćelije koje su transfektovane dominantno negativnim *SOX18* slabije proliferišu i migriraju (Young et al., 2006). Duong i saradnici su prikazali na mišijem modelu da se smanjenjem *SOX18* funkcije u melanomima

sprečava metastaza tumora i time pokazali da je indukcija *SOX18* gena ključan korak u tumorskoj limfangiogenezi identifikujući još jednom *SOX18* kao potencijalni ciljni molekul u sprečavanju metastaza (Dong et al., 2004).

Međutim, nedavno je jedna grupa naučnika detektovala ekspresiju *SOX18* gena u ćelijama invazivnog karcinoma dojke. Primenom imunohistohemijske analize na uzorcima tkiva invazivnog karcinoma dojke, osim u krvnim i limfnim sudovima, primećena je *SOX18* ekspresija i u jedrima ćelija tumora (Pula et al., 2013). Takođe, ustanovljeno je da *SOX18* ekspresija korelira sa višim stadijumom maligniteta i da je povezana sa lošom prognozom kod pacijenata obolelih od ove bolesti, pa autori ove studije zaključuju da ekspresija *SOX18* gena predstavlja prognostički marker kod invazivnog karcinoma dojke (Pula et al., 2013). Ista grupa naučnika je pokazala da se na osnovu nivoa *SOX18* ekspresija u karcinomu ovarijuma može predvideti odgovor na hemoterapiju. Rezultati prikazani u ovoj studiji su pokazali da povećana *SOX18* ekspresija, detektovana u rezidualnoj bolesti nakon tretmana tumora ovarijuma i u kasnijem stadijumu bolesti, ukazuje na lošu prognozu. Na ovaj način *SOX18* je predstavljen kao prognostički marker kod još jednog tipa invazivnog tumora (Pula et al., 2014).

1.7. Karcinom grlića materice

Epidemiološke studije su pokazale da je karcinom grlića materice kod žena drugi po učestalosti u svetu, odmah iza karcinoma dojke (Jemal et al., 2009). Procenjuje se da je ova vrsta tumora glavni uzrok smrtnosti, sa oko 500000 novodijagnostifikovanih svake godine i oko 250000 smrtnih slučajeva svake godine (Peralta-Zaragoza et al., 2012).

Oko 85% karcinoma grlića materice pripada skvamocelularnom tipu, 10%-15% pripadaju adenokarcinomu i 3% adenoskvamoznom karcinomu. Tretman pacijenata sa ovom vrstom maligniteta zavisi od kliničkog stadijuma bolesti koji se određuje prema FIGO klasifikaciji (eng. International Federation of Gynecology and Obstetrics) i koji podrazumeva pet stadijuma (Jadon and Joshi, 2012).

Karcinom grlića materice se razvija kroz niz premalignih promena koje predstavljaju oštećenja površinskog sloja kože i nazivaju se displazije ili skvamozne

intraepitelijalne lezije (CIN) . Postoji tri oblika promena označenih kao CIN I, CIN II, CIN III, gde CIN III predstavlja najteži oblik benign promene.

Infekcija Humanim papilomavirusom (HPV) je najvažniji faktor rizika i neophodan uslov za nastanak karcinoma. Poznato je da E6 i E7, viralni geni učestvuju u procesu maligne transformacije. Naime, pokazano je da produkti ovih viralnih gena inaktiviraju tumor supresor gene, p53 i Rb. Do danas je identifikovano više od 120 tipova HPV, među kojima postoje grupe sa niskim i visokim onkogenim rizikom. Pokazano je da 99% slučajeva karcinoma grlića materice je uzrokovano HPV tipom visokog onkogenog rizika (Sturgeon et al., 2010). Većina od njih (70%) je posledica infekcije HPV16 i HPV18 tipom (Sturgeon et al., 2010).

Dug latentni period između inicijalne izloženosti HPV i razvoja raka grlića materice, kao i činjenica da samo mali broj žena izloženih HPV infekciji zaista i dobije karcinom, ukazuje da, iako neophodna, HPV infekcija nije dovoljna za nastanak raka grlića materice. Da bi HPV infekcija dovela do nastanka raka grlića materice, ona mora opstajati, za šta su neophodni i drugi faktori . Većina žena inficiranih HPV u kratkom vremenskom intervalu od nekoliko meseci se putem imunog sistema izbori sa infekcijom. U malom broju slučajeva, uglavnom kod onih žena koje su inficirane HPV tipom visokog onkogenog potencijala, infekcija se zadržava. Kod njih postoji povećana verovatnoća od stvaranja premalignih lezija.

Dobra osobina karcinoma grlića materice je što se on razvija u dugom vremenskom periodu od oko 5 godina od prvih premalignih promena na ćelijama grlića do raka. Ovo omogućava otkrivanje u ranom stadijumu pre nego što postane invazivan i počne da se širi. Sa druge strane on ne daje simptome ili su oni blagi ili vrlo nespecifični, pa se u ranim fazama kada je stopa izlečenja najveća teško prepoznaje.

Standardan tretman pacijenata u uznapredovalim stadijumima ove bolesti uključuje hemoterapiju cisplatinom i zračenje. Ored toga petogodišnje preživljavanje je 66 % (Sturgeon et al., 2010). Takođe terapijske metode za pacijente sa metastazama su vrlo ograničene pri čemu je njihovo preživljavanje svega 12 meseci. Stoga je identifikacija potencijalnih novih targeta neophodna kako bi se razvili novi terapijski pristupi.

Deregulacija HH signalnog puta dovodi do razvoja različitih tipova tumora. U studiji Xuan i saradnika je po prvi put prikazano da ekspresija komponenti HH

signalnog puta u prekancerogenim lezijama i u karcinomu grlića materice povećana u poređenju sa normalnim tkivom, u kome nije detektovana ekspresija pojedinih analiziranih komponente, dok su ostale komponente slabo eksprimirane (Xuan et al., 2006). Naime, eksperimentalno je pokazano da je nivo ekspresije SHH u prekancerogenim epitelijalnim lezijama oko tri puta povećan, u karcinomu okom šest u poređenju sa normalnim tkivom gde je njegova ekspresija bila niska. Ekspresija IHH nije uočena u normalnom tkivu, dok je u prekancerogenim lezijama i tumoru bila značajno povećana (u zavisnosti od oblika lezije od dva do tri puta) (Xuan et al., 2006). Ekspresija PTCH takođe je bila značajno povećana u neoplastičnim lezijama i tumoru (oko dva puta u lezijama, dok je u tumoru oko tri) u poređenju sa normalnim epitelom, što je uočeno i za ekspresiju SMO. Analizirana je ekspresija efektora HH signalnog puta, GLI transkripcionih faktora, i uočeno je da se njihova ekspresija povećala značajno u prekancerogenim lezijama tipa II i III ali i u samom tumoru. Ovi rezultati nedvosmisleno pokazuju da je HH signalni put uključen u nastajanje i progresiju karcinoma grlića materice (Xuan et al., 2006). Takođe, utvrđeno je da je HH signalni put aktiviran u ćelijskim linijama koje vode poreklo od karcinoma grlića materice je (Samarzija and Beard, 2012).

U ovom radu je korišćen *in vitro* model karcinoma grlića materice, permanentna ćelijska linija HeLa, kao model sistem za ispitivanje uloge SHH signalnog puta u regulaciji transkripcije humanog *SOX18* gena.

2. CILJ RADA

Predhodna istraživanja su pokazala da SHH signalni put igra važnu ulogu u ranim fazama embrionalnog razvića. Takođe, kod adultnog organizma ovaj signalni put je uključen u održanje pluripotentnog i progenitorskog stanja matičnih ćelija. Međutim, poslednjih godina pokazano je da promene u regulaciji SHH signalnog puta dovode do razvoja različitih vrsta tumora kod čoveka ubrzavajući proliferaciju, invaziju i ćelijsko preživljavanje (Sanchez et al., 2005; Ruiz i Altaba et al., 2007; Mas and Ruiz i Altaba, 2010; Onishi and Katano, 2011).

Humani *SOX18* gen je kloniran i okarakterisan u Laboratoriji za humanu molekularnu genetiku. Takođe, u istoj Laboratoriji definisan je minimalan promotor ovog gena, kao i transkripcioni faktori bitni za transkripcionu regulaciju njegove ekspresije. Poznato je da se *SOX18* transkripcioni faktor tranzijentno eksprimira tokom razvića vaskularnog i limfnog sistema, kao i na mestima gde dolazi do razvoja novih krvnih sudova od već postojećih, tokom procesa angiogeneze (Downes and Koopman, 2001). Poslednjih godina su proučavanja usmerena na analizu njegove uloge u razvoju i širenju tumora regulisanjem procesa tumorske angiogeneze.

Predmet ovog rada je analiza uloge SHH signalnog puta u regulaciji ekspresije humanog *SOX18* gena u HeLa ćelijama kao model sistemu karcinoma grlića materice. U ovom radu ispitivan je međusobni funkcionalni odnos SHH signalnog puta i ekspresije *SOX18* gena.

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

I) Određivanje uloge GLI transkripcionih faktora, kao efektoru SHH signalnog puta, u regulaciji ekspresije *SOX18* gena u HeLa ćelijama, a koja je uključivala:

Ia) *in silico* analizu *SOX18* promotora u cilju identifikacije potencijalnih vezivnih mesta za GLI transkripcione faktore,

Ib) funkcionalnu analizu uloge GLI transkripcionih faktora u regulaciji aktivnosti *SOX18* promotora,

Ic) ispitivanje *in vitro* vezivanja GLI transkripcionih faktora za potencijalna vezivna mesta,

Id) analizu uticaju GLI transkripcionih faktora na endogenu ekspresiju *SOX18* gena,

II) Modulacija SHH signalnog puta komercijalnim agonistima i antagonistima HH signalne kaskade koja je uključivala:

Iia) modulaciju aktivnosti signalnog puta ciklopaminom, antagonistom HH signalnog puta, i ispitivanje njegovog uticaja na proliferaciju, vijabilnost i migraciju HeLa ćelija,

Iib) modulaciju SHH signalnog puta ciklopaminom i ispitivanje uticaja na ekspresiju *SOX18* gena,

Iic) modulaciju aktivnosti signalnog puta purmorfaminom, agonistom HH signalnog puta, i ispitivanje njegovog uticaja na proliferaciju, vijabilnost i migraciju HeLa ćelija,

Iid) modulaciju SHH signalnog puta purmorfaminom i ispitivanje uticaja na ekspresiju *SOX18* gena,

III) Generisanje i funkcionalna analiza konstrukata koji ekspimiraju *wild-type* i skraćenu formu *SOX18* proteina,

IV) Ispitivanje uloge *SOX18* gena u procesima proliferacije, vijabilnosti i migracije HeLa ćelija

V) Analiza uticaja *SOX18* proteina na ekspresiju komponenti SHH signalnog puta.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Eksperimentalni materijal

3.1.1. Bakterijski soj korišćen u radu

Soj	Karakteristike-genotip	Referenca
XL1 Blue	<i>lac recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F' <i>proAB lacI^qZDM15 Tn10</i> (Tet ^r)]	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	Stratagene®
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 -galaktozidazu i služi kao marker za praćenje i normalizaciju ekspresije,	Amersham Pharmacia Biotech®
pCI	4 kb	Eukariotski ekspresioni vektor koji poseduje <i>amp</i> rezistenciju	Promega®
pEGFP-C1	4.7 kb	Eukariotski ekspresioni vektor koji poseduje pUC i SV40 početak replikacije, mutiranu varijantnu <i>GFP</i> gena, <i>amp</i> , <i>kan</i> rezistenciju	BD Bioscience Clontech

3.1.3. Plazmidni konstrukti korišćeni u radu

Plazmid	Veličina	Karakteristike	Referenca
892pCAT6	5.1 kb	Sadrži 892bp 5' regulatornog regiona <i>SOX3</i> gena	(Petrovic and Stevanovic, 2007)
pcDNA4-NLSMTGLI1	8.686 kb	Eukariotski ekspresioni vektor za humani <i>GLI1</i> gen	Dr Bert Vogelstein i Dr Kenneth W. Kinzler, Johns hopkins university, Baltimore, maryland, USA
P4TO6MTGLI2	9.009 kb	Eukariotski ekspresioni vektor za humani <i>GLI2</i> gen	Dr Fritw Aberger, University of Salzburg, Austria

pcDNA4/TO/ GLI3richtig	10.201 kb	Eukariotski ekspresioni vektor za humani <i>GLI3</i> gen	Dr Bert Vogelstein i Dr Kenneth W. Kinzler, Johns Hopkins university, Baltimore, maryland, USA
pCISOX18wt	5.6 kb	Sadrži kompletan kodirajući region humanog <i>SOX18</i> gena	Ovaj rad i (Milivojevic et al., 2013)
pCISOX18DN	4.62 kb	Sadrži <i>EcoRI/NorI</i> fragment SOX18 cDNA	Ovaj rad i (Milivojevic et al., 2013)

3.1.4. Čelijska linija korišćena u radu

U ovom radu je korišćena permanentna čelijska linija HeLa poreklom iz humanog adenokarcinoma grlića materice koja je komercijalno dostupna (American Type Culture collection, Manassas, VA 20108, USA-ATCC br.CCL2). HeLa ćelije su gajene u DMEM-u sa niskim sadržajem glukoze, 10% FBS-a i 1x neesencijalnim aminokiselinama (Gibco BRL) na 37°C i 5%CO₂.

3.1. 5. Antitela korišćena u radu

U “superšift” eksperimentima korišćena su sledeća antitela:

- anti- SOX18 (sc-20100, Santa Cruz Biotechnology)

- anti- GLI1 (ab49314, Abcam)

U “Western blot” i u imunocitohemijskoj analizi eksperimentima korišćena su sledeća antitela

1. primarna

- anti- SOX18 (sc-20100, Santa Cruz Biotechnology)

- anti- α -tubulin (CP06, Calbichem)

2. sekundarna

- HRP-konjugovano anti-zečji-IgG (GE Healthcare)

-HRP-konjugovano anti-mišji IgG (GE Healthcare)

-Alexa Fluor 488- biotinizovana kozja anti-zečja IgG (Vector, Burlingame)

3.1. 6. Oligonukleotidi korišćeni u radu

Naziv	Sekvenca
GAPDH F	5'-GGACCTGACCTGCCGTCTAG-3'
GAPDH R	5'-CCACCACCCTGTTGCTGTAG-3'
GLI1 F	5'-CAGTTATGGGCCAGCCAGAGA-3'
GLI1 R	5'-TGGCATCCGACAGAGGTGAG-3'
GLI2 F	5'-AGCAGCAGCAACTGTCTGAGTGA-3'
GLI2 R	5'-GACCTTGCTGCGCTTGTGAA-3'
GLI3 F	5'-TCCAACACAGAGGCCTATTCCAG-3'
GLI3 R	5'-CTCTTGTTGTGCATCGGGTCA-3'

SHH F	5'-TCCAGAAACTCCGAGCGATTTAAG-3'
SHH R	5'-CACTCCTGGCCACTGGTTCA-3'
PTCH F	5'-ACCAGAATGGGTCCACGACAA-3'
PTCH R	5'-AAAGTCTGAGGTGTCCCGCAA G-3'
SOX18FG1	5'-CAAGGGCCCTTGGGGGGCAGGGAGGACG-3'
SOX18RG1	5'-GGCGTCCTCCCTGCCCCCAAGGGCCCTTG-3'
SOX18FG2	5'-GAGCCTCCAGCGGGGGGCGGGGAACGGCAA -3'
SOX18RG2	5'-GGTTGCCGTTCCCCGCCCCCGCTGGGAGGCTC -3'
SOX18FG3	5'-CCAGTTACTGCCCGGGGGTCCGACT -3'
SOX18RG3	5'-GGAGTCGGACCCCCGGGCAGTAACTGG -3'
SOX18FG4	5'-CGACTCCGTGGGTGGGTGGCAGCTCG -3'
SOX18RG4	5'-GGCGAGCTGCCACCCACCCACGGAGTCG -3'
SOX18FG5	5'CTTTCTTTCCACCCGGGGGGTCTCT -3'
SOX18RG5	5'-GGAGAGACCCCCGGGTGGGAAAGAAAG -3'
SOX18FG6	5'- GGGGGAGGTGGGGGGGCTGTGCGCGGGGGAGG -3'
SOX18RG6	5'- CCTCCCCCGCGCACAGCCCCCCCACCTCCC -3'
FGLI	5'- GGTTTAAGCTTCGTGGGTGGTCAC-3'
RGLI	5'-GTGACCACCCACGAAGCTTAAA -3'

3.1.7. Komercijalni kitovi

Plazmidna DNK je izolovana i prečišćena upotrebom “Endofree plasmid Maxi Kit”- a (Qiagen). Totalna RNK iz HeLa 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 Hot Start Ready Mix” PCR kita (Byosistems). Kvantitativni qRT-PCR je urađen pomoću “Power SYBR Green PCR master mix” reagensa (Applied Biosystems). Tranzijentne transfekcije HeLa ćelija su rađene “LIPOFECTAMINE” reagensom (Invitrogen). Merenje β -gal aktivnosti je rađeno pomoću “ β -galactosidase Enzyme Assay System” (Promega). CAT aktivnost je određena “CAT ELISA” kitom (Roche Pharmaceuticals).

3.1.8. Komercijalni agensi korišćeni u radu

Za modulaciju SHH signalnog puta u HeLa ćelijama korišćeni su sledeći hemijski agensi: ciklopamin (Sigma) u cilju inhibicije SHH signalnog puta, tomatidin (Sigma), kao kontrola ciklopaminu i purmofamin (Sigma) u cilju aktivacije SHH signalnog puta. MTT boja je korišćena u testu vijabilnosti.

3.1.9. Kompjuterski program

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

3.2. Eksperimentalne metode

3.2.1. Enzimska reakcija isecanja DNK restrikcionim enzimima

U sastav smeše za restrikciono isecanje DNK enzimima (restrikciona digestija) ulazila je DNK (vector ili konstrukt oko 5 μ g), odgovarajući komercijalni pufer za restrikcioni enzim i restrikcioni enzim koncentracije 2U/ μ g DNK. Reakcija je rađena u zapremini od 50 μ l u trajanju od 3-5h na 37°C.

3.2.2. Ligiranje fragmenata DNK

Uz pomoć enzima ligaze dolazi do povezivanja linearnih dvolančanih fragmenata DNK. Reakcija ligiranja rađena je u zapremini od 10 μ l, a sastojala se od vektora koji je predhodno linearizovan (isečen restrikcionim enzimom) i insertom u molarnom odnosu 1:5, pufera za ligaciju i 4U ligaze. Reakcija je pripremana na ledu, a odvijala se preko noći na +16°C.

3.2.3. Kultivacija bakterija

Bakterije *E.coli* su gajene u tečnom LB medijumu (1% tripton, 1%NaCl, 0.5% ekstrakt kvasca) ili na čvrstoj LB podlozi (1% tripton, 1%NaCl, 0.5% ekstrakt kvasca, 1.5% bacto-agar) koji su sterilisani autoklaviranjem. Kultivacija se odvijala na 37°C. U oba medijuma dodavan je ampicilin u koncentraciji 100 μ g/ml.

3.2.4. Priprema bakterija za elektroporaciju (elektro-transformaciju) i transformacija

Najbitnije u pripremi bakterija za elektro-transformaciju je da su bakterije rastvorene u rastvoru niske jonske jačine kako soli koje su u rastvoru ne bi uticale na električno polje što bi dovelo do lize bakterija. U tu svrhu se bakterije rastvaraju u vodi.

1% inokulum prekonoćne XL1 blue bakterija se inokuliše u 1000 ml tečnog LB medijuma i gaji na 37°C do postizanja OD₆₀₀ 0.5-0.7. Zatim se bakterije premeštaju na led usled čega se njihov rast zaustavlja i inkubiraju 15-30 min. Nakon toga se bakterije centrifugiraju 15 min na 5000 obrtaja/min u hladnom GSArotoru (Sorvall centrifuga).

Takozi se resuspenduju u 1000 ml hladne vode i ponovo centrifugiraju pod istim uslovima. Ovaj korak se još jednom ponavlja ali u 500 ml vode. Talog se na kraju resuspenduje u 20ml 10% hladnog glicerola i centrifugira u hladnom SS34 rotoru 10 min na 7000obrtaja/min. Nakon toga se talog resuspenduje u 3 ml 10% glicerola i alikvotira po 50 μ l na suvom ledu. Ovako pripremljene bakterije se čuvaju na -70°C .

Posle pripreme bakterija usledila je elektroporacija koja predstavlja efikasan način transformacije *E. coli*. Efikasnost transformacije se menja u zavisnosti od jačine polja, što predstavlja odnos voltaže i rastojanja između, i trajanja pulsa, RC vremenska konstanta.

Bakterije se odmrznu na sobnoj temperature i prebace na led. U smešu bakterija se doda ligaciona reakcija I inkubira 30 min. na ledu, nakon čega se sve iz tube prebacuje u hladnu 0.2 cm kivetu za elektroporaciju. Uslovi za elektroporaciju na “Gene pulser” aparatu su bili 25 μ F, 200 Ω i 2.5kV. U kivete je po završenoj elektroporaciji u kivetu dodavan 1 ml LB medijuma, nakon čega su se bakterije oporavljale 30 min na 37°C uz konstantno mešanje. Deo transformisane smeše je prebačen na podlogu sa ampicilinom I inkubiran preko noći na 37°C .

3.2.5. *In silico* analiza humanog *SOX18* promotora i poređenje sa ortologom sekvencom miša

Iz genomske sekvence NT_011333.5-klon AL355803 koja je objavljene na NCBI je dobijena sekvenca humanog *SOX18* promotorskog regiona i upoređena je sa ortologom sekvencom kod miša, koja je dobijena iz genomske sekvence NT_039212.5. Clustal W softverom je urađeno poređenje ovih sekvenci. Za identifikaciju potencijalnih vezivnih mesta za GLI transkripcione faktore u okviru optimalnog promotora humanog *SOX18* gena i njegovog mišjeg ortologa upotrebljen je MatInspector program. Kriterijumi prilikom korišćenja ovog programa su bili da je verovatnoća vezivanja za jezgro konsenzusne sekvence vezivnog mesta (eng. core similarity) je iznosila 1 i odgovarajući kontekst nukleotida u sekvencama koje okružuju vezivno mesto (eng. Matrix similarity) je bio optimizovan.

3.2.6. Izolacija plazmidne DNK “EndoFree^R Plasmid” kitom

Qiagen kit za izolaciju plazmidne DNK se zasniva na modifikovanoj procedure alkalne lize gde se plazmidna DNK veže za patentirani Qiagen anjonski-jonoizmenjivački matriks u odgovarajućim uslovima niskih jonskih jačina i pH. Pranjem rastvorom srednje jonske jačine se odstranjuju RNK, proteini i ostale nečistoće, dok se plazmidna DNK eluira u puferu visoke jonske jačine, izopropanolskom precipitacijom odsoljava. Plazmidni izolati korišćeni i za potrebe tranzijentne transfekcije, pa je bilo neophodno da se iz izolata odstrane bakterijski endotoksini jer se znatno umanjuje efikasnost transfekcija eukariotskih ćelija.. Endotoksini predstavljaju lipopolisaharidi Gram-negativnih bakterija, kao što je *E.coli*. Korišćenjem patentiranog ER (eng. Endotoxin removal) pufera onemogućava se vezivanje endotoksina za DNK vezujući matriks. Izolacija je rađena prema uputstvu proizvođača, a u radu su korišćeni “EndoFree Maxi Plasmid” i “EndoFree Midi Plasmid”. Izolovana plazmidna DNK je čuvana na -20°C do upotrebe u tranzijentnim transfekcijama.

3.2.7. Tranzijentna transfekcija HeLa ćelija kalcijum fosfatnom precipitacijom

Za eksperimente tranzijentne transfekcije zasejavano je 1.1×10^6 HeLa ćelija u Petri šolje prečnika 10cm. Nakon 24h rasta, ćelije su isprane dva puta HEPES rastvorom (6.7 mM KCl, 142 mM NaCl, 10 mM HEPES) i gajene još 2h u svežem medijumu.

Po isteku ovog vremena na ćelije je nakapan kalcijum fosfatni precipitat DNK koji je napravljen na sledeći način. Rastvoru DNK u 1ml 2 x HEBS rastvora (HEPES buffered saline; 274 mM NaCl, 42 mM HEPES, 9.6 mM KCl, 1.5 mM Na₂HPO₄; pH 7.15-7.30), koji je neprekidno aerisan, nakapavanjem je dodavan 259 mM rastvora CaCl₂. Na ovaj način se formira kalcijum fosfatni precipitat koji se nakapava na ćelije i inkubira 5h u standardnim uslovima za gajenje HeLa ćelija. Precipitati se uklanjaju

pranjem dva puta rastvorom HEPES-a i dodaje se svež kompletan medijum za gajenje HeLa ćelija. Po isteku 48h od uklanjanja precipitate pravljene su ćelijski ekstrakti.

U eksperimentima tranzijentne transfekcije promotor–zavisnim reporterskim konstruktima HeLa ćelije su transfektovane sa 10 µg 892pCAT6, 4 µg pBS II KS+ i 3 µg pCH110 vektora. U eksperimentima kotransfekcije HeLa ćelije su transfektovane sa 10 µg 892pCAT6 konstruktom i 2 µg ili praznog vektora (pcDNA 3.1) ili odgovarajućim ekspresionim vektorima, zajedno sa 3 µg pCH110.

3.2.8. Tranzijentana transfekcija Hela ćelija LIPOFECTAMINE reagensom

Dan pre transfekcije 3×10^5 Hela ćelija je sađeno u 35 mm Petri šolji. Ćelijama se sutradan promeni medijum i doda medijum bez seruma. Transfekcija je rađena u minimalnom OPTI-MEM (Invitrogen) medijumu u odsustvu seruma. U eksperimentima transfekcije ćelije su transfektovane sa ukupno 3µg DNK (pCI, pCDNA3.1 ili odgovarajućim plazmidnim konstruktima) koja je rastvorena u 250 µl OPTI-MEM-a. Takođe, 8 µl LIPOFECTAMINE reagensa je rastvoreno u 250 µl OPTI-MEM-a. Ova dva sadržaja se potom spoje i inkubiraju 30 minuta., nakon formiranja kompleksa u ukupnoj zapremini od 500µl. Za svaku pojedinačnu transfekciju, kompleksi su sipaju preko ćelija i ćelije se inkubiraju 5 h. Nakon toga, ćelije su isprane 1xPBS-om i dodaje se svež , kompletan medijum koji se koristi za gajenje HeLa ćelija. 24h nakon transfekcija izolovana je RNK, a takođe i ukupni ćelijski proteini.

3.2.9. Priprema ćelijskih ekstrakata

Ćelije su oprane hladnim 1 x PBS-om, struganjem odvojene od podloge u 1ml TEN rastvora (Tris-EDTA-NaCl; 40mMTris-HCl pH 7.4, 1mM EDTA, 150mM NaCl) i istaložene na 13000 rpm, 2 minuta na +4°C. Ćelijski talog je, zatim, resuspendovan u 100µl 0.25 M tris-HCl (pH 7.8 na 37°C),nakon čega je liza ćelija rađena kroz tri ciklusa zamrzavanja i odmrzavanja (3 min u tečnom azotu praćeno inkubacijom na 37°C do otapanja ćelijskog taloga. Nakon centrifugiranja na 13200 obrtaja/10 min na +4°C, a supernatant (ćelijski ekstrakt) je korišćen u β-galaktozidaznom i CAT eseju.

3.2.10. β -galaktozidazni esej

Za normalizaciju ekspresivnosti transfekcija korišćen je pCH110 vektor koji ekspresira gen za β -galaktozidazu čija se aktivnost meri pomoću eseja β -galaktozidazne aktivnosti (“ β -galactosidase Enzyme Assay System”).

β -galaktozidazni esej je metoda kojom se određuje aktivnosti enzima β -galaktozidaze u ekstraktima ćelija koje su transfektovane pCH110 vektorom. Esej se izvodi tako što se uzorku razblaženom u Tris-HCl pH 7.8 doda ista količina 2x Assay Buffer-a koji sadrži 200 mM PBS, 2 mM $MgCl_2$, 100 mM β -merkaptotanol i 1.33 mg/ml supstrata ONPG (*o*-nitrofenil- β -D-galaktopiranozid). Uzorci se inkubiraju na 37°, pri čemu se β -galaktozidaza hidrolizuje bezbojan supstrat u *o*-nitrofenil žute boje. Absorbanca je merena na Microplate reader aparatu tipa Multiscan RC (Labsystem) na talasnoj dužini od 420nm. Kao referentne vrednosti za konstruisanje standardne kalibracione krive i određivanje vrednosti β -galaktozidaze u ispitivanim ćelijskim ekstraktima korišćena su sledeća razblaženja ovog enzima: 1.56 mU, 3.125 mU, 6.25 mU, 12.5 mU, 25 mU, 50 mU, 100 mU i 200 mU.

3.2.11. CAT esej

Aktivnost CAT enzima (hloramfenikol-acetil-transferaza) su određivane “CAT ELISA esejem” (CAT Enzyme Immunosorbent Assay/ELISA Roche). CAT ELISA je enzimski imunoesej za kvantifikaciju hloramfenikol-acetil-transferaze iz *E.coli* u transfektovanim eukariotskim ćelijama, tj za kvantifikaciju ekspresije CAT enzima u eukariotskim ćelijama transfektovane plazmidima koje sadrže CAT reporterski gen.

Esej se zasniva na sendvič-ELISA principu i izvodi se u mikrotitar pločana koje imaju antitela na CAT (anti-CAT) vezane za površinu bunarčića. Prvo se u bunarčiće mikrotitar ploče dodaju ekstrakti transfektovanih ćelija i inkubiraju 60 min na 37°C. Tada dolazi do vezivanja CAT enzima iz ćelijskih ekstrakata sa anti-CAT antitelom vezano za dno bunarčića. U sledećem koraku se dodaje digoksinom obeleženo antitelo na CAT (anti-CAT-DIG) i dolazi do njegovog vezivanja za CAT. Zatim se

odaju antitela na digoksinin koja su konjugovana sa peroksidazom (anti-DIG-POD) koja se vezuje za digoksinin. U poslednjem koraku dodaje se supstrat ABTS, koji u prisustvu peroksidaze daje obojenu reakciju pri inkubaciji na 37°C. Absorbanca je merena na Microplate reader aparatu tipa Multiscan RC (Labsystem) tipa Multiscan RC (Labsystem) na talasnoj dužini 405/492 nm. Kao standardi za određivanje aktivnosti CAT-a u ispitivanim uzorcima, tj. za konstruisanje standardne krive korišćena su sledeća razblaženja CAT enzima: 1.56 pg, 3.125 pg, 6.25 pg, 12.5 pg, 25 pg, 50 pg, 100 pg i 200 pg. Vrednosti dobijenih CAT aktivnosti su normalizovane u odnosu na efikasnost transfekcije, tj u odnosu na izmerenu vrednost β -galatozidaze u datom uzor

3.2.12. Izolacija jedarnih proteina iz HeLa ćelija

Jedarni proteini su izolovani po modifikovanoj proceduri Dignama i saradnika (Dignam et al., 1983). Ćelije su isprane 1 x PBS rastvorom i centrifugirane 5 min na 900 rpm +4°C. Talog je resuspendovan u puferu A (10mM HEPES-KOH pH 7.8, 1.5 mM MgCl₂, 10 mM KCl) i inkubiran 10 min na ledu. Nakon toga je dodato 10% tritona, 1/30 zapremine u odnosu na količinu dodatog pufera A. Ćelije su vorteksovane i staložene. Supernatan, koji predstavlja citoplazmatsku frakciju, je odvojen od taloga i njemu je dodat pufer B (0.3 mM HEPES-KOH pH 7.8, 30 mM MgCl₂, 1.4 mM KCl). Talog, koji predstavlja jedarnu frakciju, je resuspendovan u puferu C (20 mM HEPES-KOH pH 7.8, 1.5 mM MgCl₂, 0.42 M NaCl, 25% glicerol, 0.2 mM EDTA). Nakon mešanja frakcija 15 min na +4°C usledilo je centrifugiranje 15 min na 14000 rpm na +4°C. Puferi A i C su sadržali inhibitore proteaza u sledećim koncentracijama: 0.5 mM DTT, 0.5 mM PMSF, 1 μ g/ml leupeptina, 1 μ g/ml pepstatina i 1 μ g/ml antipaina, dok pufer B imao je sve inhibitore proteaza osim DTT-a.

3.2.13. Izolacija ukupnih ćelijskih proteina iz HeLa ćelija

Nakon transfekcija HeLa ćelija ekspresionim vektorima za GLI transkripcione faktora, nativnu i skraćenu formu SOX18 proteina, kao i nakon tretmana komercijalnim

agensima koji modilišu SHH signalni put, izolovani su ukupni ćelijski protein koji su korišćeni u “Western blot” analizi. Ćelije su tripsinizovane, isprane dva puta 1 x PBS-om i lizirane u puferu koji sadrži 50mM Tris HCl pH 8.0, 150mM NaCl, 1% NP-40, 5µg/ml PMSF, 1µg/ml aprotinin, 1µg/ml leupeptin, 1µg/ml pepstatin A (1 x 10⁷ ćelija se lizira 1ml pufera za lizu) 30 minuta na ledu. Nakon toga su ćelije centrifugirane na 11600 obrtaja/15 min na +4°C. Supernatan u kome su se nalazili ukupni ćelijski protein je alikvotiran i alikvoti čuvani na - 80°C.

3.2. 14. Esej smanjene elektroforetske pokretljivosti

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

R ili F oligonukleotidi su dizajnirani tako da sadrže 2-3 nesparena guanozina na 5' kraju čime se obezbeđuju obeležavanje probe ugrađivanjem [α -³²P] dCTP-a na komplementarnom lancu u reakciji sa Klenow-ovim fragmentom. Reakcija obeležavanja je sadržala: 100 ng oligonukleotida, 1µl [α -³²P] dCTP, 2 µl 10 x Klenow reaction Buffer (USB), 1 µl Klenow fragmenta DNK polimeraze (USB) i ddH₂O do 20 µl. Nakon inkubacije u trajanju od 60 min na 37°C i dodavanje 30 µl ddH₂O, reakcije su propuštane kroz G-50 kolonu (Amersham Pharmacia Biotech).

EMSA reakcije su rađene sa 5 µg jedarnih proteina iz HeLa ćelija i 1 ng obeležene probe, u reakcionom puferu koji sadrži 10 mM HEPES pH 7.9, 15 mM KCl, 0.25 mM ZnSO₄, 0.25 mM EDTA, 3% glicerol, 0.25 mM DTT i 50 ng/µl poly (dI-dC) u zapremini od 20 µl, 30 min na 37°C. Za kompeticiju su korišćeni neobeležene oligonukleotidne probe u molarnom višku od 100 x. U esejima smanjene elektroforetske pokretljivosti u prisustvu antitela (superšift) proteini su, pre dodavanja obeležene probe inkubirani sa antitelima na SOX18 20 min na sobnoj temperaturi ili 30 min na 37°C u reakcijama sa anti-GLI1 antitelom

Reakcije su elektroforetski razdvojene u 5% nativnom poliakrilamidnom gelu sa 0.5 x TBE puferom (Tris-borat-EDTA, 45mM Tris-borat, 1mM Na₂ EDTA).

3.2.15. Imunološka detekcija proteina (eng. Western blot)

Uzorci ukupnih ćelijskih proteina su razdvajani 10% SDS-PAGE i transferom prebačeni na PVDF membranu. Posle blokade u 5% nemasnom mleku preko noći na +4°C, membrane su inkubirane sa primarnim antitelima na SOX18 i α -tubulin 1h na sobnoj temperaturi. Membrane su zatim inkubirane sa odgovarajućim HRP-konjugovanim sekundarnim antitelima 1h na sobnoj temperaturi. Imunoblotovi su vizualizovani ECL sistemom za detekciju (Millipore).

3.2.16. Imunofluorescentna citohemijska analiza

Ova metoda omogućava detekciju ekspresije, ali i lokalizaciju proteina unutar adherentnih ćelija. Imunofluorescentni esej je zasnovan na vezivanju specifičnih primarnih antitela za membranske, citosolne i nuklearne proteine, koja se vizuelizuje korišćenjem sekundarnih i/ili tercijernih antitela konjugovanih fluorohromama.

24h časa nakon tranzijentne kotransfekcije GFP ekspresionim vektorom i ekspresionim vektorima za GLI transkripcione faktore pokrovna stakalca na kojima su rasle ćelije su isprana 1x PBS-om i fiksirane 4% paraformaldehidom (PFA) u trajanju od 20 min na sobnoj temperaturi. Nakon toga je usledila je permeabilizacija hladnim metanolom 10 min, a posle toga blokada nespecifičnog vezivanja 30 min sa 0.1% tritonom i 5% goveđem serum albuminu (BSA) u 1xPBS-u na sobnoj temperaturi. Inkubacija sa primarnim antitelima, rastvorenim u 0.1% triton, 1% BSA u 1xPBS-u, razblaženje 1: 100, vršena je 1 sat na sobnoj temperaturi. Pokrovna stakalca su zatim oprana tri puta po 10 min u 0.1% triton u 1xPBS-u i inkubirana sa biotinizovanim kozjim anti zečjim IgG antitelima 1h na sobnoj temperaturi u 1% BSA, 0.1% triton u 1xPBS-u (razblaženje 1:500). Nakon toga ljuspice su inkubirane sa streptavidin konjugovanom Cy3 bojom (Jackson ImmunoResearch, 1: 500) u 1x PBS-u, 1h na sobnoj temperaturi. Nakon isteka ovog vremena, ćelije su oprane tri puta po 10 min u 1

x PBS puferom, i ćelije su bojene 0.1 mg/ml diaminofenilindolom (DAPI, Sigma). Uzorci su analizirani korišćenjem Leica TCS SP8 konfokalnog mikroskopa i Leica Microsystems LAS AF-TCS SP8 (Leica Microsystems).

3.2.17. Tretmani ćelija

U cilju modulacije *Hedgehog* (HH) signalnog puta ćelije su tretirane 10 μ M ciklopaminom ili 10 μ M purmorfaminom. U eksperimentima inhibicije HH signalnog puta ciklopaminom kontrolne ćelije su tretirane tomatidinom (strukturnim analogom ciklopamina koji ne ispoljava inhibitorni efekat na HH signalni put). U eksperimentima aktivacije istog signalnog puta purmorfaminom kontrolnu grupu su činile ćelije tretirane DMSO-om, koji je korišćen kao rastvarač purmorfamina.

3.2.18. MTT test vijabilnosti

MTT test je kvantitativna kolorimetrijska metoda i koristi se za merenje vijabilnosti i proliferativnog kapaciteta ćelija. Ova metoda se zasniva na sposobnosti enzima mitohondrija dehidrogenaze da redukuje žuti 3-[4, 5-dimetiltiazol-2-il]-2, 5-difenitetrazolijum bromid (MTT) u ljubičasti formazin. Pomenuta reakcija se odvija samo u živim ćelijama, u kojima su dehidrogenaze aktivne pa je količina dobijenog formazina proporcijalna broju vijabilnih ćelija. Za ovaj esej sađeno je 2×10^3 HeLa ćelija u svaki bunarić mikroplate ploče sa 96 bunarića. Nakon zasejavanja ćelije su gajene u medijumu za gajenje HeLa ćelija u prisustvu ilil odsustvu komercijalni agrnasa, modulatora SHH signalnog puta. Nakon završetka tretmana medijum je zamenje rastvorom MTT boje u svežem medijumu u finalnoj koncentraciji od 0.5 mg/ml. Ćelije su inkubirane 1h na 37°C. Rastvor je posle inkubacije zamenjen DMSO-om koji je omogućio liziranje ćelija usled čega je dolazi do lize ćelija i oslobađanja formazina. Apsorbanca ovako dobijenog rastvora izmerena je na Microplate reader aparatu tipa Multiscan RC (Labsystem) na talasnoj dužini od 490nm.

3.2.19. “Wound scratch” esej

“Wound scratch” test se koristi za određivanje migracione sposobnosti ćelija *in vitro*. Pomoću ovog testa praćen je efekat migracije HeLa ćelije tretirane modulatorima SHH signalnog puta, ali i HeLa ćelije tranzijentno transfektovane kontrolnim vektorom i vektorima koji eksprimiraju nativnu i skraćenu formu SOX18 proteina. Nakon 24 h, nastavkom je napravljena pukotina koju su ćelije određenim tempom popunjavale. Formirane pukotine su fotografisane u početnom trenutku, nakon 5 i 24h i analizirano je da li i kojom brzinom popunjavaju nastali prazan prostor.

3.2.20. Izolacija RNK

RNK je izolovana iz konfluentnih HeLa ćelija direktnim nakapavanjem 300 μ l TRIzol reagensa (Sigma) u 35mm Petri šolje, prema uputstvu proizvođača. TRIzol reagens je rastvor fenola i guanin-izotiocijanata koji efikasno izoluje totalnu RNK iz ćelija i tkiva. Nakon dodavanja TRIzol-a pri čemu dolazi do lize ćelija, lizati su pokupljeni i prebačeni u ependorficu. Zatim je dodato 60 μ l hloroforma u ependorficu u kojoj se nalaze lizati, dobro promućkano i inkubirano 10 min na sobnoj temperaturi, a nakon toga je usledilo centrifugiranje 15 min na +4°C/12000 g. Posle centrifugiranja, u ependorfici se izdvojila vodena faza u kojoj se nalazi RNK od organske faze. Nakon odvajanja vodene faze RNK se precipitira izopropanolom (150 μ l izopropanola na 300 μ l TRIzol-a), a zatim se centrifugira 10 min na +4°C/12000 g. Dobijen talog RNK se pere 75% etanolom, kratko suši na sobnoj temperaturi i rastvara u 30-60 μ l DEPC tretiranoj bidestilovanoj vodi i inkubira 10 min na 55 °C kako bi se sva RNK dobro rastvorila. Ukupne RNK se do upotrebe čuva na -80°C. Ovako izolovana RNK se koristi za potrebe RT-PCR i qRT-PCR metoda. Koncentracija totalne RNK je izmerena pomoću NanoDrop spektrofotometra (Thermo Scientific).

3.2.21. Oslobađanje totalne RNK od ostataka genomske DNK

Nakon izolovanja RNK urađen je tretman DNKazom (eng. Deoxyribonuclease) upotrebom DNA-free Kit-a po uputstvima proizvođača. Ovaj tretman omogućuje

prečišćavanje totalne RNK uklanjajući zaostalu količinu DNK iz izolata. DNKazaI svojom endonukleaznom aktivnošću hidrolizuje fosfodiesterne veze dvolančane i jednolančane DNK. DNKazaI i divalentni katjoni (magnezijum i kalcijum- katalizuju degradaciju RNK) se uklanjaju pomoću DNKazaI inaktivirajućeg reagensa. 5µl totalne RNK je tretirano 1U DNKaze I u prisustvu 1 x DNKaza I pufera (10mM Tris-HCl pH7.5, 2.5 mM MgCl₂, 0.5 mM CaCl₂) u zapremini od 25 µl, prema uputstvu proizvođača, 30 min na 37°C. Po završenoj inkubaciji u smešu je dodat resuspendovani DNKaza inaktivirajući reagens. Nakon inkubacije u trajanju od 2 min usledilo je centrifugiranje na 10000g 1.5 min. Supernatant koji je sadržao RNK oslobođenu od genomske DNK je prebačen u novu tubu.

3.2.22. Sinteza komplementarne DNK (cDNK)

Sinteza cDNK vrši se procesom reverzne transkripcije u prisustvu MuLV reverzne transkriptaze (Applied Biosystems) u kome se kao matrica koristi jednolančana RNK. U prisustvu 2.5 µl prajmera (Random hexamers, Applied Biosystems), 2.5 U MuLV reverzne transkriptaze, 10 U Rnaznog inhibitora, 4mM dNTPmix-a, 1 x pufera i 5 mM MgCl₂, 1µg RNK se prevodi u cDNK, inkubacijom 10 min na sobnoj temperaturi a zatim u PCR aparatu, 15 min na 42°C, 5 min 99°C i 5 min na 5°C.

3.2.23. RT-PCR

Dobijena cDNK korišćena je kao matrica u semi-kvantitativnoj RT-PCR reakciji za umnožavanje željenih sekvenci, uporedo sa kontrolnom GAPDH. U reakcijama je korišćen KAPA 2G Fast Hot Start Ready Mix (2 x) (Biosistem).

Program PCR reakcije bio je:

1. Početna denaturacija - 95°C, 2 min

2. Denaturacija - 95°C, 15sec
3. Sparivanje prajmera - 60°C, 15 sec (broj ciklusa je 35, osim za GAPDH, 25)
4. Polimerizacija - 72°C, 30 sec
5. Završna sinteza - 72°C, 2 min

3.2.24. Kvantitativni RT-PCR (qRT-PCR)

Kvantitativni RT-PCR je tehnika koja omogućava amplifikaciju i istovremenu kvantifikaciju specifičnog DNK molekula. Reakcije qRT-PCR su rađene Power SYBR Green PCR master mix-om u ukupnoj zapremini od 20 µl u aparatu 7500 Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems). SYBR Green boja se vezuje za dvolančanu DNK i nakon ekscitacije emituje fluorescentni signal određene talasne dužine. Preciznije, kako se PCR produkti amplifikuju i nagomilavaju, intenzitet fluorescentnog signala se proporcionalno povećava. cDNK iz Hela ćelija tretiranih komercijalnim agensima za modulaciju SHH signalnog puta, ali i iz ćelija transfektovanim plazmidnim konstruktima koji eksprimiraju nativnu i skraćenu formu SOX18 proteina su poslužile kao matrica u ovim reakcijama. Svaka reakcija je rađena u triplikatu i uzimana je u obzir srednja vrednost za svaki uzorak. Relativni nivo ekspresije analiziranih gena 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 ispitivanih gena (*SOX18* gena, gena koji eksprimiraju komponente SHH signalnog puta) je predstavljena kao procenat u odnosu na ekspresiju u lažno transfektovanim ćelijama ili u kontrolnom tretmanu, kojima je dodeljena vrednost 100%.

3.2.25. Kvantifikacija luminiscentnih signala luciferaza primenom “Dual-Luciferase Reporter Assay” sistemom

“Dual-Luciferase Reporter Assay” sistem omogućava istovremeno merenje ekspresije dva nezavisna reporterska gena, aktivnosti luciferaze svica i “Renilla” luciferaze uzastopno unutar istog uzorka. Najpre se meri aktivnost luciferaze svica dodavanjem reagensa označenog kao LAR II (eng. Luciferase Assay Reagent II). Nakon kvantifikacije luminiscencije luciferaze svica meri se aktivnost “Renilla” luciferaze dodavanjem reagensa “Stop&Glo” koji dovodi do gašenja signala luciferaze svica i aktiviranja “Renilla” luciferaze.

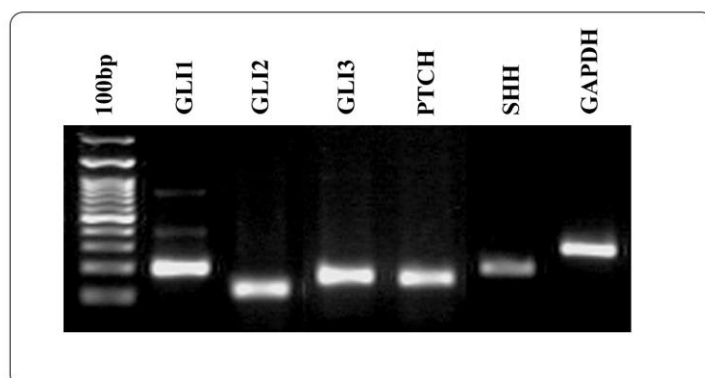
HeLa ćelije su ko- transfektovane sa pCISOX18*wt* i pCISOX18DN konstruktima zajedno sa 3xSXLuc reporterskim konstruktom (ref). Nakon transfekcije ćelije su isprane 1 x PBS puferom i lizirane dodavanjem tzv. pasivnog pufera za lizu (eng. Passive Lysis Buffer). Zatim su lizirane ćelije inkubirane 30 min na ledu i centrifugirane 30 sec u mikrofugi na 13000 obrtaja. 10 µl lizata je prebačeno u novu tubu i usledilo je merenje luminiscentnih signala.

4. REZULTATI

4.1. HeLa ćelije kao model sistem za ispitivanje uloge SHH puta u regulaciji ekspresije *SOX18* gena

Kao *in vitro* model sistem za proučavanje uloge SHH signalnog puta u regulaciji ekspresije *SOX18* gena izabrana je HeLa ćelijska linija. HeLa ćelijska linija vodi poreklo od humanog adenokarcinoma grlića materice. Ova permanentna ćelijska linija je u Laboratoriji za humanu molekularnu genetiku korišćena za ispitivanje transkripcione regulacije *SOX18* gena, kada su otkriveni pozitivni i negativni regulatori promotorske aktivnosti i endogene ekspresije ovog gena (Petrovic et al., 2009; Petrovic et al., 2010a). Noviji literaturni podaci pokazuju da se određene komponente SHH signalnog puta pojačano ekspimiraju u karcinomu grlića materice u poređenju sa normalnim tkivom (Xuan et al., 2006). Takođe, predhodno je pokazano da je SHH signalni put aktivan i u permanentnim ćelijskim linijama koje vode poreklo od karcinoma grlića materice (Samarzija and Beard, 2012)

Prvi korak u ispitivanju uticaja SHH signalnog puta u regulaciji humanog *SOX18* gena bio je analiza nivoa ekspresije određenih komponenti SHH signalnog puta u HeLa ćelijskoj liniji. Kada se analizira aktivnost Hedgehog signalnog puta, proverava se nivo ekspresije različitih komponenti ove signalne kaskade. Često se analiza zasniva na proveru ekspresije finalnih efektoru ove signalne kaskade, GLI transkripcionih faktora. Kako ekspresija GLI transkripcionih faktora nije isključivo zavisna od nivoa aktivnosti Hedgehog signalnog puta, poželjno je u analizu uključiti nivo ekspresije jednog od dva receptora, PTCH i SMO, a ukoliko se sumnja na autokrinu regulaciju, proverava se i nivo ekspresije Hedgehog liganada. Kao što je prikazano na Slici 2. u HeLa ćelijama su ekspimirane sledeće analizirane komponente SHH signalnog puta: SHH ligand, PTCH, GLI1, GLI2 i GLI3.



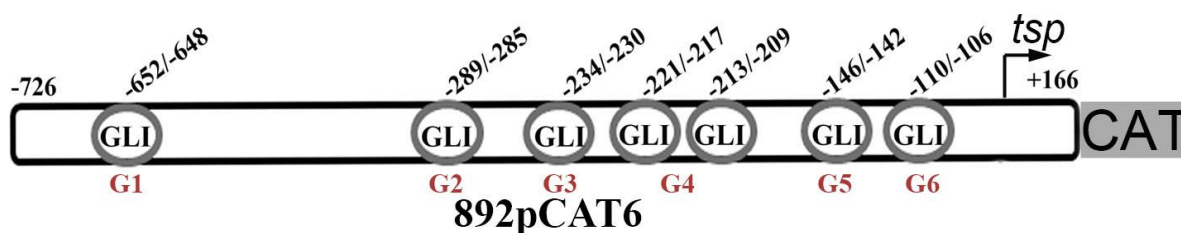
Slika 2. Ekspresija komponenti SHH signalnog puta u HeLa ćelijskoj liniji. 100bp DNK marker. Komponente SHH signalnog puta čija je ekspresija identifikovana su označene iznad slike.

Na osnovu ovog rezultata potvrđena je ekspresija komponenti SHH signalnog puta u HeLa ćelijama, na osnovu čega se može zaključiti da je SHH signalni put autonomno aktivan u ovom model sistemu. Time su se stekli uslovi da se ova ćelijska linija dalje koristi za ispitivanje međusobnih funkcionalnih odnosa pomenutog signalnog puta i ekspresije *SOX18* gena.

4.2. Bioinformatička (*in silico*) analiza promotorskog regiona *SOX18* gena

Cilj istraživanja u ovom radu je utvrđivanje uloge SHH signalnog puta u regulaciji ekspresije humanog *SOX18* gena. Kako su GLI transkripcioni faktori efektori SHH signalnog puta koji se vezuju u okviru promotora ciljnih gena i regulišu njihovu transkripciju, prvi korak bila je bioinformatička analiza promotorskog regiona humanog *SOX18* gena koja je obuhvatala utvrđivanje potencijalnih mesta vezivanja za GLI transkripcione faktore. Familija GLI transkripcionih faktora, GLI1, GLI2 i GLI3, vezuje

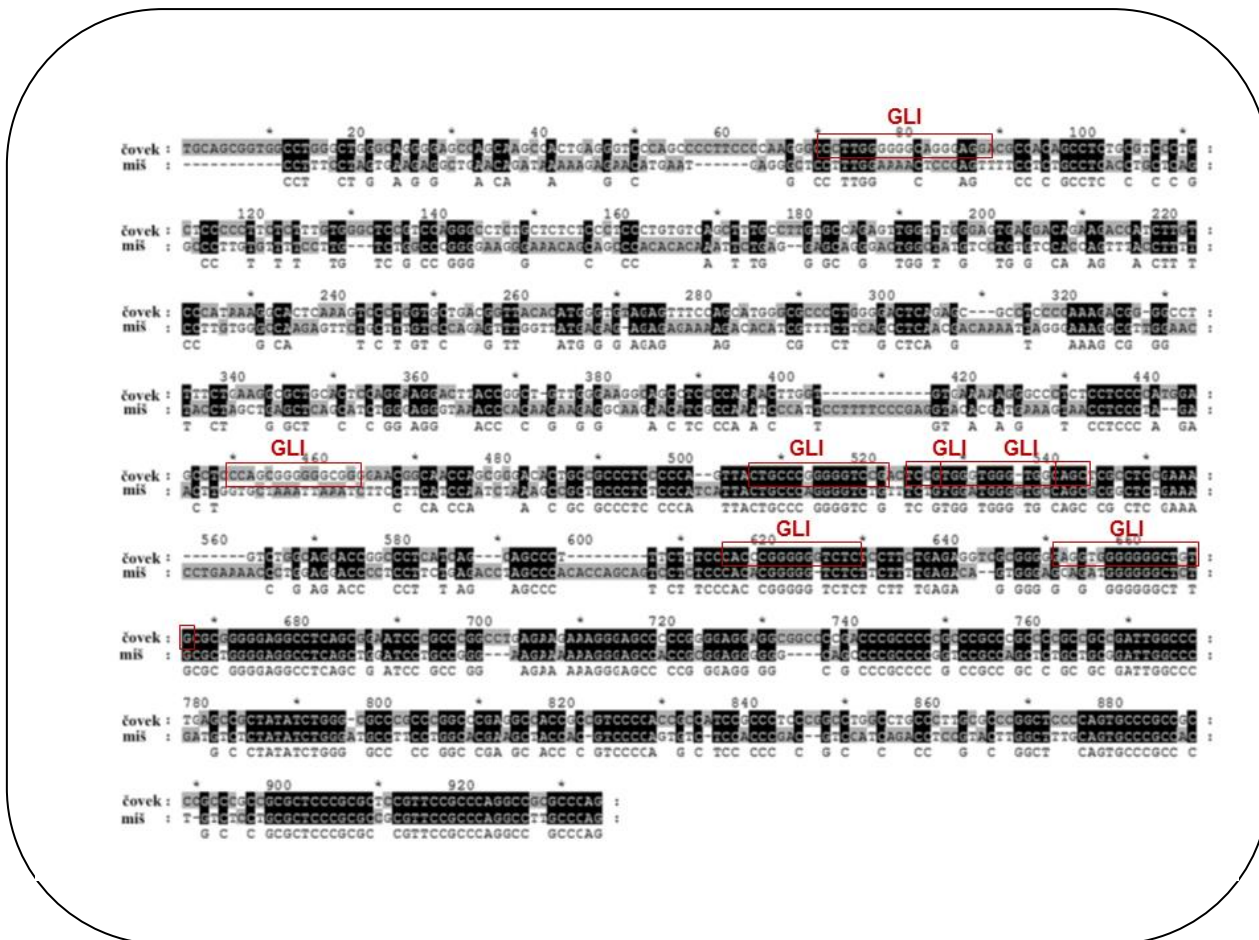
se sa velikim afinitetom za konsenzusnu sekvencu 5'- GACCACCCA -3'. Analiziran je promotorski region od -726 do +166 u odnosu na start transkripcije, koji je okarakterisan kao optimalni *SOX18* promotor. U tu svrhu korišćen je MatInspector kompjuterski program, pomoću koga je analizirano prisustvo potencijalnih vezivnih mesta za transkripcione faktore, pri čemu je zadat uslov da verovatnoća vezivanja transkripcionog faktora za jezgro vezivnog mesta bude 1.0. Rezultati dobijeni MatInspector analizom (Slika 3.) pokazali su da se u okviru optimalnog promotora *SOX18* gena nalazi sedam potencijalnih vezivnih mesta za GLI transkripcione faktore.



Slika 3. Shematski prikaz optimalnog *SOX18* promotora (892pCAT6) sa ucrtanim potencijalnim vezivnim mestima za GLI transkripcione faktore (označeno krugovima). Pozicije potencijalnih vezivnih mesta, kao i pozicije optimalnog *SOX18* promotora, u odnosu na start transkripcije (*tsp*) označene su iznad sheme, dok su ispod crvenom bojom označene relativne pozicije DNK probe koje su korišćene u EMSA eseju. CAT – reporterski gen hloramfenikol-acetil-transferaza u okviru promotorskog konstrukta.

Potom je izvršeno poređenje humane sekvence optimalnog promotora *SOX18* gena sa ortologom sekvencom kod miša. Upotrebom Clustal W kompjuterskog programa poređena je genomska sekvenca na poziciji 1417497-1418397 humane sekvence (NT_011333.5), koja odgovara optimalnom promotorskom regionu *SOX18* gena, sa odgovarajućom ortologom sekvencom kod miša. Ova analiza je pokazala da homologija nukleotidnih sekvenci promotora *SOX18* gena čoveka i miša nije visoka i iznosi 35% (Kovacevic-Grujicic et al., 2007). Takođe, analiza nije ukazala na značajnu očuvanost u broju, sekvenci i poziciji potencijalnih vezivnih mesta za GLI transkripcione faktore kod čoveka i miša (Slika 4). Evolutivna očuvanost vezivnih mesta govori o mogućnosti da ona mogu imati značajnu regulatornu ulogu. Sa druge

strane, izostanak evolutivne očuvanosti nije dovoljan dokaz o izostanku funkcionalnog značaja i iziskuje da se svako pojedinačno potencijalno vezivno mesto ponaosob analizira da bi se eksperimentalno potvrdila mogućnost vezivanja transkripcionih faktora. Zbog toga su u daljem radu analizirana sva potencijalna vezivna mesta.

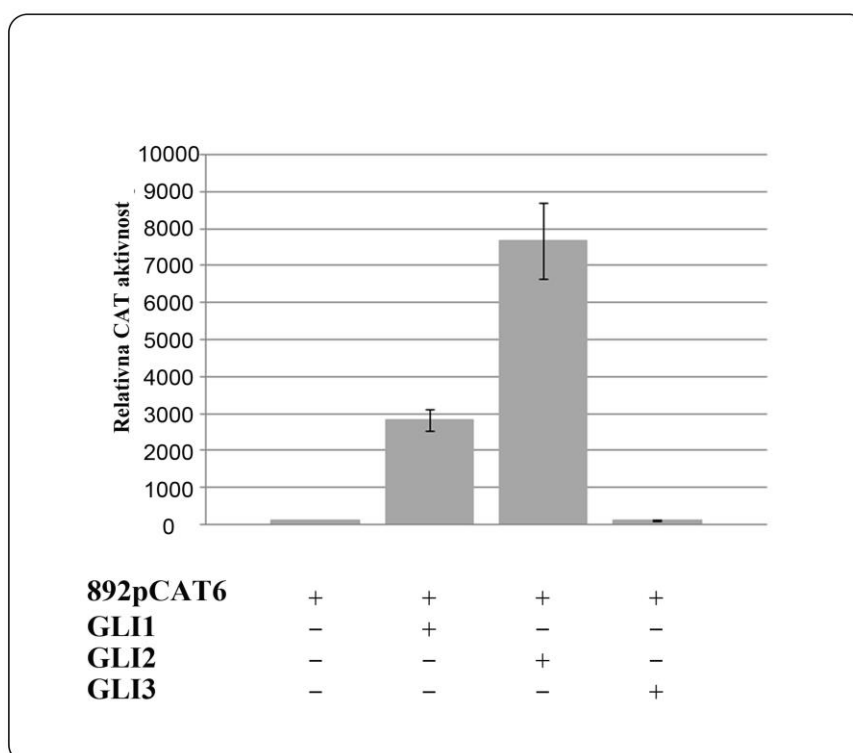


Slika 4. Nukleotidna sekvenca optimalnog promotorskog regiona humanog *SOX18* gena i poređenje sa ortologom sekvencom miša. Pozicije GLI vezivnih mesta kod čoveka označene su crvenim pravougaonicima i naznačene iznad sekvence.

4.3. Analiza uloge povećane ekspresije GLI 1-3 transkripcionih faktora na aktivnost optimalnog promotora *SOX18* gena u HeLa ćelijama

Uzimajući u obzir rezultate bioinformatičke analize, a u cilju funkcionalne analize uloge GLI transkripcionih faktora u regulaciji transkripcije *SOX18* gena, prvi korak je bila analiza uticaja pojačane ekspresije GLI1, GLI2 i GLI3 transkripcionih faktora na aktivnost promotora *SOX18* gena. U tu svrhu korišćeni su ekspresioni vektori za GLI1, GLI2 i GLI3 transkripcione faktore: pcDNA4NLSMTGLI1, p4TO6MTGLI2 i

pcDNA4/TO/GLI3richtig. Analiziran je efekat povećane ekspresije GLI transkripcionih faktora na aktivnost 892pCAT6 *SOX18* promotorskog konstrukta koji je ranije definisan kao optimalni promotor *SOX18* gena (Petrovic and Stevanovic, 2007). Na Slici 3 prikazan je optimalni promotorski konstrukt sa relativnim položajem potencijalnih GLI vezivnih mesta. Efekat povećane ekspresije GLI 1, GLI2 i GLI 3 proteina na aktivnost 892pCAT6 je praćen CAT imuno-esejem.



Slika 5. Efekat pojačane ekspresije GLI1, GLI2 i GLI3 na aktivnost *SOX18* promotora. Normalizovane CAT vrednosti su predstavljene kao procenat aktivnosti 892pCAT6 promotor-reporterskog konstrukta kome je dodeljena vrednost 100%. Vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost \pm SD (standard deviation) iz najmanje tri nezavisna eksperimenta.

Tranzijentno povećanje ekspresije GLI1 transkripcionog faktora u HeLa ćelijama dovelo je do povećanja aktivnosti optimalnog *SOX18* promotora (892pCAT6) od približno 30 puta, kao što je predstavljeno na Slici 5. Takođe, pojačana ekspresija GLI2 transkripcionog faktora dovodi do povećanja aktivnosti *SOX18* promotorskog konstrukta približno 80 puta. Sa druge strane, povećana ekspresija GLI3 transkripcionog faktora nije uticala na aktivnost optimalnog konstrukta, tj. odgovor konstrukta je izostao.

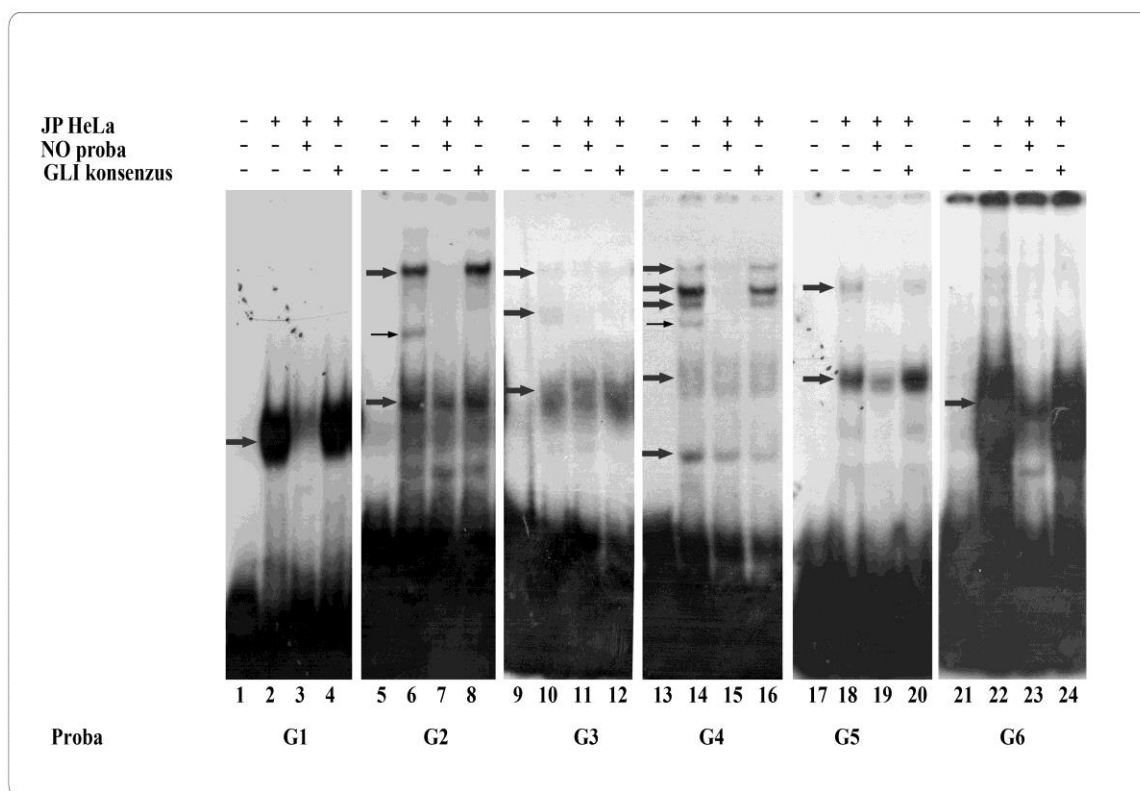
Na osnovu prikazanih rezultata može se zaključiti da su GLI1 i GLI2 transkripcioni faktori snažni aktivatori promotorske aktivnosti *SOX18* gena. Suprotno njima, GLI3 transkripcioni faktor nije doveo do promene *SOX18* promotorske aktivnosti.

4.4. *In vitro* vezivanje GLI transkripcionih faktora za potencijalna vezivna mesta u okviru optimalnog promotora *SOX18* gena

Kako je prikazano na Slici 3, sedam potencijalnih vezivnih mesta za GLI transkripcione faktore nalazi se u okviru optimalnog promotora *SOX18* gena. Imajući u vidu da nijedno potencijalno GLI vezivno mesto prepoznato u okviru *SOX18* promotora nije evolutivno očuvano kod čoveka i miša, odlučeno je da se u esejima smanjene elektroforetske pokretljivosti (EMSA) analiziraju sva potencijalna vezivna mesta, kao što je ranije obrazloženo. S obzirom da su potencijalna GLI vezivna mesta na pozicijama -221 do -217 i -213 do -209 međusobno blisko pozicionirana, za potrebe eksperimenata *in vitro* vezivanja generisana je jedna dvolančana *SOX18* oligonukleotidna proba koja je obuhvatala oba potencijalna GLI vezivna mesta (G4). Za sva ostala GLI potencijalna vezivna mesta generisane su pojedinačne *SOX18* dvolančane oligonukleotidne probe (G1, G2, G3, G5 i G6) kao što je i prikazano na Slici 3.

U EMSA esejima, jedarni proteini izolovani iz HeLa ćelija su se specifično vezali za svih šest *SOX18* oligonukleotidnih proba formirajući protein-DNK komplekse (Slika

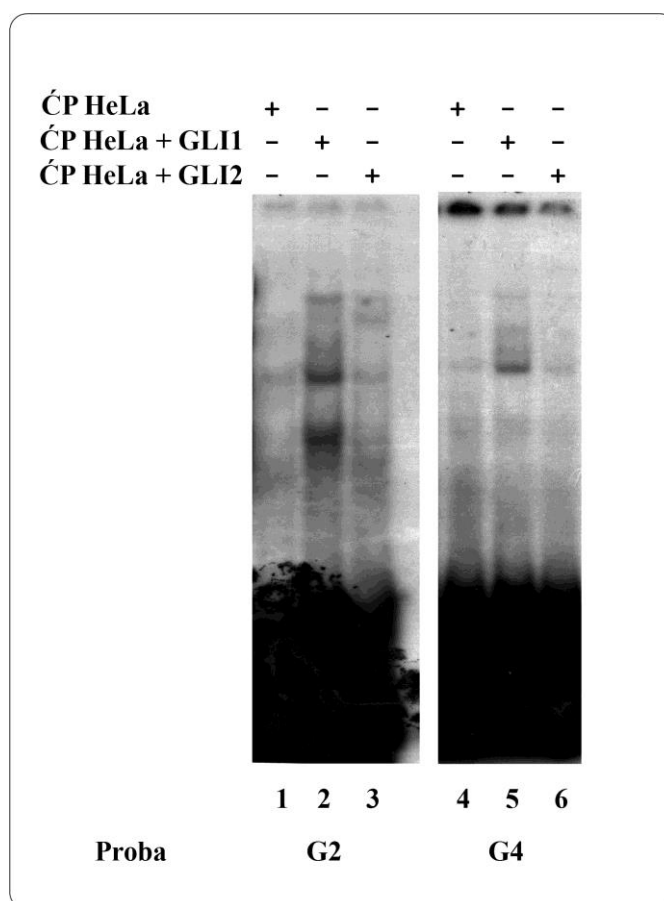
6, linije 2, 6, 10, 14, 18, 22). Specifičnost formiranih kompleksa proverena je u reakcijama kompeticije sa 100 puta molarnim viškom neobebeženih (hladnih) proba. U svim reakcijama došlo je do kompeticije u vezivanju obebeženih i neobebeženih proba što je dovelo do smanjenja formiranja kompleksa, tzv. "efekta hlađenja" svih formiranih protein-DNK kompleksa. Na ovaj način je potvrđeno da su nastali kompleksi posledica specifičnog vezivanja jedarnih proteina za ponuđene oligonukleotidne probe (Slika 6, linije 3, 7, 11, 15, 19, 23). Da bi ispitali da li se u okviru formiranih protein-DNK kompleksa nalaze GLI transkripcioni faktori, urađene su reakcije kompeticije vezivanja jedarnih proteina sa 100 puta molarnim viškom neobebeženog specifičnog kompetitora. Kao specifični kompetitor, upotrebljena je oligonukleotidna proba koja sadrži GLI vezivno mesto (GLI konsenzus). Kao što je na Slici 6 predstavljeno, kompeticija sa GLI konsensusnom probom nije dovela do gubitka protein-DNK kompleksa koji su formirani sa probama G1, G3, G5, G6 (Slika 6, linije 4, 12, 20, 24). U reakcijama sa probama G2 i G4, hlađenje GLI konsenzus probom dovelo je do smanjenja intenziteta formiranih kompleksa, označenih strelicama na Slici 6 (linije 8 i 16). Na osnovu ovih rezultata, zaključeno je da u formiranju protein-DNK kompleksa sa probama G1, G3, G5 i G6 ne učestvuju GLI transkripcioni faktori. Sa druge strane, rezultati su ukazali na mogućnost da u protein-DNK kompleksima formiranim sa probama G2 i G4 učestvuju GLI transkripcioni faktori.



Slika 6. EMSA reakcija sa odgovarajućim *SOX18* oligonukleotidnim probama (G1-G6) i jedarnim proteinima izolovanih iz HeLa (JP HeLa) ćelija. Protein-DNK kompleksi koji se formiraju u reakciji G1-G6 proba i JP HeLa označeni su debljim strelicama, dok su specifični protein-DNK kompleksi koji se hlade 100 x molarnim viškom GLI konsenzusom označeni tanjim strelicama. Kompeticija vezivanja za svaku DNK probu je urađena sa odgovarajućim neobeležnim oligonukleotidnim *SOX18* DNK probama u 100 x molarnom višku, što je predstavljeno linijama 3, 7, 11, 15, 19, 23. Kompeticija sa 100 x molarnim viškom neobeležene oligonukleotidne probe koja nosi konsenzusno vezivno mesto za GLI transkripcione faktore (GLI konsenzus) predstavljeno je linijama 4, 8, 12, 16, 20, 24.

S obzirom da je u funkcionalnim esejima pokazano da su GLI1 i GLI2 transkripcioni faktori aktivatori promotorske aktivnosti *SOX18* gena, a GLI3 ne dovodi do promene *SOX18* promotorske aktivnosti, u dalju analizu uključeni su GLI1 i GLI2 transkripcioni faktori, dok uticaj GLI3 na *in vitro* vezivanje nije bio predmet dalje analize. Da bi se ispitala ova mogućnost, u EMSA reakcijama su korišćeni ukupni

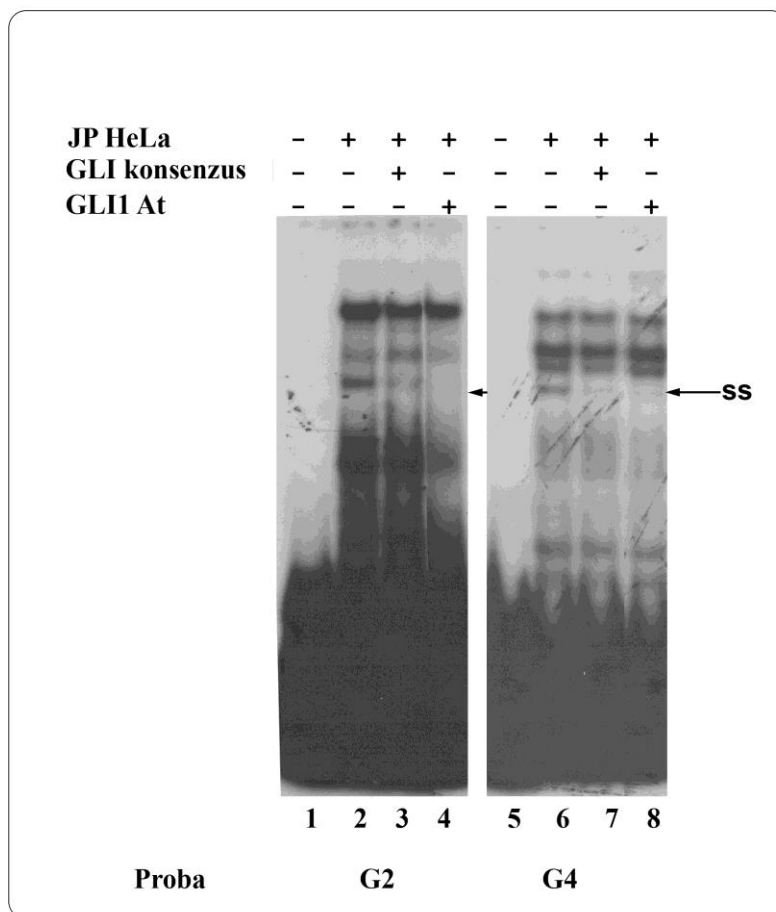
ćelijski proteini izolovani iz HeLa ćelija koje su tranzijentno transfektovane ekspresionim vektorima za GLI1 i GLI2. U reakcijama u kojima su korišćeni ukupni ćelijski proteini koji su “obogaćeni“ GLI1 proteinom, vezivanje ovih proteina za obe probe dovelo je do povećanja intenziteta formiranih protein-DNK kompleksa (Slika 7, linije 2 i 5). Sa druge strane, u reakciji ukupnih ćelijskih proteina obogaćenih GLI2 proteinom sa probom G2, formirani protein-DNK kompleksi su bili intenzivniji u poređenju sa ukupnim ćelijskim proteinima iz HeLa ćelija, ali svakako manjeg intenziteta od kompleksa koji je nastao u reakciji sa proteinima obogaćenim GLI1 transkripcionim faktorom (Slika 7., linije 1, 2 i 3).



Slika 7. EMSA reakcija sa SOX18 oligonukleotidnim probama G2 i G4 i ćelijskim proteinima iz HeLa ćelija (ĆP HeLa) i HeLa transfektovanih GLI1 (ĆP HeLa + GLI1) i GLI2 (ĆP HeLa + GLI2) ekspresionim vektorima.

U reakciji vezivanja sa oligonukleotidnom G4 proba, kompleksi formirani sa proteinima izolovanim iz ćelija u kojima je tranzijentno povećana ekspresija GLI2 su bili znatno manjeg intenziteta od onih formiranim sa GLI1 obogaćenim proteinima i nisu se razlikovali po intenzitetu od kompleksa formiranih sa ukupnim ćelijskim proteinima izolovanih iz HeLa (Slika 7, linije 4, 5 i 6). Dobijeni rezultati su ukazali na mogućnost da GLI1 transkripcioni faktor učestvuje u formiranju protein-DNK kompleksa sa G2 i G4 probama.

U cilju dodatne potvrde da u formiranju kompleksa sa oligonukleotidnim probama G2 i G4 učestvuje GLI1 transkripcioni faktor, upotrebljena su specifična GLI1 antitela u "supershift" reakcijama. U EMSA reakcijama sa obe probe došlo je do inhibicije formiranja protein-DNK kompleksa, čime je potvrđeno da u njihovom formiranju učestvuje GLI1 transkripcioni faktor (Slika 8, linije 4 i 8). Premda upotreba specifičnih antitela najčešće dovodi do formiranja novog kompleksa, smanjene elektroforetske pokretljivosti, tzv. "supershift" kompleksa, u literaturi postoje slučajevi kada upotreba specifičnih antitela dovodi do inhibicije formiranja kompleksa (Petrovic et al., 2009; Petrovic et al., 2010a). U ovakvim slučajevima antitelo specifično prepoznaje i vezuje DNK-vezujući domen transkripcionog faktora usled čega je sprečeno njegovo vezivanje za DNK, pa tako izostaje formiranje protein-DNK kompleksa.



Slika 8. EMSA reakcija sa *SOX18* oligonukleotidnim probama G2 i G4 izolavanih iz HeLa ćelija (JP HeLa), hlađenje sa specifičnim kompetitorom (GLI konsenzus) i “supershift“ sa anti GLI1 antitelima (GLI1At) označen strelicama-ss (linije 4 i 8).

Ovim rezultatima je potvrđeno da GLI1 transkripcioni faktor učestvuje u formiranju protein-DNK kompleksa sa G2 i G4 dvolančanim oligonukleotidnim probama u *in vitro* uslovima.

4.5. Analiza efekta pojačane ekspresije GLI transkripcionih faktora na endogenu ekspresiju *SOX18* gena

U predhodnih rezultatima je pokazano da GLI1 i GLI2 regulatorni protein utiču na aktivnost optimalnog promotora *SOX18* gena. Sledeći korak u analizi efekta SHH signalnog puta u regulaciji humanog *SOX18* gena predstavljao je analizu uticaja pojačane ekspresije GLI transkripcionih faktora na endogenu ekspresiju *SOX18* gena.

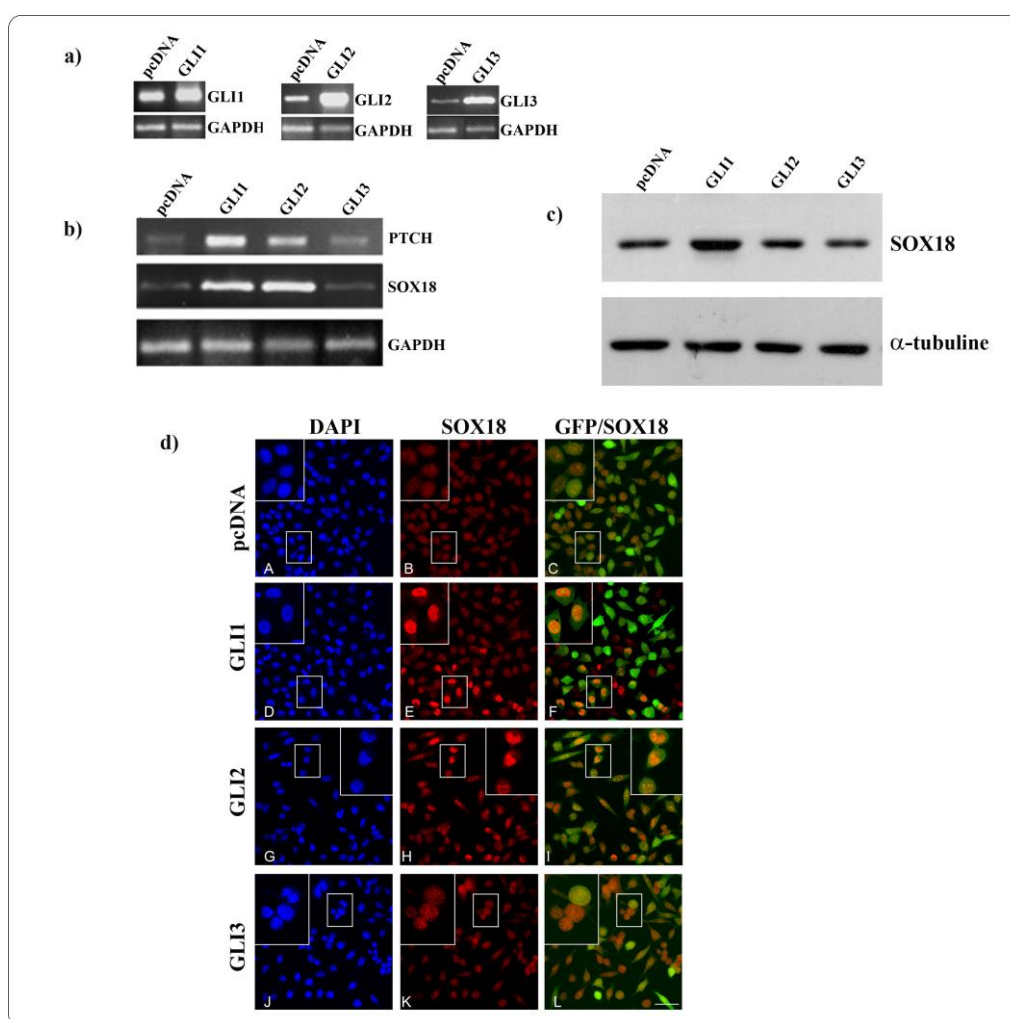
Kako bi se ispitaio efekat povećane ekspresije GLI1, GLI2 i GLI3 transkripcionih faktora na nivo endogene ekspresije *SOX18* gena, HeLa ćelije su tranzijentno transfektovane ekspresionim vektorima za GLI transkripcione faktore. Nakon transfekcije bilo je neophodno utvrditi da li su GLI transkripcioni faktori uspešno ekspimirani u HeLa ćelijama. Analiza ekspresija GLI transkripcionih faktora, praćena na RNK nivou, RT-PCR metodom, pokazala je da u ćelijama transfektovanim ekspresionim konstruktima za GLI regulatorne protein povećan nivo ekspresije gena za GLI1, GLI2 i GLI3 u odnosu na ćelije transfektovane praznim vektorom (Slika 9a). Nakon što je potvrđena uspešnost tranzijentne transfekcije u HeLa ćelijama, analizirana je ekspresija *PTCH*, poznatog, direktnog ciljnog gena SHH signalnog puta. Analizom rezultata uočeno je da ekspresija *PTCH* najveća u ćelijama u kojima je povećana ekspresija gena *GLI1*, nešto manji u ćelijama koje su transfektovane *GLI2* ekspresionim konstruktom, dok je najniži nivo ekspresije uočeno u ćelijama sa povećanom ekspresijom gena *GLI3*, kao što je prikazano na Slici 9b.

Uticaj na endogenu ekspresiju *SOX18* gena praćen je na RNK i proteinskom nivou. Kao što je prikazano na Slici 9b, povećana ekspresija GLI1 i GLI2 transkripcionih faktora dovodi do povećanja transkripcije *SOX18* gena, dok povećana ekspresija GLI3 ne menja nivo transkripcije *SOX18* u HeLa ćelijama. Potom, "Western blot" metodom pokazano je da u uslovima povećane ekspresije GLI1 i GLI2 dolazi do porasta nivoa *SOX18* proteina (Slika 9c). Povećana ekspresija GLI3 regulatornog proteina u HeLa model sistemu nije uticala na nivo *SOX18* proteina.

Konačno, imunocitohemijskom metodom je analiziran efekat povećane ekspresije GLI transkripcionih faktora na nivo *SOX18* proteina u pojedinačnim ćelijama (Slika 9d). Za ovaj eksperiment, HeLa ćelije su ko-transfektovane GFP ekspresionim

vektorom, kako bi se utvrdila efikasnost transfekcije, i odgovarajućim ekspresionim vektorima. Rezultati ovog eksperimenta su pokazali da na nivou pojedinačnih ćelija GLI1 i GLI2 dovode do povećanja nivoa SOX18 proteina, dok GLI3 ne menja nivo ovog SOX proteina u jedrima HeLa ćelija (Slika 9c).

Na osnovu dobijenih rezultata zaključeno je da povećanje ekspresije GLI1 i GLI2 transkripcionih faktora u HeLa ćelijama dovodi do povećanja endogene ekspresije humanog *SOX18* gena kako na nivou RNK tako i na proteinskom nivou.



Slika 9. Uticaj povećane ekspresije GLI transkripcionih faktora na ekspresiju *SOX18* gena u HeLa ćelijama: a) Dokaz ektopične ekspresije GLI transkripcionih faktora u HeLa ćelijama. RT-PCR analiza nakon tranzijentne transfekcije GLI ekspresionim

vektorima. GAPDH je korišćen kao kontrola unosa cDNK. Specifični produkti su naznačeni sa desne strane. b) Efekat povećane ekspresije GLI1, GLI2 i GLI3 na nivo transkripcije *SOX18* gena. RT-PCR analiza *SOX18* ekspresije nakon tranzijentne transfekcije HeLa ćelija praznim pcDNA3.1 vektorom i ekspresionim vektorima za GLI ekspresionim vektorima. Takođe RT-PCR metodom je analiziran efekat GLI transkripcionih faktora na ekspresiju *PTCH* gena. GAPDH je korišćen kao kontrola količine cDNK unete u reakciju. Specifični produkti (*SOX18* i *GAPDH*) su označeni sa desne strane. c) Efekat povećane ekspresije GLI1, GLI2 i GLI3 na nivo *SOX18* proteina. Western blot analiza ukupnih ćelijskih proteina izolovanih iz HeLa ćelija nakon transfekcija sa praznim pcDNA3.1 vektorom i ekspresionim vektorima za GLI transkripcione faktore. α -tubulin je korišćen kao kontrola količine analiziranih proteina. Sa desne strane označene su pozicije *SOX18* proteina i tubulina. d) Imunocitohemijska analiza efekata povećane ekspresije GLI transkripcionih faktora na nivo *SOX18* proteina. HeLa ćelije su ko-transfektovane GFP i pcDNA 3.1 ekspresionim vektorima (A-C), GFP i GLI1 ekspresionim vektorima (D-F), GFP i GLI2 ekspresionim vektorima (G-I) ili GFP i GLI3 ekspresionim vektorima (J-L). Jedra HeLa ćelija su obojena DAPI bojom (A, D, G I J). U svakoj slici (A-L) su određeni delovi uvećani i uokvireni.

4.6. Modulacija SHH signalnog puta ciklopaminom u HeLa ćelijama

Poslednjih godina pokazano je da promene u regulaciji SHH signalnog puta dovode do razvoja različitih vrsta tumora kod čoveka. Uzimajući u obzir ulogu SHH signalnog puta u razviću i progresiji tumora, manipulacija ovim signalnim putem potencijalno predstavlja efikasnu strategiju u terapiji različitih tipova tumora.

Prvi okarakterisan inhibitor HH signalnog puta je ciklopamin, alkaloid izolovan iz biljke *Veratrum californicum* (planinski ljiljan) (McFerren, 2006). Ciklopamin inhibira aktivnost HH signalnog puta na taj način što se direktno veže za SMO receptor, onemogućava njegovu aktivaciju i dalji prenos signala (Beachy et al., 1997). Literaturni podaci ukazuju da ciklopamin ima antitumorsko dejstvo kod tumora pankreasa,

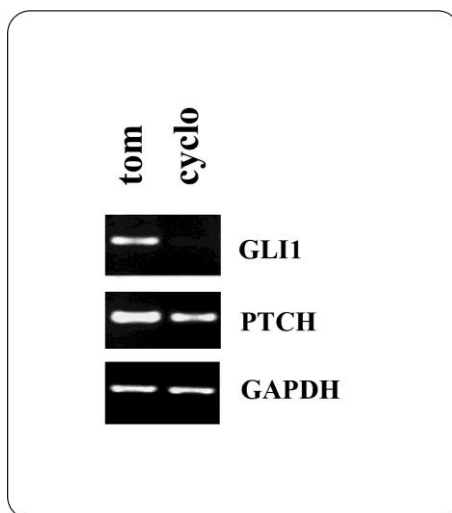
meduloblastoma, tumora dojke, prostate i gastrointestinalnog trakta (Onishi and Katano, 2011).

Kako je pokazano na Slici 1, u HeLa ćelijama su autonomno prisutne komponente SHH signalnog puta. U odsustvu SHH liganda, PTCH inhibira aktivnost SMO receptora. Međutim, vezivanjem SHH liganda za PTCH receptor ukida se ova inhibicija i pokreće signalna kaskada do krajnjih efektoru GLI transkripcijskih faktora. Ciklopamin se vezuje za heptahelični SMO receptor i dovodi do konformacione promene ovog G-proteina (Chen et al., 2010), usled čega je inhibiran dalji prenos signala do efektoru, GLI transkripcijskih faktora, odnosno finalno, do ciljnih gena.

U literaturi ima dosta podataka o upotrebi ciklopamina u svrhu inhibicije Hedgehog signalnog puta. Kako bi se inhibirao SHH signalni put različite permanentne ćelijske linije su tretirane različitim koncentracijama ciklopamina u rasponu od 5 μM do 100 μM . Tako je pokazano da tretmani U87-MG ćelijske linije poreklom od glioblastoma 10 μM ciklopaminom u trajanju od dva dana dovode do značajnog smanjenja broja ćelija (Bar et al., 2007). Zatim, za tretmane MCF-7 i MDA-MB-231, humanih ćelijskih linija poreklom od karcinoma dojke, korišćen je tretman 10 i 20 μM ciklopaminom u trajanju od jednog i do deset dana pri čemu su obe koncentracije dovode do smanjenja proliferacije (Che et al., 2013). Za AGS ćelije, koje vode poreklo od karcinoma želuca, je pokazano da 5 μM i 10 μM koncentracije ciklopamina ne utiču na proliferaciju, već su neophodne daleko veće koncentracije od 50 μM i 100 μM koje su i dovele do promene u broju ćelija (Bai et al., 2014). U studiji Bearda i Samarzija je pokazano da inhibicija SHH signalnog puta 5 i 10 μM ciklopaminom smanjuje proliferaciju ćelija karcinoma grlića materice na dozno- zavisani način (Samarzija and Beard, 2012). Za potrebe inhibicije SHH signalnog puta u HeLa ćelijama odlučeno je da se koristi ciklopamin u finalnoj koncentraciji od 10 μM . Takođe, ćelije su tretirane tomatidinom, strukturnim analogom ciklopamina koji ne dovodi do inhibicije SMO receptora i predstavlja negativnu kontrolu (Thayer et al., 2003).

Kako bi utvrdili nivo modulacije, tj. efikasnost tretmana HeLa ćelija ciklopaminom, analiziran je nivo ekspresije *PTCH*, direktnog ciljnog gena SHH signalne kaskade, kao i negativnog regulatora i *GLII*, takođe direktnog ciljnog gena SHH signalnog puta koji predstavlja marker aktivacije ovog signalnog puta. Ekspresija

ovih gena je pozitivno regulisana kada je put aktivan (Lee et al., 1997; Dai et al., 1999; Rahnama et al., 2006). Kao što je na Slici 10 pokazano, inhibicije SHH signalnog puta 10 μ M ciklopaminom u trajanju od jednog dana dovela je do smanjenja ekspresije oba ciljna gena SHH signalnog puta. Ovim rezultatom je potvrđeno da je SHH signalni put uspešno inhibiran 10 μ M ciklopaminom.

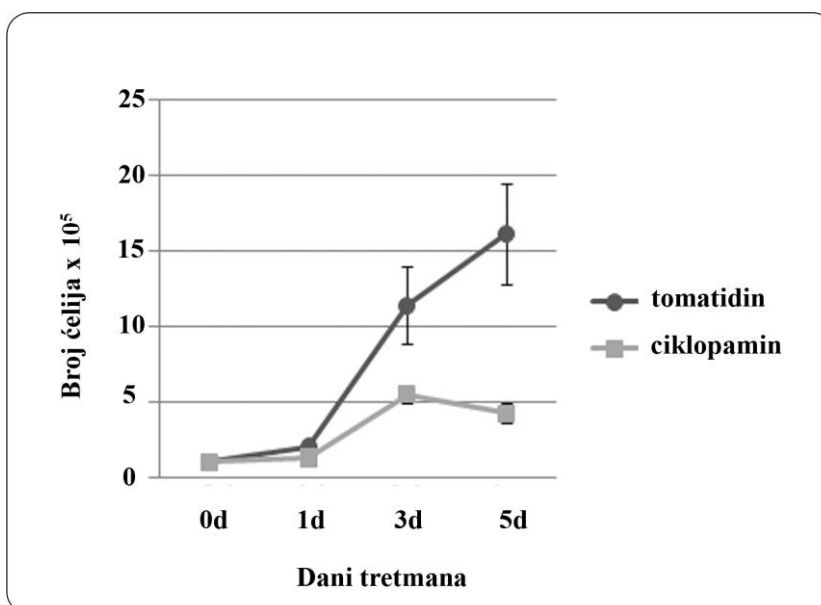


Slika 10. Modulacija SHH signalnog puta SMO antagonistom. HeLa ćelije su tretirane 10 μ M cilopaminom (cyclo). Kontrola reakcije bio tretman HeLa ćelija tomatidinom (tom). Ekspresija *PTCH* i *GLI1* je praćena RT-PCR-om. GAPDH je korišćen kao kontrola količine cDNK unete u reakciju.

4.6.1. Uticaj ciklopamina na proliferaciju i vijabilnost Hela ćelija

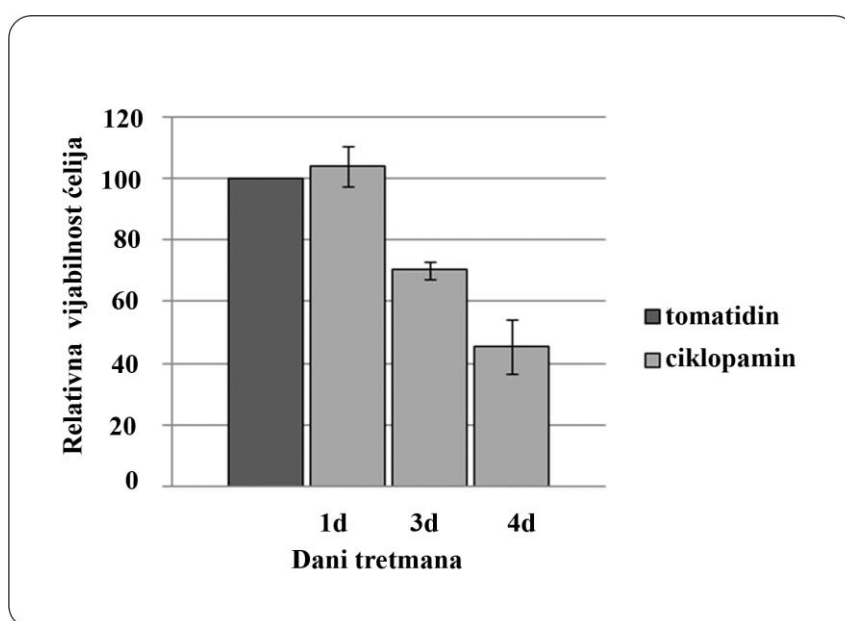
Iz literature je poznato da pojačana ekspresija GLI1 transkripcionog faktora, kao posledica poremećaja u regulaciji SHH signalnog puta, dovodi do povećanja proliferacije, invazivnosti i diferencijacije ćelija tumora i povezana je sa lošom prognozom (Kinzler et al., 1987; Roberts et al., 1989). Novija istraživanja ukazuju da SHH signalni put indukuje proliferaciju i migraciju ćelija karcinoma grlića materice i na taj način promoviše njihovo preživljavanje (Samarzija and Beard, 2012).

Kako bi analizirali uticaj inhibicije SHH signalnog puta na proliferaciju, HeLa ćelije su tretirane 10 μ M ciklopaminom i tomatidinom i testiran je njegov uticaj na proliferaciju HeLa ćelija posle jednog, tri i pet dana. Ćelije su tripsinizovane nakon svakog ovog vremenskog intervala od početka tretmana i izbrojane. Tretman ciklopaminom u trajanju od tri dana doveo je do značajnog smanjenje broja HeLa ćelija, za oko 50%, u poređenju sa tretmanom kontrolnim agansom dok je tretman od pet dana ciklopaminom doveo do smanjenja proliferacije za oko 75%.(Slika 11).



Slika 11. Uticaj modulacije SHH signalnog puta ciklopaminom na proliferaciju HeLa ćelija. Ćelije su tretirane 10 μ l ciklopaminom i tomatidinom kao kontrolom i brojane posle tretmana u trajanju od 1, 3 i 5 dana. Rezultati uticaja ciklopamina na proliferaciju su predstavljeni kao srednja vrednost broja ćelija \pm SEM od najmanje tri nezavisna eksperimenta.

Upotrebom MTT testa praćen je efekat modulacije signalnog puta na vijabilnost HeLa ćelija nakon jednog, tri i četiri dana tretmana. Primenom ovog testa, kao što je prikazano na Slici 12, prvi efekat inhibicije SHH signalnog puta na vijabilnost ćelija uočen je posle tri dana tretmana, što je u korelaciji sa efektom ciklopamina na proliferaciju. Naime, nakon tri dana tretmana ciklopaminom, vijabilnost ćelija je smanjena oko 30%. Ovaj trend smanjenja vijabilnosti HeLa ćelija nastavljen je nakon četiri dana pri čemu je zapaženo smanjenja vijabilnost iznosilo skoro 60% (Slika 12).

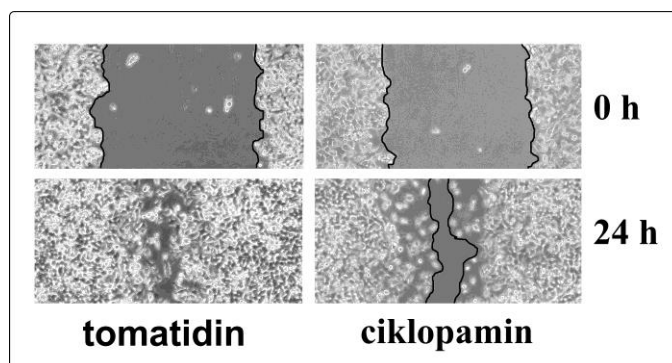


Slika 12. Uticaj modulacije SHH signalnog puta ciklopaminom na vijabilnost HeLa ćelija. Vijabilnost Hela ćelija praćena je MTT testom nakon 1, 3 i 4 dana tretmana ćelija 10 μ M ciklopaminom i tomatidinom kao kontrolom. Vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost \pm SEM najmanje tri nezavisna eksperimenta.

Prikazani rezultati pokazuju da inhibicija SHH signalnog puta ciklopaminom dovodi do smanjenja proliferacije i vijabilnosti HeLa ćelija.

4.6.2. Uticaj ciklopamina na migraciju HeLa ćelija

Sposobnost ćelija tumora da migriraju je usko povezana sa njihovom sposobnošću da metastaziraju. Da bi se analizirao efekat tretmana ciklopaminom na proces migracije HeLa ćelija, kao model sistema karcinoma grlića materice, primenjen je migratorni esej. Ovaj esej se izvodi tako što se konfluentnoj kulturi ćelija napravi povreda (“scratch”), nakon čega se posmatra kojom brzinom se tako formirani prostor popunjava. Popunjavanje praznog prostora praćeno je tokom 24h, kao što je prikazano na Slici 13. Zapaženo je da HeLa ćelije tretirane ciklopaminom sporije popunjavaju i zatvaraju prazan prostor u poređenju sa HeLa ćelijama tretiranim tomatidinom.



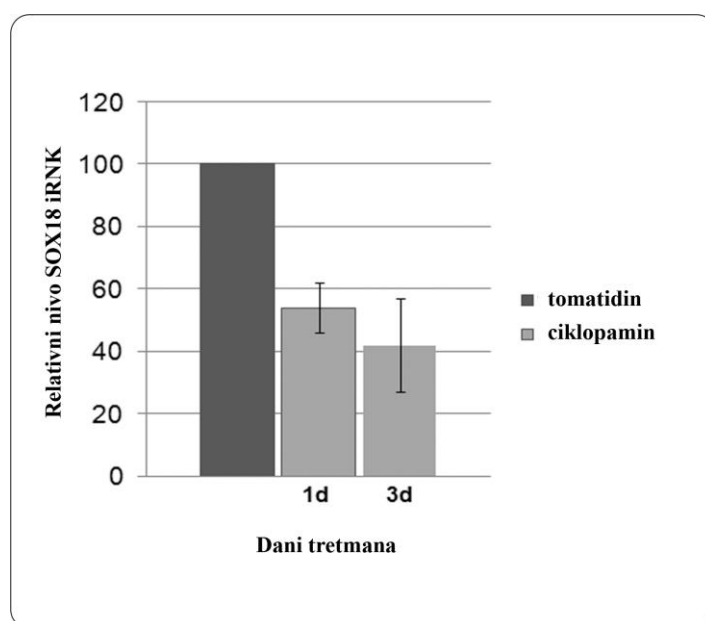
Slika 13. Uticaj modulacije SHH signalnog puta ciklopaminom na migraciju HeLa ćelija. Migraciona sposobnost ćelija analizirana je “wound scratch”testom. Urađena su tri nezavisna eksperimenta od kojih je jedan prikazan.

Na ovaj način je pokazano da inhibicija SHH signalnog puta ciklopaminom smanjuje sposobnost migracije HeLa ćelija u kulturi na osnovu čega se može zaključiti da SHH signalni put učestvuje u regulaciji procesa migracije HeLa ćelija.

4.6.3. Uticaj ciklopamina na endogenu *SOX18* ekspresiju

Predhodno je pokazano da transkripcioni faktori GLI1 i GLI2 u funkcionalnim esejima povećavaju aktivnost *SOX18* promotora. Takođe, pokazano je da pojačana ekspresija GLI1 i GLI2 transkripcionih faktora povećava endogenu ekspresiju humanog *SOX18* gena.

U skladu sa ovim rezultatima, osnovna pretpostavka je bila da će i modulacija SHH signalnog puta uticati na ekspresiju *SOX18* gena. Kako bismo ovo analizirali, HeLa ćelije su tretirane 10 μ M ciklopaminom i tomatidinom, jedan i tri dana. Nakon toga, iz ćelija su izolavani totalna RNK i ukupni ćelijski protein i ispitivana je promena u nivou ekspresije *SOX18* gena na nivou transkripcije, qRT-PCR kao i na proteinskom nivou “Wester blot” metodom.

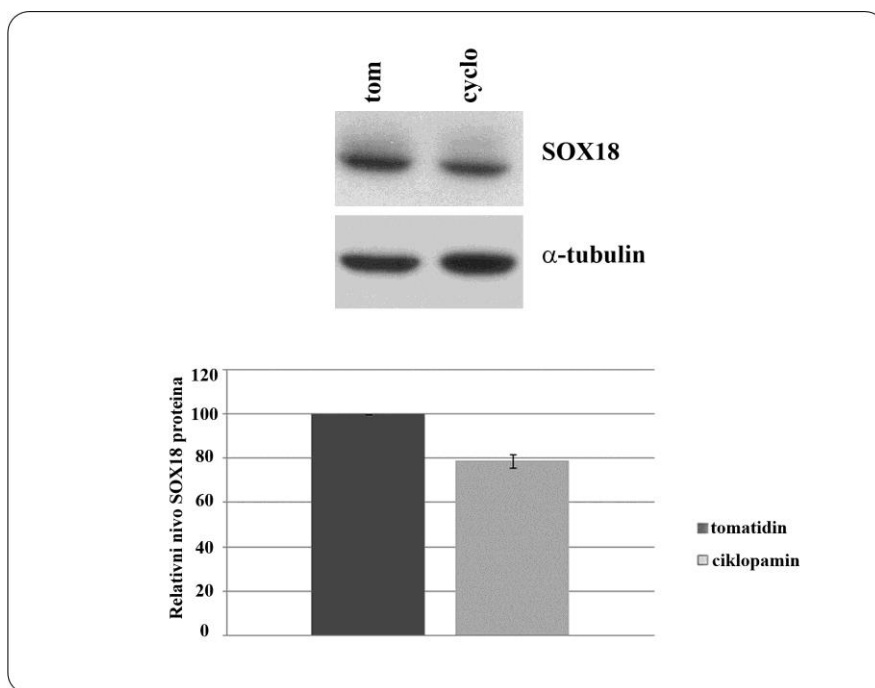


Slika 14. Efekat modulacije SHH signalnog puta ciklopaminom na nivo ekspresije *SOX18* gena. HeLa ćelije su tretirane inhibitorom SHH puta ciklopaminom i kontrolnim agensom tomatidinom. Relativni nivo *SOX18* iRNK izražen je u odnosu na nivo iRNK u ćelijama koje su tretirane tomatidimom koji je prikazan kao 100%. Vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost \pm S.E.M. najmanje tri nezavisna eksperimenta.

Kvantitativnom qRT-PCR metodom je pokazano da nakon jednog dana tretmana ciklopaminom dolazi do smanjenja transkripcije *SOX18* gena u HeLa ćelijama za oko

40% (Slika 14) u odnosu na tretman tomatidinom. Nakon trećeg dana tretmana ciklopaminom primećeno je dalje smanjenje ekspresije *SOX18* gena (smanjenje za 60%)

Potom je ispitivan uticaj tretmana ciklopaminom na nivo *SOX18* proteina u HeLa ćelijama. Primenom Western blot metode pokazano je da nakon tretmana ciklopaminom u trajanju od tri dana dolazi do smanjenja nivoa *SOX18* proteina približno za 20% u HeLa ćelijama u poređenju sa kontrolnim tretmanom tomatidinom (Slika 15.).



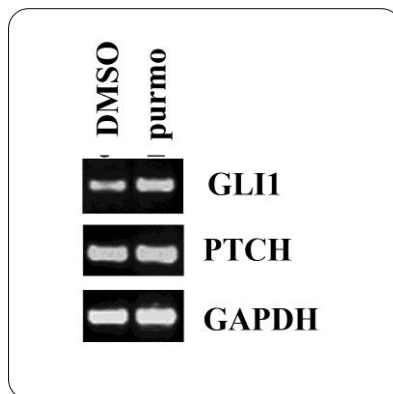
Slika 15. Efekat modulacije SHH signalnog puta ciklopaminom na nivo *SOX18* proteina. HeLa ćelije su tretirane i ciklopaminom (cyclo) i tomatidinom (tom) u trajanju od tri dana. Ekspresija proteina analizirana je Western blot metodom na ukupnim ćelijskim proteinima upotrebom antitela na *SOX18* i α -tubulin. Urađena su tri nezavisna eksperimenta od kojih je jedan predstavljen. Imunoreaktivni signali su digitalizovani i kvantifikovani pomoću Image J kompjuterskog programa i normalizovani u odnosu na α -tubulin. Količina *SOX18* proteina u ćelijama tretiranim ciklopaminom je izračunata kao procenat u odnosu na količinu *SOX18* proteina u ćelijama tretiranim tomatidinom kojoj je dodeljena vrednost 100%. Vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost \pm S.E.M. najmanje tri nezavisna eksperimenta.

Predstavljeni rezultati pokazuju da tretman HeLa ćelija ciklopaminom dovodi do smanjenja endogene ekspresije humanog *SOX18* gena, kako na nivou RNK tako i na nivou proteina. S obzirom da smo pokazali da ciklopamin dovodi do smanjenja ekspresije GLI1 transkripcionog faktora, možemo pretpostaviti da je inhibitorni efekat ciklopamina na ekspresiju *SOX18* gena, jednim delom posledica smanjenja GLI1 ekspresije. Pošto je ciklopamin specifični inhibitor Hedgehog signalnog puta, a HeLa ćelije imaju konstitutivnu ekspresiju SHH liganda, možemo zaključiti da je predstavljeni rezultat dodatna potvrda da SHH signalni put učestvuje u regulaciji ekspresije humanog *SOX18* gena.

4.7. Modulacija SHH signalnog puta purmorfaminom u HeLa ćelijama

Purmorfamin je sintetički agonist SHH signalnog puta (Beloti et al., 2005). Ekspresione analize su pokazale da purmorfamin aktivira PTCH1 i GLI1 ali ne i HH ligande, SHH, DHH i IHH, čime je potvrđeno da je ovaj molekul agonist SHH signalnog puta i da deluje vezujući se za SMO receptor (Beloti et al., 2005). Takođe, pokazano je da purmorfamin smanjuje efekat ciklopamina i kompetira sa njim za SMO receptor (Beloti et al., 2005; Sinha and Chen, 2006).

Kako bi uspešno modulirali SHH signalni put SMO agonistom, purmorfaminom, bilo je neophodno odrediti efektivnu koncentraciju ovog agensa. Iz literature je poznato da tretman HeLa ćelija 10 μM purmorfaminom tokom 24 časa dovodi do aktivacije SHH signalnog puta. U našim eksperimentima je za potrebe analize uloge modulacije SHH signalnog puta ovaj signalni put modulisan rastućim koncentracijama purmorfamina 2,5 μM , 5 μM , 10 μM i 20 μM purmorfaminom u period od 1, 3 i 4 dana. Primećeno je da niže koncentracije od 10 μM purmorfamina (2,5 i 5 μM purmorfamin) ne dovode do promene stope proliferacije HeLa ćelija. Sa druge strane, 20 μM purmorfamin je pokazao značajnu citotoksičnost sa značajnim smanjenjem proliferacije HeLa ćelija (rezultati titracija purmorfamina nisu prikazani u ovom radu). Na osnovu ovih rezultata je odlučeno da se za modulaciju SHH signalnog puta agonistom SMO receptora u HeLa ćelijama koristi purmorfamin u finalnoj koncentraciji od 10 μM .



Slika 16. Modulacija SHH signalnog puta SMO agonistom. HeLa ćelije su tretirane 10 μ M purmorfaminom (purmo). Kontrolne ćelije su tretirane DMSO-om. Ekspresija *PTCH* i *GLI1* je praćena je RT-PCR metodom. GAPDH je korišćen kao kontrola količine cDNK unete u reakciju.

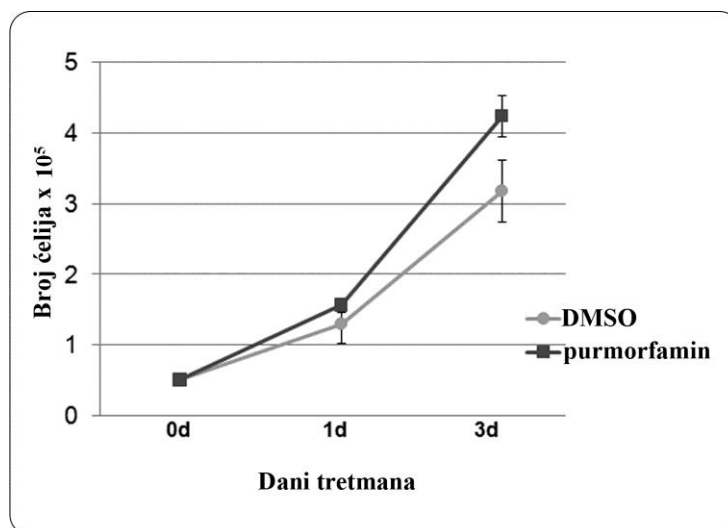
Da bi dokazali da je purmorfamin efikasno modulirao, tj. aktivirao SHH signalni put ispitana je promena nivoa ekspresije SHH ciljnih gena, *PTCH* i *GLI1*. Kontrolne ćelije su tretirane DMSO-om. Kao što je prikazano na Slici 16. profili ekspresije *PTCH* i *GLI1* pokazuju porast ekspresije oba gena u poređenju sa kontrolnim tretmanom nakon jednog dana tretmana purmorfaminom.

4.7.1. Uticaj purmorfamina na proliferaciju i vijabilnost HeLa ćelijama

U predhodnim rezultatima je prikazano kako inhibicija SHH signalnog puta utiče na procese proliferacije, vijabilnosti i migracije HeLa ćelija. Takođe, pokazano je kako ovaj vid modulacije utiče na endogenu ekspresiju *SOX18* gena.

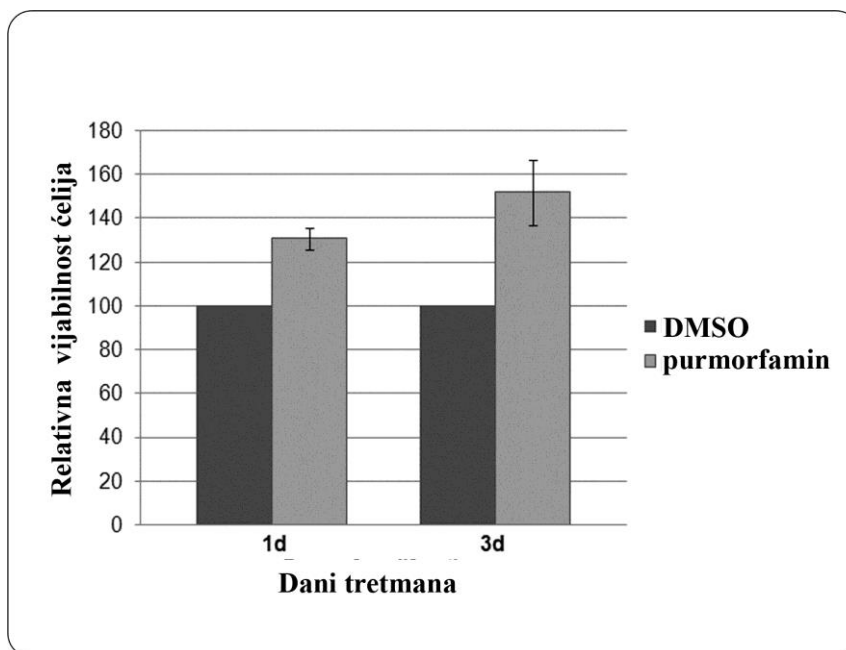
Kako bi ispitali da li i na koji način aktivacija SHH signalnog puta purmorfaminom utiče na proliferaciju i vijabilnost HeLa ćelije su tretirane pet dana 10 μ M purmorfaminom. Ćelije su tretirane jedan i tri dana 10 μ M purmorfaminom i DMSO-om, tripsinizovane i izbrojane. Tretman od jednog dana purmorfaminom nije doveo do promene u broju HeLa ćelija u odnosu na kontrolni tretman DMSO-om, ali se

zato nakon tri dana tretmana purmorfaminom očava razlika od oko 30% u odnosu na kontrolni tretman (Slika 17).



Slika 17. Uticaj modulacije SHH signalnog puta purmorfaminom na proliferaciju HeLa ćelija. Ćelije su tretirane 10 μ M purmorfaminom i DMSO-om kao kontrolom i brojane posle 1 i 3 dana tretmana. Rezultati uticaja purmorfamina su predstavljeni kao srednja vrednost broja ćelija \pm SEM od najmanje tri nezavisna eksperimenta.

Upotrebom MTT eseja praćen je efekat purmorfamina na vijabilnost HeLa ćelija. Za potrebe ovog eseja ćelije su tretirane 10 μ M purmorfaminom jedan i tri dana. Tretman 10 μ M purmorfaminom u trajanju od jednog dana doveo je do povećanja vijabilnosti za 30% u odnosu na kontrolni tretman rastvaračem (DMSO). Modulacija SHH signalnog puta purmorfamina tokom tri dana dovela je do daljeg povećanja vijabilnost ćelija za 50% (Slika 18).



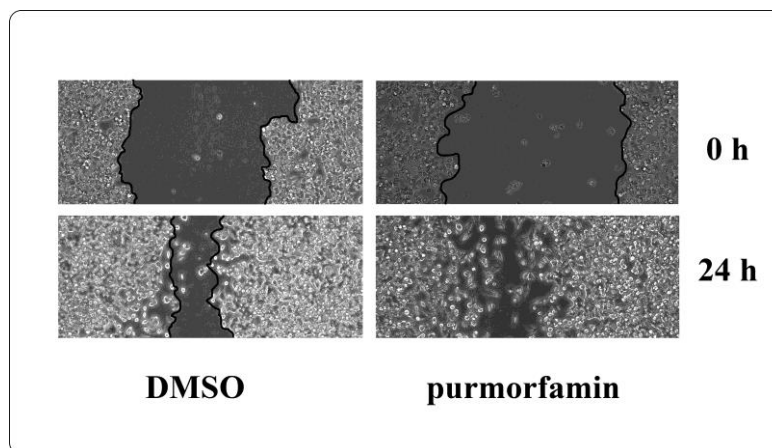
Slika 18. Uticaj modulacije SHH signalnog puta purmorfaminom na vijabilnost HeLa ćelija. Vijabilnost HeLa ćelija praćena je MTT testom nakon jednog i tri dana tretmana ćelija 10 μ M purmorfaminom. Relativna vijabilnost ćelija je predstavljena kao procenat vijabilnosti u odnosu na vijabilnost ćelija tretirane DMSO-om koja je odrećena za 100%. Rezultati uticaja purmorfamina na vijabilnost ćelija su predstavljeni kao srednja vrednost relativne vijabilnosti \pm SEM od najmanje tri nezavisna eksperimenta.

Prikazani rezultati pokazuju da uspešno modulisan SHH signalni put SMO agonistom purmorfaminom dovodi do porasta broja HeLa ćelija i do povećanja vijabilnosti.

4.7.2. Uticaj purmorfamina na migraciju HeLa ćelija

Pored stope rasta i vijabilnosti, analizirana je i sposobnost migracije HeLa ćelija nakon tretmana 10 μ M purmorfaminom u trajanju od 24h. Kontrolne ćelije su tretirane DMSO-om takođe u trajanju od 24h. Konfluentnoj kulturi ćelija je nastavkom napravljena povreda (scratch), nakon čega je posmatrano kojom brzinom i na koji način se ovaj prostor popunjava ćelijama tokom 24h (Slika 19). Posle pet sati od uklanjanja ćelija vidljivi su prvi znaci popunjavanja prostora. Uočeno je da HeLa ćelije tretirane purmorfaminom migriraju brže u prazan prostor u odnosu na tretman ćelija DMSO-om,

što je predstavljeno na Slici 19. Ova razlika u migraciji je još veća nakon 24h. Primenom ovog testa zapažena je još jedna razlika između migracije HeLa ćelija tretiranih agonistom u odnosu na kontrolu. Za razliku od HeLa ćelija tretiranih DMSO-m koje ulaze u prazan prostor, tj popunjavaju prazan prostor u vidu fronta, nakon tretmana purmorfaminom pojedinačne ćelije se odvajaju i popunjavaju prazan prostor (Slika 19).



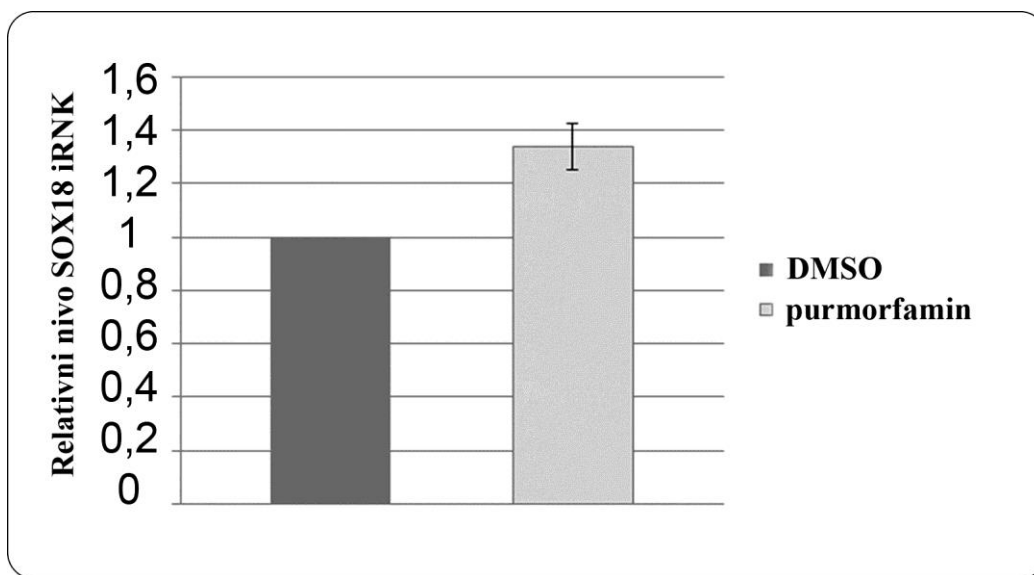
Slika 19. Uticaj modulacije SHH signalnog puta purmorfaminom na migraciju HeLa ćelija. Migraciona sposobnost ćelija analizirana je “wound scratch”testom. Urađena su tri nezavisna eksperimenta od kojih je jedan prikazan.

Na osnovu dobijenih rezultata može se doneti zaključak da tretman purmorfaminom povećava sposobnost HeLa ćelija da migriraju i to na način da pojedinačne ćelije popunjavaju prazan prostor.

4.7.3. Uticaj purmorfamina na endogenu SOX18 ekspresiju

Predhodni eksperimenti pokazuju da efektori SHH signalnog puta, GLI1 i GLI2 transkripcioni faktori, utiču na ekspresiju humanog SOX18 gena. Takođe, pokazano je da uspešna inhibicija SHH signalnog puta ciklopaminom smanjuje endogenu ekspresiju SOX18 gena. Pored uticaja purmorfamina na proliferaciju, vijabilnost i migraciju HeLa

ćelije analiziran je efekta modulacije SHH signalnog puta purmorfaminom na ekspresiju *SOX18* gena nakon tri dana tretmana. HeLa ćelije su tretirane 10 μ M purmorfaminom i DMSO-m u trajanju od tri dana. Nakon toga, iz ćelija je izolavana RNK i ispitivana je promena u nivou ekspresije *SOX18* gena qRT-PCR metodom.



Slika 20. Efekat aktivacije SHH signalnog puta SMO agonistom. HeLa ćelije su tretirane 10 μ M purmorfaminom i DMSO-m, kao kontrola u trajanju od tri dana. Relativna *SOX18* ekspresija je predstavljena kao procenat ekspresije u ćelijama tretiranim DMSO-m i ta vrednost je zadata kao 1. Vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost \pm SEM najmanje tri nezavisna eksperimenta.

Kvantitativnom qRT-PCR metodom je pokazano da nakon tri dana tretmana purmorfaminom dolazi do povećanja transkripcije *SOX18* gena u HeLa ćelijama za oko 30% (Slika 20) u odnosu na kontrolni tretman.

Predstavljeni rezultati još jednom potvrđuju da SHH signalni put učestvuje u regulaciji ekspresije humanog *SOX18* gena. Ovim rezultatima je pokazano da tretman purmorfaminom povećava endogenu ekspresiju *SOX18* gena, stimulacijom SHH signalnog puta.

Zajedno, rezultati modulacije SHH signalnog puta ciklopaminom i purmorfaminom potvrđuju funkcionalnu vezu između aktivnosti pomenute signalne kaskade i nivoa ekspresije *SOX18* gena.

4.8. Konstruisanje i funkcionalna analiza *wild-type* i dominantno-negativnog *SOX18* ekspresionih konstrukata

Predhodnim rezultatima je pokazano da GLI1 i GLI2 transkripcioni faktori, kao efektori SHH signalnog puta, učestvuju u regulaciji ekspresije humanog *SOX18* gena, kao i da modulacija ovog signalnog puta uzrokuje promene u ekspresiji *SOX18* gena. Takođe, pokazano je da modulacija SHH signalnog puta, inhibitorom i aktivatorom, utiče na proliferaciju, vijabilnost i migraciju HeLa ćelija.

Da bi razumeli značaj transkripcione regulacije *SOX18* gena pod uticajem SHH signalne kaskade, naš sledeći cilj je bio da ispitamo da li je *SOX18* transkripcioni faktor uključen u prenos SHH signala tako što učestvuje u regulaciji proliferacije, vijabilnosti i migracije HeLa ćelija, za koje je pokazano da su pod uticajem pomenutog signalnog puta. S obzirom da smo pokazali da modulacija SHH signalnog puta utiče na ekspresiju *SOX18* gena i procese proliferacije, vijabilnosti i migracije, sledeći korak je bila analiza uticaja *SOX18* transkripcionog faktora u regulaciji procesa proliferacije, vijabilnosti i migracije HeLa ćelija. Osim toga, kako je predmet ovog rada ispitivanje međusobnih odnosa SHH signalnog puta i ekspresije *SOX18* gena u HeLa ćelijama, sledeći cilj u ispitivanju predstavljala je analiza uticaja *SOX18* proteina u regulaciji ekspresije komponenti SHH signalnog puta u HeLa ćelijama.

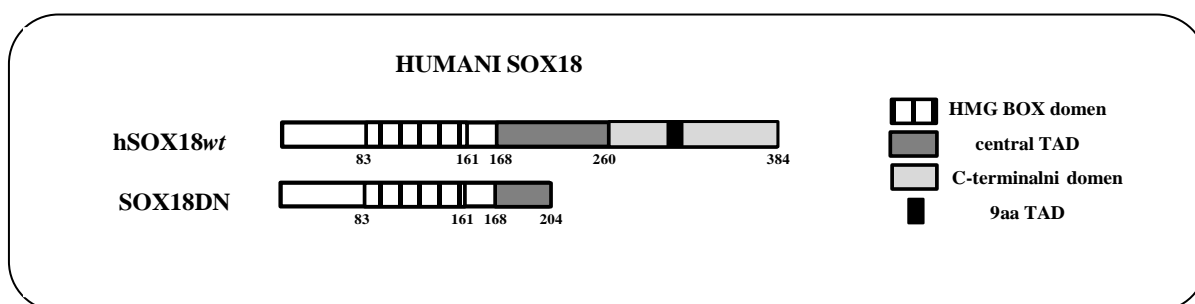
Proučavanje funkcije SOX proteina, pa tako i *SOX18*, utišavanjem pojedinačnih članova u okviru iste genske familije, otežano je činjenicom da ovi protein ispoljavaju funkcionalnu redundantnost. *In vivo* experimenti su pokazali da su miševi, kod kojih ne postoje *Sox18* transkript, vijabilni, fertilni i ne pokazuju nikakve kardiovaskularne defekte. Za razliku od njih RaOp miševi, koji ekspimiraju dominantno-negativnu formu *SOX18* proteina, koja se vezuje za DNK ali ne može da ostvari svoju funkciju u

regulaciji ciljnih gena, razvijaju edeme i rano umiru. Zbog toga se smatra da je upotreba dominantno-negativnog mutant, koji zauzima vezivno mesto u promotoru ciljnog gena i onemogućava vezivanje *wild type* proteina i funkcionalno redundantnih proteina, bolja strategija za ispitivanje funkcije SOX proteina.

U cilju ispitivanja uloge *SOX18* gena konstruisana su dva tipa SOX18 ekspresionih konstrukata, jedan koji eksprimira *wild type* SOX18 protein i drugi koji eksprimira skraćenu, dominantno-negativnu, formu SOX18 proteina.

4.8.1. Konstruisanje pCISOX18*wt* i pCISOX18DN ekspresionih konstrukata

Humani *SOX18* gen kodira protein dužine 384 amino kiselina koji poseduje N-terminalni domen, DNK vezujući domen (HMG BOX domen), centralni transaktivacioni domen (central TAD) i C-terminalni domen u okviru koga je identifikovan transaktivacioni motiv od 9 aminokiselina (9aa TAD) (Slika 21).



Slika 21. Shematski prikaz strukture SOX18 proteina. Brojevi ispod ilustracije predstavljaju poziciju aminokiselina u proteinskim domenima. Shema humanog SOX18 proteina (hSOX18*wt*) i dominantno negativnog SOX18 (SOX18DN), opisanog u ovom radu.

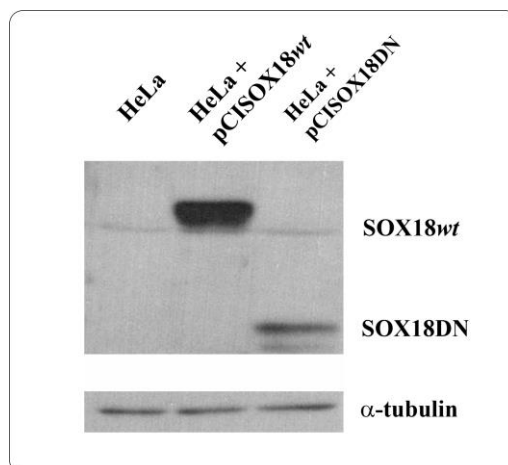
Wild type SOX18 konstrukt (pCISOX18*wt*) je generisan ligacijom fragmenta iz *SOX18* cDNK klona, koji je sadržavao kompletan kodirajući region humanog SOX18 gena (Stanojic and Stevanovic, 2000), u pCI ekspresioni vektor.

Kako bi generisali dominantno-negativni SOX18 konstrukt (pCISOX18DN), izvršena je restikciona digestija humanog *SOX18* cDNK klona. Na taj način dobijeni SOX18 konstrukt eksprimira protein koji sadrži samo N terminalni domen, kompletan HMG BOX domen i mali deo centralnog transaktivacionog domena, dok mu kompletan C-terminalni domena i veći deo centralnog transaktivacionog domena nedostaju. Ovako konstruisan vektor eksprimira skraćeni SOX18 protein od svega 204 amino kiseline, koji bi trebalo da se vezuje za svoje ciljne sekvence u okviru promotora ciljnih gena, ali usled nedostatka transaktivacionog domena ne bi trebalo da ostvaruje svoju funkciju u

regulaciji njihove transkripcije. Istovremeno, ovakav protein trebalo bi da spreči da drugi proteine iz iste, SOXF grupe ostvare svoju ulogu preko istih vezivnih mesta.

4.8.2. Ekspresija *wild-type* i dominantno-negativnog SOX18 proteina u HeLa ćelijama

Nakon generisanja *SOX18* ekspresionih konstrukata, bilo je neophodno proveriti da li se u HeLa ćelijama uspešno ekspimiraju *wild type* i skraćeni SOX18 protein. U tu svrhu urađena je Western blot analiza na ukupnim ćelijskim proteinima, izolovanih iz HeLa ćelije koje su tranzijentno transfektovane pCISOX18*wt* i pCISOX18DN konstruktima, kao što je prikazano na Slici 22. Upotrebom SOX18 antitela, koje je napravljeno tako da prepoznaje epitop koji odgovara regionu SOX18 proteina od 161-300 amino kiseline, omogućena je detekcija SOX18*wt* proteina, molekulske mase 45kDa, kao i skraćene forme, koja je oko 23kDa. Kao što je i očekivano, transfekcije HeLa ćelija pCISOX18*wt* konstruktom dovela je do značajnog povećanja SOX18 proteina. Takođe, u uzorcima HeLa ćelija transfektovanim pCISOX18DN konstruktom detektovan je pored endogenog SOX18 proteina i skraćena forma ovog protein, očekivane molekulske mase od oko 23kDa (Slika 22).



Slika 22. Pojačana ekspresija SOX18 $_{wt}$ i SOX18DN u HeLa ćelijama. HeLa ćelije su tranzijentno transfektovane pCISOX18 $_{wt}$ i pCISOX18DN ekspresionim vektorima i izolovani ukupni ćelijski proteini. Urađena je Western blot analiza sa anti SOX18 antitelima i α -tubulinom kao kontrolom količine analiziranih proteina. Detektovani proteini su označeni sa strane. Urađena su tri nezavisna eksperimenta od kojih je jedan prikazan.

Na osnovu ovih rezultata potvrđeno je da se i *wild-type* i skraćena forma SOX18 proteina efikasno eksprimiraju u HeLa ćelijama.

4.8.3. *In vitro* vezivanje *wild type* i dominantno-negativnog SOX18 mutanta

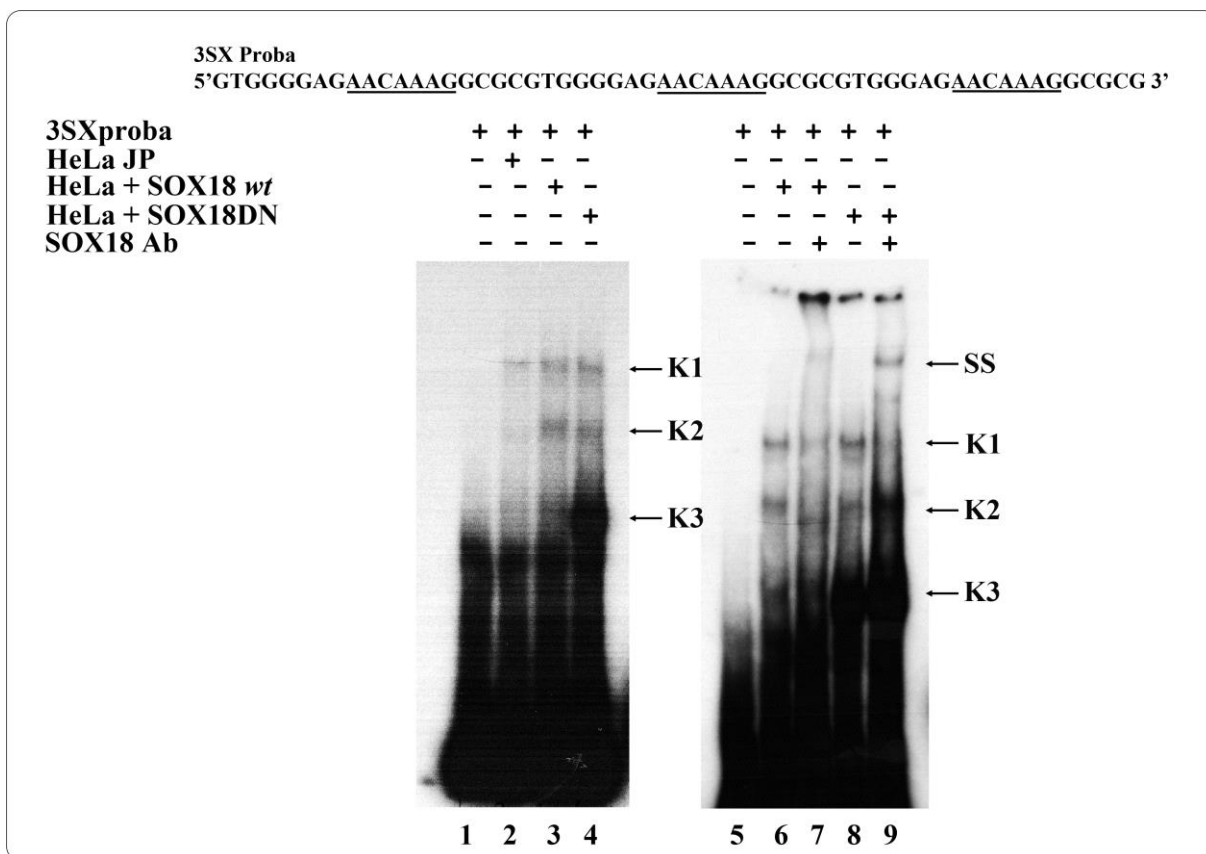
Pošto je pokazano da se generisani SOX18 konstrukti uspešno eksprimiraju u HeLa ćelijskoj liniji, sledeći korak bila je analiza *in vitro* vezivanja *wild type* i dominantno-negativnog SOX18 proteina. Kako SOX18 transkripcioni faktor specifično prepoznaje 5' AACAAAG-3' DNK sekvencu (SOX konsenzusno vezivno mesto), za potrebe EMSA eseja generisana je oligonukleotidna proba koja sadrži tri SOX vezivna mesta, označena kao 3SX.

Inkubacija 3SX probe sa jedarnim proteinima izolovanim iz netransfektovanih HeLa ćelija dovela je do formiranja tri protein-DNA označenih kao K1, K2 i K3 (Slika

23, linija 2). Kada su korišćeni jedarni proteini, izolovani iz ćelija u kojima je tranzijentno pojačano ekspimiran SOX18 wt , afinitet za vezivanje ovih protein za 3SX probu se značajno povećao što je uočeno povećanjem intenziteta sva tri protein-DNK kompleksa (Slika 23, linije 3). U EMSA reakcijama u kojima su korišćeni jedarni proteini obogaćeni SOX18DN uočava se pojačanje K3 protein-DNK kompleksa u poređenju sa ovim kompleksima formiranim sa jedarnim proteinima iz HeLa ili proteinima obogaćenim SOX18 wt kao što je i predstavljeno na Slici 23.

Kako bi potvrdili da u kompleksima formiranim sa 3SX probom i jedarnim proteinima obogaćenim SOX18 wt i njegovom skraćenom formom zaista učestvuje SOX18 protein, urađene su reakcije vezivanja u prisustvu antitela za SOX18. Primenom SOX18 antitela, došlo je do pojave kompleksa sporije elektroforetske pokretljivosti, "supershifta" (Slika 23, linije 7 i 9), čime se potvrđuje da SOX18 wt i skraćena, dominantno-negativna forma ovog proteina učestvuju u formiranju protein-DNK kompleksa.

Ovi rezultati nedvosmisleno pokazuju da su *wild type* i skraćena forma SOX18 proteina, koji se ekspimiraju sa konstruisanih vektora, sposobni da se specifično vežu za SOX18 konsenzusnu sekvencu *in vitro*.



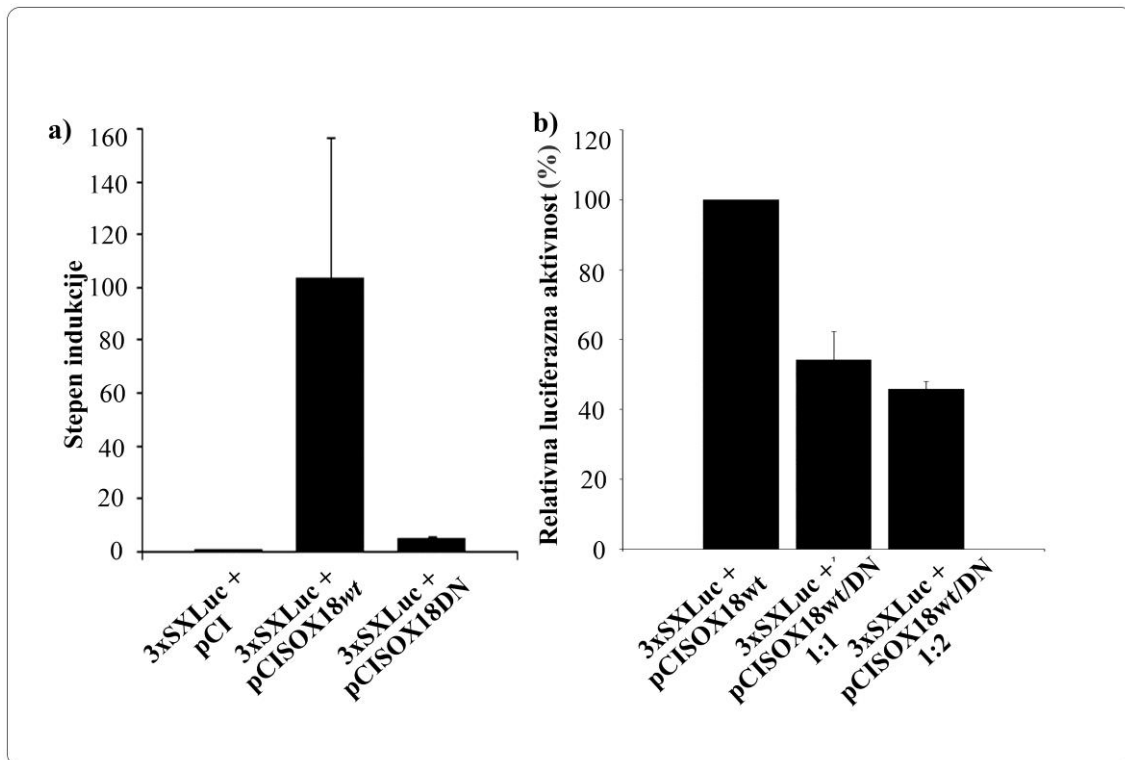
Slika 23. Proučavanje sposobnosti *in vitro* vezivanja *wild type* i skraćene forme SOX18 proteina. EMSA reakcija sa radioaktivno obeženom 3SXprobom (sadrži tri SOX vezivna mesta, mesta su podvučena na slici), jedarnim proteinima iz HeLa ćelija (linija 2) i jedarnim proteinima iz HeLa ćelija transfektovanim pCISOX18*wt* (linije 3 i 6) ili pCISOX18DN (linije 4 i 8). “Supershift” sa anti SOX18 antitelom (linije 7 i 9) obeležen strelicom-SS. DNK-proteinski kompleksi K1, K2 i K3 su označeni strelicama.

4.8.4. Funkcionalna analiza pCISOX18_{wt} i pCISOX18 ekspresionih konstrukata

Predhodno je pokazano da se *wild type* i skraćena forma SOX18 proteina efikasno eksprimiraju u HeLa ćelijama, kao i da su sposobni da se *in vitro* vežu za SOX18 konsenzusnu sekvencu. Sledeći korak u istraživanju bio je ispitivanje njihovih transaktivacionih osobina. Za potrebe funkcionalne analize u HeLa ćelijama korišćen je 3xSXLuc reporterski konstrukt, koji je ranije upotrebljen za analizu aktivnosti Sox4 i Sox10 proteina (Schreiber et al., 1997). 3xSXLuc reporterski plazmid sadrži tri ponovljene oligonukleotidne sekvence koje odgovaraju SOX vezivnom mestu, uklonirane u pTATALuc vektor koji eksprimira reporter gen za luciferazu pod kontrolom β -globinskog minimalnog promotora (Kuhlbrodt et al., 1998). Na Slici 24 prikazana je funkcionalna analiza generisanih SOX18 ekspresionih konstrukata. Eksperimentima ko-transfekcije HeLa ćelija 3xSXLuc vektorom i pCISOX18_{wt} pokazano je da se aktivnost luciferaze povećava 100 puta u odnosu na bazalni nivo (Slika 24a). Ovaj rezultat pokazuje da egzogeni SOX18_{wt}, ekspimiran sa pCISOX18_{wt} konstrukta, ima snažno transaktivatorsko svojstvo u HeLa ćelijama, što je u korelaciji sa predhodno objavljenim literaturnim podacima (Hosking et al., 1995). Sa druge strane, u funkcionalnim esejima sa pCISOX18DN, pokazano je smanjenje transaktivacionog svojstva za 20 puta u poređenju sa efektom SOX18_{wt}, kao što je prikazano na Slici 24a. Ovim rezultatom je pokazano da skraćeni SOX18DN, kome nedostaju kompletan C-terminalni domena i veći deo centralnog transaktivacionog domena, ima smanjeno transaktivaciono svojstvo.

Kako bi dodatno potvrdili da skraćeni SOX18 protein zaista funkcioniše na dominantno negativan način, urađeni su eksperimenti kompeticije u kojima je na konstantnu količinu pCISOX18_{wt} sukcesivno dodavana rastuća količina pCISOX18DN. Kao što je na Slici 24b prikazano, u uslovima kompeticije SOX18DN sa SOX18_{wt} u odnosu 1:1, dolazi do smanjenja aktivnosti reporterskog konstrukta za oko 50%. Naknadnim dodavanjem SOX18DN, 2:1 u odnosu na SOX18_{wt}, došlo je do još većeg smanjenja aktivnosti SOX- reporterskog konstrukta.

Prikazani rezultati potvrđuju da skraćena forma SOX18 proteina, SOX18DN, funkcioniše na dominantno-negativan način, vezuje za istu ciljnu sekvencu kao i SOX18 $_{wt}$, ali zbog nedostatka transaktivacionog domena ne ostvaruje svoju ulogu.



Slika 24. Funkcionalna karakterizacija SOX18^{wt} i SOX18^{DN} ekspresionih konstrukata. a) Kotransfekcije HeLa ćelija 3xSXLuc reporterskim plazmidom i praznim vektorom pCI ili ekspresionim konstruktima pCISOX18^{wt} i pCISOX18^{DN}. Normalizovana luciferazna aktivnost je predstavljena kao odnos aktivnosti 3xSXLuc reporterskog plazmida u ćelijama transfektovanim ekspresionim SOX18 konstruktima i aktivnosti sa praznim pCI vektorom kojem je zadata vrednost 1. b) Dominantno-negativni efekat pCISOX18^{DN} je testiran u eksperimentima kotransfekcije sa konstantnom koncentracijom pCISOX18^{wt} i rastućom koncentracijom pCISOX18^{DN} (1:1 i 1:2) u prisustvu 3xSXLuc reporterskog plazmida. Normalizovana luciferazna aktivnost je predstavljena kao procenat aktivnosti 3xSXLuc reporterskog plazmida u ćelijama transfektovanim pCISOX18^{wt} konstruktima kojoj je dodeljena vrednost 100%. Vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost \pm SEM najmanje tri nezavisna eksperimenta.

4.9. Uticaj SOX18 proteina na proliferaciju i vijabilnost HeLa ćelija

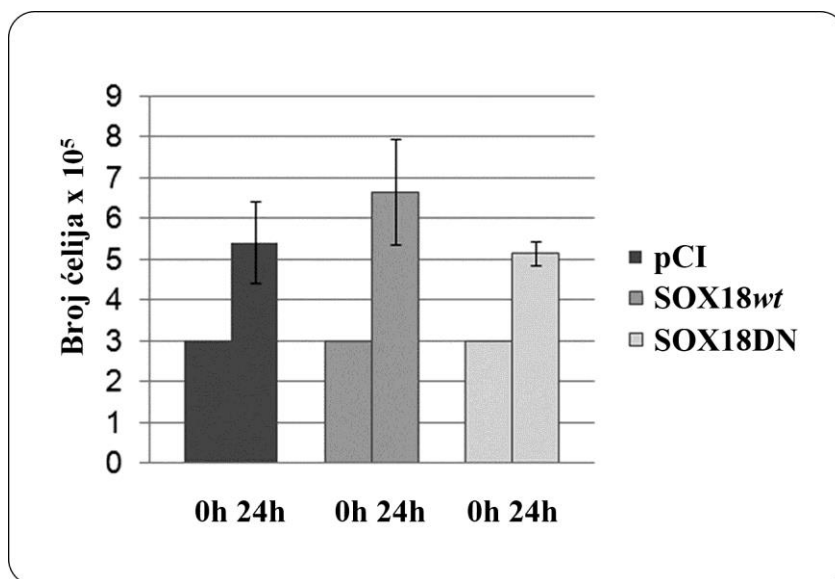
Poznato je da se SOX18 transkripcioni faktor tranzijentno eksprimira tokom embrionalnog razvića u endotelijalnim ćelijama koje se formiraju (Downes and Koopman, 2001). Pored embrionalnog razvića, *SOX18* se tranzijentno eksprimira na mestima gde dolazi do razvoja već postojećih krvnih sudova, tokom procesa zarastanja rana (Darby et al., 2001). Literaturni podaci pokazuju da pojačana ekspresija *SOX18* gena u endotelijalnim ćelijama doprinosi proliferaciji vaskularnih ćelija u podmaklim koronarnim aterosklerotičnim lezijama kod ljudi, dok inhibicija ekspresije *SOX18* specifičnim oligonukleotidima dovodi do smanjenja njihove proliferacije (Garcia-Ramirez et al., 2005). Na osnovu ovih rezultata pretpostavljena je uloga SOX18 u procesima koji uključuju ćelijski rast.

Osim toga, pokazano je da ekspresija mišijeg dominantno-negativnog SOX18 (SOX18RaOp) smanjuje proliferaciju HUVEC, primarne ćelijske linije poreklom od endotela humane umbikalne vene, i MCF7 ćelija, permanentne ćelijske linije poreklom od karcinoma dojke, a takođe narušava formiranje krvnog suda *in vitro* (Young et al., 2006).

Imajući u vidu sve ove literaturne podatke, sledeći korak u istraživanju bio je da se pokaže da li *SOX18* gen utiče na proliferaciju i vijabilnost HeLa ćelija. Kako bi se ispitaio njegov uticaj na pomenute procese, HeLa ćelije su tranzijentno transfektovane generisanim SOX18 konstruktima koji ekspimiraju *wild type* i skraćenu formu ovog proteina, kao i praznim vektorom. 24h nakon transfekcije ćelije su tripsinizovane i izbrojane. Kao što je prikazano na Slici 25 nije primećena razlika u broju HeLa ćelija transfektovanih pCISOX18*wt* u poređenju sa kontrolnim vektorom, kao ni razlika kod ćelija transfektovanih pCISOX18 DN u poređenju sa brojem HeLa ćelija transfektovanih kontrolnim vektorom.

Kako bi se na još jedan način utvrdio efekat SOX18 na proliferaciju HeLa ćelija, analizirana je ekspresija *ciklinD1* gena koji je neophodan za proliferaciju ćelija i reguliše prelazak iz G1 u S fazu ćelijskog ciklusa (Slika 26). Pokazano je da se

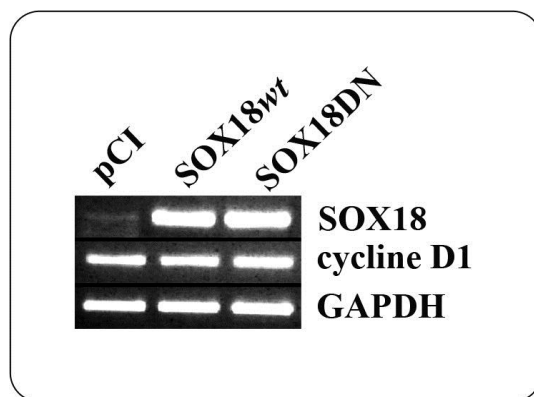
ekspresija *ciklinD1* gena povećava tokom aktivacije SHH signalnog puta, a takođe je dokazano da je *ciklinD1* ciljni gen GLI transkripcionih faktora (Stecca and Ruiz, 2010).



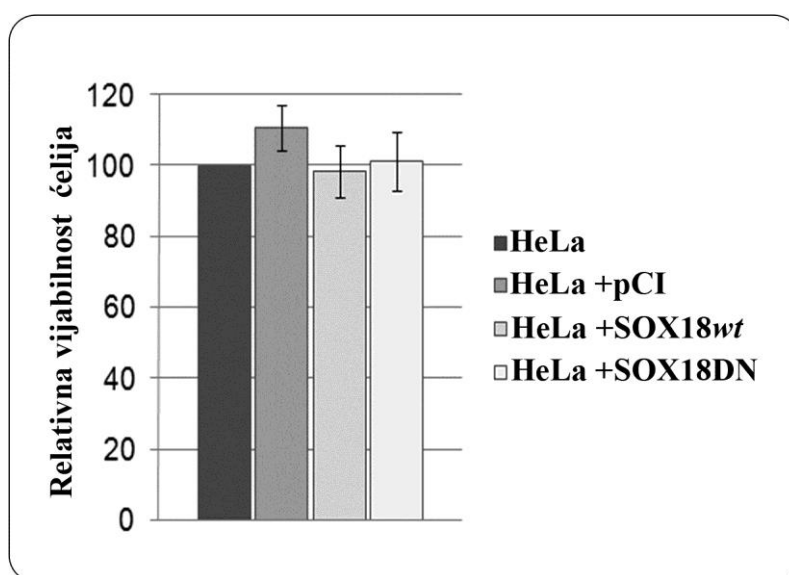
Slika 25. Efekat SOX18 proteina na proliferaciju HeLa ćelija. HeLa ćelije su transfektovane pCI kontrolnim vektorom, pCISOX18*wt* ili pCISOX18DN ekspresionim konstruktima i izbrojane 24 časa nakon transfekcije. Vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost \pm SEM najmanje tri nezavisna eksperimenta.

Za potrebe tog eksperimenta HeLa ćelije su tranzijentno transfektovane pCI ekspresionim vektorom i konstruktima koji ekspimiraju nativnu i skraćenu formu SOX18 proteina (pCISOX18*wt* i pCISOX18DN). Praćen je uticaj na ekspresiju *ciklinD1* gena RT-PCR metodom. Rezultati ove analize su pokazali da nema promene ekspresije *ciklinD1* gena čime je još jednom potvrđeno da SOX18 ne utiče na proliferaciju HeLa ćelija.

MTT testom je praćen efekat humanog SOX18*wt* proteina i njegove skraćene forme na vijabilnost HeLa ćelija. Na Slici 27 prikazan je rezultat testa vijabilnosti nakon tranzijentne transfekcije HeLa ćelija praznim vektorom i konstruktima koji ekspimiraju *wild type* i dominantno-negativni SOX18. Kao što rezultati pokazuju, ni SOX18*wt*, ni njegova skraćena forma nisu dovele do promene u vijabilnosti HeLa ćelija.



Slika 26. Efekat povećane ekspresije SOX18 na ekspresiju *ciklinD1* gena. RT-PCR analiza *ciklinD1* ekspresije nakon tranzijentne transfekcije HeLa ćelija praznim pCI vektorom i ekspresionim vektorima za nativnu i skraćenu formu SOX18 proteina. Nakon transfekcije je takođe proveren nivo transkripcije *SOX18* gena. GAPDH je korišćen kao kontrola količine cDNK unete u reakciju. Specifični produkti (*SOX18*, *ciklinD1* i *GAPDH*) su označeni sa desne strane.



Slika 27. Uticaj modulacije SOX18 ekspresije na vijabilnost HeLa ćelija. HeLa ćelije su transfektovane pCI vektorom (kontrola), pCISOX18^{wt} i pCISOX18^{DN} ekspresionim konstruktima. 24 časa nakon transfekcije rađen je MTT test. Vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost \pm SEM najmanje tri nezavisna eksperimenta.

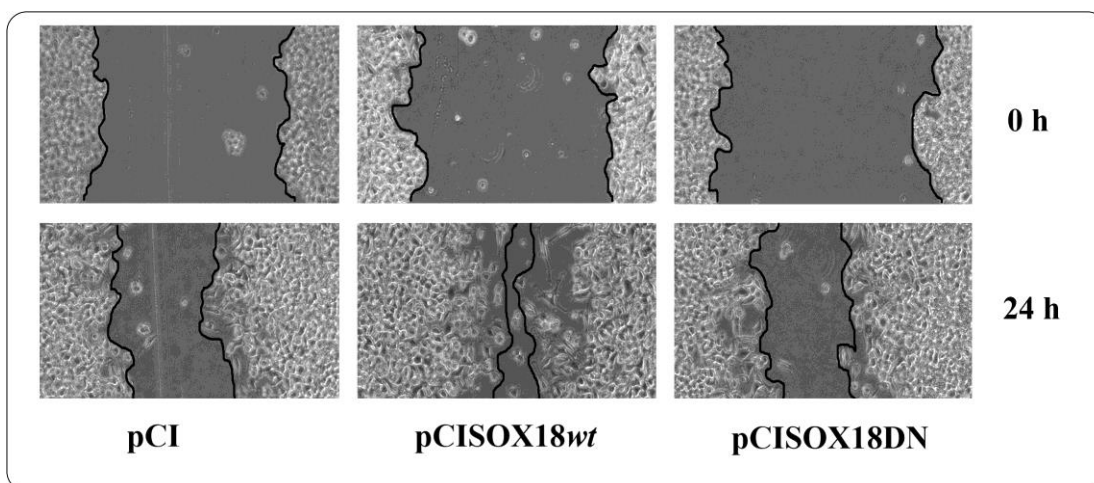
Na osnovu dobijenih rezultata zaključeno je da nakon tranzijentne transfekcije HeLa ćelija SOX18 ekspresionim konstruktima nije primećen uticaj SOX18^{wt} i skraćenog, dominantno-negativnog SOX18 proteina na proliferaciju i vijabilnost HeLa ćelija. Kako je predhodnim eksperimentima pokazano, modulacija SHH signalnog puta ima uticaj na proliferaciju i vijabilnost HeLa ćelija, a istovremeno dovodi do promene u ekspresiji SOX18 gena. Naši rezultati pokazuju, međutim, da modulacija SOX18 ekspresije ne utiče na analizirane procese, te se nameće zaključak da proliferacija HeLa ćelija pod uticajem aktiviranog SHH signalnog puta nije posredovana SOX18 transkripcionim faktorom.

4.10. Uticaj SOX18 proteina na migraciju HeLa ćelija

Literaturni podaci ukazuju da se SOX18 gen eksprimira u različitim tumorima, kao što su melanomi, neuroblastomi, tumori pankreasa, jajnika, ovarijuma, uterusa. Takođe, pokazano je da modulisanjem SOX18 funkcije upotrebom mišjeg dominantno-negativnog SOX18 (RaOp) dolazi do slabijeg razvoja tumora *in vivo* i do smanjenja proliferacije i migracije ćelija *in vitro*, što je verovatno posledica smanjenje mikrocirkulacije koja je neophodan uslov za napredovanje samog tumora (Young et al., 2006). Pula i saradnici su nedavno pokazali da ekspresija SOX18 gena koreliše sa razvojem kancera dojke, ali da nije povezana sa proliferacijom ćelija kancera (Pula et al., 2013).

Sledeće pitanje je da li modulacija SOX18 ekspresije utiče na migraciju HeLa ćelija? U tu svrhu HeLa ćelije su transfektovane ekspresionim SOX18 konstruktima, pCISOX18^{wt}, pCISOX18DN i praznim vektorom, nakon čega je primenjen “wound scratch” esej. Popunjavanje praznog prostora praćeno je tokom 24h, kao što je prikazano na Slici 28 pri čemu su prvi znaci popunjavanja praznog prostora, tj. migracije bili su vidljivi već nakon 5 h od nastanka povrede. Zapaženo je da HeLa ćelije, u kojima je pojačano eksprimiran SOX18^{wt}, popunjavaju i zatvaraju prazan prostor brže u poređenju sa HeLa ćelijama transfektovanim konstruktom koji eksprimira dominantno-negativni SOX18 (Slika 28).

Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da *SOX18^{wt}* povećava migraciju HeLa ćelija, kao i da efikasnije popunjava prostor u poređenju sa HeLa ćelijama transfektovanim kontrolnim i vektorom koji eksprimira dominantno-negativni *SOX18*.



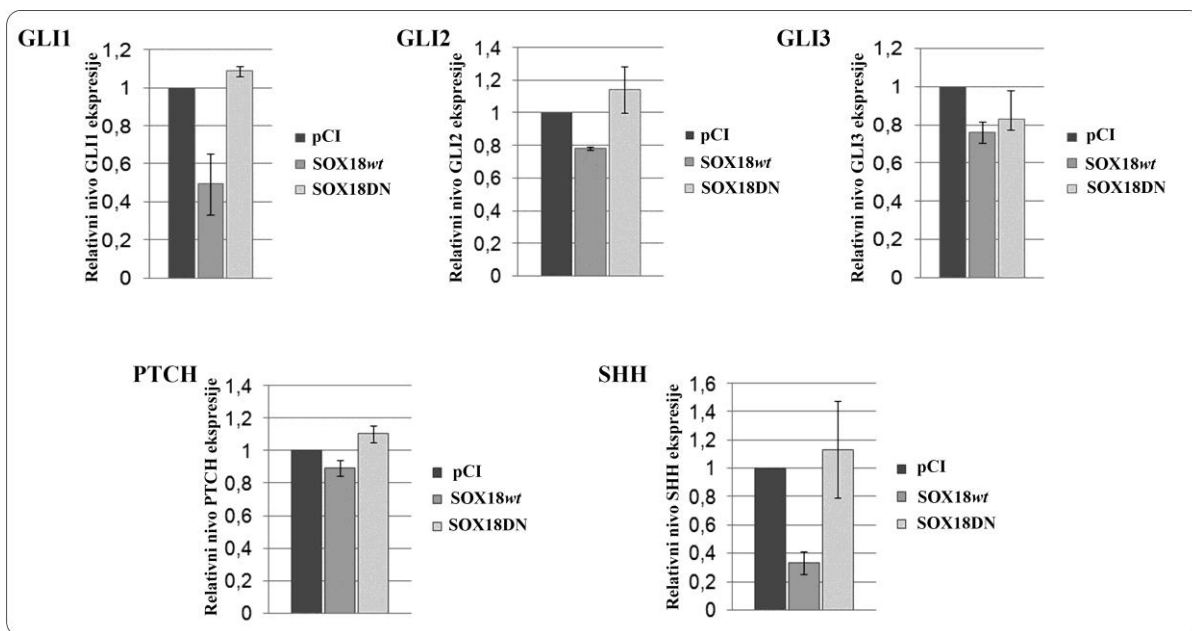
Slika 28. Uticaj pojačane ekspresije *SOX18* wild type i skraćenog *SOX18* proteina na migraciju HeLa ćelija. HeLa ćelije su tranzijentno transfektovane pCI, pCISOX18^{wt} i pCISOX18DN ekspresionim konstruktom, nakon čega je urađen wound scratch esej. Migraciona sposobnost ćelija je praćena tokom 24 časa. Urađena su tri nezavisna eksperimenta od kojih je jedan prikazan.

4.11. Uticaja *SOX18* proteina na ekspresiju komponenti SHH signalnog puta u HeLa ćelijama

U prvom delu rada je eksperimentalno pokazano da HeLa ćelije konstitutivno ekspimiraju komponente SHH signalnog puta, SHH, PTCH, GLI1, GLI2 i GLI3. Takođe, pokazano je i da SHH signalni put učestvuje u regulaciji *SOX18* ekspresije u HeLa ćelijama. Kako je predmet ovog istraživanja analiza međusobnih funkcionalnih

odnosa SHH signalanog puta i ekspresije *SOX18* gena, u ovom delu rada analizirana je uloga SOX18 proteina na ekspresiju komponenti ovog signalnog puta u istoj ćelijskoj liniji.

Kako bi utvrdili uticaj SOX18 na ekspresiju komponenti SHH signalnog puta u HeLa ćelijama, ćelije su tranzijentno transfektovane konstruktima koji ekspimiraju *wild type* i skraćenu formu SOX18 proteina i praćen uticaj na nivou transkripcije (Slika 29). Rezultati qRT-PCR analize su pokazali da povećana ekspresija *wild type* SOX18 dovodi smanjenja transkripcije *SHH*, familije GLI transkripcionih faktora GLI1, GLI2 i GLI3, dok nije bilo uticaja na ekspresiju *PTCH* gena. Sa druge strane, pojačana ekspresija dominantno-negativne forme SOX18 proteina nije dovela do promene nivoa ekspresije *SHH*, *GLI1*, *GLI2* i *GLI3* (Slika 29).



Slika 29. Efekat SOX18 proteina na komponente SHH signalnog puta. HeLa ćelije su tranzijentno transfektovane pCI vektorom i konstruktima koji ekspimiraju nativnu i dominantno-negativnu formu SOX18 proteina (pCISOX18*wt* i pCISOX18 DN). Relativna ekspresija komponenti SHH signalnog puta je izražena kao stepen promene ekspresije datog gena u poređenju sa ekspresijom u ćelijama transfektovanim praznim vektorom i ta vrednost je zadata kao 1. Vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost \pm SEM najmanje tri nezavisna eksperimenta.

Podaci ove analize pokazuju da SOX18 utiče na ekspresiju SHH i GLI transkripcionih faktora, ukazujući na moguću negativnu povratnu spregu između SHH signalnog puta i SOX18 regulatornog proteina. Ovaj rezultat nedvosmisleno potvrđuje postojanje međusobne funkcionalne veze, koja u slučaju uticaja SHH signalne kaskade može biti i direkta, s obzirom da smo pokazali da se GLI1 direktno vezuje za SOX18 promotor u *in vitro* uslovima. Uloga SOX18 proteina u regulaciji ekspresije SHH liganda i GLI transkripcionih faktora najverovatnije nije direktna, s obzirom da za ovaj transkripcioni faktor još uvek nije pokazano da može da ima ulogu transkripcionog represora.

5. DISKUSIJA

Humani *SOX18* gen pripada *SOXF* grupi zajedno sa *SOX7* i *SOX17* genima. Članovi ove grupe gena kodiraju transkripcione faktore odgovorne za specifikaciju i diferencijaciju endotelijalnih ćelija tokom razvića vaskularnog i limfnog sistema (Downes and Koopman, 2001). Tokom adultnog perioda ovi geni imaju važnu ulogu u regulaciji procesa angiogeneze u fiziološkim i patološkim stanjima organizma (Darby et al., 2001). Kod čoveka mutacije u regionima *SOX18* gena koji kodiraju DNK-vezivni i transaktivacioni domen dovode do *Hypotrichosis-lymphedema-telangiectasia* (HLT) sindroma, koga karakterišu poremećaji u razviću dlake, vaskularnog i limfnog sistema (Irrthum et al., 2003). Takođe, literaturni podaci pokazuju da se *SOX18* gen eksprimira i u različitim tumorima. Tako su Saitoh i Katoh pokazali da je *SOX18* ekspimiran u 7 ćelijskih linija poreklom od tumora želuca, 7 tumorskih linija pankreasa, 3 ćelijske linije karcinoma dojke i 5 embrionalnih tumorskih linija (Saitoh and Katoh, 2002). Dong i saradnici su na osnovu EST (eng. express sequence tag) analize utvrdili da se *SOX18* eksprimira u melanomina, neuroblastomima, kancerima pankreasa, ovariuma i uterusu (Dong et al., 2004). Kako je *SOX18* gen uključen u razviće krvnog i limfnog sistema, poslednjih godina su proučavanja njegove uloge u kancerogenezi bila usmerena na ispitivanje funkcije ovog gena u širenju tumora regulisanjem tumorske angiogeneze čime se formiraju povoljni uslovi za rast i progresiju tumorskih ćelija. Tako su Eom i saradnici utvrdili da je kod tumora želuca veći nivo *SOXF* transkripata u poređenju sa normalnim tkivom, ali su takođe pokazali da je kod tumora želuca koji ekspimiraju *SOX18* (*SOX18* pozitivna grupa) veća učestalost invazije limfnim sistemom i metastaza u limfnim čvorovima u poređenju sa tumorom želuca kod koga nije detektovana *SOX18* ekspresija (*SOX18* negativna grupa) (Eom et al., 2012). Duong i saradnici su takođe pokazali da je uloga *SOX18* gena u kancerogenezi povezivana sa progresijom tumora kroz regulaciju procesa tumorske angiogeneze i limfangiogeneze (Duong et al., 2012) i identifikovali *SOX18* je kao ključni regulator neolimfangiogeneze (Duong et al., 2012). Osim toga, pokazano je da ovaj gen moduliše sposobnost ćelija melanoma da metastaziraju do najbližeg limfnog čvora (Duong et al., 2012). Sa druge strane, modulisanjem *SOX18* funkcije dolazi do smanjenja u razvoju tumora *in vivo*, kao i do

smanjenja proliferacije i migracije ćelija *in vitro* (Young et al., 2006). Najnoviji istraživanja pokazuju da je *SOX18* gen pojačano eksprimiran ne samo u endotelu koji okružuje tumor, već i ćelijama tumora (Pula et al., 2013). U studiji koja prikazuje ulogu *SOX18* ekspresije kod invazivnog karcinoma dojke, po prvi put je pokazano da je *SOX18* protein osim u endotelu krvnih i limfnih sudova eksprimiran i u ćelijama tumora na presecima tkiva poreklom od pacijenata. Osim toga, povećana ekspresija *SOX18* detektovana je kod svih ćelijskih linija poreklom od karcinoma dojke. Takođe, u karcinomu jajnika detektovana je *SOX18* ekspresija u jedru i citoplazmi tumorskih ćelija, pri čemu je primećeno da povećan nivo *SOX18* ekspresije u jedru povezan sa višim stadijumom maligniteta i tako povezan sa lošom prognozom (Pula et al., 2014).

SHH, delujući kao morfogen, igra važnu ulogu u ranim fazama embrionalnog razvića udova, centralnih struktura u mozgu, kičmene moždine, talamusa (Ingham and McMahon, 2001). Kod adultnog organizma ovaj signalni put je uključen u održanje pluripotentnog i progenitorskog stanja matičnih ćelija (Beachy et al., 2004). SHH signalni put je uključen u proces *de novo* vaskularizacije određenih embrionalnih tkiva, ali i u proces indukovanja angiogeneze kod adulta (Pola et al., 2001; Vokes et al., 2004). Na osnovu podataka iz literature zaključuje se da promene u regulaciji SHH signalnog puta dovode do razvoja različitih vrsta tumora kod čoveka (Kato and Kato, 2005). Najnovija istraživanja pokazuju da se određene komponente SHH signalnog puta pojačano eksprimiraju i u karcinomu grlića materice u poređenju sa normalnim tkivom, kao i da je SHH signalni put aktivan u permanentnim ćelijskim linijama koje vode poreklo od karcinoma grlića materice (Xuan et al., 2006; Samarzija and Beard, 2012).

Cilj istraživanja u ovom radu bio je analiza uloge SHH signalnog puta u regulaciji ekspresije humanog *SOX18* gena u HeLa ćelijskoj liniji. U predhodnim istraživanjima kloniran je i okarakterisan humani *SOX18* gen (Stanojčić and Stevanović, 2000). Takođe, definisan je promotor *SOX18* gena i pokazano je da su transkripcioni faktori EGR1, Sp3, ZBP-89 i NF-Y odgovorni za regulaciju promotorske aktivnosti ovog gena i njegove endogene ekspresije (Petrović and Stevanović, 2007; Petrović et al., 2009; Petrović et al., 2010a). Pored toga, pokazana je funkcionalna veza *SOX18* transkripcionog faktora i određenih signalnih molekula koji imaju važnu ulogu u regulaciji angiogeneze (Petrović et al., 2010b).

U ovom radu opisana je uloga GLI transkripcionih faktora, efektoru SHH signalnog puta, u transkripcionoj regulaciji *SOX18* gena. Pokazano je da modulacija SHH signalnog puta, pored toga što utiče na proliferaciju, vijabilnost i migraciju HeLa ćelija, utiče i na ekspresiju humanog *SOX18* gena. Na ovaj način je humani *SOX18* gen prvi put predstavljen kao target SHH signalne kaskade u *in vitro* model sistema karcinoma grlića materice.

Imajući u vidu da je predmet ovog rada analiza međusobnih funkcionalnih odnosa SHH signalnog puta i ekspresije *SOX18* gena, prikazani su i rezultati koji govore o ulozi *SOX18* transkripcionog faktora u regulaciji ekspresije određenih komponenti SHH signalnog puta. Pored toga, analizirana je uloga *SOX18* proteina u regulaciji proliferacije, vijabilnosti i migracije HeLa ćelija, u cilju boljeg razumevanja njegove uloge u prenosu efekta aktiviranog SHH signalnog puta.

5.1. Kompjuterska analiza potencijalnih vezivnih mesta za GLI transkripcione faktore u okviru promotorskog regiona *SOX18* gena

Promotor *SOX18* gena analiziran je upotrebom MatInspector kompjuterskog programa. Ovaj program daje predikciju za koje transkripcione faktore postoje vezivna mesta u okviru zadatog promotorskog regiona nekog gena, tj. prepoznaje konsenzusne sekvence vezivnih mesta i verovatnoću vezivanja za određeni transkripcioni faktor.

Kako je predmet ovog rada uticaj SHH signalnog puta u regulaciji ekspresije *SOX18* gena, pretraživanje promotora *SOX18* gena je bilo usmereno na identifikaciju potencijalnih vezivnih mesta za GLI transkripcione faktore, koji predstavljaju finalne efektore SHH signalne kaskade. Familiju GLI transkripcionih faktora kod ljudi sačinjavaju GLI1, GLI2 i GLI3 (Ruppert et al., 1988). Sva tri GLI proteina prepoznaju i vezuju se za istu konsenzusnu sekvencu 5' GACCACCCA 3' svojim visoko očuvanim DNK vezujućim domenom po tipu cinkanih prstića (Kinzler and Vogelstein, 1990). Uslovi koji su korišćeni za ovu bioinformatičku analizu bili su da je verovatnoća vezivanja za jezgro vezivnog mesta 1, koja ukazuje da je konzerviranost nukleotida u

okviru jezgra vezivnog mesta potpuna. Takođe, zadato je da verovatnoća vezivanja za sekvence koje uokviruju vezivno mesto, tzv. matriks vezivnog mesta bude optimizovana, što znači da program iz baze podataka procenjuje i selektuje samo one sekvence koje zaista predstavljaju matriks vezivnog mesta nekog transkripcionog faktora. *In silico* analiza promotora *SOX18* gena ukazala je na prisustvo sedam potencijalnih vezivnih mesta za GLI transkripcione faktore sa verovatnoćom vezivanja za matriks vezivnog mesta u rasponu od 0,8 do 0,914 što ukazuje na visoku verovatnoće vezivanja transkripcionog faktora za identifikovano potencijalno vezivno mesto koja ne odgovaraju u potpunosti konsenzusnoj sekvenci za vezivanje GLI transkripcionih faktora.

U literaturi postoji mnogo primera koji pokazuju da se potencijalna vezivna mesta za GLI transkripcione faktore apsolutno ne poklapaju sa konsenzusnom GLI sekvencom, ali da su funkcionalno aktivna. Winklmayr i saradnici su funkcionalnim analizama pokazali da promene u nukleotidnoj sekvenci i manji afinitet vezivanja GLI transkripcionih faktora za potencijalne sekvence u promotorima ciljnih gena, ne isključuje njihovu ulogu u regulaciji transkripcije ciljnih gena (Winklmayr et al., 2010). Takođe, ovi autori su pokazali da mutacijom funkcionalno dokazanih GLI vezivnih mesta u promotorima *JUN* i *GLI1* gena iz ne-konsenzusnih u konsenzusna ne dovode do promene aktivacije luciferaznog reporter gena (Laner-Plamberger et al., 2009). Dokazano je da GLI2 transkripcioni faktor aktivira transkripciju *GLI1* gena vezivanjem za potencijalno GLI vezivno mesto koje se razlikuje u jednom baznom paru u poređenju sa konsenzusnom sekvencom za GLI transkripcione faktore (Ikram et al., 2004). Takođe, ne-konsenzusno GLI vezivno mesto u okviru HNF3 enhensera je važno za aktivaciju ovog transkripcionog faktora (Sasaki et al., 1997). Dalje, u okviru promotora gena za osteopontin kod pacova i miševa okarakterisano je ne-konsenzusno GLI vezivno mesto (Das et al., 2009). Takođe, Bien-Willner i saradnici su pokazali da GLI1 transkripcioni faktor učestvuje u regulaciji ekspresije humanog *SOX9* gena, vezivanjem za ne-konsenzusno vezivno mesto (Bien-Willner et al., 2007). Zanimljiva je činjenica da mutacija GLI konsenzusne sekvence u promotoru *TGM3* gena ne utiče na aktivnost reporter gena kao ni na *in vivo* vezivanje. Suprotno tome, funkcionalni eseji su pokazali da uvođenje dodatnih mutacija u ne-konsenzusna GLI vezivna mesta u okviru istog promotora potpuno ukidaju transkripcionu aktivnost (Winklmayr et al., 2010).

Sva potencijalna GLI vezivna mesta identifikovana u promotoru *SOX18* gena se od konsenzusne GLI sekvence razlikuju u dva bazna para. Istovremeno šest od ukupno sedam, identifikovanih GLI potencijalnih vezivnih mesta se ne podudaraju sa pomenutim ne-konsenzusnim GLI sekvencama iz literature. Potencijalno G7 vezivno mesto se po sekvenci poklapa sa pomenutim vezivnim mesto za GLI transkripcione faktore u okviru promotora *JUN* gena (Laner-Plamberger et al., 2009). Zbog velike heterogenosti, kao i činjenice da publikovani podaci ukazuju na funkcionalni značaj ne-konsenzusnih vezivnih mesta odlučeno je da se u daljem radu analiziraju sva potencijalna GLI vezivna mesta identifikovana u okviru optimalnog promotora *SOX18* gena.

5.2. Uloga GLI transkripcionih faktora u regulaciji transkripcije *SOX18* gena u HeLa ćelijama

SHH signalni put svoj efekat ostvaruje preko uloge GLI transkripcionih faktora u regulaciji ekspresije *SOX18* gena. Na osnovu rezultata funkcionalnih analiza, *in vitro* vezivanja kao i funkcionalnih analiza u nativnom kontekstu, pokazano je da su GLI transkripcioni faktori uključeni u transkripcionu regulaciju *SOX18* gena u HeLa ćelijama.

Rezultati funkcionalne analize prikazane u ovom radu pokazuju da su transkripcioni faktori GLI1 i GLI2 pozitivni regulatori promotorske aktivnosti *SOX18* gena u HeLa ćelijama. Podaci iz literature pokazuju da GLI1 ima ulogu aktivatora transkripcije ciljnih gena kod svih vrsta kičmenjaka (Dai et al., 1999; Wang et al., 2000; Bai et al., 2004). GLI2 prevashodno ima ulogu aktivatora, ali je pokazana i represorska uloga, kod žaba, gde inhibira diferencijaciju podne ploče nervne cevi (Ruiz i Altaba, 1998). U funkcionalnim esejima prikazanim u ovom radu, primećena je razlika u jačini odgovora istog promotorskog regiona na pojačanu ekspresiju GLI1 odnosno GLI2 transkripcionog faktora. Pokazano je da GLI2 transkripcioni faktor oko 2,5 puta jače aktivira optimalni promotorski region *SOX18* gena (Slika 5, približno 80 puta) u poređenju sa GLI1 (Slika 5, približno 30 puta). Ova razlika u odgovoru se delom može objasniti činjenicom da GLI2 transkripcioni faktor može aktivirati ekspresiju GLI1, te bi njegova uloga mogla biti indirektna, preko aktivacije GLI1, i direktna, vezivanjem za vezivna mesta u promotoru *SOX18* gena. U literaturi postoje podaci koji opisuju

funkcionalnu vezu GLI1 i GLI2 transkripcionih faktora. Tako je pokazano da GLI2 u normalnom humanom epidermisu i bazocelularnom karcinomu indukuje GLI1 ekspresiju vezivanjem za njegov promotor koji sada pozitivnom povratnom spregom indukuje GLI2 (Ikram et al., 2004). Sa druge strane, u eksperimentima smanjene elektroforetske pokretljivosti je nedvosmisleno pokazano da GLI1 transkripcioni faktor ima veći afinitet vezivanja za ponuđene sekvence poreklom iz *SOX18* promotorskog regiona, što nameće zaključak da je GLI1-posredovana aktivacija *SOX18* promotora verovatno dominantniji mehanizam transkripcione kontrole u odnosu na aktivaciju od strane GLI2.

GLI3 je u literaturi opisan kao repressor ciljnih gena, mada ima podataka koji govore o njegovoj slaboj aktivatorskoj ulozi (Sasaki et al., 1997; Ruiz i Altaba, 1998; Regl et al., 2002; Bai et al., 2004). U funkcionalnim esejima prikazanim u ovom radu, GLI3 nije uticao na promotorsku aktivnost *SOX18* gena u HeLa model sistemu.

Uloga GLI transkripcionih faktora na endogenu ekspresiju *SOX18* gena je u skladu sa efektima dobijenim na osnovu funkcionalne analize promotorske aktivnosti, te je povećana ekspresija GLI1 i GLI2 transkripcionih faktora dovela do povećanja nivoa *SOX18* transkripta i proteina u HeLa ćelijama. Već je istaknuto da svih sedam potencijalnih vezivnih mesta za GLI transkripcione faktore u okviru *SOX18* promotora pripadaju grupi tzv, ne-konsenzusnih GLI vezivnih mesta. U *in vitro* esejima interakcije jedarnih proteina iz HeLa ćelija sa odgovarajućim DNK probama koje sadrže GLI vezivna mesta ustanovljeno je da se GLI1 transkripcioni faktor vezuju samo za vezivna mesta na pozicijama od -289 do -285 i od -221 do -209 u odnosu na start transkripcije. Identifikovana vezivna mesta mogu imati ulogu u odgovoru *SOX18* promotora na direktno vezivanje GLI1 transkripcionog faktora. Takođe, uloga GLI transkripcionih faktora u regulaciji *SOX18* gena može biti i indirektna, posredovana drugim molekularnim mehanizmima čija je aktivnost pod uticajem GLI regulatornih proteina.

Za nekoliko gena iz *Sox/SOX* genske familije je pokazano da su regulisani komponentama SHH signalnog puta u tumorskim model sistemima. Humani *SOX14* gen je u U87MG, ćelijskoj liniji poreklom od glioblastoma, pozitivno regulisan GLI1 transkripcionim faktorom na RNK i proteinskom nivou (Popovic et al., 2010). Takođe, tretman ovih ćelija SHH-N signalnim peptidom dovodi do povećanja ekspresije *SOX14*

gena, kako na nivou iRNK, tako i na nivou proteina. Ekspresija humanog *SOX9* gena je regulisana GLI1 transkripcionim faktorom u SW1353 ćelijskoj liniji koja vodi poreklo od hondrosarkoma (Bien-Willner et al., 2007). Podaci najnovijih istraživanja na melanomima pokazuju da je *SOX2* direktno regulisan GLI1 i GLI2 transkripcionim faktorima (Santini et al., 2014).

Moguća funkcionalna veza između SHH i *SOX18* gena primećena je u istraživanjima koja se bave uticajem HH signalnog puta u održanju krvno-moždane barijere (Alvarez et al., 2011). Autori su u ovom radu pokazali da je *SOX18* genska ekspresija u endotelijalnim ćelijama koje ulaze u sastav krvno-moždane barijere najviša dva sata nakon aktivacije GLI1 transkripcionog faktora humanim rekombinantnim SHH proteinom. Autori, takođe, pretpostavljaju da je ovaj *SOX* gen regulisan SHH signalnim putem, verovatno posredstvom GLI1 transkripcionog faktora (Alvarez et al., 2011).

U ovom radu je prvi put prikazana uloga GLI1 i GLI2 transkripcionih faktora kao pozitivnih regulatora *SOX18* ekspresije u *in vitro* model sistema karcinoma grlića materice. S obzirom da je SHH signalni put aktivan u ćelijama koje vode poreklo od karcinoma grlića materice, prikazana funkcionalna veza sa *SOX18* regulatornim proteinom doprinosi boljem razumevanju prenosa signala ovom signalnom kaskadom u ćelijama kancera.

5.3. Efekat modulacije SHH signalnog puta ciklopaminom u HeLa ćelijama

Uzimajući u obzir ulogu SHH signalnog puta u razviću i progresiji tumora, inhibicija ovog signalnog puta bi predstavljala efikasnu strategiju u terapiji različitih tipova tumora. Ciklopamin je prvi okarakterisani inhibitor HH signalnog puta koji inhibira njegovu aktivnost vezujući se direktno za SMO receptor. Na taj način ovaj agens onemogućava aktivaciju pomenutog signalnog puta i dalji nizvodni prenos signala (Beachy et al., 1997). Literaturni podaci ukazuju da ciklopamin ima antitumorsko dejstvo kod tumora pankreasa, meduloblastoma, tumora dojke, prostate, tumora gastrointestinalnog trakta (Ruiz i Altaba et al., 2002; Low and de Sauvage, 2010; Onishi

and Katano, 2011; Che et al., 2013; Xie et al., 2013). Ciklopamin suprimira proliferaciju ćelija adenokarcinoma pankreasa *in vitro* i *in vivo* koja je posredovana GLI3 transkripcionim faktorom (Steg et al., 2010). Poslednjih godina su generisani mnogobrojni derivati ciklopamina. Do sada su razvijeni derivati sa poboljšanom rastvorljivošću (IPI-926), zatim SMO inhibitori koji se značajno razlikuju po strukturi od ciklopamina (GDC-0499- vismodegib, LDE225, BMS-833923, XL-139, PF-0449913), zatim inhibitori transformacije SMO receptora iz neaktivnog u aktivnu formu (SANT 74-75) i inhibitori transporta neaktivnog SMO receptora iz citoplazme do ćelija (SANT 1-4) (Kato and Kato, 2005; Rudin et al., 2009; Tremblay et al., 2009a; Tremblay et al., 2009b; Yang et al., 2009; Buonamici et al., 2010; Low and de Sauvage, 2010). Početkom 2012. godine vismodegib (GDC-0499), sintetički inhibitor HH signalnog puta, je prvi lek iz grupe HH inhibitora odobren za terapiju bazocelularnog karcinoma. Ovaj mali molekul se selektivno vezuje za SMO protein i na taj način blokira unutarćelijsku signalnu kaskadu i inaktivira HH signalni put. Vismodegib je trenutno u kliničkim studijama za primenu u terapiji kolorektalnog karcinoma, karcinoma malih ćelija pluća, karcinoma pankreasa, meduloblastoma i hondrosarkoma.

Najnovija studija koja se bavi uticajem SHH signalnog puta na proliferaciju, preživljavanje i migraciju ćelija karcinoma grlića materice pokazuje da inhibiranjem puta ciklopaminom utičemo na ove procese (Samarzija and Beard, 2012). Osim toga, autori ove studije pokazuju da SHH ligand promoviše preživljavanje različitih ćelijskih linija poreklom od karcinoma grlića materice povećanjem njihove proliferacije i migracije (Samarzija and Beard, 2012).

Podaci prikazani u ovom radu pokazuju da tretman HeLa ćelija ciklopaminom dovodi do značajnog smanjenja proliferacije (do 75%), što je u skladu sa predhodno pomenutom studijom. U drugom, nezavisnom testu kojim se meri proliferacija i vijabilnost ćelija, ciklopamin dovodi do smanjenja vijabilnosti HeLa ćelija oko 60%. Poznato je da HH signalni put reguliše proliferaciju ćelija direktnom aktivacijom gena koji su uključeni u regulaciju ćelijskog ciklusa. Pokazano je da HH signalni put reguliše ekspresiju *c-Myc*, *l-Myc* i *n-Myc* gena (Berman et al., 2002). Takođe, *ciklinD1* i *ciklinD2*, geni bitni za proliferaciju ćelija i prelazak ćelija iz G1 u S fazu ćelijskog ciklusa, su pod kontrolom HH signalnog puta (Mill et al., 2003). Stoga je razumljivo da

inhibicija HH signalnog puta, za koga je pokazano da stimuliše proliferaciju ćelija, ima za posledicu smanjenje proliferacije HeLa ćelija.

Pored toga, u ovoj tezi je praćen uticaj ciklopamina na migraciju HeLa ćelija. Rezultati naših eksperimenata pokazuju da HeLa ćelije nakon tretmana ciklopaminom sporije migriraju u poređenju sa ćelijama tretiranim kontrolnim agansom. U brojnim studijama je pokazano da je aberantna aktivacija SHH signalnog puta usko povezana sa nastankom tumora, metastazom i tumorskom angiogenezom (Yoo et al., 2011; Yang et al., 2012; Chen et al., 2013a). Veliki broj autora pokazuje da molekularni mehanizmi, pomoću kojih SHH signalni put utiče na migraciju i invaziju ćelija uključuju regulaciju target gena kao što su E-kadherin i matriksne metaloproteinaze (MMP) koji učestvuju u remodelovanju tkiva regulišući na taj način procese neohodne za invaziju tumorskih ćelija i metastaze (Fan et al., 2014).

Osim efekta na pomenute procese, analizirana je uloga ciklopamina na endogenu ekspresiju *SOX18* gena. Premda je dokazano da GLI1 i GLI2 transkripcioni faktori učestvuju u regulaciji ekspresije *SOX18* gena, njihov uticaj ne govori o ulozi kanonskog HH signalnog puta u regulaciji ekspresije ovog SOX gena. GLI transkripcioni faktori mogu biti aktivirani raznim signalnim molekulima nezavisno od HH liganda, odnosno SMO receptora. Naime, pokazano je da TNF- α i TGF- β dovode do SMO-nezavisne aktivacije GLI transkripcionih faktora (Javelaud et al., 2012; Wang et al., 2012; Perrot et al., 2013). S obzirom da je ciklopamin selektivni inhibitor HH signalnog puta, smanjenje ekspresije *SOX18* gena pod dejstvom ciklopamina nedvosmisleno pokazuje da *SOX18* ekspresija u HeLa ćelijama zavisi od nivoa aktivnosti SHH signalne kaskade. Tačnije, može se reći da je transkripciona regulacija *SOX18* gena pod kontrolom kanonske HH-GLI signalne kaskade.

Uzimajući u obzir ulogu SOX18 proteina u kardiovaskularnom razviću i adultnoj neovaskularizaciji poslednjih godina ovaj transkripcioni faktor je označen kao potencijalan ciljnik molekula u terapiji različitih vrsta tumora, modulišući angiogenezu ili limfangiogenezu (Azhikina et al., 2011; Duong et al., 2012; Eom et al., 2012). Autori najnovije studije o ulozi SOX18 u invazivnom karcinomu dojke su pokazali da je povećana *SOX18* ekspresija primećena u tkivima sa najvišim stupnjem maligniteta i time povezana sa lošom prognozom, pa smatraju da nivo ekspresije ovog gena može

predstavljati prognostički marker (Pula et al., 2013). Osim toga u pomenutoj studiji je po prvi put pokazano da je *SOX18* eksprimiran ne samo u endotelu koji okružuje tumor već i u jedrima ćelija tumora. Takođe, *SOX18* gen je označen kao potencijalni prognostički marker u karcinomu jajnika, nakon što je imunohistihemijski detektovan povećan nivo ekspresije *SOX18* u ćelijama uznapredovalog stadijuma ovog tumora (Pula et al., 2014). Stoga inhibicija ekspresije *SOX18* gena ciklopaminom koji istovremeno utiče na procese bitne za progresiju tumora predstavlja ohrabrujući korak u potrazi za novim terapijskim pristupima.

5.4. Efekat modulacije SHH signalnog puta purmorfaminom u HeLa ćelijama

Purmorfamin predstavlja sintetički agonist HH signalnog puta (Sinha and Chen, 2006). Purmorfamin selektivno indukuje osteogenezu u multipotentnim mezenhimalnim progenitorskim ćelijama (Wu et al., 2004). Rezultati mikrorej analize su pokazali da osteogena aktivnost ćelija tretiranih purmorfaminom nastaje usled aktivacije HH signalnog puta (Wu et al., 2004). Ekspresione analize su pokazale da purmorfamin aktivira *PTCH1* i *GLI1* ali ne i HH ligande, *SHH*, *DHH* i *IHH*, čime je potvrđeno da je ovaj molekul agonist *SHH* signalnog puta i da deluje vezujući se za *SMO* receptor. Dokazano je i da purmorfamin smanjuje efekat ciklopamina i kompetira sa njim za *SMO* receptor (Beloti et al., 2005).

U eksperimentima koji su prikazani u ovom radu je pokazano da inhibicija *SHH* signalnog puta antagonistom *SMO* receptora dovodi do smanjenja proliferacije, vijabilnosti i migracije HeLa ćelija. Tretman ćelija agonistom doveo je do očekivanog, suprotnog efekta u istom model sistemu, dovodeći do povećanja broja ćelija za oko 30% i povećanja vijabilnost za oko 50%. Takođe, tretman purmorfaminom doveo je do povećanja migracije ćelija. Pored toga što su HeLa ćelije tretirane purmorfaminom brže popunjavale prazan prostor u oblasti povrede (eng. wound scratch), primećeno je da se veći broj pojedinačnih ćelija odvojio od konfluentnog sloja ćelija i samostalno migrirao u prazan prostor. Interesantna je činjenica da način pokretljivosti ćelija tumora može uticati na to da li će se širenje vršiti putem limfnog ili krvnog sistema (Giampieri et al.,

2009). Pokazano je da aktivacija TGF β signalnog puta koja se dešava u maloj populaciji ćelija tumora, promovira pokretljivost pojedinačnih ćelija koje zatim odlaze u krvotok. Suprotno, ćelije kod kojih ovaj signalni put nije aktiviran pokreću se zajedno, u frontu i ulaze u limfne sudove, pa se pretpostavlja da će način na koji ćelije tumora migriraju utiče na to da li će se širenje tumora postići krvnim ili limfnim sistemom. Tako ova studija naglašava da aktivirani TGF β signalni put dovodi do pokretljivosti pojedinačnih ćelija tumora koji će metastazirati putem krvi, za razliku od onih ćelija tumora koje nemaju aktiviran ovaj signalni put i koje će migrirati u frontu putem limfnog sistema (Giampieri et al., 2009). U experimentima prikazanim u ovom radu pokazano je da aktivacija SHH signalnog puta, najverovatnije, favorizuje migraciju pojedinačnih HeLa ćelija.

Kako je purmorfamin agonist SHH signalnog puta i svoje dejstvo ostvaruje direktno preko SMO receptora, tretman purmorfaminom je doveo do povećanja *SOX18* ekspresije u HeLa ćelijskoj liniji. Na ovaj način je pokazano da, nezavisno od liganda, aktivirana SHH signalna kaskada dovodi do povećanja *SOX18* ekspresije. S obzirom da purmorfamin dovodi do aktivacije transkripcije *GLI1* gena, a istovremeno dovodi do povećanja *SOX18* ekspresije još jednom se nameće zaključak da je regulacija ovog *SOX* gena pod kontrolom kanonskog HH-GLI signalnog puta.

5.5. Strategija primenjena za generisanje konstrukta koji eksprimira dominantno-negativni SOX18 protein

Sox18/SOX18 gen zajedno sa *Sox7/SOX7* i *Sox17/SOX17* pripada *SOXF* grupi ((Bowles et al., 2000) koja kodira transkripcione aktivatore (Hosking et al., 1995). Kao što je u uvodnom delu rečeno, humani *SOX18* gen kodira protein veličine 384 amino kiselina koji poseduje N-terminalni domen, DNK vezujući domen (HMG BOX domen), centralni transaktivacioni domen (central TAD) i C-terminalni domen u okviru koga je identifikovan transaktivacioni motiv od 9 aminokiselina (9aa TAD) (Hosking et al., 1995; Sandholzer et al., 2007) (Slika 21).

Članovi *SOXF* familije imaju ulogu u razviću vaskularnog sistema i u postnatalnoj neovaskularizaciji (Matsui et al., 2006; Cermenati et al., 2008). *Sox7*,

Sox17 and *Sox18* su tranzijentno koeksprimirani tokom embrionalnog razvića u nastajućim endotelijalnim ćelijama (Olsson et al., 2001; Fawcett and Klymkowsky, 2004; Cermenati et al., 2008). Uloga *SOX18* je otkrivena zahvaljujući poremećajima u razvoju vaskularnog sistema i dlake koji postoje kod prirodnih mišijih mutanata. Već je istaknuto da postoje četiri vrste prirodnih mutanata koji su označeni kao „ragged“ (Ra) miševi kod kojih je identifikovana delecija jednog baznog para i koje dovode do promene okvira čitanja. Kao rezultat ovih mutacija, dolazi do sinteze skraćenog proteina (Pennisi et al., 2000a; James et al., 2003). Ra (ragged), RaJ (ragged Jackson) i Ragl (raggedlike) miševi u homozigotnoj formi razvijaju edeme i vrlo brzo umiru, dok se heterozigoti odlikuju samo promenom krzna (Pennisi et al., 2000a; James et al., 2003). Četvrta vrsta RaOp (ragged opsum) u heterozigotnoj formi ima izražene fenotipske promene, kao homozigoti za Ra, RaJ i Ral mutacije, dok homozigoti imaju ozbiljne kardiovaskularne defekte i umiru *in utero* (Pennisi et al., 2000a). Pokazano je da RaOp miševi eksprimiraju dominantno-negativnu formu SOX18 proteina koja se vezuje za DNK ali ne ostvaruje interakciju sa partnerskim proteinom i time onemogućava aktivaciju ciljnih gena koji su odgovorni za kontrolu vaskularnog razvića. Prirodne mutacije u *SOX18* genu kod ljudi su povezane sa Hypotrichosis–lymphedema–telangiectasia sindromom (HLT) (Irrthum et al., 2003). Dve mutacije su recesivne, mapirane unutar HMG boks domena i dovode do aminokiselinske zamene, pa je onemogućeno vezivanje SOX18 transkripcionog faktora za DNK. Treća mutacija je dominantna i pogađa transaktivacioni domen SOX18 proteina. Ova mutacija dovodi do stvaranja preuranjenog stop kodona što za posledicu ima sintezu skraćenog proteina, sa smanjenom transaktivacionom funkcijom (Irrthum et al., 2003; Sandholzer et al., 2007).

U literaturi postoji mnogo podataka koji potvrđuju da SOXF proteini u kontroli vaskularizacije i u postnatalnoj angiogenezi ispoljavaju funkcionalnu redundantnost (Cermenati et al., 2008). Tako su *Sox18*^{-/-} miševi za razliku od *ragged* mutanata vijabilni i nemaju defekte kardiovaskularnog sistema. Funkcionalna redundantnost između *Sox7* i *Sox18* je pokazana tokom vaskularnog razvića zebrića (Cermenati et al., 2008), dok je funkcionalna redundantnost za *Sox17* i *Sox18* pokazana tokom ranog kardiovaskularnog razvića miševa (Sakamoto et al., 2007).

SOXF grupa gena nije jedina *SOX* genska familija koja pokazuje funkcionalnu redundantnost. Članovi *SOXB1* grupe, *SOX1*, *SOX2* i *SOX3* funkcionišu na redundantan način tokom razvoja centralnog nervnog sistema u neuralnim matičnim ćelijama (Miyagi et al., 2009). *Sox5* i *Sox6*, članovi *SOXD* genske familije, pokazuju funkcionalnu redundantnost tokom diferencijacije i proliferacije hondrocita (Smits et al., 2001). Članovi *SOXE* grupe, *SOX8*, *SOX9* i *SOX10* takođe pokazuju funkcionalnu redundantnost (Chaboissier et al., 2004; Barrionuevo and Scherer, 2010). Zbog svega navedenog proučavanje uloge *SOX* proteina utišavanjem pojedinačnih članova u okviru iste genske familije ne predstavlja dobru strategiju. Bolji pristup u proučavanju proteina čije se funkcije preklapaju predstavlja upotreba dominantno negativnog mutanta koji ima sposobnost da zauzme vezivno mesto u okviru promotora ciljog gena i onemogućiti vezivanje i *wild type* proteina ali i drugih u okviru iste grupe. U literaturi je opisano nekoliko primera upotrebe dominantno negativnih mutanata u proučavanju funkcije *SOX* proteina pri čemu je prikazano i nekoliko strategija za njegovo konstruisanje. Neki od načina se zasnivaju na uvođenju mutacija u DNK vezujući domen ili u okviru NLS (eng. nuclear localisation signal) koji je važan za transport u jedro (Li et al., 2007; Shih et al., 2010). Tako je pokazano da je kod *Sox3* mutanta zebrice, kod koga je mutacija uticala na DNK vezivanje, izostala sposobnost aktivacije 3xSX luciferaznog reporterskog konstrukta (Shih et al., 2010). Osim toga ovaj dominantno negativni mutant onemogućio je i *wild type Sox3* da aktivira ciljne gene (Shih et al., 2010). Mutacije koje pogađaju NLS, pozicionirane u okviru HMG box domena, kod mišijeg *Sox2* i *Sox3* kod zebrice funkcionišu na dominantno-negativan način (Li et al., 2007; Shih et al., 2010). Međutim, ovakvo konstruisani dominantno-negativni mutanti ne mogu da prevaziđu funkcionalnu redundantnost *SOX* proteina. Dobra strategija je konstruisanje mutanta koji ima očuvan DNK vezujući domen ali ne i transaktivacioni ili transrepresorni domen. Takav primer predstavlja *SOX10* mutant koji ima očuvan DNK vezujući domen, ali mu nedostaju K2 i transaktivacioni domen. Ovakav mutant sprečava transkripcionu aktivnost *wild type SOX10* proteina i ostale članove *SOXE* grupe da ga u funkciji nadomeste (Cossais et al., 2010).

Osim toga, uvođenje mutacija po uzoru na prirodne predstavlja još jednu strategiju u konstruisanju dominantno negativnog mutant. Za ovakav pristup su se opredelili Fontijn i saradnici, koji su generisali humani *SOX18* dominantno-negativni

mutant uvođenjem mutacije na isto mesto kao kod RaOp mišjeg ortologa, što je za posledicu imalo sintezu skraćenog SOX18 proteina. Skraćeni SOX18 protein je zadržao sposobnost vezivanja, usled očuvanog DNK vezujućeg domena, ali je imao smanjenu transaktivacionu sposobnost (Fontijn et al., 2008). Nekoliko prirodnih mutacija koje su kod SOX2 proteina povezane sa anoftalmijom, mikroftalmijom i hipogonadotropnim hipogonadizmom su dovele do sinteze skraćene forme ovog proteina koji ima nepromenjen DNK vezujući HMG box domen, ali narušen transaktivacioni domen (Kelberman et al., 2006). Premda su ovi SOX2 mutanti pokazali smanjenu transaktivacionu funkciju, ipak je izostao dominantno-negativni efekat u eksperimentima kotransfekcije sa *wild type* proteinom (Kelberman et al., 2006). Takođe, Chen i saradnici su pokazali da SOX2 mutant kome nedostaje C-terminalni domen i domen bogat serinom ima očuvanu transaktivacionu sposobnost (Chen et al., 2008).

U ovom radu je predstavljeno konstruisanje novog dominantno-negativnog SOX18 proteina, koje se oslanja na strategiju ponavljanja prirodnih mutacija. Dominantno negativni SOX18 ekspresioni vektor predstavljen u ovom radu konstruisan je delom po ugledu na prirodne mutacije kod čoveka i kodira protein koji se sastoji od N terminalog domena, kompletnog HMG BOX domen i malog dela centralnog transaktivacionog domena, dok mu ceo C-terminalni domena i veći deo centralnog transaktivacionog domena nedostaju. U odnosu na dominantno-negativni SOX18 protein nastao prirodnom mutacijom u transaktivacionom regionu kod čoveka, predstavljeni protein predstavlja do sada najkraću opisanu formu koja zadržava mogućnost vezivanja za ciljne DNK sekvence (Milivojevic et al., 2013). Uporedo sa njim napravljen je i konstrukt koji eksprimira *wild type* SOX18 protein (Milivojevic et al., 2013). *In vitro* esejima je ispitivana sposobnost vezivanja oba generisana konstrukta. Funkcionalnim analizama je potvrđeno da je nativni SOX18 protein snažan aktivator, dok skraćeni SOX18 mutantni protein funkcioniše na dominantno-negativni način uspešno funkcionalno kompetirajući sa *wild type* proteinom (Milivojevic et al., 2013).

5.6. Uticaj SOX18 proteina na proliferaciju, vijabilnost, migraciju HeLa ćelija kao i na ekspresiju komponenti SHH signalnog puta

Dosadašnji prikazani rezultati su pokazali da *SOX18* gen predstavlja novi target SHH signalne kaskade, kao i da je moguće modulirati njegovu ekspresiju hemijskim agensima koji istovremeno menjaju aktivnost SHH signalnog puta u HeLa ćelijama. Prirodno se nametnulo pitanje kakvu posledicu uzrokuje promena u *SOX18* ekspresiji u istom model sistemu? Do sada je u literaturi pokazano da *SOX18* gen ima ulogu u regulaciji razvića vaskularnog i limfnog sistema, folikula dlake, kao i u procesima angiogeneze. Njegova uloga u biologiji kancera je prevashodno bila povezana sa tumorskom angiogenezom, a sam *SOX18* je bio obeležen kao dobar target za potencijalne antiangiogenetske terapije kancera. Tek nedavno je uočeno da ekspresija *SOX18* gena kod tumora ne korelira samo sa krvnim sudovima koji se nalaze u blizini tumora, već je primećena u ćelijama samog tumora. Takođe, pokazano je da *SOX18* predstavlja marker na osnovu koga se može predvideti prognoza bolesti kao i odgovor na primenjenu terapiju (Pula et al., 2013; Pula et al., 2014).

Danas se zna da je uloga *SOX18* gena u indukovanom endotelu u regulaciji procesa angiogeneze. Angiogeneza podrazumeva modulacije u endotelijalnim ćelijama takve da omoguće njihovu proliferaciju, adheziju i migraciju. U Laboratoriji za humanu molekularnu genetiku je pokazano da vaskularni faktor rasta (VEGF), koji predstavlja glavni regulatorni molekul angiogeneze, u endotelijalnim ćelijama, dovodi do povećanja ekspresije *SOX18* gena (Petrovic et al., 2010b).

Ispitujući ulogu *SOX18* proteina u proliferaciji HeLa ćelija u ovom radu je zaključeno da povećanje njegove ekspresije ne doprinosi povećanju proliferacije i vijabilnosti HeLa ćelija, kao ni promeni u nivou ekspresije gena za *ciklinD1*. Do danas, uloga *SOX18* u proliferaciji tumora nije u potpunosti razjašnjena. U literaturi postoje primeri koji pokazuju da ekspresija mišijeg dominantno-negativnog *SOX18* (*SOX18RaOp*) pored toga što smanjuje proliferaciju HUVEC, primarne ćelijske linije poreklom od endotela humane umbilikalne vene, dovodi i do antiproliferativnog efekta kod MCF7 ćelija, permanentne ćelijske linije poreklom od karcinoma dojke (Young et

al., 2006). Pula i saradnici su, međutim, primetili da ekspresija SOX18 u ćelijama karcinoma dojke ne korelira sa veličinom samog tumora niti utiče na proliferaciju ćelija *in vitro* (Pula et al., 2013). Rezultati prikazani o ovoj tezi su u saglasnosti sa rezultatima Pula i saradnika i pokazuju da SOX18 protein ne utiče na proliferaciju i vijabilnost HeLa ćelija u kulturi.

Sa druge strane, predstavljeni rezultati pokazuju da je povećana *SOX18* ekspresija dovela do brže migracije HeLa ćelija. Sposobnost ćelije tumora da migriraju povezana je sa njihovom sposobnošću da dovedu do metastatskog širenja tumora, tako da se aktivacijom procesa migracije povećava maligni potencijal tumorskih ćelija. Promigratorni potencijal *SOX18* gena je predhodnih godina objašnjen u studiji Young i saradnika. U ovoj studiji je pokazano da MCF-7 ćelijske linije, poreklom od karcinoma dojke, stabilno transfektovane dominantno-negativnom formom *SOX18* gena (*SOX18* RaOp) imaju smanjenu migratornu sposobnost (Young et al., 2006). Osim toga, uspešno je pokazano da miševi koji eksprimiraju dominantno-negativnu formu SOX18 proteina, tj. imaju RaOP mutaciju, sporije razvijaju tumore (Young et al., 2006). Poznato je da se ekspresija *SOX18* gena ne može detektovati u endotelijalnim ćelijama limfnih sudova. U patološkim uslovima, kao što su zarastanje rana ili rast tumora, u kojima dolazi do aktivacije endotela koja uključuje proliferaciju i migraciju endotelijalnih ćelija, primećena ekspresija *SOX18* gena (Garcia-Ramirez et al., 2005). *SOX18* gen se pojačano eksprimira u endotelijalnih ćelijama koje se nalaze na granicama povreda i pokazano je da on učestvuje u indukciji angiogeneze tokom zarastanja rana (Darby et al., 2001). Kod miševa sa smanjenom SOX18 funkcijom utvrđeno je smanjene limfangiogeneza indukovana tumorom što je za posledicu imalo smanjenje brzine kojom ćelije tumora metastaziraju (Duong et al., 2012). Hosking i saradnici su pokazali da je VCAM-1, adhezioni molekul eksprimiran na membranama endotelijalnih ćelija važan u aktivaciji endotela, direktno regulisan SOX18 transkripcionim faktorom (Hosking et al., 2004). Pretpostavlja se da ova veza doprinosi remodelovanju limfnog sistema tokom tumorogeneze (Hosking et al., 2004). Kako je jedan od okarakterisanih ciljnih SOX18 gena MMP7, matriksna metaloproteinaza 7, enzim odgovoran za degradaciju ekstraćelijskog matriksa koja je primećena tokom invazije ćelija tumora i metastaze, može se pretpostaviti da SOX18 preko regulacije ovog enzima utiče na migraciju ćelija (Hoeth et al., 2012). Predhodno je, takođe, pokazano da SOX18

reguliše transkripciju kludina-5, proteina specifičnog za endotelijalne ćelije koji učestvuje u formiranju međućelijskih adhezionih veza i formiranju endotelijalne barijere (Fontijn et al., 2008). Nedavno je poznato da ovaj transkripcioni faktor utiče na pokretljivost ćelija karcinoma dojke (Escudero-Esparza et al., 2012). Na kraju, u rezultatima predstavljenim u ovoj tezi je pokazano da inhibicija SHH signalnog puta dovodi do smanjenja ekspresije *SOX18* gena kao i da narušava migratornu sposobnost HeLa ćelija. Istovremeno, povećanje ekspresije *SOX18* u HeLa ćelijama dovodi do stimulacije migracije ovih ćelija u kulturi. Do danas su identifikovani neki ciljni geni za koje se smatra da mogu biti odgovorni za SHH indukovanu migraciju ćelija kao što su E katerin i matriksne metaloproteinaze. Predstavljeni rezultati ukazuju da bi *SOX18* protein mogao da bude novi target gen odgovaran za transdukciju promigratornog signala od strane SHH signalne kaskade. Da li su promigratorna svojstva aktiviranog SHH signalnog puta sa jedne strane i *SOX18* proteina sa druge strane zaista u tesnoj funkcionalnoj vezi, treba da bude predmet daljih analiza.

U cilju daljeg ispitivanja uloge *SOX18* proteina u okviru SHH signalne kaskade pokazano je da povećana ekspresija *SOX18 wild type* dovodi do smanjenja nivoa ekspresije *GLI1*, *GLI2* i *GLI3* transkripcionih faktora i SHH liganda, dok se ekspresija gena za *PTCH* receptor nije promenila. Istovremeno, skraćena, dominantno-negativna forma *SOX18* nije dovela do promena u ekspresiji analiziranih SHH komponenti. Prikazani rezultati ukazuju da funkcionalna vezu između signalnog puta i *SOX18* transkripcionog faktora možda uključuje regulaciju negativnom povratnom spregom. Do danas nisu objavljeni podaci koji govore o represorskoj ulozi *SOX18* transkripcionog faktora. *SOX18* je protein sa definisanim transaktivacionim domenom i svi do sada identifikovani ciljni geni su pozitivno regulisani ovim transkripcionim faktorom (Hosking et al., 2001; Hosking et al., 2004; Fontijn et al., 2008; Hoeth et al., 2012). Zato se može pretpostaviti da je uočena represorska uloga *SOX18* u regulaciji pomenutih komponenti SHH kaskade indirektna, odnosno posredovana drugim regulatornim proteinima, koji se vezuje za regulatorne elemente ovih gena i reprimiraju njihovu ekspresiju. U literaturi postoje podaci o međusobnoj regulaciji *SOX* gena i komponenti SHH signalnog puta. U mozgu je *Shh* gen identifikovan kao veoma važan ciljni gen *Sox2* transkripcionog faktora. Sa druge strane, nizvodni efektori ovog signalnog puta, *Gli* proteini predstavljaju partnere *Sox2* transkripcionom faktorom u

aktivaciji *Nkx2.2* (NK2 homeobox 2), *Olig2* (oligodendrocyte transcription factor 2), *Nkx6.1* and *Nkx6.2*, koji su eksprimirani u neuralnim progenitorima u kičmenoj moždini ((Peterson et al., 2012)). Takođe, pokazano je da Sox2 i Sox3 na dozno-zavisian način regulišu ekspresiju *Shh* direktnim vezivanjem za njegove enhenserske regione u prednjem mozgu mišijih embriona ((Zhao et al., 2012))

U literaturi je poznato da su mnogi proteini koji su prvobitno identifikovani i okarakterisani kao veoma važni za kontrolu embrionalnog razvića takođe uključeni i u razvoj mnogih tumora. Pokazano je da SHH signalni put ima bitnu ulogu tokom ranog embrionalnog razvića, ali i tokom nastajanja i progresije tumora. Sa druge strane, poznato je da su SOX transkripcioni faktori uključeni u mnogobrojne procese tokom embrionalnog razvoja. Takođe, njihova uloga primećena je kod različiti vrsta tumora. Zbog toga nije neočekivano postojanje funkcionalne veze između *SOX* gena i SHH signalne kaskade u tumorima. Sve je veći broj radova koji prepoznaju *SOX* gene kao važne regulatore komponenti SHH signalne kaskade, ali i kao ciljne gene ovog signalnog puta tokom embrionalnog razvića. Pokazano je da SHH u neuralnim matičnim ćelijama hipokampusa ima ulogu medijatora Sox2 funkcije ((Favaro et al., 2009)). Eksperimentima hromatinske imunoprecipitacije na embrionalnim ćelijama mozga poreklom iz hipokampusa pokazano je da se SOX2 vezuje za tri od četiri ispitivana potencijalna mesta u okviru regulatornog regiona *SHH* gena, kao i da je SHH eksprimiran u *wild-type* neuralnim ćelijama u kulturi, dok se ekspresija gubi u Sox2 null ćelijama *in vitro* ((Favaro et al., 2009)). Takanaga i saradnici pokazuju da je Sox2 transkripcioni faktor, važan za održanje neuralnih matičnih ćelija telencefalona, regulisan SHH ligandom i da utišavanje ovog transkripcionog faktora skraćenom formom Gli2 regulatornog proteina inhibira ekspresiju *Sox2* i drugih markera pluripotentnosti (Takanaga et al., 2009). Rezultati eksperimenata sa embrionima pileta i miša pokazali su da je *Sox14* genska ekspresija zavisna od SHH signalnog molekula (Hargrave et al., 2000)

Istraživanja prikazana u ovoj tezi pokazuju da je ekspresija *SOX18* gena u *in vitro* tumorskom model sistemu regulisana SHH signalnim putem za koji je poznato da igra važnu ulogu u kancerogenezi. Predstavljeni rezultati ističu da je ekspresija *SOX18* gena u HeLa ćelijama pozitivno regulisana GLI1 i GLI2 transkripcionim faktorima, i da

je reč o transkripcionoj regulaciji kanonskom SHH-GLI signalnom kaskadom. Pokazano je da SOX18 transkripcioni faktor ne menja proliferaciju HeLa ćelija, ali značajno utiče na njihovu migratornu sposobnost. Konačno, uočeno je da SOX18 transkripcioni faktor takođe može da utiče na ekspresiju pojedinih komponenti SHH signalnog puta reprimirajući njihovu ekspresiju.

Mnogobrojni literaturni podaci dokazuju da je poremećaj SHH signalne kaskade uzrok razvoja i progresije različitih vrsta tumora. Međutim, SHH signalni put ne utiče samostalno na razvoj i progresiju tumora, već taj efekat ostvaruje u međusobnoj interakciji sa drugim signalnim putevima i regulatornim proteinima. Takođe, podaci najnovijih istraživanja navode da je ekspresija *SOX18* gena uočena kod invazivnih formi tumora dojke i ovarijuma što ukazuje da ovaj humani gen može imati važnu ulogu u nastanku i širenju malignih tumora.(Pula et al., 2013; Pula et al., 2014). Proučavanje međusobnih funkcionalnih odnosa SHH signalnog puta i SOX18 regulatornog proteina omogućiće bolje razumevanje složenih molekularnih mehanizama koji se nalaze u osnovi procesa kancerogeneze, zbog čega ovaj rad predstavlja važan doprinos u oblasti fundamentalnog istraživanja kancera.

6. ZAKLJUČCI

U ovoj tezi su prikazani rezultati koji doprinose razjašnjavanju uloge SHH signalnog puta u regulaciji ekspresije humanog *SOX18* gena u *in vitro* model sistemu karcinoma grlića materice. Analizirana je uloga GLI transkripcionih faktora, efektora SHH signalnog puta, u regulaciji transkripcije *SOX18* gena u HeLa ćelijskoj liniji. Osim toga ispitan je efekat modulacije SHH signalnog puta na proliferaciju, vijabilnost i migraciju HeLa ćelija. Sa druge strane, analiziran je uticaj *SOX18* proteina na ekspresiju komponenti SHH signalnog puta u HeLa ćelijskoj liniji, kao i na proliferaciju, vijabilnost i migraciju HeLa ćelija.

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

1. U okviru optimalnog promotora *SOX18* gena *in silico* analizom identifikovano je sedam potencijalnih vezivnih mesta za familiju GLI transkripcionih faktora. Analiza interakcije jedarnih proteina izolovanih iz HeLa ćelija sa DNK probama, koje obuhvataju potencijalna vezivna mesta za GLI transkripcione faktore, pokazano je da se GLI1 transkripcioni faktor specifično vezuje za tri potencijalna vezivna mesta u okviru regiona optimalnog *SOX18* promotora na pozicijama -289 do -285 i od -221 do -209 u odnosu na start transkripcije.
2. Funkcionalnom analizom je pokazano da povećana ekspresija GLI1 i GLI2 transkripcionih faktora dovodi do povećanja aktivnosti optimalnog *SOX18* promotor-reporterskog konstrukta u HeLa ćelijama. Povećana ekspresija GLI3 transkripcionog faktora ne dovodi do promene aktivnosti optimalnog *SOX18* promotor-reporterskog konstrukta u istom model sistemu. Zaključeno je da su transkripcioni faktori GLI1 i GLI2 pozitivni regulatori aktivnosti *SOX18* promotora.
3. Povećana ekspresija GLI1 i GLI2 transkripcionih faktora u HeLa ćelijama dovela je do povećanja ekspresije endogenog *SOX18* gena, kako na nivou RNK tako i na nivou proteina, potvrđujući aktivatorski uticaj ovih transkripcionih faktora na ekspresiju *SOX18* gena. Tranzijentna transfekcija istog model sistema GLI3

ekspresionim vektorom nije dovela do promene ekspresije endogenog *SOX18* gena na RNK i proteinskom nivou.

4. Tretman HeLa ćelija inhibitorom SHH signalnog puta, ciklopaminom, doveo je do smanjenja stepena proliferacije i smanjenja vijabilnosti HeLa ćelija. Osim toga pokazano je da modulacija SHH signalnog puta ciklopaminom smanjuje sposobnost migracije HeLa ćelija.

5. Tretman HeLa ćelija ciklopaminom doveo je do smanjenja ekspresije *SOX18* gena, na RNK i proteinskom nivou, čime je još jednom potvrđeno da SHH signalni put učestvuje u regulaciji ekspresije *SOX18* gena.

6. Aktivacija SHH signalnog puta purmorfaminom doveo je do povećanja stepena proliferacije i vijabilnosti HeLa ćelija. Takođe, tretman HeLa ćelija purmorfaminom povećao je stopu migracije HeLa ćelija.

7. Modulacijom SHH signalne kaskade purmorfaminom u HeLa ćelijskoj liniji detektovano je povećanje ekspresije *SOX18* gena.

8. Generisani su konstrukti koji ekspimiraju nativni, *wild type* kao i novi dominantno-negativni SOX18 protein, koji poseduje DNK vezujući domen i manji deo transaktivacionog domena. Pokazano je da generisani konstrukti efikasno ekspimiraju nativnu i skraćenu formu SOX18 proteina u HeLa model sistemu. Funkcionalnom analizom je potvrđeno da nativni SOX18 deluje kao transkripcioni aktivator, dok skraćeni SOX18 pokazuje dominantno-negativni efekat.

9. U okviru ovog rada pokazano je da povećana ekspresija native i skraćene forme SOX18 proteinne ne utiče na proliferaciju i vijabilnost HeLa ćelija. Sa druge strane, pojačana ekspresija *wild type* dovela je do povećanja sposobnosti migracije HeLa ćelija u poređenju sa pojačanom ekspresijom skraćenog SOX18 proteina.

10. Povećana ekspresija nativnog SOX18 proteina smanjuje ekspresiju *SHH* gena, kao i GLI1, GLI2 i GLI3 komponenti SHH signalne kaskade upućujući na postojanje potencijalne negativne povratne sprege.

LITERATURA

- Ahmed, KA, Xiang, J. 2011. Mechanisms of cellular communication through intercellular protein transfer. *J Cell Mol Med* 15: 1458-1473.
- Aida, M, Chen, Y, Nakajima, K, Yamaguchi, Y, Wada, T, Handa, H. 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.
- Alcedo, J, Ayzenzon, M, Von Ohlen, T, Noll, M, Hooper, JE. 1996. The *Drosophila* smoothed gene encodes a seven-pass membrane protein, a putative receptor for the hedgehog signal. *Cell* 86: 221-232.
- Allen, BL, Song, JY, Izzi, L, Althaus, IW, Kang, JS, Charron, F, Krauss, RS, McMahon, AP. 2011. Overlapping roles and collective requirement for the coreceptors GAS1, CDO, and BOC in SHH pathway function. *Dev Cell* 20: 775-787.
- Allen, BL, Tenzen, T, McMahon, AP. 2007. The Hedgehog-binding proteins Gas1 and Cdo cooperate to positively regulate Shh signaling during mouse development. *Genes Dev* 21: 1244-1257.
- Alvarez, JI, Dodelet-Devillers, A, Kebir, H, Ifergan, I, Fabre, PJ, Terouz, S, Sabbagh, M, Wosik, K, Bourbonniere, L, Bernard, M, van Horsen, J, de Vries, HE, Charron, F, Prat, A. 2011. The Hedgehog pathway promotes blood-brain barrier integrity and CNS immune quiescence. *Science* 334: 1727-1731.
- Apionishev, S, Katanayeva, NM, Marks, SA, Kalderon, D, Tomlinson, A. 2005. *Drosophila* Smoothed phosphorylation sites essential for Hedgehog signal transduction. *Nat Cell Biol* 7: 86-92.
- Azhikina, T, Kozlova, A, Skvortsov, T, Sverdlov, E. 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, Saito, T, Masuho, Y, Muramatsu, M. 2000. cDNA cloning, tissue expression, and chromosome mapping of human homolog of SOX18. *J Hum Genet* 45: 192-195.
- Bai, CB, Stephen, D, Joyner, AL. 2004. All mouse ventral spinal cord patterning by hedgehog is Gli dependent and involves an activator function of Gli3. *Dev Cell* 6: 103-115.

- Bai, R, Zhao, H, Zhang, X, Du, S. 2014. Characterization of sonic hedgehog inhibition in gastric carcinoma cells. *Oncol Lett* 7: 1381-1384.
- Bar, EE, Chaudhry, A, Lin, A, Fan, X, Schreck, K, Matsui, W, Piccirillo, S, Vescovi, AL, DiMeco, F, Olivi, A, Eberhart, CG. 2007. Cyclopamine-mediated hedgehog pathway inhibition depletes stem-like cancer cells in glioblastoma. *Stem Cells* 25: 2524-2533.
- Barrionuevo, F, Scherer, G. 2010. SOX E genes: SOX9 and SOX8 in mammalian testis development. *Int J Biochem Cell Biol* 42: 433-436.
- Beachy, PA, Cooper, MK, Young, KE, von Kessler, DP, Park, WJ, Hall, TM, Leahy, DJ, Porter, JA. 1997. Multiple roles of cholesterol in hedgehog protein biogenesis and signaling. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 62: 191-204.
- Beachy, PA, Karhadkar, SS, Berman, DM. 2004. Tissue repair and stem cell renewal in carcinogenesis. *Nature* 432: 324-331.
- Beloti, MM, Bellesini, LS, Rosa, AL. 2005. The effect of purmorphamine on osteoblast phenotype expression of human bone marrow mesenchymal cells cultured on titanium. *Biomaterials* 26: 4245-4248.
- Benayoun, BA, Veitia, RA. 2009. A post-translational modification code for transcription factors: sorting through a sea of signals. *Trends Cell Biol* 19: 189-197.
- Berman, DM, Karhadkar, SS, Hallahan, AR, Pritchard, JI, Eberhart, CG, Watkins, DN, Chen, JK, Cooper, MK, Taipale, J, Olson, JM, Beachy, PA. 2002. Medulloblastoma growth inhibition by hedgehog pathway blockade. *Science* 297: 1559-1561.
- Bernard, P, Harley, VR. 2010. Acquisition of SOX transcription factor specificity through protein-protein interaction, modulation of Wnt signalling and post-translational modification. *Int J Biochem Cell Biol* 42: 400-410.
- Bien-Willner, GA, Stankiewicz, P, Lupski, JR. 2007. SOX9^{cre1}, a cis-acting regulatory element located 1.1 Mb upstream of SOX9, mediates its enhancement through the SHH pathway. *Hum Mol Genet* 16: 1143-1156.
- Bitgood, MJ, Shen, L, McMahon, AP. 1996. Sertoli cell signaling by Desert hedgehog regulates the male germline. *Curr Biol* 6: 298-304.

- Boshart, M, Kluppel, M, Schmidt, A, Schutz, G, Luckow, B. 1992. Reporter constructs with low background activity utilizing the cat gene. *Gene* 110: 129-130.
- 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.
- Breathnach, R, Chambon, P. 1981. Organization and expression of eucaryotic split genes coding for proteins. *Annu Rev Biochem* 50: 349-383.
- Brennan, D, Chen, X, Cheng, L, Mahoney, M, Riobo, NA. 2012. Noncanonical Hedgehog signaling. *Vitam Horm* 88: 55-72.
- Buglino, JA, Resh, MD. 2008. What is a palmitoyltransferase with specificity for N-palmitoylation of Sonic Hedgehog. *J Biol Chem* 283: 22076-22088.
- Buonamici, S, Williams, J, Morrissey, M, Wang, A, Guo, R, Vattay, A, Hsiao, K, Yuan, J, Green, J, Ospina, B, Yu, Q, Ostrom, L, Fordjour, P, Anderson, DL, Monahan, JE, Kelleher, JF, Peukert, S, Pan, S, Wu, X, Maira, SM, Garcia-Echeverria, C, Briggs, KJ, Watkins, DN, Yao, YM, Lengauer, C, Warmuth, M, Sellers, WR, Dorsch, M. 2010. Interfering with resistance to smoothed antagonists by inhibition of the PI3K pathway in medulloblastoma. *Sci Transl Med* 2: 51ra70.
- Buttitta, L, Mo, R, Hui, CC, Fan, CM. 2003. Interplays of Gli2 and Gli3 and their requirement in mediating Shh-dependent sclerotome induction. *Development* 130: 6233-6243.
- Carter, T, P.R. 1954. Ragged, a semidominant coat texture mutant in the house mouse. *J Hered* 45: 151-154.
- Castillo, SD, Sanchez-Cespedes, M. 2012. The SOX family of genes in cancer development: biological relevance and opportunities for therapy. *Expert Opin Ther Targets* 16: 903-919.
- Cermenati, S, Moleri, S, Cimbri, S, Corti, P, Del Giacco, L, Amodeo, R, Dejana, E, Koopman, P, Cotelli, F, Beltrame, M. 2008. Sox18 and Sox7 play redundant roles in vascular development. *Blood* 111: 2657-2666.
- Chaboissier, MC, Kobayashi, A, Vidal, VI, Lutzkendorf, S, van de Kant, HJ, Wegner, M, de Rooij, DG, Behringer, RR, Schedl, A. 2004. Functional analysis of Sox8 and Sox9 during sex determination in the mouse. *Development* 131: 1891-1901.

- Che, J, Zhang, FZ, Zhao, CQ, Hu, XD, Fan, SJ. 2013. Cyclopamine is a novel Hedgehog signaling inhibitor with significant anti-proliferative, anti-invasive and anti-estrogenic potency in human breast cancer cells. *Oncol Lett* 5: 1417-1421.
- Chen, JS, Huang, XH, Wang, Q, Huang, JQ, Zhang, LJ, Chen, XL, Lei, J, Cheng, ZX. 2013a. Sonic hedgehog signaling pathway induces cell migration and invasion through focal adhesion kinase/AKT signaling-mediated activation of matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 in liver cancer. *Carcinogenesis* 34: 10-19.
- Chen, Q, Gao, G, Luo, S. 2013b. Hedgehog signaling pathway and ovarian cancer. *Chin J Cancer Res* 25: 346-353.
- Chen, Y, Li, S, Tong, C, Zhao, Y, Wang, B, Liu, Y, Jia, J, Jiang, J. 2010. G protein-coupled receptor kinase 2 promotes high-level Hedgehog signaling by regulating the active state of Smo through kinase-dependent and kinase-independent mechanisms in *Drosophila*. *Genes Dev* 24: 2054-2067.
- Chen, Y, Shi, L, Zhang, L, Li, R, Liang, J, Yu, W, Sun, L, Yang, X, Wang, Y, Zhang, Y, Shang, Y. 2008. The molecular mechanism governing the oncogenic potential of SOX2 in breast cancer. *J Biol Chem* 283: 17969-17978.
- Chen, Y, Struhl, G. 1996. Dual roles for patched in sequestering and transducing Hedgehog. *Cell* 87: 553-563.
- Chew, LJ, Gallo, V. 2009. The Yin and Yang of Sox proteins: Activation and repression in development and disease. *J Neurosci Res* 87: 3277-3287.
- Corbit, KC, Aanstad, P, Singla, V, Norman, AR, Stainier, DY, Reiter, JF. 2005. Vertebrate Smoothed functions at the primary cilium. *Nature* 437: 1018-1021.
- Cossais, F, Wahlbuhl, M, Kriesch, J, Wegner, M. 2010. SOX10 structure-function analysis in the chicken neural tube reveals important insights into its role in human neurocristopathies. *Hum Mol Genet* 19: 2409-2420.
- Cretnik, M, Musani, V, Oreskovic, S, Leovic, D, Levanat, S. 2007. The Patched gene is epigenetically regulated in ovarian dermoids and fibromas, but not in basocellular carcinomas. *Int J Mol Med* 19: 875-883.
- Curran, T, Ng, JM. 2008. Cancer: Hedgehog's other great trick. *Nature* 455: 293-294.

- Currie, PD, Ingham, PW. 1996. Induction of a specific muscle cell type by a hedgehog-like protein in zebrafish. *Nature* 382: 452-455.
- Dai, P, Akimaru, H, Tanaka, Y, Maekawa, T, Nakafuku, M, Ishii, S. 1999. Sonic Hedgehog-induced activation of the Gli1 promoter is mediated by GLI3. *J Biol Chem* 274: 8143-8152.
- Darby, IA, Bisucci, T, Raghoenath, S, Olsson, J, Muscat, GE, Koopman, P. 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, JE, Jr. 1982. Variety in the level of gene control in eukaryotic cells. *Nature* 297: 365-371.
- Das, S, Harris, LG, Metge, BJ, Liu, S, Riker, AI, Samant, RS, Shevde, LA. 2009. The hedgehog pathway transcription factor GLI1 promotes malignant behavior of cancer cells by up-regulating osteopontin. *J Biol Chem* 284: 22888-22897.
- De Maio, A, Vega, VL, Contreras, JE. 2002. Gap junctions, homeostasis, and injury. *J Cell Physiol* 191: 269-282.
- Denny, P, Swift, S, Brand, N, Dabhade, N, Barton, P, Ashworth, A. 1992. A conserved family of genes related to the testis determining gene, SRY. *Nucleic Acids Res* 20: 2887.
- Desclozeaux, M, Poulat, F, de Santa Barbara, P, Capony, JP, Turowski, P, Jay, P, Mejean, C, Moniot, B, Boizet, B, Berta, P. 1998. Phosphorylation of an N-terminal motif enhances DNA-binding activity of the human SRY protein. *J Biol Chem* 273: 7988-7995.
- Detmer, K, Thompson, AJ, Garner, RE, Walker, AN, Gaffield, W, Dannawi, H. 2005. Hedgehog signaling and cell cycle control in differentiating erythroid progenitors. *Blood Cells Mol Dis* 34: 60-70.
- Dignam, JD, Lebovitz, RM, Roeder, RG. 1983. Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei. *Nucleic Acids Res* 11: 1475-1489.
- Ding, Q, Fukami, S, Meng, X, Nishizaki, Y, Zhang, X, Sasaki, H, Dlugosz, A, Nakafuku, M, Hui, C. 1999. Mouse suppressor of fused is a negative regulator

- of sonic hedgehog signaling and alters the subcellular distribution of Gli1. *Curr Biol* 9: 1119-1122.
- Dlugosz, AA, Talpaz, M. 2009. Following the hedgehog to new cancer therapies. *N Engl J Med* 361: 1202-1205.
- Dong, C, Wilhelm, D, Koopman, P. 2004. Sox genes and cancer. *Cytogenet Genome Res* 105: 442-447.
- Downes, M, Koopman, P. 2001. SOX18 and the transcriptional regulation of blood vessel development. *Trends Cardiovasc Med* 11: 318-324.
- Dunaeva, M, Michelson, P, Kogerman, P, Toftgard, R. 2003. Characterization of the physical interaction of Gli proteins with SUFU proteins. *J Biol Chem* 278: 5116-5122.
- Duong, T, Proulx, ST, Luciani, P, Leroux, JC, Detmar, M, Koopman, P, Francois, M. 2012. Genetic ablation of SOX18 function suppresses tumor lymphangiogenesis and metastasis of melanoma in mice. *Cancer Res* 72: 3105-3114.
- Dvir, A, Conaway, JW, Conaway, RC. 2001. Mechanism of transcription initiation and promoter escape by RNA polymerase II. *Curr Opin Genet Dev* 11: 209-214.
- Echelard, Y, Epstein, DJ, St-Jacques, B, Shen, L, Mohler, J, McMahon, JA, McMahon, AP. 1993. Sonic hedgehog, a member of a family of putative signaling molecules, is implicated in the regulation of CNS polarity. *Cell* 75: 1417-1430.
- Eom, BW, Jo, MJ, Kook, MC, Ryu, KW, Choi, IJ, Nam, BH, Kim, YW, Lee, JH. 2012. The lymphangiogenic factor SOX 18: a key indicator to stage gastric tumor progression. *Int J Cancer* 131: 41-48.
- Epstein, E, Jr. 2001. Genetic determinants of basal cell carcinoma risk. *Med Pediatr Oncol* 36: 555-558.
- Ericson, J, Briscoe, J, Rashbass, P, van Heyningen, V, Jessell, TM. 1997. Graded sonic hedgehog signaling and the specification of cell fate in the ventral neural tube. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 62: 451-466.
- Ericson, J, Morton, S, Kawakami, A, Roelink, H, Jessell, TM. 1996. Two critical periods of Sonic Hedgehog signaling required for the specification of motor neuron identity. *Cell* 87: 661-673.

- Escudero-Esparza, A, Jiang, WG, Martin, TA. 2012. Claudin-5 is involved in breast cancer cell motility through the N-WASP and ROCK signalling pathways. *J Exp Clin Cancer Res* 31: 43.
- Fan, HX, Wang, S, Zhao, H, Liu, N, Chen, D, Sun, M, Zheng, JH. 2014. Sonic hedgehog signaling may promote invasion and metastasis of oral squamous cell carcinoma by activating MMP-9 and E-cadherin expression. *Med Oncol* 31: 41.
- Favaro, R, Valotta, M, Ferri, AL, Latorre, E, Mariani, J, Giachino, C, Lancini, C, Tosetti, V, Ottolenghi, S, Taylor, V, Nicolis, SK. 2009. Hippocampal development and neural stem cell maintenance require Sox2-dependent regulation of Shh. *Nat Neurosci* 12: 1248-1256.
- Fawcett, SR, Klymkowsky, MW. 2004. Embryonic expression of *Xenopus laevis* SOX7. *Gene Expr Patterns* 4: 29-33.
- Ferrell, RE, Kimak, MA, Lawrence, EC, Finegold, DN. 2008. Candidate gene analysis in primary lymphedema. *Lymphat Res Biol* 6: 69-76.
- Flores, O, Lu, H, Reinberg, D. 1992. Factors involved in specific transcription by mammalian RNA polymerase II. Identification and characterization of factor IIIH. *J Biol Chem* 267: 2786-2793.
- Fontijn, RD, Volger, OL, Fledderus, JO, Reijerkerk, A, de Vries, HE, Horrevoets, AJ. 2008. SOX-18 controls endothelial-specific claudin-5 gene expression and barrier function. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 294: H891-900.
- 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.
- Garcia-Ramirez, M, Martinez-Gonzalez, J, Juan-Babot, JO, Rodriguez, C, Badimon, L. 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.
- Ghosh, G, Van Duyne, GD. 1996. Pieces of the puzzle: assembling the preinitiation complex of Pol II. *Structure* 4: 891-895.
- Giampieri, S, Manning, C, Hooper, S, Jones, L, Hill, CS, Sahai, E. 2009. Localized and reversible TGFbeta signalling switches breast cancer cells from cohesive to single cell motility. *Nat Cell Biol* 11: 1287-1296.

- Gilchrist, DA, Nechaev, S, Lee, C, Ghosh, SK, Collins, JB, Li, L, Gilmour, DS, Adelman, K. 2008. NELF-mediated stalling of Pol II can enhance gene expression by blocking promoter-proximal nucleosome assembly. *Genes Dev* 22: 1921-1933.
- Girard, M, Goossens, M. 2006. Sumoylation of the SOX10 transcription factor regulates its transcriptional activity. *FEBS Lett* 580: 1635-1641.
- Goetz, SC, Anderson, KV. 2010. The primary cilium: a signalling centre during vertebrate development. *Nat Rev Genet* 11: 331-344.
- Goodrich, LV, Johnson, RL, Milenkovic, L, McMahon, JA, Scott, MP. 1996. Conservation of the hedgehog/patched signaling pathway from flies to mice: induction of a mouse patched gene by Hedgehog. *Genes Dev* 10: 301-312.
- Green, E, M.S. 1961. Opossum, a semi-dominant lethal mutation affecting hair and other characteristics of mice. *J Hered* 52: 223-227.
- Grindley, JC, Bellusci, S, Perkins, D, Hogan, BL. 1997. Evidence for the involvement of the Gli gene family in embryonic mouse lung development. *Dev Biol* 188: 337-348.
- Gubbay, J, Collignon, J, Koopman, P, Capel, B, Economou, A, Munsterberg, A, Vivian, N, Goodfellow, P, Lovell-Badge, R. 1990. A gene mapping to the sex-determining region of the mouse Y chromosome is a member of a novel family of embryonically expressed genes. *Nature* 346: 245-250.
- Hahn, H, Christiansen, J, Wicking, C, Zaphiropoulos, PG, Chidambaram, A, Gerrard, B, Vorechovsky, I, Bale, AE, Toftgard, R, Dean, M, Wainwright, B. 1996. A mammalian patched homolog is expressed in target tissues of sonic hedgehog and maps to a region associated with developmental abnormalities. *J Biol Chem* 271: 12125-12128.
- Hargrave, M, Karunaratne, A, Cox, L, Wood, S, Koopman, P, Yamada, T. 2000. The HMG box transcription factor gene Sox14 marks a novel subset of ventral interneurons and is regulated by sonic hedgehog. *Dev Biol* 219: 142-153.
- Harley, VR, Lovell-Badge, R, Goodfellow, PN. 1994. Definition of a consensus DNA binding site for SRY. *Nucleic Acids Res* 22: 1500-1501.

- Hasegawa, M, Hiraoka, Y, Hagiuda, J, Ogawa, M, Aiso, S. 2002. Expression and characterization of *Xenopus laevis* SRY-related cDNAs, xSox17alpha1, xSox17alpha2, xSox18alpha and xSox18beta. *Gene* 290: 163-172.
- Hattori, T, Eberspaecher, H, Lu, J, Zhang, R, Nishida, T, Kahyo, T, Yasuda, H, de Crombrughe, B. 2006. Interactions between PIAS proteins and SOX9 result in an increase in the cellular concentrations of SOX9. *J Biol Chem* 281: 14417-14428.
- Hausmann, G, von Mering, C, Basler, K. 2009. The hedgehog signaling pathway: where did it come from? *PLoS Biol* 7: e1000146.
- Hiraoka, Y, Ogawa, M, Sakai, Y, Kido, S, Aiso, S. 1998. The mouse Sox5 gene encodes a protein containing the leucine zipper and the Q box. *Biochim Biophys Acta* 1399: 40-46.
- Hoeth, M, Niederleithner, H, Hofer-Warbinek, R, Bilban, M, Mayer, H, Resch, U, Lemberger, C, Wagner, O, Hofer, E, Petzelbauer, P, de Martin, R. 2012. The transcription factor SOX18 regulates the expression of matrix metalloproteinase 7 and guidance molecules in human endothelial cells. *PLoS One* 7: e30982.
- Hokari, R, Kitagawa, N, Watanabe, C, Komoto, S, Kurihara, C, Okada, Y, Kawaguchi, A, Nagao, S, Hibi, T, Miura, S. 2008. Changes in regulatory molecules for lymphangiogenesis in intestinal lymphangiectasia with enteric protein loss. *J Gastroenterol Hepatol* 23: e88-95.
- Hooper, JE, Scott, MP. 1989. The *Drosophila* patched gene encodes a putative membrane protein required for segmental patterning. *Cell* 59: 751-765.
- Hosking, BM, Muscat, GE, Koopman, PA, Dowhan, DH, Dunn, TL. 1995. Trans-activation and DNA-binding properties of the transcription factor, Sox-18. *Nucleic Acids Res* 23: 2626-2628.
- Hosking, BM, Wang, SC, Chen, SL, Penning, S, Koopman, P, Muscat, GE. 2001. SOX18 directly interacts with MEF2C in endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 287: 493-500.
- Hosking, BM, Wang, SC, Downes, M, Koopman, P, Muscat, GE. 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, W, Zhou, X, Lefebvre, V, de Crombrughe, B. 2000. Phosphorylation of SOX9 by cyclic AMP-dependent protein kinase A enhances SOX9's ability to transactivate a Col2a1 chondrocyte-specific enhancer. *Mol Cell Biol* 20: 4149-4158.
- Huangfu, D, Anderson, KV. 2006. Signaling from Smo to Ci/Gli: conservation and divergence of Hedgehog pathways from Drosophila to vertebrates. *Development* 133: 3-14.
- Ikram, MS, Neill, GW, Regl, G, Eichberger, T, Frischauf, AM, Aberger, F, Quinn, A, Philpott, M. 2004. GLI2 is expressed in normal human epidermis and BCC and induces GLI1 expression by binding to its promoter. *J Invest Dermatol* 122: 1503-1509.
- Incardona, JP, Gruenberg, J, Roelink, H. 2002. Sonic hedgehog induces the segregation of patched and smoothed in endosomes. *Curr Biol* 12: 983-995.
- Ingham, PW, McMahon, AP. 2001. Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles. *Genes Dev* 15: 3059-3087.
- Ingham, PW, Taylor, AM, Nakano, Y. 1991. Role of the Drosophila patched gene in positional signalling. *Nature* 353: 184-187.
- Irrthum, A, Devriendt, K, Chitayat, D, Matthijs, G, Glade, C, Steijlen, PM, Fryns, JP, Van Steensel, MA, Vikkula, M. 2003. Mutations in the transcription factor gene SOX18 underlie recessive and dominant forms of hypotrichosis-lymphedema-telangiectasia. *Am J Hum Genet* 72: 1470-1478.
- Izzi, L, Levesque, M, Morin, S, Laniel, D, Wilkes, BC, Mille, F, Krauss, RS, McMahon, AP, Allen, BL, Charron, F. 2011. Boc and Gas1 each form distinct Shh receptor complexes with Ptch1 and are required for Shh-mediated cell proliferation. *Dev Cell* 20: 788-801.
- Jadon, G, Joshi, SK. 2012. Cervical Cancer. *Journal of Biomedical and Pharmaceutical Research* 1: 1-4.
- James, K, Hosking, B, Gardner, J, Muscat, GE, Koopman, P. 2003. Sox18 mutations in the ragged mouse alleles ragged-like and opossum. *Genesis* 36: 1-6.
- Javelaud, D, Pierrat, MJ, Mauviel, A. 2012. Crosstalk between TGF-beta and hedgehog signaling in cancer. *FEBS Lett* 586: 2016-2025.

- Jemal, A, Siegel, R, Ward, E, Hao, Y, Xu, J, Thun, MJ. 2009. Cancer statistics, 2009. *CA Cancer J Clin* 59: 225-249.
- Jenkins, D. 2009. Hedgehog signalling: emerging evidence for non-canonical pathways. *Cell Signal* 21: 1023-1034.
- Jia, H, Liu, Y, Xia, R, Tong, C, Yue, T, Jiang, J, Jia, J. 2010. Casein kinase 2 promotes Hedgehog signaling by regulating both smoothed and Cubitus interruptus. *J Biol Chem* 285: 37218-37226.
- Jia, H, Liu, Y, Yan, W, Jia, J. 2009. PP4 and PP2A regulate Hedgehog signaling by controlling Smo and Ci phosphorylation. *Development* 136: 307-316.
- Jia, J, Tong, C, Wang, B, Luo, L, Jiang, J. 2004. Hedgehog signalling activity of Smoothed requires phosphorylation by protein kinase A and casein kinase I. *Nature* 432: 1045-1050.
- Johnson, RL, Rothman, AL, Xie, J, Goodrich, LV, Bare, JW, Bonifas, JM, Quinn, AG, Myers, RM, Cox, DR, Epstein, EH, Jr., Scott, MP. 1996. Human homolog of patched, a candidate gene for the basal cell nevus syndrome. *Science* 272: 1668-1671.
- Johnson, RL, Scott, MP. 1998. New players and puzzles in the Hedgehog signaling pathway. *Curr Opin Genet Dev* 8: 450-456.
- Johnson, RL, Zhou, L, Bailey, EC. 2002. Distinct consequences of sterol sensor mutations in Drosophila and mouse patched homologs. *Dev Biol* 242: 224-235.
- Kasper, M, Regl, G, Frischauf, AM, Aberger, F. 2006. GLI transcription factors: mediators of oncogenic Hedgehog signalling. *Eur J Cancer* 42: 437-445.
- Katoh, Y, Katoh, M. 2005. Hedgehog signaling pathway and gastric cancer. *Cancer Biol Ther* 4: 1050-1054.
- Kelberman, D, Rizzoti, K, Avilion, A, Bitner-Glindzicz, M, Cianfarani, S, Collins, J, Chong, WK, Kirk, JM, Achermann, JC, Ross, R, Carmignac, D, Lovell-Badge, R, Robinson, IC, Dattani, MT. 2006. Mutations within Sox2/SOX2 are associated with abnormalities in the hypothalamo-pituitary-gonadal axis in mice and humans. *J Clin Invest* 116: 2442-2455.
- Kiefer, JC. 2007. Back to basics: Sox genes. *Dev Dyn* 236: 2356-2366.

- Kim, J, Kato, M, Beachy, PA. 2009. Gli2 trafficking links Hedgehog-dependent activation of Smoothened in the primary cilium to transcriptional activation in the nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 21666-21671.
- Kinzler, KW, Bigner, SH, Bigner, DD, Trent, JM, Law, ML, O'Brien, SJ, Wong, AJ, Vogelstein, B. 1987. Identification of an amplified, highly expressed gene in a human glioma. *Science* 236: 70-73.
- Kinzler, KW, Vogelstein, B. 1990. The GLI gene encodes a nuclear protein which binds specific sequences in the human genome. *Mol Cell Biol* 10: 634-642.
- Kogerman, P, Grimm, T, Kogerman, L, Krause, D, Uden, AB, Sandstedt, B, Toftgard, R, Zaphiropoulos, PG. 1999. Mammalian suppressor-of-fused modulates nuclear-cytoplasmic shuttling of Gli-1. *Nat Cell Biol* 1: 312-319.
- Kondoh, H, Kamachi, Y. 2010. SOX-partner code for cell specification: Regulatory target selection and underlying molecular mechanisms. *Int J Biochem Cell Biol* 42: 391-399.
- Kovacevic-Grujicic, N, Mojsin, M, Djurovic, J, Petrovic, I, Stevanovic, M. 2007. Comparison of promoter regions of SOX3, SOX14 and SOX18 orthologs in mammals. *DNA Seq* 19: 185-194.
- Krauss, G. 2008. *Biochemistry of Signal Transduction and Regulation*. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- Krauss, S, Concordet, JP, Ingham, PW. 1993. A functionally conserved homolog of the *Drosophila* segment polarity gene *hh* is expressed in tissues with polarizing activity in zebrafish embryos. *Cell* 75: 1431-1444.
- Kristiansen, K. 2004. Molecular mechanisms of ligand binding, signaling, and regulation within the superfamily of G-protein-coupled receptors: molecular modeling and mutagenesis approaches to receptor structure and function. *Pharmacol Ther* 103: 21-80.
- Kuhlbrodt, K, Herbarth, B, Sock, E, Hermans-Borgmeyer, I, Wegner, M. 1998. Sox10, a novel transcriptional modulator in glial cells. *J Neurosci* 18: 237-250.
- Kuwabara, PE, Labouesse, M. 2002. The sterol-sensing domain: multiple families, a unique role? *Trends Genet* 18: 193-201.
- Lai, K, Kaspar, BK, Gage, FH, Schaffer, DV. 2003. Sonic hedgehog regulates adult neural progenitor proliferation in vitro and in vivo. *Nat Neurosci* 6: 21-27.

- Laner-Plamberger, S, Kaser, A, Paulischta, M, Hauser-Kronberger, C, Eichberger, T, Frischauf, AM. 2009. Cooperation between GLI and JUN enhances transcription of JUN and selected GLI target genes. *Oncogene* 28: 1639-1651.
- Le, H, Kleinerman, R, Lerman, OZ, Brown, D, Galiano, R, Gurtner, GC, Warren, SM, Levine, JP, Saadeh, PB. 2008. Hedgehog signaling is essential for normal wound healing. *Wound Repair Regen* 16: 768-773.
- Lee, J, Platt, KA, Censullo, P, Ruiz i Altaba, A. 1997. Gli1 is a target of Sonic hedgehog that induces ventral neural tube development. *Development* 124: 2537-2552.
- Lefebvre, V, Dumitriu, B, Penzo-Mendez, A, Han, Y, Pallavi, B. 2007. Control of cell fate and differentiation by Sry-related high-mobility-group box (Sox) transcription factors. *Int J Biochem Cell Biol* 39: 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.
- Levin, M, Johnson, RL, Stern, CD, Kuehn, M, Tabin, C. 1995. A molecular pathway determining left-right asymmetry in chick embryogenesis. *Cell* 82: 803-814.
- Lewis, M, Burgess, R. 1982. Eukaryotic RNA polymerase. In: Boyer, PD (Ed.) *The Enzyme*. New York: Academic Press. p.
- Lewis, MT, Veltmaat, JM. 2004. Next stop, the twilight zone: hedgehog network regulation of mammary gland development. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 9: 165-181.
- Li, J, Pan, G, Cui, K, Liu, Y, Xu, S, Pei, D. 2007. A dominant-negative form of mouse SOX2 induces trophectoderm differentiation and progressive polyploidy in mouse embryonic stem cells. *J Biol Chem* 282: 19481-19492.
- Li, Y, Flanagan, PM, Tschochner, H, Kornberg, RD. 1994. RNA polymerase II initiation factor interactions and transcription start site selection. *Science* 263: 805-807.
- Lin, Q, Lu, J, Yanagisawa, H, Webb, R, Lyons, GE, Richardson, JA, Olson, EN. 1998. Requirement of the MADS-box transcription factor MEF2C for vascular development. *Development* 125: 4565-4574.

- Low, JA, de Sauvage, FJ. 2010. Clinical experience with Hedgehog pathway inhibitors. *J Clin Oncol* 28: 5321-5326.
- Lum, L, Yao, S, Mozer, B, Rovescalli, A, Von Kessler, D, Nirenberg, M, Beachy, PA. 2003. Identification of Hedgehog pathway components by RNAi in *Drosophila* cultured cells. *Science* 299: 2039-2045.
- Machold, R, Hayashi, S, Rutlin, M, Muzumdar, MD, Nery, S, Corbin, JG, Gritli-Linde, A, Dellovade, T, Porter, JA, Rubin, LL, Dudek, H, McMahon, AP, Fishell, G. 2003. Sonic hedgehog is required for progenitor cell maintenance in telencephalic stem cell niches. *Neuron* 39: 937-950.
- Maldonado, E, Ha, I, Cortes, P, Weis, L, Reinberg, D. 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.
- Mann, RK, Beachy, PA. 2004. Novel lipid modifications of secreted protein signals. *Annu Rev Biochem* 73: 891-923.
- Marigo, V, Davey, RA, Zuo, Y, Cunningham, JM, Tabin, CJ. 1996a. Biochemical evidence that patched is the Hedgehog receptor. *Nature* 384: 176-179.
- Marigo, V, Scott, MP, Johnson, RL, Goodrich, LV, Tabin, CJ. 1996b. Conservation in hedgehog signaling: induction of a chicken patched homolog by Sonic hedgehog in the developing limb. *Development* 122: 1225-1233.
- Marti, E, Bumcrot, DA, Takada, R, McMahon, AP. 1995. Requirement of 19K form of Sonic hedgehog for induction of distinct ventral cell types in CNS explants. *Nature* 375: 322-325.
- Martin, V, Carrillo, G, Torroja, C, Guerrero, I. 2001. The sterol-sensing domain of Patched protein seems to control Smoothed activity through Patched vesicular trafficking. *Curr Biol* 11: 601-607.
- Mas, C, Ruiz i Altaba, A. 2010. Small molecule modulation of HH-GLI signaling: current leads, trials and tribulations. *Biochem Pharmacol* 80: 712-723.
- Maston, GA, Evans, SK, Green, MR. 2006. Transcriptional regulatory elements in the human genome. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 7: 29-59.

- Matsui, T, Kanai-Azuma, M, Hara, K, Matoba, S, Hiramatsu, R, Kawakami, H, Kurohmaru, M, Koopman, P, Kanai, Y. 2006. Redundant roles of Sox17 and Sox18 in postnatal angiogenesis in mice. *J Cell Sci* 119: 3513-3526.
- Mavrich, TN, Jiang, C, Ioshikhes, IP, Li, X, Venters, BJ, Zanton, SJ, Tomsho, LP, Qi, J, Glaser, RL, Schuster, SC, Gilmour, DS, Albert, I, Pugh, BF. 2008. Nucleosome organization in the *Drosophila* genome. *Nature* 453: 358-362.
- McFerren, MA. 2006. Useful plants of dermatology. VIII. The false hellebore (*Veratrum californicum*). *J Am Acad Dermatol* 54: 718-720.
- Mertin, S, McDowall, SG, Harley, VR. 1999. The DNA-binding specificity of SOX9 and other SOX proteins. *Nucleic Acids Res* 27: 1359-1364.
- Milivojevic, M, Petrovic, I, Kovacevic-Grujicic, N, Popovic, J, Mojsin, M, Stevanovic, M. 2013. Construction and functional analysis of novel dominant-negative mutant of human SOX18 protein. *Biochemistry (Mosc)* 78: 1287-1292.
- Mill, P, Mo, R, Fu, H, Grachtchouk, M, Kim, PC, Dlugosz, AA, Hui, CC. 2003. Sonic hedgehog-dependent activation of Gli2 is essential for embryonic hair follicle development. *Genes Dev* 17: 282-294.
- Miyagi, S, Kato, H, Okuda, A. 2009. Role of SoxB1 transcription factors in development. *Cell Mol Life Sci* 66: 3675-3684.
- Motoyama, J, Milenkovic, L, Iwama, M, Shikata, Y, Scott, MP, Hui, CC. 2003. Differential requirement for Gli2 and Gli3 in ventral neural cell fate specification. *Dev Biol* 259: 150-161.
- Motoyama, J, Takabatake, T, Takeshima, K, Hui, C. 1998. Ptch2, a second mouse Patched gene is co-expressed with Sonic hedgehog. *Nat Genet* 18: 104-106.
- Murone, M, Rosenthal, A, de Sauvage, FJ. 1999. Hedgehog signal transduction: from flies to vertebrates. *Exp Cell Res* 253: 25-33.
- Nachtergaele, S, Whalen, DM, Mydock, LK, Zhao, Z, Malinauskas, T, Krishnan, K, Ingham, PW, Covey, DF, Siebold, C, Rohatgi, R. 2013. Structure and function of the Smoothed extracellular domain in vertebrate Hedgehog signaling. *Elife* 2: e01340.
- Niimi, T, Hayashi, Y, Futaki, S, Sekiguchi, K. 2004. SOX7 and SOX17 regulate the parietal endoderm-specific enhancer activity of mouse laminin alpha1 gene. *J Biol Chem* 279: 38055-38061.

- Okada, A, Charron, F, Morin, S, Shin, DS, Wong, K, Fabre, PJ, Tessier-Lavigne, M, McConnell, SK. 2006. Boc is a receptor for sonic hedgehog in the guidance of commissural axons. *Nature* 444: 369-373.
- Olsson, JE, Kamachi, Y, Penning, S, Muscat, GE, Kondoh, H, Koopman, P. 2001. Sox18 expression in blood vessels and feather buds during chicken embryogenesis. *Gene* 271: 151-158.
- Onishi, H, Katano, M. 2011. Hedgehog signaling pathway as a therapeutic target in various types of cancer. *Cancer Sci* 102: 1756-1760.
- Osaki, E, Nishina, Y, Inazawa, J, Copeland, NG, Gilbert, DJ, Jenkins, NA, Ohsugi, M, Tezuka, T, Yoshida, M, Semba, K. 1999. Identification of a novel Sry-related gene and its germ cell-specific expression. *Nucleic Acids Res* 27: 2503-2510.
- Palma, V, Lim, DA, Dahmane, N, Sanchez, P, Brionne, TC, Herzberg, CD, Gitton, Y, Carleton, A, Alvarez-Buylla, A, Ruiz i Altaba, A. 2005. Sonic hedgehog controls stem cell behavior in the postnatal and adult brain. *Development* 132: 335-344.
- Pan, X, Li, H, Zhang, P, Jin, B, Man, J, Tian, L, Su, G, Zhao, J, Li, W, Liu, H, Gong, W, Zhou, T, Zhang, X. 2006. Ubc9 interacts with SOX4 and represses its transcriptional activity. *Biochem Biophys Res Commun* 344: 727-734.
- Park, KS, Martelotto, LG, Peifer, M, Sos, ML, Karnezis, AN, Mahjoub, MR, Bernard, K, Conklin, JF, Szczepny, A, Yuan, J, Guo, R, Ospina, B, Falzon, J, Bennett, S, Brown, TJ, Markovic, A, Devereux, WL, Ocasio, CA, Chen, JK, Stearns, T, Thomas, RK, Dorsch, M, Buonamici, S, Watkins, DN, Peacock, CD, Sage, J. 2011. A crucial requirement for Hedgehog signaling in small cell lung cancer. *Nat Med* 17: 1504-1508.
- Pathi, S, Pagan-Westphal, S, Baker, DP, Garber, EA, Rayhorn, P, Bumcrot, D, Tabin, CJ, Blake Pepinsky, R, Williams, KP. 2001. Comparative biological responses to human Sonic, Indian, and Desert hedgehog. *Mech Dev* 106: 107-117.
- Pearse, RV, 2nd, Collier, LS, Scott, MP, Tabin, CJ. 1999. Vertebrate homologs of *Drosophila* suppressor of fused interact with the gli family of transcriptional regulators. *Dev Biol* 212: 323-336.

- Pennisi, D, Gardner, J, Chambers, D, Hosking, B, Peters, J, Muscat, G, Abbott, C, Koopman, P. 2000a. Mutations in Sox18 underlie cardiovascular and hair follicle defects in ragged mice. *Nat Genet* 24: 434-437.
- Pennisi, DJ, James, KM, Hosking, B, Muscat, GE, Koopman, P. 2000b. Structure, mapping, and expression of human SOX18. *Mamm Genome* 11: 1147-1149.
- Peralta-Zaragoza, O, Bermudez-Morales, VH, Perez-Plasencia, C, Salazar-Leon, J, Gomez-Ceron, C, Madrid-Marina, V. 2012. Targeted treatments for cervical cancer: a review. *Onco Targets Ther* 5: 315-328.
- Perrot, CY, Javelaud, D, Mauviel, A. 2013. Overlapping activities of TGF-beta and Hedgehog signaling in cancer: therapeutic targets for cancer treatment. *Pharmacol Ther* 137: 183-199.
- Peterson, KA, Nishi, Y, Ma, W, Vedenko, A, Shokri, L, Zhang, X, McFarlane, M, Baizabal, JM, Junker, JP, van Oudenaarden, A, Mikkelsen, T, Bernstein, BE, Bailey, TL, Bulyk, ML, Wong, WH, McMahon, AP. 2012. Neural-specific Sox2 input and differential Gli-binding affinity provide context and positional information in Shh-directed neural patterning. *Genes Dev* 26: 2802-2816.
- Petrovic, I, 2005. Ekspresija i analiza promotorskog regiona humanog SOX18 gena., Magistarski rad Biološki fakultet. Univerzitet u Beogradu, Beograd.
- Petrovic, I, Kovacevic-Grujicic, N, Stevanovic, M. 2009. ZBP-89 and Sp3 down-regulate while NF-Y up-regulates SOX18 promoter activity in HeLa cells. *Mol Biol Rep* 36: 993-1000.
- Petrovic, I, Kovacevic-Grujicic, N, Stevanovic, M. 2010a. Early growth response protein 1 acts as an activator of SOX18 promoter. *Exp Mol Med* 42: 132-142.
- Petrovic, I, Nikcevic, G, Zaric, J, Ruegg, C, Stevanovic, M. 2010b. VEGF and TNF up-regulate, NSAID down-regulate SOX18 protein level in HUVEC. *Cent Eur J Biol* 5: 427-434.
- Petrovic, I, Stevanovic, M. 2007. The human *SOX18* gene: expression analysis and characterization of its 5' flanking region. *Arch Biol Sci* 59: 267-272.
- Plotnikova, OV, Golemis, EA, Pugacheva, EN. 2008. Cell cycle-dependent ciliogenesis and cancer. *Cancer Res* 68: 2058-2061.

- Poh, A, Karunaratne, A, Kolle, G, Huang, N, Smith, E, Starkey, J, Wen, D, Wilson, I, Yamada, T, Hargrave, M. 2002. Patterning of the vertebrate ventral spinal cord. *Int J Dev Biol* 46: 597-608.
- Pola, R, Ling, LE, Silver, M, Corbley, MJ, Kearney, M, Blake Pepinsky, R, Shapiro, R, Taylor, FR, Baker, DP, Asahara, T, Isner, JM. 2001. The morphogen Sonic hedgehog is an indirect angiogenic agent upregulating two families of angiogenic growth factors. *Nat Med* 7: 706-711.
- Popovic, J, Klajn, A, Petrovic, I, Stevanovic, M. 2010. Tissue-specific Forkhead protein FOXA2 up-regulates SOX14 gene expression. *Biochim Biophys Acta* 1799: 411-418.
- Pula, B, Kobierzycki, C, Solinski, D, Olbromski, M, Nowak-Markwitz, E, Spaczynski, M, Kedzia, W, Zabel, M, Dziegiel, P. 2014. SOX18 Expression Predicts Response to Platinum-based Chemotherapy in Ovarian Cancer. *Anticancer Res* 34: 4029-4037.
- Pula, B, Olbromski, M, Wojnar, A, Gomulkiewicz, A, Witkiewicz, W, Ugorski, M, Dziegiel, P, Podhorska-Okolow, M. 2013. Impact of SOX18 expression in cancer cells and vessels on the outcome of invasive ductal breast carcinoma. *Cell Oncol (Dordr)* 36: 469-483.
- Rahnama, F, Shimokawa, T, Lauth, M, Finta, C, Kogerman, P, Teglund, S, Toftgard, R, Zaphiropoulos, PG. 2006. Inhibition of GLI1 gene activation by Patched1. *Biochem J* 394: 19-26.
- Rasmussen, EB, Lis, JT. 1993. In vivo transcriptional pausing and cap formation on three Drosophila heat shock genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 7923-7927.
- Regl, G, Neill, GW, Eichberger, T, Kasper, M, Ikram, MS, Koller, J, Hintner, H, Quinn, AG, Frischauf, AM, Aberger, F. 2002. Human GLI2 and GLI1 are part of a positive feedback mechanism in Basal Cell Carcinoma. *Oncogene* 21: 5529-5539.
- Remenyi, A, Lins, K, Nissen, LJ, Reinbold, R, Scholer, HR, Wilmanns, M. 2003. Crystal structure of a POU/HMG/DNA ternary complex suggests differential assembly of Oct4 and Sox2 on two enhancers. *Genes Dev* 17: 2048-2059.
- Riddle, RD, Johnson, RL, Laufer, E, Tabin, C. 1993. Sonic hedgehog mediates the polarizing activity of the ZPA. *Cell* 75: 1401-1416.

- Robbins, DJ, Fei, DL, Riobo, NA. 2012. The Hedgehog signal transduction network. *Sci Signal* 5: re6.
- Roberts, WM, Douglass, EC, Peiper, SC, Houghton, PJ, Look, AT. 1989. Amplification of the gli gene in childhood sarcomas. *Cancer Res* 49: 5407-5413.
- Roelink, H, Porter, JA, Chiang, C, Tanabe, Y, Chang, DT, Beachy, PA, Jessell, TM. 1995. Floor plate and motor neuron induction by different concentrations of the amino-terminal cleavage product of sonic hedgehog autoproteolysis. *Cell* 81: 445-455.
- Rohatgi, R, Milenkovic, L, Corcoran, RB, Scott, MP. 2009. Hedgehog signal transduction by Smoothened: pharmacologic evidence for a 2-step activation process. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 3196-3201.
- Rougvie, AE, Lis, JT. 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.
- Routh, MD, Zalucki, Y, Su, CC, Zhang, Q, Shafer, WM, Yu, EW. 2011. Efflux pumps of the resistance-nodulation-division family: a perspective of their structure, function, and regulation in gram-negative bacteria. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 77: 109-146.
- Roy, R, Schaeffer, L, Humbert, S, Vermeulen, W, Weeda, G, Egly, JM. 1994. The DNA-dependent ATPase activity associated with the class II basic transcription factor BTF2/TFIIH. *J Biol Chem* 269: 9826-9832.
- Rubin, LL, de Sauvage, FJ. 2006. Targeting the Hedgehog pathway in cancer. *Nat Rev Drug Discov* 5: 1026-1033.
- Rudin, CM, Hann, CL, Laterra, J, Yauch, RL, Callahan, CA, Fu, L, Holcomb, T, Stinson, J, Gould, SE, Coleman, B, LoRusso, PM, Von Hoff, DD, de Sauvage, FJ, Low, JA. 2009. Treatment of medulloblastoma with hedgehog pathway inhibitor GDC-0449. *N Engl J Med* 361: 1173-1178.
- Ruiz i Altaba, A. 1998. Combinatorial Gli gene function in floor plate and neuronal inductions by Sonic hedgehog. *Development* 125: 2203-2212.
- Ruiz i Altaba, A. 1999. Gli proteins encode context-dependent positive and negative functions: implications for development and disease. *Development* 126: 3205-3216.

- Ruiz i Altaba, A, Mas, C, Stecca, B. 2007. The Gli code: an information nexus regulating cell fate, stemness and cancer. *Trends Cell Biol* 17: 438-447.
- Ruiz i Altaba, A, Sanchez, P, Dahmane, N. 2002. Gli and hedgehog in cancer: tumours, embryos and stem cells. *Nat Rev Cancer* 2: 361-372.
- Ruppert, JM, Kinzler, KW, Wong, AJ, Bigner, SH, Kao, FT, Law, ML, Seunemann, HN, O'Brien, SJ, Vogelstein, B. 1988. The GLI-Kruppel family of human genes. *Mol Cell Biol* 8: 3104-3113.
- 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, Matsui, T, Miura, Y, Tsunekawa, N, Kurohmaru, M, Saijoh, Y, Koopman, P, Kanai, Y. 2007. Redundant roles of Sox17 and Sox18 in early cardiovascular development of mouse embryos. *Biochem Biophys Res Commun* 360: 539-544.
- Saldanha, G. 2001. The Hedgehog signalling pathway and cancer. *J Pathol* 193: 427-432.
- Samarzija, I, Beard, P. 2012. Hedgehog pathway regulators influence cervical cancer cell proliferation, survival and migration. *Biochem Biophys Res Commun* 425: 64-69.
- Sanchez, P, Clement, V, Ruiz i Altaba, A. 2005. Therapeutic targeting of the Hedgehog-GLI pathway in prostate cancer. *Cancer Res* 65: 2990-2992.
- Sanders, SL, Weil, PA. 2000. Identification of two novel TAF subunits of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* TFIID complex. *J Biol Chem* 275: 13895-13900.
- Sandholzer, J, Hoeth, M, Piskacek, M, Mayer, H, de Martin, R. 2007. A novel 9-amino-acid transactivation domain in the C-terminal part of Sox18. *Biochem Biophys Res Commun* 360: 370-374.
- Santini, R, Pietrobono, S, Pandolfi, S, Montagnani, V, D'Amico, M, Penachioni, JY, Vinci, MC, Borgognoni, L, Stecca, B. 2014. SOX2 regulates self-renewal and tumorigenicity of human melanoma-initiating cells. *Oncogene* 0.
- Sasaki, H, Hui, C, Nakafuku, M, Kondoh, H. 1997. A binding site for Gli proteins is essential for HNF-3beta floor plate enhancer activity in transgenics and can respond to Shh in vitro. *Development* 124: 1313-1322.

- Savare, J, Bonneaud, N, Girard, F. 2005. SUMO represses transcriptional activity of the *Drosophila* SoxNeuro and human Sox3 central nervous system-specific transcription factors. *Mol Biol Cell* 16: 2660-2669.
- Scales, SJ, de Sauvage, FJ. 2009. Mechanisms of Hedgehog pathway activation in cancer and implications for therapy. *Trends Pharmacol Sci* 30: 303-312.
- Schlierf, B, Ludwig, A, Klenovsek, K, Wegner, M. 2002. Cooperative binding of Sox10 to DNA: requirements and consequences. *Nucleic Acids Res* 30: 5509-5516.
- Schreiber, J, Sock, E, Wegner, M. 1997. The regulator of early gliogenesis glial cells missing is a transcription factor with a novel type of DNA-binding domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 4739-4744.
- Shih, YH, Kuo, CL, Hirst, CS, Dee, CT, Liu, YR, Laghari, ZA, Scotting, PJ. 2010. SoxB1 transcription factors restrict organizer gene expression by repressing multiple events downstream of Wnt signalling. *Development* 137: 2671-2681.
- Shin, SH, Kogerman, P, Lindstrom, E, Toftgard, R, Biesecker, LG. 1999. GLI3 mutations in human disorders mimic *Drosophila cubitus interruptus* protein functions and localization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 2880-2884.
- Silva-Vargas, V, Lo Celso, C, Giangreco, A, Ofstad, T, Prowse, DM, Braun, KM, Watt, FM. 2005. Beta-catenin and Hedgehog signal strength can specify number and location of hair follicles in adult epidermis without recruitment of bulge stem cells. *Dev Cell* 9: 121-131.
- Sinclair, AH, Berta, P, Palmer, MS, Hawkins, JR, Griffiths, BL, Smith, MJ, Foster, JW, Frischauf, AM, Lovell-Badge, R, Goodfellow, PN. 1990. A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature* 346: 240-244.
- Sinha, S, Chen, JK. 2006. Purmorphamine activates the Hedgehog pathway by targeting Smoothed. *Nat Chem Biol* 2: 29-30.
- Smale, ST, Kadonaga, JT. 2003. The RNA polymerase II core promoter. *Annu Rev Biochem* 72: 449-479.
- Smits, P, Li, P, Mandel, J, Zhang, Z, Deng, JM, Behringer, RR, de Crombrughe, B, Lefebvre, V. 2001. The transcription factors L-Sox5 and Sox6 are essential for cartilage formation. *Dev Cell* 1: 277-290.

- Stamatakis, D, Ulloa, F, Tsoni, SV, Mynett, A, Briscoe, J. 2005. A gradient of Gli activity mediates graded Sonic Hedgehog signaling in the neural tube. *Genes Dev* 19: 626-641.
- Stanojcic, S, Stevanovic, M. 2000. The human SOX18 gene: cDNA cloning and high resolution mapping. *Biochim Biophys Acta* 1492: 237-241.
- Stecca, B, Ruiz, IAA. 2010. Context-dependent regulation of the GLI code in cancer by HEDGEHOG and non-HEDGEHOG signals. *J Mol Cell Biol* 2: 84-95.
- Steg, A, Amm, HM, Novak, Z, Frost, AR, Johnson, MR. 2010. Gli3 mediates cell survival and sensitivity to cyclopamine in pancreatic cancer. *Cancer Biol Ther* 10: 893-902.
- Stone, DM, Hynes, M, Armanini, M, Swanson, TA, Gu, Q, Johnson, RL, Scott, MP, Pennica, D, Goddard, A, Phillips, H, Noll, M, Hooper, JE, de Sauvage, F, Rosenthal, A. 1996. The tumour-suppressor gene patched encodes a candidate receptor for Sonic hedgehog. *Nature* 384: 129-134.
- Strobl, LJ, 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.
- Strutt, H, Thomas, C, Nakano, Y, Stark, D, Neave, B, Taylor, AM, Ingham, PW. 2001. Mutations in the sterol-sensing domain of Patched suggest a role for vesicular trafficking in Smoothed regulation. *Curr Biol* 11: 608-613.
- Sturgeon, MC, Duffy, JM, Hoffman, RB, Lamerz, R, Fritsche, AH, Gaarenstroom, K, Bonfrer, GMJ, Ecke, T, Grossman, HB, Hayes, P, Hoffmann, TR, Lerner, PS, Lohe, F, Louhimo, J, Sawczuk, I, Taketa, K, Diamandis, PE. 2010. Tumor Markers in Cervical Cancer. In: Sturgeon, MC and Diamandis, PE Eds. *Use of Tumor Markers in Liver, Bladder,*

Cervical, and Gastric Cancers

Washington, DC.: American Association for Clinical Chemistry, Inc. p.

- Su, Y, Ospina, JK, Zhang, J, Michelson, AP, Schoen, AM, Zhu, AJ. 2011. Sequential phosphorylation of smoothed transduces graded hedgehog signaling. *Sci Signal* 4: ra43.

- Taipale, J, Beachy, PA. 2001. The Hedgehog and Wnt signalling pathways in cancer. *Nature* 411: 349-354.

- Takanaga, H, Tsuchida-Straeten, N, Nishide, K, Watanabe, A, Aburatani, H, Kondo, T. 2009. Gli2 is a novel regulator of sox2 expression in telencephalic neuroepithelial cells. *Stem Cells* 27: 165-174.
- Teglund, S, Toftgard, R. 2010. Hedgehog beyond medulloblastoma and basal cell carcinoma. *Biochim Biophys Acta* 1805: 181-208.
- Tenzen, T, Allen, BL, Cole, F, Kang, JS, Krauss, RS, McMahon, AP. 2006. The cell surface membrane proteins Cdo and Boc are components and targets of the Hedgehog signaling pathway and feedback network in mice. *Dev Cell* 10: 647-656.
- Thayer, SP, di Magliano, MP, Heiser, PW, Nielsen, CM, Roberts, DJ, Lauwers, GY, Qi, YP, Gysin, S, Fernandez-del Castillo, C, Yajnik, V, Antoniu, B, McMahon, M, Warshaw, AL, Hebrok, M. 2003. Hedgehog is an early and late mediator of pancreatic cancer tumorigenesis. *Nature* 425: 851-856.
- Thevenet, L, Mejean, C, Moniot, B, Bonneaud, N, Galeotti, N, Aldrian-Herrada, G, Poulat, F, Berta, P, Benkirane, M, Boizet-Bonhoure, B. 2004. Regulation of human SRY subcellular distribution by its acetylation/deacetylation. *EMBO J* 23: 3336-3345.
- Tran, DP, Kim, SJ, Park, NJ, Jew, TM, Martinson, HG. 2001. Mechanism of poly(A) signal transduction to RNA polymerase II in vitro. *Mol Cell Biol* 21: 7495-7508.
- Tremblay, MR, Lescarbeau, A, Grogan, MJ, Tan, E, Lin, G, Austad, BC, Yu, LC, Behnke, ML, Nair, SJ, Hagel, M, White, K, Conley, J, Manna, JD, Alvarez-Diez, TM, Hoyt, J, Woodward, CN, Sydor, JR, Pink, M, MacDougall, J, Campbell, MJ, Cushing, J, Ferguson, J, Curtis, MS, McGovern, K, Read, MA, Palombella, VJ, Adams, J, Castro, AC. 2009a. Discovery of a potent and orally active hedgehog pathway antagonist (IPI-926). *J Med Chem* 52: 4400-4418.
- Tremblay, MR, Nesler, M, Weatherhead, R, Castro, AC. 2009b. Recent patents for Hedgehog pathway inhibitors for the treatment of malignancy. *Expert Opin Ther Pat* 19: 1039-1056.
- Tsukui, T, Capdevila, J, Tamura, K, Ruiz-Lozano, P, Rodriguez-Esteban, C, Yonei-Tamura, S, Magallon, J, Chandraratna, RA, Chien, K, Blumberg, B, Evans, RM, Belmonte, JC. 1999. Multiple left-right asymmetry defects in *Shh*(^{-/-}) mutant

- mice unveil a convergence of the shh and retinoic acid pathways in the control of Lefty-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 11376-11381.
- Turner, BM, Birley, AJ, 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.
- van de Wetering, M, Oosterwegel, M, van Norren, K, Clevers, H. 1993. Sox-4, an Sry-like HMG box protein, is a transcriptional activator in lymphocytes. *EMBO J* 12: 3847-3854.
- van den Brink, GR. 2007. Hedgehog signaling in development and homeostasis of the gastrointestinal tract. *Physiol Rev* 87: 1343-1375.
- van den Heuvel, M, Ingham, PW. 1996. smoothed encodes a receptor-like serpentine protein required for hedgehog signalling. *Nature* 382: 547-551.
- van Nimwegen, E. 2003. Scaling laws in the functional content of genomes. *Trends Genet* 19: 479-484.
- Varjosalo, M, Taipale, J. 2008. Hedgehog: functions and mechanisms. *Genes Dev* 22: 2454-2472.
- Villavicencio, EH, Walterhouse, DO, Iannaccone, PM. 2000. The sonic hedgehog-patched-gli pathway in human development and disease. *Am J Hum Genet* 67: 1047-1054.
- Vokes, SA, Yatskievych, TA, Heimark, RL, McMahan, J, McMahan, AP, Antin, PB, Krieg, PA. 2004. Hedgehog signaling is essential for endothelial tube formation during vasculogenesis. *Development* 131: 4371-4380.
- Vortkamp, A, Gessler, M, Grzeschik, KH. 1995. Identification of optimized target sequences for the GLI3 zinc finger protein. *DNA Cell Biol* 14: 629-634.
- Wallrath, LL, Lu, Q, Granok, H, Elgin, SC. 1994. Architectural variations of inducible eukaryotic promoters: preset and remodeling chromatin structures. *Bioessays* 16: 165-170.

- Wang, B, Fallon, JF, Beachy, PA. 2000. Hedgehog-regulated processing of Gli3 produces an anterior/posterior repressor gradient in the developing vertebrate limb. *Cell* 100: 423-434.
- Wang, Y, Ding, Q, Yen, CJ, Xia, W, Izzo, JG, Lang, JY, Li, CW, Hsu, JL, Miller, SA, Wang, X, Lee, DF, Hsu, JM, Huo, L, Labaff, AM, Liu, D, Huang, TH, Lai, CC, Tsai, FJ, Chang, WC, Chen, CH, Wu, TT, Buttar, NS, Wang, KK, Wu, Y, Wang, H, Ajani, J, Hung, MC. 2012. The crosstalk of mTOR/S6K1 and Hedgehog pathways. *Cancer Cell* 21: 374-387.
- Wang, Y, McMahon, AP, Allen, BL. 2007. Shifting paradigms in Hedgehog signaling. *Curr Opin Cell Biol* 19: 159-165.
- Watkins, DN, Berman, DM, Burkholder, SG, Wang, B, Beachy, PA, Baylin, SB. 2003. Hedgehog signalling within airway epithelial progenitors and in small-cell lung cancer. *Nature* 422: 313-317.
- Wegner, M. 1999. From head to toes: the multiple facets of Sox proteins. *Nucleic Acids Res* 27: 1409-1420.
- Weiss, MA. 2001. Floppy SOX: mutual induced fit in hmg (high-mobility group) box-DNA recognition. *Mol Endocrinol* 15: 353-362.
- Winklmayr, M, Schmid, C, Laner-Plamberger, S, Kaser, A, Aberger, F, Eichberger, T, Frischauf, AM. 2010. Non-consensus GLI binding sites in Hedgehog target gene regulation. *BMC Mol Biol* 11: 2.
- Wissmuller, S, Kosian, T, Wolf, M, Finzsch, M, Wegner, M. 2006. The high-mobility-group domain of Sox proteins interacts with DNA-binding domains of many transcription factors. *Nucleic Acids Res* 34: 1735-1744.
- Wolf, I, Bose, S, Desmond, JC, Lin, BT, Williamson, EA, Karlan, BY, Koeffler, HP. 2007. Unmasking of epigenetically silenced genes reveals DNA promoter methylation and reduced expression of PTCH in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 105: 139-155.
- Wright, EM, Snopek, B, Koopman, P. 1993. Seven new members of the Sox gene family expressed during mouse development. *Nucleic Acids Res* 21: 744.
- Wu, X, Walker, J, Zhang, J, Ding, S, Schultz, PG. 2004. Purmorphamine induces osteogenesis by activation of the hedgehog signaling pathway. *Chem Biol* 11: 1229-1238.

- Wunderle, VM, Critcher, R, Ashworth, A, Goodfellow, PN. 1996. Cloning and characterization of SOX5, a new member of the human SOX gene family. *Genomics* 36: 354-358.
- Xie, J, Bartels, CM, Barton, SW, Gu, D. 2013. Targeting hedgehog signaling in cancer: research and clinical developments. *Onco Targets Ther* 6: 1425-1435.
- Xie, J, Johnson, RL, Zhang, X, Bare, JW, Waldman, FM, Cogen, PH, Menon, AG, Warren, RS, Chen, LC, Scott, MP, Epstein, EH, Jr. 1997. Mutations of the PATCHED gene in several types of sporadic extracutaneous tumors. *Cancer Res* 57: 2369-2372.
- Xuan, YH, Jung, HS, Choi, YL, Shin, YK, Kim, HJ, Kim, KH, Kim, WJ, Lee, YJ, Kim, SH. 2006. Enhanced expression of hedgehog signaling molecules in squamous cell carcinoma of uterine cervix and its precursor lesions. *Mod Pathol* 19: 1139-1147.
- Yang, H, Xiang, J, Wang, N, Zhao, Y, Hyman, J, Li, S, Jiang, J, Chen, JK, Yang, Z, Lin, S. 2009. Converse conformational control of smoothed activity by structurally related small molecules. *J Biol Chem* 284: 20876-20884.
- Yang, L, Su, X, Xie, J. 2012. Activation of Hedgehog pathway in gastrointestinal cancers. *Vitam Horm* 88: 461-472.
- Yang, L, Xie, G, Fan, Q, Xie, J. 2010. Activation of the hedgehog-signaling pathway in human cancer and the clinical implications. *Oncogene* 29: 469-481.
- Yao, S, Lum, L, Beachy, P. 2006. The ihog cell-surface proteins bind Hedgehog and mediate pathway activation. *Cell* 125: 343-357.
- Yauch, RL, Gould, SE, Scales, SJ, Tang, T, Tian, H, Ahn, CP, Marshall, D, Fu, L, Januario, T, Kallop, D, Nannini-Pepe, M, Kotkow, K, Marsters, JC, Rubin, LL, de Sauvage, FJ. 2008. A paracrine requirement for hedgehog signalling in cancer. *Nature* 455: 406-410.
- Yoo, YA, Kang, MH, Lee, HJ, Kim, BH, Park, JK, Kim, HK, Kim, JS, Oh, SC. 2011. Sonic hedgehog pathway promotes metastasis and lymphangiogenesis via activation of Akt, EMT, and MMP-9 pathway in gastric cancer. *Cancer Res* 71: 7061-7070.
- Young, N, Hahn, CN, Poh, A, Dong, C, Wilhelm, D, Olsson, J, Muscat, GE, Parsons, P, Gamble, JR, Koopman, P. 2006. Effect of disrupted SOX18 transcription factor

- function on tumor growth, vascularization, and endothelial development. *J Natl Cancer Inst* 98: 1060-1067.
- Zaphiropoulos, PG, Unden, AB, Rahnama, F, Hollingsworth, RE, Toftgard, R. 1999. PTCH2, a novel human patched gene, undergoing alternative splicing and up-regulated in basal cell carcinomas. *Cancer Res* 59: 787-792.
- Zawel, L, Reinberg, D. 1992. Advances in RNA polymerase II transcription. *Curr Opin Cell Biol* 4: 488-495.
- Zeitlinger, J, Stark, A, Kellis, M, Hong, JW, Nechaev, S, Adelman, K, Levine, M, Young, RA. 2007. RNA polymerase stalling at developmental control genes in the *Drosophila melanogaster* embryo. *Nat Genet* 39: 1512-1516.
- Zhang, W, Hong, M, Bae, GU, Kang, JS, Krauss, RS. 2011. Boc modifies the holoprosencephaly spectrum of Cdo mutant mice. *Dis Model Mech* 4: 368-380.
- Zhao, L, Yu, Y, Deng, C. 2014. Protein and mRNA expression of Shh, Smo and Gli1 and inhibition by cyclopamine in hepatocytes of rats with chronic fluorosis. *Toxicol Lett* 225: 318-324.
- Zhao, L, Zevallos, SE, Rizzoti, K, Jeong, Y, Lovell-Badge, R, Epstein, DJ. 2012. Disruption of SoxB1-dependent Sonic hedgehog expression in the hypothalamus causes septo-optic dysplasia. *Dev Cell* 22: 585-596.
- Zhou, JX, Jia, LW, Liu, WM, Miao, CL, Liu, S, Cao, YJ, Duan, EK. 2006. Role of sonic hedgehog in maintaining a pool of proliferating stem cells in the human fetal epidermis. *Hum Reprod* 21: 1698-1704.
- Zhu, H, Lo, HW. 2010. The Human Glioma-Associated Oncogene Homolog 1 (GLI1) Family of Transcription Factors in Gene Regulation and Diseases. *Curr Genomics* 11: 238-245.

BIOGRAFIJA

Milena C. Milivojević je rođena 16.11.1979. godine u Zaječaru. Diplomirala je 2005. godine na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, studijska grupa Molekularna biologija i fiziologija, smer Eksperimentalna biomedicina. Eksperimentalni deo diplomskog rada uradila je u Laboratoriji za humanu molekularnu genetiku, Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Univerziteta u Beogradu. Doktorske studije je upisala 2006. godine na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, studijski program Molekularna biologija. Iste godine je zaposlena u Laboratoriji za humanu molekularnu genetiku Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo Univerziteta u Beogradu. Zvanje istraživač-saradnik stiče 2010. godine. Do sada je objavila pet naučnih radova u časopisima od međunarodnog značaja, a rezultate svog rada predstavila i kroz 13 kongresnih saopštenja.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а Милена Ц. Миливојевић

број индекса Ю 060041

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Улога *Sonic hedgehog* сигналног пута у регулацији експресије *SOX18* гена у

HeLa ћелијама, као модел систему карцинома грлића материце

- 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, 29.08.2014



Прилог 2.

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

Име и презиме аутора Милена Ц. Миливојевић

Број индекса Ю 060041

Студијски програм Молекуларна биологија

Наслов рада Улога *Sonic hedgehog* сигналног пута у регулацији експресије
SOX18 гена у HeLa ћелијама, као модел систему карцинома грлића
материце

Ментор др Исидора Петровић и др Душанка Савић Павићевић

Потписани/а Милена Ц. Миливојевић

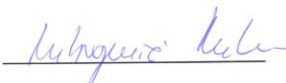
Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској
верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног
репозиторијума Универзитета у Београду**.

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, 29.08.2014.



Прилог 3.

Изјава о коришћењу

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

Улога *Sonic hedgehog* сигналног пута у регулацији експресије *SOX18* гена у

HeLa ћелијама, као модел систему карцинома грлића материце

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, 29.08.2014.



1. Ауторство - Дозвољавање 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. Дозвољавање 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. Дозвољавање 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. Дозвољавање 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. Дозвољавање 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. Дозвољавање 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.