

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Aleksandra BAJC

**SPREMLJANJE EKSPRESIJE GENA *SOX2* V
TUMORJIH UŠESA, NOSU IN ŽRELA**

MAGISTRSKO DELO

Univerzitetni študij – 2. stopnja Molekulska biologija

Ljubljana, 2013

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Aleksandra BAJC

**SPREMLJANJE EKSPRESIJE GENA *SOX2* V TUMORJIH UŠESA,
NOSU IN ŽRELA**

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študijski program – 2. stopnja Molekulska biologija

STUDY OF *SOX2* GENE EXPRESSION IN HEAD AND NECK TUMORS

M. SC. THESIS

Ljubljana, 2013

Magistrsko delo predstavlja zaključek magistrskega študija 2. stopnje Molekulska biologija. Vzorci so bili pridobljeni na Oddelku za otorinolaringologijo in maksilofacialno kirurgijo Univerzitetnega kliničnega centra Maribor, delo pa se je v celoti opravljalo v Laboratoriju za medicinsko genetiko Univerzitetnega kliničnega centra Maribor.

Študijska komisija Oddelka za biologijo je za mentorja magistrskega dela imenovala doc. dr. Jernejo Ambrožič Avguštin, za somentorja doc. dr. Špelo Stangler Herodež, za recenzenta pa prof. dr. Nadjo Kokalj Vokač.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Darja ŽGUR BERTOK

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: doc. dr. Jerneja AMBROŽIČ AVGUŠTIN

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: doc. dr. Špela STANGLER HERODEŽ

Univerza v Mariboru, Medicinska fakulteta, UKC Maribor

Član: prof. dr. Nadja KOKALJ VOKAČ

Univerza v Mariboru, Medicinska fakulteta, UKC Maribor

Datum zagovora: 6.12.2013

Magistrsko delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisana se strinjam z objavo svojega magistrskega dela na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je delo, ki sem ga oddala v elektronski obliki, identično tiskani verziji.

Aleksandra Bajc

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Du2
DK	
KG	ekspresija/povečano število kopij gena/RNA/ <i>sox2</i> /transkripcijski faktor/tumorji/ qRT-PCR
AV	BAJC, Aleksandra, dipl. biol. (UN)
SA	AMBROŽIČ AVGUŠTIN, Jerneja (mentor)/STANGLER HERODEŽ, Špela (somentor)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij molekulske biologije
LI	2013
IN	SPREMLJANJE EKSPRESIJE GENA <i>SOX2</i> V TUMORJIH UŠESA, NOSU IN ŽRELA
TD	Magistrsko delo (Magistrski študijski program – 2. stopnja)
OP	XIV, 52 str., 19 pregl., 11 sl., 2 pril., 165 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Tumorji ušesa, nosu in žrela spadajo med najpogostejša rakasta obolenja na svetu. V teh tumorjih je pogosto izražen gen <i>sox2</i> , čigar produkt je transkripcijski faktor, pomemben pri samoobnovi in ohranjanju pluripotence embrionalnih matičnih celic. Številni ga opisujejo kot onkogen, pa tudi kot tumorski označevalec, pomemben pri odkrivanju in prognozi bolezni, na podlagi katerega bi lahko razvili tarčno zdravljenje teh tumorjev. Namen našega dela je bil, da v tumorskih vzorcih kvantificiramo ekspresijo gena <i>sox2</i> po predhodno ugotovljenem povečanem številu kopij gena na kromosomu 3, z metodo FISH. Iz tumorskih vzorcev smo izolirali RNA, izmerili njeno koncentracijo ter jo z encimom reverzna transkriptaza prepisali v komplementarno DNA. Z metodo qRT-PCR smo kvantificirali ekspresijo gena <i>sox2</i> , pri čemer smo za referenčni gen uporabili gen za β -aktin, končne rezultate pa so predstavljala relativna razmerja koncentracij PCR-pomnožkov genov <i>sox2</i> / β -aktin. Ugotovili smo, da večje število kopij gena <i>sox2</i> , dokazano z metodo FISH, ne vpliva na povišanje ekspresije gena <i>sox2</i> . Sklepamo lahko, da ne obstaja enostavna povezava med številom kopij gena <i>sox2</i> in njegovo stopnjo ekspresije pri tumorjih s področja ušes, nosu in žrela.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Du2

DC

CX expression/gene amplification/RNA/*sox2*/transcriptional factor/tumors/qRT-PCR

AU BAJC, Aleksandra, dipl. biol. (UN)

AA AMBROŽIČ AVGUŠTIN, Jerneja (supervisor)/STANGLER HERODEŽ, Špela (co-advisor)

PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101

PB University of Ljubljana, Biotechnical faculty, Master Study Programmes-Molecular biology

PY 2013

TI STUDY OF *SOX2* GENE EXPRESSION IN HEAD AND NECK TUMORS

DT M. SC. Thesis (Master Study Programmes-Molecular biology)

NO XIV, 52 p., 19 tab., 11 fig., 2 ann., 165 ref.

LA sl

AL sl/en

AB Head and neck tumors are one of the most common tumors in the world. In these tumors, the *sox2* gene is often over-expressed. Its product is a transcriptional factor, important in self renewal and pluripotence of embryonic stem cells. Many describe it as an oncogene, as well as a molecular marker, important for detection and prognosis of disease. Therefore it could be useful for developing target cancer therapy of these tumors. In this study, we quantified *sox2* gene expression from tumor samples and healthy controls and looked for association with *sox2* gene copy number in the chromosome 3, detected with the FISH method. We have isolated RNA, measured its concentration and then transcribed it into complementary DNA with the enzyme reverse transcriptase. qRT-PCR method was used to quantify *sox2* and reference *β -aktin* gene expression. The final results are presented as relative ratios between *sox2* and *β -aktin*. We found that *sox2* gene copy number in the schromosome 3, detected with the FISH method, do not correlate with the increased expression of the *sox2* gene. A more complex mechanism may influence the *sox2* expression in addition to gene copy number in head and neck tumors.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO SLIK	VIII
KAZALO PREGLEDNIC	IX
KAZALO PRILOG	X
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XI
SLOVARČEK.....	XIII
1 UVOD	1
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 TUMORJI UŠESA, NOSU IN ŽRELA	3
2.1.1 Ploščatocelični karcinom.....	3
2.2 MOLEKULARNI MEHANIZMI KANCEROGENEZE.....	3
2.3 HIPOTEZE NASTANKA RAKA IN HETEROGENOSTI TUMORSKIH CELIC.....	4
2.3.1 Matične celice in nastanek rakaste matične celice.....	4
2.4 GEN <i>SOX2</i> KOT TUMORSKI OZNAČEVALEC	5
2.5 TRANSKRIPCIJSKI FAKTOR <i>Sox2</i>	6
2.5.1 Prepoznavanje ustrezne tarče gena <i>sox2</i> in regulacija njene transkripcije na celično specifični ravni	7
2.5.1.1 Prepoznavanje in regulacija transkripcijskih faktorjev Oct-4 in Utf1 v embrionalnih matičnih celicah in embrionalnih rakastih celicah	8
2.5.1.2 Prepoznavanje in regulacija transkripcijskih faktorjev Brn1, Brn2, Brn4 in Oct-6 v nevrlnih matičnih in progenitornih celicah.....	9
2.6 FUNKCIJE TRANSKRIPCIJSKEGA FAKTORJA <i>Sox2</i>	9
2.6.1 Funkcija transkripcijskega faktorja <i>Sox2</i> pri razvoju tkiv.....	9
2.6.2 Funkcija pri uravnavanju pluripotentnega stanja in samoobnove celic	10
2.6.3 Funkcija pri reprogramiranju diferenciranih odraslih celic v pluripotentne matične celice	12
2.7 GEN <i>SOX2</i> KOT TARČA GENETSKIH SPREMEMB.....	12
2.7.1 Gen <i>sox2</i> kot onkogen.....	13
2.8 METODI RAZISKOVANJA GENETSKIH SPREMEMB IN GENSKE EKSPRESIJE, KI SMO JU UPORABILI V MAGISTRSKI NALOGI	13

2.8.1	Fluorescentna <i>in situ</i> hibridizacija (angl. fluorescence <i>in situ</i> hybridisation-FISH)	13
2.8.2	Verižna reakcija s polimerazo v realnem času (qRT-PCR)	14
3	MATERIAL IN METODE	16
3.1	MATERIAL.....	16
3.1.1	Seznam uporabljenih kemikalij in laboratorijskega materiala	16
3.1.2	Tkivni vzorci	17
3.1.2.1	Pridobivanje tkivnih vzorcev	17
3.1.2.2	Pregled tkivnih vzorcev	17
3.2	METODE.....	20
3.2.1	Fluorescentna <i>in situ</i> hibridizacija	20
3.2.2	Izolacija RNA iz tkivnih vzorcev	20
3.2.2.1	Obdelava vode z DEPC (dietil pirokarbonat).....	20
3.2.2.2	Obdelava vzorcev z encimom DNaza	21
3.2.2.3	Potek izolacije RNA	21
3.2.3	Merjenje koncentracije izolirane RNA	22
3.2.4	Prepis RNA v komplementarno DNA (cDNA)	23
3.2.5	Verižna reakcija s polimerazo v realnem času	23
3.2.5.1	Osnove verižne reakcije s polimerazo v realnem času	23
3.2.5.2	Izvedba verižne reakcije s polimerazo v realnem času.....	24
3.2.5.2.1	Začetna faza izvedbe qRT-PCR: priprava standardov, vzorcev in negativnih kontrol za qRT-PCR	25
3.2.5.2.2	Končna faza izvedbe qRT-PCR.....	25
3.2.5.3	Relativna kvantifikacija rezultatov meritev ekspresije, dobljenih z metodo qRT-PCR.....	26
3.2.6	Analiza polimorfizma dolžin restrikcijskih fragmentov (RFLP)	27
3.2.6.1	Osnove metode RFLP.....	27
3.2.6.2	Namen uporabe metode RFLP	27
3.2.6.3	Izvedba restrikcije.....	27
3.2.6.4	Izvedba agarozne gelske elektroforeze.....	27
3.2.7	Statistična analiza	28
4	REZULTATI	29
4.1	REZULTATI ANALIZE EKSPRESIJE GENA <i>SOX2</i>	29
4.1.1	Primerjava ekspresije gena <i>sox2</i> med tumorji in zdravim tkivom	29

4.1.2	Primerjava ekspresije gena <i>sox2</i> glede na rezultate metode FISH	30
4.1.2.1	Pregled rezultatov metode FISH.....	30
4.1.2.2	Grafični prikaz ekspresije gena <i>sox2</i> glede na rezultate metode FISH	31
4.2	METODA RFLP	31
5	RAZPRAVA	33
6	SKLEPI.....	36
7	POVZETEK	37
8	VIRI	39
8.1	ELEKTRONSKI VIRI	51

KAZALO SLIK

Slika 1: Kromosom 3 z označeno lokacijo gena <i>sox2</i> (3q26.33).....	6
Slika 2: Arhitekturna vloga proteinov Sox	7
Slika 3: Oct-Sox in terciarna struktura kompleksa Oct-Sox-DNA.....	8
Slika 4: Interakcije različnih faktorjev z ojačevalcem Oct-Sox	11
Slika 5: Primer amplifikacijske krivulje	14
Slika 6: Princip delovanja barvila SYBR Green I	15
Slika 7: Shematični prikaz izolacije RNA iz tkiv	22
Slika 8: Standardna krivulja vzorcev s pomnoženim genom <i>sox2</i>	26
Slika 9: Primerjava relativnih razmerij povprečnih koncentracij PCR-pomnožkov genov <i>sox2/β-aktin</i> med tumorji in kontrolami	29
Slika 10: Primerjava relativnih razmerij povprečnih koncentracij PCR-pomnožkov genov <i>sox2/β-aktin</i> med tumorji, ki imajo več kopij gena <i>sox2</i> , in tumorji, pri katerih gen ni pomnožen	31
Slika 11: Slika agarozne elektroforeze restrikcijskih fragmentov pomnožkov qRT-PCR gena <i>sox2</i>	32

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Seznam uporabljene laboratorijske opreme.....	16
Preglednica 2: Seznam uporabljenih kemikalij in pufrov	16
Preglednica 3: Seznam uporabljenih kompletov	16
Preglednica 4: Seznam uporabljenih laboratorijskih pripomočkov.....	16
Preglednica 5: Seznam uporabljenih reagentov.....	17
Preglednica 6: Seznam tumorjev za izolacijo RNA	17
Preglednica 7: Razvrstitveni sistem UICC TNM za ORL-karcinome (prirejeno po Strojjan P., 2009:103).....	20
Preglednica 8: Funkcija pufrov, prisotnih v kompletu RNeasy® Mini Kitu (povzeto po RNeasy Mini Kit Handbook, 2010)	21
Preglednica 9: Reagenti v kompletu SuperScript® VILO™ cDNA Synthesis Kit in njihova sestava	23
Preglednica 10: Sestava reagenta Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (2X) in funkcija posameznih komponent.....	24
Preglednica 11: Nukleotidno zaporedje in T_m začetnih oligonukleotidov za pomnoževanje gena za β -aktin in pomnoževanje gena <i>sox2</i> v tkivnih vzorcih.....	24
Preglednica 12: Pripravljeni standardi in njihove koncentracije	25
Preglednica 13: Program qRT-PCR	25
Preglednica 14: Seznam uporabljenih restrikcijskih encimov in njihovo število restrikcijskih mest	27
Preglednica 15: Primerjava relativnih razmerij povprečnih koncentracij PCR-pomnožkov genov <i>sox2</i> / β -aktin med tumorji in zdravimi kontrolami.....	29
Preglednica 16: Statistični rezultati testa Mann-Whitney	30
Preglednica 17: Pregled rezultatov FISH	30
Preglednica 18: Primerjava relativnih razmerij povprečnih koncentracij PCR-pomnožkov genov <i>sox2</i> / β -aktin tumorjev glede na rezultat FISH.....	31
Preglednica 19: Statistični rezultati testa Mann-Whitney	31

KAZALO PRILOG

Priloga A: Prikaz restrikcijskih mest encimov, uporabljenih pri metodi RFLP

Priloga B: Rezultati qRT-PCR za referenčni gen β -*aktin* in gen *sox2*

Priloga C: Prikaz končnih rezultatov meritev (relativnih razmerij povprečnih koncentracij PCR pomnožkov genov *sox2*/ β -*aktin*)

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

Brn1	drugo ime za POU3F3 (angl. POU domain, class 3, transcription factor 3)
Brn2	drugo ime za POU3F2 (angl. POU class 3 homeobox 2)
Brn4	drugo ime za POU3F4 (angl. POU class 3 homeobox 4)
CCND1	ciklin D1 (angl. cyclin D1)
CDH1	katherin 1 (angl. cadherine 1)
cDNA	komplementarna deoksiribonukleinska kislina (angl. complementary deoxyribonucleic acid)
<i>c-myc</i>	angl. v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)
COX2	ciklooksigenaza 2 (angl. cyclooxygenase 2)
Ct	angl. cycle treshold, prag detekcije pri reakciji verižne reakcije s polimerazo v realnem času
DEPC	dietil polikarbonat (angl. diethylpyrocarbonate, IUPAC ime diethyl dicarbonate)
DNA	deoksiribonukleonska kislina (angl. deoxyribonucleic acid)
EGFR	receptor za epidermalni rastni faktor (angl. epidermal growth factor receptor)
Fbxo15	angl. F-box-protein 15
FGF4	fibroblastni rastni faktor 4 (angl. fibroblast growth factor 4)
FISH	fluorescentna in situ hibridizacija (angl. fluorescence in situ hybridization)
FRET	fluorescentni prenos resonančne energije (angl. fluorescent resonance energy transfer)
HMG	angl. high mobility group
Ki-67	antigen Ki-67 (angl. antigen identified by monoclonal antibody Ki-67)
Klf4	angl. Kruppel-like factor 4 (gut)
Lin28	angl. lin-28 homolog A
MMP	metaloproteinaze matriksa (angl. matrix methalloproteinases)
mRNA	informacijska RNA (angl. messenger RNA)
Nanog	angl. homeobox transcriptional factor Nanog
Nr2f2	angl. nuclear receptor subfamily 2, group F, member 2
Nr5a2	angl. nuclear receptor subfamily 5, group A, member 2
Oct-1	oktamer 1 (angl. octamer binding transcriptional factor 1)
Oct-4	oktamer 4 (angl. octamer binding transcriptional factor 4)
Oct-6	oktamer 6 (angl. octamer binding transcriptional factor 6)

p300	E1A vezavni protein p300 (angl. E1A binding protein p300)
p53	tumorski protein 53 (angl. tumor protein 53)
p63	tumorski protein 63 (angl. tumor protein 63)
Pax 6	angl. paired box 6
PCR	verižna reakcija s polimerazo (angl. polymerase chain reaction)
qRT-PCR	verižna reakcija s polimerazo v realnem času (angl. real time polymerase chain reaction)
RNA	ribonukleinska kislina (angl. ribonucleic acid)
Sox	angl. SRY-related HMG box
Sox2	angl. SRY (sex determining factor Y) box 2
Sox4	angl. SRY (sex determining factor Y) box 4
Sox11	angl. SRY (sex determining factor Y) box 11
Sox14	angl. SRY (sex determining factor Y) box 14
SRY	regija na kromosomu Y, povezana z določitvijo spola (angl. sex determining region Y)
Tcf3	angl. transcription factor 3 (E2A immunoglobulin enhancer binding factors E12/E47)
Utf1	transkripcijski faktor 1 nediferenciranih embrionalnih celic (angl. undifferentiated embryonic cell transcriptional factor 1)
VEGF	žilni endotelijski rastni faktor (angl. vascular endothelial growth factor)
Xpo4	eksportin 4
Lefty1	angl. left-right determination factor 1

SLOVARČEK

Amplifikacija, pomnoženost, povečano število kopij gena	Enkratna, ponavadi pa večkratna podvojitev gena v specifičnih celicah, ki lahko posledično zviša nivo transkripcije gena. Do tega pride zaradi odziva na razvojne signale ali vplive iz okolja.
Apoptoza	Proces programirane celične smrti celic.
Ekspresija gena	Izražanje nekega gena, pri čemer nastane funkcionalni produkt gena, ki je lahko RNA ali protein.
Blastocista	Nastane 5 do 7 dni po oploditvi in jo sestavljata notranja celična masa in trofoektoderm. Vsaka celica ali blastomera je totipotentna, torej se je vsaka sposobna razviti v svoj zarodek.
Embrionalne matične celice	Celice, ki se prve pojavijo pri razvoju človeka in izvirajo iz notranje celične mase v blastocisti. So pluripotentne in nespecializirane.
<i>In vitro</i>	Poskus ali proces, ki poteka v nadzorovanem okolju zunaj živega organizma, npr. v laboratoriju.
<i>In vivo</i>	Poskus ali proces, ki poteka znotraj živega organizma. Predvsem kadar želimo preveriti vpliv določenih substanc na organizem.
Kancerogeneza	Razvoj in nastanek maligne novotvorbe.
Karcinom	Novotvorba malignih celic, ki izvirajo iz celic povrhnjice.
Neoplazma	Drugi izraz za novotvorbo oziroma tumor.
Nesmiselna mutacija	O tej mutaciji govorimo, kadar pride do spremembe smiselnega kodona v nesmiselni stop kodon. Translacija se ustavi in s tem je polipeptidna veriga krajša.
Nevralne matične celice	Tkivno specifične matične celice, ki jih najdemo predvsem v sprednjih lateralnih ventriklih in hipokampusu.
Odrasle matične celice	Matične celice odraslih tkiv, ki proizvajajo omejeno skupino specializiranih celic in sčasoma izgubijo svojo vitalnost. Najdemo jih predvsem v kostnem mozgu in maščobnem tkivu.
Ojačevalec	Zaporedje, oddaljeno od osrednjega dela promoterja, na katerega se vežejo transkripcijski faktorji.
Onkogen	Gen, ki je pogosto mutiran protoonkogen oziroma produkt gena, ki nadzoruje celične delitve in celično

	rast, njegova povišana ekspresija pa lahko vodi do nastanka raka.
Pluripotenca	Sposobnost celic, da se razvijejo v vse celične tipe oziroma se diferencirajo v katerokoli od treh zarodnih plasti.
Progenitorne matične celice	Prehodne matične celice so že linijsko usmerjene in jih lahko enačimo z unipotentnimi celicami, ki so se zmožne diferencirati v le en celični tip.
Promotor	Mesto vezave encima RNA-polimeraze oziroma osnovnega transkripcijskega aparata, ki omogoči prepis mRNA.
Protoonkogen	Gen z zapisom za proteine, ki navadno sodelujejo pri celični regulaciji, z mutacijo pa se lahko spremeni v onkogen.
Domena POU	Zaporedje 160 aminokislin, ki je zelo ohranjeno pri oktamernih transkripcijskih faktorjih.
Sinergija	Medsebojno sodelovanje, dopolnjevanje dveh ali več snovi.
Transkripcijski faktor	Beljakovina, potrebna za začetek transkripcije, ki se specifično povezuje z DNA in drugimi transkripcijskimi faktorji.
Tumorogeneza	Proces nastajanja tumorja.
Tumor supresorski gen	Geni z zapisom za proteine, ki sodelujejo pri uravnavi celičnega cikla in ekspresiji protoonkogenov. Če mutira ali je izgubljen, vodi to v povišano stopnjo celičnih delitev in do nastanka raka.

1 UVOD

Tumorji glave in vratu so eni izmed najpogostejših tumorjev v svetu, povezani z nizko stopnjo preživetja in visoko obolevnostjo (Jemal A. in sod., 2007; Parkin D.M. in sod., 1999). Zanje je značilna agresivna rast in pomanjkanje očitnih, zgodnjih simptomov (Lehnerdt G.F. in sod., 2008). Čeprav je 5-letna stopnja preživetja, s pomočjo standardnega zdravljenja z operacijo in pooperativnim obsevanjem, 40 do 50-odstotna, je večina teh tumorjev ob postavitvi diagnoze neodstranljivih zaradi napredovanja v okoliško tkivo (Ozer E. in sod., 2006).

Če upoštevamo hipotezo rakaste matične celice, lahko tumor obravnavamo kot skupino celic, ki so nastale iz matične celice, imenovane rakasta matična celica, ali njenih zgodnjih potomk. Vsak tumor namreč vsebuje majhno podskupino celic, ki imajo sposobnost samoobnove in diferenciacije v več linij. Takšne celice so lahko vir vseh malignih celic v primarnem tumorju, lahko predstavljajo zasnove za oddaljene metastaze ali predstavljajo skupino celic, odpornih na zdravila, zato jih povezujejo s kancerogenezo, z zasevanjem in ponovnim pojavom tumorjev (Jordan C.T. in sod., 2006; Reya T. in sod., 2001). Rakaste matične celice so bile odkrite v različnih solidnih tumorjih, kot so rak dojke in rak črevesa (Al-Hajj M. in sod. 2003; O'Brien C.A. in sod. 2007), v njih pa so dokazali prisotnost in povišano ekspresijo gena *sox2* tako na nivoju mRNA kot na nivoju proteinov (Masui S. in sod., 2007).

Gen *sox2* ima zapis za enega pomembnejših transkripcijskih faktorjev, ki lahko omogoči, da se odrasle celice reprogramirajo in postanejo pluripotentne matične celice, hkrati pa vzdržuje njihov proliferativni potencial (Bani-Yaghoub M. in sod., 2006). Raziskave na področju RNA-interference so pokazale, da je gen *sox2* pomemben pri razvoju požiralnika, saj sodeluje pri proliferaciji in neodvisni rasti celičnih linij požiralnika. Izražen je tudi v tumorjih požiralnika, ki kažejo tako zasnove zarodne diferenciacije kot tudi pluripotentnost, zato ga označujemo kot onkogen teh tumorjev (Bass A.J. in sod., 2009). Gen *sox2* uravnava tudi delovanje drugih onkogenov, kot je npr. Wnt, hkrati pa igra pomembno vlogo pri kancerogenezi in napredovanju tumorjev ušesa, nosu in žrela. Lahko bi se uporabljal kot molekularni marker bolezni in posledično za razvoj tarčnega zdravljenja ter kot indikator prognoze bolezni (Chen S. in sod., 2012).

Tarčno zdravljenje dobiva vedno večji pomen na področju zdravljenja tumorjev. Predpogoj je pravilno določena tarča v tumorju vsakega bolnika, čemur sledi razvoj proti njej usmerjenega specifičnega zdravila. Pomembno je, da tarčo dobro poznamo, da ugotovimo, ali je prisotna specifična mutacija tarče ali pa je prisotna samo prekomerna ekspresija tarče (Ge N. in sod., 2010).

Prisotnost in ekspresijo gena *sox2* lahko določamo z metodama fluorescentne *in situ* hibridizacije (FISH) in z verižno reakcijo s polimerazo v realnem času (qRT-PCR). FISH omogoča oceno celic v interfazi in zaznavo sprememb na kromosomu oziroma v genu, ki jih z običajno citogenetsko preiskavo ne ugotovimo, medtem ko je qRT-PCR uveljavljena nadgradnja standardne PCR-tehnologije, ki omogoča spremljanje pomnoževanja določenega odseka DNA, s tem pa natančno merjenje količine produktov (ugotavljanje

števila kopij gena, kvantificiranje količine RNA). Na področju onkologije se tehnologija qRT-PCR lahko uporablja za natančno oceno displastičnih sprememb v tumorju. Pridobljeni podatki prispevajo k diagnostičnemu dokazovanju bolezni, klasifikaciji vrste tumorja, oceni sposobnosti za zasevanje, prognozi bolezni, načrtovanju terapije, izbiri kemoterapije, spremljanju terapije in postterapevtskemu nadzoru bolezni (Yasuyuki G.in sod., 2010).

Namen raziskave je bil, da z metodo qRT-PCR kvantificiramo ekspresijo gena *sox2* v vzorcih tumorjev ušesa, nosu in žrela. Želeli smo dokazati povišano ekspresijo gena *sox2* v teh tumorjih in ugotoviti, ali obstaja povezava med povečanim številom kopij gena *sox2* na kromosomu 3 in njegovo stopnjo ekspresije.

Naša hipoteza pravi, da lahko metodo qRT-PCR uporabljamo za kvantifikacijo ekspresije genov oziroma za natančno analizo količine RNA. S tem lahko dokažemo, da je v primerjavi z zdravim tkivom, povišana ekspresija gena *sox2* prisotna le v tumorskih celicah ušesa, nosu in žrela.

2 PREGLED OBJAV

2.1 TUMORJI UŠESA, NOSU IN ŽRELA

V Sloveniji zbolijo za tumorji ušesa, nosu in žrela vsako leto približno 450 ljudi, predvsem moških po 50. letu starosti (Strojan P. in Zakotnik B., 2010). Po pogostnosti se ti tumorji uvrščajo na 6. mesto v svetu, incidenca pa se v zadnjem obdobju bistveno ne spreminja. Za tovrstne tumorje je značilna agresivna rast, saj pri skoraj polovici bolnikov zasledimo prisotnost področnih zasevkov, bolniki pa pogosto ponovno zbolijo še za enim rakom. Najpomembnejša dejavnika tveganja še vedno ostajata alkohol in tobak, ki ob sočasnem konzumiranju delujeta sinergično (Strojan P. in sod., 2009: 254-271).

2.1.1 Ploščatocelični karcinom

Večino, kar 90 odstotkov tumorjev področja ušesa, nosu in žrela, predstavljajo ploščatocelični karcinomi (Parkin D.M., 2001). Predstavljajo skupino tumorjev, ki nastanejo iz ploščatocelične mukozne površine, kot so nosna votlina, paranazalni sinusi, ustna votlina, žrelo in grlo. Ob zgodnjem odkritju je 5-letno preživetje 75-odstotno (Silveira N.J. in sod., 2008).

V ploščatoceličnih karcinomih so bile opažene različne molekularne spremembe in njihova povezava s prognozo. Glavne spremembe se zgodijo večinoma v regulatorjih celičnega cikla, kot so *tp63* (tumorski protein 63), *p53* (tumorski protein 53), *Ki-67* (antigen *Ki-67*) in *CCND1* (ciklin D1), pa tudi v regulatorjih celične signalne transdukcije in proteinskega metabolizma, kot sta *EGFR* (receptor za epidermalni rastni faktor) in *COX2* (ciklooksigenaza 2). Poleg navedenih se v ploščatoceličnih karcinomih zgodijo še številne druge spremembe, kot so spremembe v genski ekspresiji in nastajanju proteinov, genetske mutacije in spremembe v epigenetski regulaciji. Naštete spremembe so v genih za signalno transdukcijo (*VEGF* (žilni endotelijski rastni faktor)), v genih z zapisom za transkripcijske faktorje (*Sox2* (sex determining factor Y box2)), v genih za celično adhezijo (*CDH1* (katherin 1)) in v genih za razgradnjo ekstracelularnega matriksa (*MMP* (metaloproteinaze matriksa)) (Yan W. in sod., 2011).

2.2 MOLEKULARNI MEHANIZMI KANCEROGENEZE

Kancerogeneza je kompleksen, večstopenjski proces, med katerim se zgodijo radikalne spremembe v povezavi s celično DNA. Spremembe se zgodijo na genih, ki stimulirajo delitev celice, pa tudi na genih, povezanih z uravnavo podvajanja celic, genih, pomembnih za popravilne mehanizme, in genih, pomembnih za apoptozo. Posledice kancerogeneze se tako kažejo v spremembah različnih genov, kar imenujemo model večih sprememb (angl. multi-hit concept of cancerogenesis). Proces nabiranja mutacij v delečih se celicah imenujemo iniciacija kancerogeneze, ki ima za posledico nekontrolirano (povišano) ekspresijo protoonkogenov in/ali izključitev ekspresije tumor supresorskih genov. Po iniciaciji kancerogenih sprememb še ne govorimo o nastanku rakaste celice, saj je za to potrebna naslednja stopnja, stopnja promocije. V tej stopnji se spremenjena, mutirana celica normalno deli, kar povzroča dodatno genetsko nestabilnost in nastanek celice z malignim fenotipom. Ta pojav imenujemo maligna konverzija. Promotorji niso kancerogeni, vendar sprožijo delitev celic brez metabolne aktivacije in s tem skrajšajo čas nastanka tumorske celice. Zadnja stopnja kancerogeneze je progresija, med katero pride do izražanja lastnosti celic z malignim fenotipom. Začne se razvoj žilja tumorja, pojavljajo pa

se še dodatne mutacije in epigenetske spremembe, kar vodi v obsežno rast tumorja (Novaković in sod., 2009: 24-26).

Zaradi zapletenega mehanizma nastanka raka, so novejša raziskava usmerjene predvsem v genetske raziskave, kot je odkrivanje genetskih povezav med nastajanjem raka in raziskave na nivoju celic (katere celice so tiste, ki povzročajo nastanek, progresijo in ponavljanje raka) (Novaković in sod., 2009: 24-26).

2.3 HIPOTEZE NASTANKA RAKA IN HETEROGENOSTI TUMORSKIH CELIC

Za razlago heterogenosti tumorskih celic v tumorjih obstajata vsaj 2 hipotezi, klonalna hipoteza (Campbell L.L. in Polyak K., 2007; Nowell P.C., 1976) in hipoteza rakaste matične celice (Reya T. in sod., 2001; Lapidot T. in sod., 1994).

Klonalna hipoteza predvideva, da večina neoplazem izhaja iz ene same celice in da je tumorska progresija rezultat selekcije najbolj agresivne linije. To kaže na to, da je populacija tumorskih celic genetsko manj stabilna v primerjavi s populacijo normalnih celic (Nowell P.C., 1976).

Hipoteza rakaste matične celice predvideva, da je nastanek in vzdrževanje tumorjev povezano s pojavom podskupine celic, ki imajo značilnosti matičnih celic ter jih imenujemo rakaste matične celice (Jordan C.T. in sod., 2006; Reya T. in sod., 2001). Funkcionalno jih definiramo kot skupino tumorskih celic, ki so zmožne samoobnove in pluripotence in tako delujejo kot progenitorne rakaste celice (Reya T. in sod., 2001; Bonnet D. in Dick J.E., 1997). Rakaste matične celice in rakastim matičnim celicam podobne celice so bile odkrite v tumorjih raka dojke in črevesja (Al-Hajj M. in sod., 2003; O'Brien C.A. in sod., 2007). Subpopulacija takšnih celic naj bi bila tesno povezana s kancerogenezo, pojavnostjo in metastaziranjem tumorjev (Jordan C.T. in sod., 2006).

2.3.1 Matične celice in nastanek rakaste matične celice

Matične celice lahko glede na razvojni status delimo na odrasle matične celice in embrionalne matične celice. Embrionalne matične celice, ki izhajajo iz notranje celične mase blastociste, imajo možnost diferenciacije v celice vseh 3 zarodnih plasti (Evan M.J. in Kaufman M.H., 1981; Martin G.R., 1981). V nasprotju, imajo odrasle matične celice omejeno zmožnost samoobnove in diferenciacije, ki jih ločuje od okoliškega tkiva ter je bolj določena kot v celicah, iz katerih izhajajo. Odrasle matične celice imajo pomembno vlogo pri vzdrževanju homeostaze in regeneracije, prav tako pa lahko prispevajo k nastanku številnih bolezni, kot je rak (Al-Hajj M. in sod., 2003; Reya T. in sod., 2001).

V razvoju organizma lahko zasledimo sistem, pri katerem matične celice izgubljajo multipotentnost, s čimer je zagotovljen nastanek progenitornih celic, ki se nato počasi diferencirajo v določeno tkivo. Pri raku predstavlja izvorno celico rakasta matična celica, sposobna samoobnove in dolgoživosti. Zaradi tega je bolj dovzetna za genetske in epigenetske spremembe, ki povzročajo transformacijo teh celic. Ni še znano, ali rakaste matične celice nastanejo zaradi transformacije normalnih matičnih celic ali iz omejenih progenitornih ali diferenciranih celic. Te celice pridobijo sposobnost samoobnove, ki je posledica genetskih ali epigenetskih sprememb (Visvader L.J. in Linderman G.J., 2008). Plastičnost tega sistema je ponazorjena z opažanjem, da lahko matične celice nastanejo tudi z reprogramiranjem diferenciranih ali somatskih celic (Wilmot I. in sod., 1997; Tata M. in sod., 2001; Cowan C.A. in sod., 2005). Leta 2006 sta Takahashi in Yamanaka dokazala, da faktorji Sox2, Oct-4, c-Myc in Kif4 povzročajo pluripotenco v fibroblastih, s

čimer nastane inducirana pluripotentna celica (Takahashi K. in Yamanaka S., 2006). Transplantacija induciranih pluripotentnih celic v miši povzroči nastanek tumorjev, ki vsebujejo celice vseh treh zarodnih plasti. Nastanek induciranih pluripotentnih celic iz fibroblastov sta dokazala tudi pri človeku (Takahashi K. in sod., 2007). Thomson in sodelavci so dokazali, da so faktorji Sox2, Oct-4, Nanog (angl. homeobox transcriptional factor Nanog) in Lin28 (angl. lin-28 homolog A) dovolj za reprogramiranje človeških somatskih celic v pluripotentne matične celice, ki imajo vse značilnosti embrionalnih matičnih celic (Yu J.Y. in sod., 2007). Končni znaki rakaste celice so značilen fenotip in funkcionalna, proliferativna ter genetska heterogenost celic (Visvader L.J. in Linderman G.J., 2008; Pardo R. in sod., 2003).

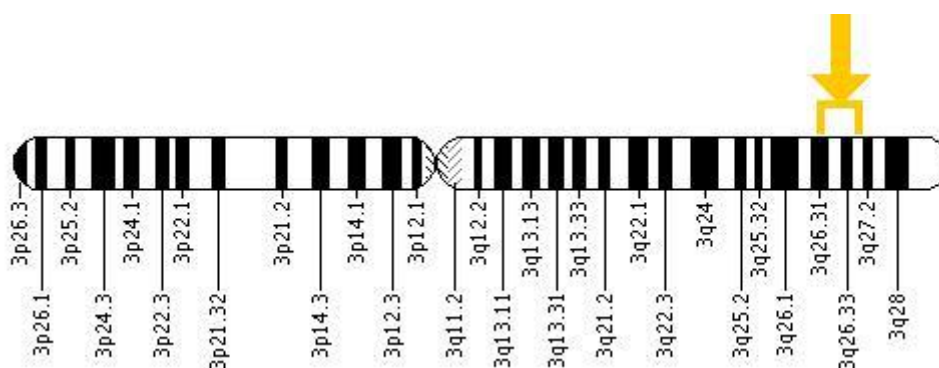
Razvidno postaja, da stopnje, pomembne pri fiziološkem razvoju organizma, igrajo pomembno vlogo tudi v zgodnjih stopnjah tumorogeneze. Wnt-signaliziranje je na primer kritično pri embrionalnem razvoju in kontrolira homeostazo samoobnavljanja (Clevers H., 2006). Somatske mutacije genov poti Wnt so povezane z etiologijo številnih tumorjev, vključno z rakom črevesja (Clevers H. 2006; Reya T. in Clevers H., 2005). Ugotovljeno je bilo, da je transkripcijski faktor Sox2 nujen pri vzdrževanju pluripotentnega fenotipa embrionalnih matičnih celic (Rodda D.J. in sod., 2005). Poleg tega učinkovito povzroča nastanek induciranih pluripotentnih celic (Takahashi K. in Yamanaka S., 2006; Yu J.Y. in sod., 2007) in predstavlja onkogen (gen *sox2*), ki je v več kopijah pri pljučnem raku ter raku požiralnika (Bass A.J. in sod., 2009; Yuan P. in sod., 2010).

Rakaste matične celice imajo veliko skupnega s fiziološkimi matičnimi celicami, to pa povzroča veliko problemov pri raziskovanju in razvoju tarčnih terapij. Raziskovalci zato iščejo in raziskujejo tumorske označevalce, ki bi identificirali zgolj rakaste matične celice. Trenutno se tumorski označevalci kombinirajo, najbolj učinkoviti pa so tisti, ki so tumorsko specifični oziroma odvisni od tipa tumorja (primer je kombinacija transkripcijskih faktorjev Oct-4, Sox2 in Nanog) (Zhang Z. in sod., 2012).

Predlagan je bil model, pri katerem se predvideva, da je gen *sox2* izražen v subpopulaciji celic tumorjev in da se te celice lahko razvijejo v tumor. Takšni tumorji so slabo diferencirani in naj bi bili povezani s slabim preživetjem (Ben-Porath I. in sod., 2008).

2.4 GEN *SOX2* KOT TUMORSKI OZNAČEVALEC

Leta 1995 je bil *sox2* (SRY (sex determining region Y) box2) identificiran kot gen z zapisom za protein, ki se skupaj s faktorjem Oct-4 (oktamer 4) veže na ojačevalsko regijo gena *fgf4* (fibroblastni rastni faktor 4) in je specifično izražen v pluripotentnih matičnih celicah. Uvrstili so ga v gensko družino Sox (angl. SRY-related HMG box) (Yuan in sod., 1995). Gen *sry* (angl. sex determining region Y) z zapisom za faktor, ki določa spol, je bil ob koncu 20. stoletja prvi odkriti gen te družine (Sinclair A.H. in sod., 1990). Do zdaj je bilo identificiranih približno 30 genov Sox, od tega jih 20 najdemo pri človeku in miših (Kiefer J.C. in sod., 2007). Gen *sox2* se nahaja na kromosomski regiji 3q26.33 in je sestavljen iz kodirajoče regije in 2 nekodirajočih regij na 5' ter 3' koncu, ki predstavljata ojačevalca. Ojačevalec HS1/SRR1 na 5' koncu ima dve vezavni mesti za oktamer-faktor in ga uravnava faktor Oct-4 (Catena R. in sod., 2004). Ojačevalec na 3' koncu, imenovan SRR2 (Sox2 regulatorna regija 2), pa je tipičen ojačevalec Oct-Sox z vezavnim mestom za faktor Oct in faktor Sox (Tomioaka M. in sod., 2002). Oba ojačevalca sta aktivna v pluripotentnih matičnih celicah in v nevralnih matičnih celicah, kjer vzdržujeta transkripcijo (Miyagi S. in sod., 2004; Zappone M.V. in sod., 2000).



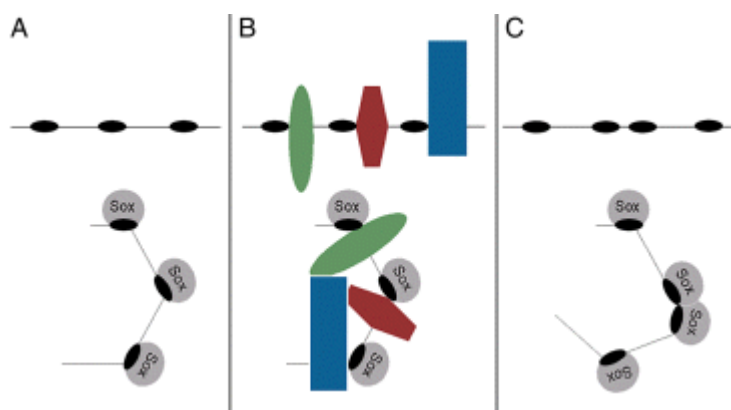
Slika 1: Kromosom 3 z označeno lokacijo gena *sox2* (3q26.33) (rumena puščica) (Sox2 gene, 2009).

Proteini, ki jih kodirajo geni *sox*, imajo 79 aminokislin dolgo zaporedje HMG (angl. high mobility group) box za sekvenčno specifično (50-A/TA/TCAAA/TG-30) vezavo na DNA in tako aktivirajo ali zavirajo transkripcijo (Gubbay J. in sod., 1990; Wright E.M. in sod., 1993; Harley V.R. in sod., 1994; Van de Wetering M. in Clevers H., 1992). So specifični za živali, na osnovi filogenetskih raziskav zaporedja HMG box pa delimo sesalčje proteine Sox v 8 skupin z oznakami od A do H (Bowles J. in sod., 2000). Zaporedje HMG box je med proteini Sox izredno ohranjeno, saj *in vitro* študije vezave na DNA ne kažejo nobenih razlik v prepoznavanju vezavnega zaporedja. Kljub temu vsak protein Sox prepozna različne regulatorne regije DNA, ki vsebujejo vezavno mesto za Sox, *in vivo* (Kamachi Y. in sod., 2000). Produkt gena *sox2*, protein Sox2, spada v podskupino b1 skupine B, v kateri sta še Sox1 (SRY (sex determining region Y) box 1) in Sox3 (SRY (sex determining region Y) box 3), vsi trije pa imajo aktivacijsko transkripcijsko domeno (Bowles J. in sod., 2000). Geni podskupine b1 so izraženi v zgodnjem embriju, razvijajočih se testisih in v živčnem sistemu ter so pomembni pri določanju usode celic (Pevny L.H. in Lovell-Badge R., 1997; Wegner M., 1999; Avilion A.A. in sod., 2003; Graham V. in sod., 2003). Povezujejo se s specifičnimi regulatornimi proteini in tako kontrolirajo ekspresijo različnih genov (Kamachi Y. in sod., 2000).

2.5 TRANSKRIPCIJSKI FAKTOR Sox2

Transkripcijski faktorji so ključne molekule, ki sodelujejo pri uravnavi ekspresije genov. Torej so posledično ključni tudi za samoobnovo, diferenciacijo in razvojni program organizma. Vzdrževanje primerne nivoja ekspresije transkripcijskih faktorjev je nujno za vzdrževanje normalne homeostaze celic in tkiv. Napačna regulacija je pogosto prisotna v rakastih celicah in je povezana s specifičnimi tumorskimi podtipi (Darnell J.E. Jr., 2002).

Sox2 je transkripcijski faktor, sestavljen iz domene HMG box in transkripcijsko aktivacijske domene na C-terminalnem koncu, obe domeni pa sta potrebni za aktivacijo tarčnih ojačevalcev (Ambrosetti D.C. in sod., 2000). Domena HMG posreduje jedro-citoplazemski prenos Sox2 in tako dodatno zagotavlja regulacijo aktivnosti. V domeni HMG sta dva jedrna lokalizacijska signala (Li J. in sod., 2007), s katerima Xpo4 (eksportin 4) olajša jedrni vnos (Gontan C. in sod., 2009). Aktivnost Sox2 je negativno regulirana z jedrnim izvozom in se aktivira z acetilacijo jedrnega izvoznega signala na domeni HMG (Baltus G.A. in sod., 2009). Poleg tega se za razliko od drugih transkripcijskih faktorjev protein Sox2 (kot tudi ostali proteini Sox) rad veže v mali žleb DNA, kar spremeni lokalno strukturo kromatina in omogoči nastanek ojačevalskega kompleksa. Zato ga uvrščamo tudi med pomembne arhitekturne proteine (Kamachi Y. in sod., 2000; Wegner M., 2005).

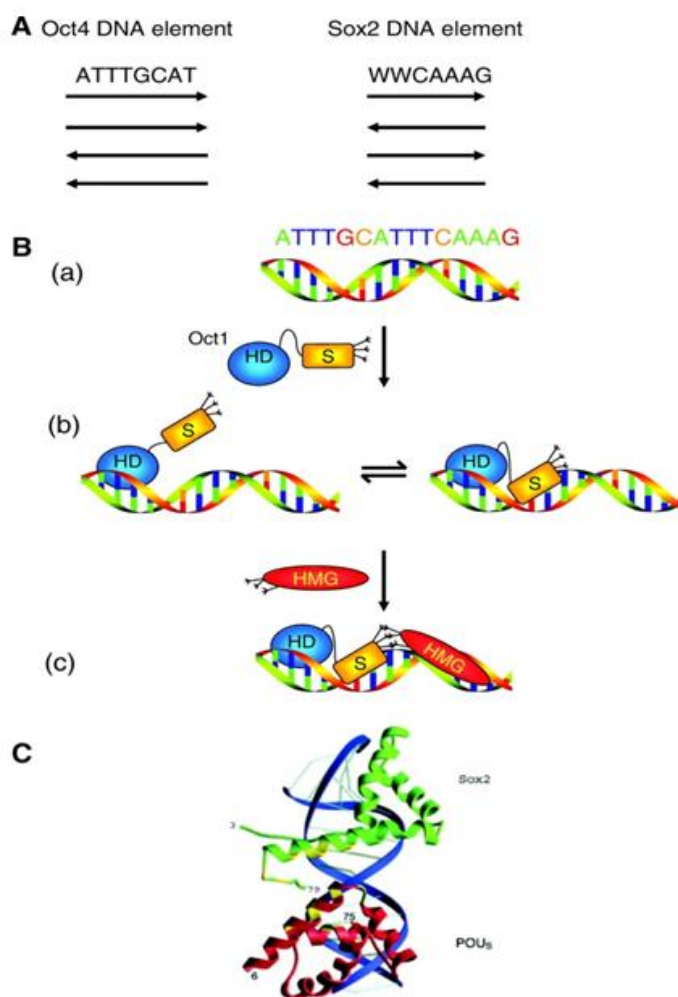


Slika 2: Arhitekturna vloga proteinov Sox. (A) Proteini Sox se vežejo na DNA. DNA regija s številnimi vezavnimi mesti za Sox spremeni konformacijo. (B) Takšna aktivnost proteinov Sox naj bi omogočila povezovanje transkripcijskih faktorjev, ki so vezani na iste regije in s tem nastanek ojačevalskega kompleksa. (C) Vezava dimerov proteinov Sox spremeni konformacijo DNA na drugačen način kot vezava monomerov (povzeto po Wegner M., 2005).

2.5.1 Prepoznavanje ustrezne tarče gena *sox2* in regulacija njene transkripcije na celično specifični ravni

Regulatorna regija SRR2 gena *sox2* vsebuje ojačevalec Oct-Sox in je sposobna vzdrževati transkripcijo v embrionalnih matičnih celicah in nevrlnih matičnih celicah (Tomioka M. in sod., 2002; Miyagi S. in sod., 2004). Strukturo tega ojačevalca so odkrili pri raziskavah gena *fgf4*, kjer je bila na tem regulatorju ugotovljena prisotnost oktamernega motiva (WBHWGCAT) in motiva Sox (WWCAAWG). Faktorja Oct-4 in Sox2 delujeta skupaj, tako da aktivirata ojačevalec Oct-Sox (Yuan in sod., 1995). S tem ojačevalcem so regulirani številni geni, ki so specifično izraženi v pluripotentnih matičnih celicah *utf1* (nediferencirani embrionalni transkripcijski faktor 1), *nanog*, *oct-4*, *sox2*, *fbxo15* (angl. F-box protein 15), *fgf4* in *lefty1* (angl. left-right determination factor 1)) (Kuroda in sod., 2005; Nakatake in sod., 2006; Nishimoto in sod., 1999; Okumura-Nakanishi in sod., 2005; Tokuzawa in sod. 2003; Tomioka in sod., 2002). Ojačevalec Oct-Sox naj bi bil nujen za aktivacijo transkripcije teh genov. Zadnje raziskave z embrionalnimi matičnimi celicami, pri katerih je gen *sox2* utišan, so pokazale, da kljub temu, da je transkripcijski faktor Sox2 nujen za vzdrževanje pluripotence, ni nujno potreben za aktivacijo ojačevalca Oct-Sox, saj je lahko nadomeščen z drugimi faktorji Sox, kot so Sox14, Sox11 ali Sox15 (Masui S., 2011).

Regulatorne regije, ki vsebujejo ojačevalec Oct-Sox, lahko delimo glede na njihovo specifičnost na tri skupine: (a) regije, ki funkcionirajo v embrionalnih matičnih celicah, (b) regije, ki funkcionirajo v nevrlnih matičnih in progenitornih celicah ter (c) regije, ki delujejo v obeh tipih celic. V splošnem se transkripcijski faktor Oct-4 veže na oktamer-vezavno mesto ojačevalca Oct-Sox, da bi vzpodbudil transkripcijo v embrionalnih matičnih celicah, medtem ko Brn1, Brn2, Brn4 in Oct-6 sodelujejo s Sox2 na SRR2 in vplivajo na transkripcijo genov v nevrlnih matičnih in progenitornih celicah. (Miyagi S. in sod., 2009).



Slika 3: Oct-Sox in terciarna struktura kompleksa Oct-Sox-DNA. (A) Vezavna zaporedja na DNA, kamor se vezeta Oct-4 in Sox2. (B) Najprej se na DNA veže faktor Oct z domeno POU, nato sledi vezava faktorja Sox2 s domeno HMG. Sox2 povzroči stabilizacijo domene POU na DNA. (C) Terciarna struktura Oct-1 (rdečo) in Sox2 (zeleno), ko sta vezana na regulatorni element (modro) DNA. (Chambers I. in Tomlinson S.R., 2009).

2.5.1.1 Prepoznavanje in regulacija transkripcijskih faktorjev Oct-4 in Utf1 v embrionalnih matičnih celicah in embrionalnih rakastih celicah

Namig, kako transkripcijski faktor Sox2 uravnava transkripcijo tarčnih genov, prihaja iz študij ekspresije gena *fgf4* v embrionalnih rakastih celicah in embrionalnih matičnih celicah (Yuan H. in sod., 1995; Ambrosetti D.C. in sod., 1997; Ambrosetti D.C. in sod., 2000). Regulatorna regija, ojačevalec Oct-Sox, uravnava ekspresijo gena *fgf4* tako, da se nanj vežeta faktorja Oct in Sox (Okamoto K. in sod., 1990; Rosner M.B. in sod., 1990; Scholer H.R. in sod., 1990). Za aktivacijo transkripcije je nujna vezava obeh transkripcijskih faktorjev na ustrezna vezavna mesta, v nasprotnem primeru ni transkripcije. Podobno je regulirana ekspresija gena *utf1* (Okuda A. in sod., 1998; Fukushima A., in sod., 1998) v embrionalnih rakastih celicah in embrionalnih matičnih celicah (Nishimoto M. in sod., 1999), kar kaže na to, da je kombinacija delovanja Sox2 in Oct-4 glavni mehanizem, ki regulira gensko ekspresijo v teh celicah. Za razliko od drugih regulatornih elementov, ki vsebujejo vezavno mesto Sox in vezavno mesto za Oct-4,

regulatorna regija gena *utf1* selektivno usmerja komplekse Oct-4-Sox2 in tako prepreči vezavo podobnih kompleksov, kot sta Oct-1-Sox2 ali Oct-6-Sox2. Specifičnost je omogočena zaradi sposobnosti POU-homeodomene Oct-4, da prepozna oktameri motiva na regulatornem elementu *utf1*. Regulatorni regiji *fgf4* in *utf1* se ne nahajata v bližini promotorskih regij, ampak nekaj kilobaz stran. Znanstvenike je zato zanimalo, ali kompleks Oct-4-Sox2 sodeluje neposredno s preiniciacijskim kompleksom na promotorju *fgf4* ali je prisoten še kakšen vmesni regulatorni faktor (Nowling K.T. in sod., 2000; Nowling T. in sod., 2003). Tako so odkrili, da Sox2 fizično sodeluje s koaktivatorjem p300 in posreduje informacijo o aktivaciji transkripcije s proteinskim kompleksom Oct-4-Sox2 do promotorja. Izguba transkripcijskega faktorja Sox2 vodi do aktivacije negativnih regulatorjev transkripcijskega faktorja Oct-4 in do aktivacije pospeševalcev diferenciacije. Hkrati se zmanjša ekspresija pozitivnih regulatorjev Oct-4. Tako transkripcijski faktor Sox2 regulira ekspresijo gena *oct-4*, kar spada med njegove poglavitne naloge (Masui S. in sod., 2007).

2.5.1.2 Prepoznavanje in regulacija transkripcijskih faktorjev Brn1, Brn2, Brn4 in Oct-6 v nevralnih matičnih in progenitornih celicah

Sox2 regulira tudi transkripcijo genov, ki niso prisotni v embrionalnih matičnih celicah, ampak v nevralnih matičnih in progenitornih celicah, kot je gen *nestin* (Josephson R. in sod., 1998; Tanaka S. in sod., 2004). Regulatorna regija gena *nestin* vsebuje vezavni mesti za faktorja Sox in Oct, kjer se Sox2 povezuje z vezavnimi faktorji kot so Brn1, Brn2, Brn4 ali Oct-6. Faktorja Brn in Oct-6 sodelujeta s Sox2 na ojačevalcu SRR2 in tako omogočata ekspresijo genov v nevralnih matičnih celicah (Miyagi S. in sod., 2009).

2.6 FUNKCIJE TRANSKRIPCIJSKEGA FAKTORJA Sox2

Produkt gena *sox2* ima pomembno vlogo v zgodnjem razvoju vretenčarjev. Mišji embriji, homozigoti, v katerih je tarčno povzročena delecija gena *sox2*, propadejo hitro po implantaciji (Avilion A.A. in sod., 2003). Prav tako regulira diferenciacijo živčnih matičnih in progenitornih celic v centralnem živčnem sistemu in je ključen za razvoj notranjega ušesa in mrežnice (Wegner M., 1999; Kiernan A.E. in sod., 2005; Taranova O.V. in sod., 2006). Skupaj s transkripcijskim faktorjem Oct-4 deluje kot glavni regulator sesalčje embriogeneze in je ključen za vzdrževanje pluripotentnosti ter samoobnove embrionalnih matičnih celic (Masui S. in sod., 2007; Fong H. in sod., 2008). Pomemben je tudi pri reprogramiranju diferenciranih celic v pluripotentne celice oziroma pri nastanku induciranih pluripotentnih celic (Takahashi K. in sod., 2006; Takahashi K. in sod., 2007; Yamanaka S., 2007).

2.6.1 Funkcija transkripcijskega faktorja Sox2 pri razvoju tkiv

Transkripcijski faktor Sox2 je nujen za proliferacijo in neodvisno rast celičnih linij pljuč in požiralnika, kar je dokazano s poskusi RNA-interference, ter tako prispeva k razvoju prebavil in dihal (Bass A.J. in sod., 2009). Regulira namreč začetno dorzalno-ventralno diferenciacijo, pomemben je za oblikovanje epitelijsko-mezenhimalne interakcije in za ustrezno diferenciacijo ploščatoceličnega epitela požiralnika (Que J. in sod., 2007) ter številnih celičnih tipov dihal (Que J. in sod., 2009). Izražen je v razvijajočem endodermu sprednjega dela prebavil, najmočneje v celicah na področju bodočega požiralnika, žrela in prednjega dela želodca (Ishii Y. in sod., 1998; Williamson K.A. in sod., 2006). Sox2 obdrži pomembno funkcijo tudi v odraslem prebavilu, kjer je izražen v proliferativni bazalni lamini ploščatoceličnega epitela požiralnika in verjetno v trahealnih in zračnih

matičnih celicah (Que J. in sod., 2009; Rock J.R. in sod.), kjer je nujen za proliferacijo in odgovor na poškodbe (Que J. in sod., 2009). Sox2 je izražen tudi v nekaterih odraslih nevronih (Bani-Yaghoob M. in sod., 2006; Cavallaro M. in sod., 2008). Dokazano je, da je gen *sox2* mutiran v dednih deformacijah požiralnika (Williamson K.A. in sod., 2006). Pri človeku je heterozigotnost za Sox2 povezana s sindromom »anophthalmia esophageal genital syndrom«, stanjem, ki vključuje požiralnično atrezijo in traheozofagalno fistulo (Williamson K.A. in sod., 2006).

V embrionalnem razvoju notranjega ušesa naj bi Sox2 reguliral nastanek senzoričnih domen. Sox2 se pojavi že na samem začetku razvoja notranjega ušesa in med oblikovanjem senzoričnih organov regulatorno deluje navzgor od gena *atoh1* (Kiernan A.E. in sod., 2005). Njegova vloga v kasnejši celični diferenciaciji je neznana. Mutacije v genu *sox2* se kažejo v hudih deformacijah notranjega ušesa in slušnih organov, ki nastanejo zaradi pomanjkanja ciliarnih in podpornih celic ter s slabim sluhom (Hagstrom S.A. in sod., 2005; Kiernan A.E. in sod., 2005).

Gen *sox2* je izražen med celotnim embrionalnim razvojem mrežnice, pri razvoju leče pa le v zgodnjem embrionalnem razvoju. Izguba gena *sox2* ali mutacija v tem genu pri miših vodi do popolne izgube proliferativne in diferenciacijske sposobnosti nevrlnih retinalnih progenitornih celic mrežnice (Taranova O.V. in sod., 2006), medtem ko pri razvoju leče mutacije gena *sox2* nimajo bistvenega pomena, saj Sox2 v poznejšem embrionalnem razvoju nadomesti Sox1 (defekti leče tako nastanejo le, če pride do mutacije gena *sox1*). Najresnejši tip očesne deformacije, zaradi mutacij gena *sox2* pri človeku, je bilateralna anaptalmija/mikroptalmija. Pri človeku 3 odstotki unilateralnih in 10 odstotkov bilateralnih deformacij izhaja iz haploidne nezadostnosti *sox2* (Fantes J. in sod., 2003; Ragge N.K. in sod., 2005). Večina mutacij gena *sox2* je nesmiselnih in vodijo do krajšanja proteina Sox2 (Faivre L. in sod., 2006).

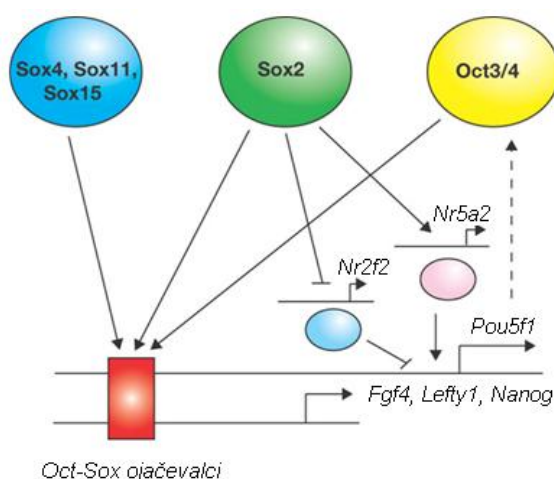
2.6.2 Funkcija pri uravnavanju pluripotentnega stanja in samoobnove celic

Transkripcijski faktorji, ki urejajo pluripotentnost celic so zanimivi za številne raziskovalce. Pomen teh faktorjev je bil dobro prikazan, ko sta Takahashi in Yamanaka ustvarila inducirane pluripotentne matične celice in s tem dokazala, da sta transkripcijska faktorja Oct-4 in Sox2 zadostna za pluripotenco celic (Takahashi K. in Yamanaka S., 2006). V zgodnjem embrionalnem razvoju je ekspresija gena *sox2* omejena na germinalne celice, matične celice trofoblata, celice epiblasta, celice notranje celične mase zgodnjega embrija in celice v nevralnem tkivu (Avilion A.A. in sod., 2003; Wood H.B. in Episkopou V., 1999; D'Amour K.A. in Gage F.H., 2003). Te celice so ustrezno regulirane, napake v regulaciji pa vodijo do različnih motenj. Tako embriji miši, brez izraženega transkripcijskega faktorja Sox2, propadejo takoj po implantaciji, hkrati pa pride z izbitjem gena *sox2* do spontanih diferenciacij embrionalnih matičnih celic predvsem v trofoektoderm, majhen delež pa v ekstraembrionalni endoderm (Avilion A.A. in sod., 2003; Ivanova V. in sod., 2006; Masui S. in sod., 2007).

Ojačevalec Oct-Sox na lokusih genov *oct-4* in *sox2* ustvarja avtoregulatorno transkripcijsko zanko (Tomioka M. in sod., 2002; Chew J.-L. in sod., 2005; Okumura-Nakanishi S. in sod., 2005). Oslabitev tega regulatornega kroga vodijo do diferenciacije embrionalnih matičnih celic. Oslabitev povzroča faktor Cdx2, ki tvori inhibitorno zanko z Oct-4 in tako deluje kot promotor diferenciacije trofoektoderma (Niwa H. in sod., 2005). Kljub temu, da vodi inducirano stanje v embrionalnih matičnih celicah brez Sox2 v propad

vzdrževanja pluripotentnosti in primarno v diferenciacijo trofoektodermu podobne celice, Sox2 ni potreben za aktivacijo večine regulatornih ojačevalcev, ki vsebujejo vezavna mesta za faktorje Oct in Sox (Masui S. in sod., 2007). Vzrok temu je verjetno funkcionalna opustitev, saj so v embrionalnih celicah prisotni tudi Sox4 (Bowles J. in sod., 2000), Sox11 (Wiebe M.S. in sod., 2003) in Sox15 (Maruyama M. in sod., 2005). Analize DNA z mikročipi so pokazale, da je v embrionalnih matičnih celicah brez Sox2 ekspresija *Nr5a2* (Gu P. in sod., 2005), pozitivnega regulatorja ekspresije Oct-4, znižana. Obratno je z *Nr2f2* (Schoorlemmer J. in sod., 1994), negativnim regulatorjem ekspresije Oct-4, čigar ekspresija je povišana. To dokazuje, da je Sox2 nujen za vzdrževanje pluripotentnosti embrionalnih matičnih celic predvsem zaradi tega, ker vzdržuje zahtevan nivo ekspresije gena *oct-4* (Masui S. in sod., 2007).

Oct-4 in Sox2 sodelujeta s faktorjem Nanog pri regulaciji genov (vključno s tem, da regulirajo tudi sami sebe), ki so pomembni za vzdrževanje pluripotence in embrionalni razvoj (Boyer L.A. in sod., 2005; Loh Y.H. in sod., 2006). Za ustrezno regulacijo se jim pridružujejo polikombni represorski kompleksi (PRC1 in PRC2) (Boyer L.A. in sod. 2006; Endoh M in sod., 2008; Lee T.I. in sod., 2006). Sox2, Oct-4 in Nanog aktivirajo te komplekse za inhibicijo programa diferenciacije in tako predstavljajo model za vzdrževanje pluripotence. Ekspresija teh genov je usklajena s pomočjo miRNA, vključno z miR-290-295, in regulirana z Oct-4, Sox2, Nanog ter Tcf3 (Marson M. in sod., 2008).



Slika 4: Interakcije različnih faktorjev z ojačevalcem Oct-Sox. Faktor Sox2 in drugi faktorji Sox regulirajo ekspresijo genov, ki so odvisni od ojačevalca Oct-Sox, vendar samo Sox2 regulira številne transkripcijske faktorje, ki imajo pozitiven ali negativen efekt na ekspresijo Oct-4 (povzeto po Masui S. in sod., 2007).

S tem je postavljen osnovni model vzdrževanja embrionalnih matičnih celic. Oct-4, Nanog in Sox2 aktivirajo in utišajo veliko genov (vključno z njimi samimi). Aktivirani geni so transkripcijski faktorji in geni za proteine, povezani s preoblikovanjem kromatina, ki sodelujejo z geni za pluripotenco ter s tem vzdržujejo utišanje prepisovanja transkripcijskih faktorjev, ki kontrolirajo razvoj tkiv iz treh zarodnih plasti. Embrionalne matične celice ostanejo nediferencirane, dokler je ekspresija teh treh faktorjev in njihovih kofaktorjev visoka. Ko pride signal za diferenciacijo, se ekspresija teh faktorjev počasi zniža, kar omogoči ekspresijo ključnih faktorjev razvoja in diferenciacijo celic v ustrezna tkiva. Podobno je pri vzdrževanju samoobnove teh celic, kjer je gen *sox2* močno izražen, medtem ko je ob vklopu programa diferenciacije matičnih celic njegov promotor epigenetsko utišan (Boyer L.A. in sod., 2005; Hochedlinger K. in Plath K., 2009). V nevrlnih progenitornih

celicah pride do epigenetskih modifikacij na dveh ojačevalcih *sox2*, SRR1 in SRR2, ki tako kontrolirajo diferenciacijo (Sikorska M in sod., 2008). V večini diferenciranih celic je promotor *sox2* gena utišan (Beltran A.S. in sod., 2011).

2.6.3 Funkcija pri reprogramiranju diferenciranih odraslih celic v pluripotentne matične celice

Takahashi in Yamanaka sta leta 2006 poročala o uspešni vstavitvi 4 transkripcijskih faktorjev (Oct-4, Sox2, Klf4 in c-Myc) v diferencirane celice, s čimer sta povzročila preobrazbo teh celic v pluripotentne celice. Te celice, imenovane inducirane pluripotentne celice, imajo podobno pluripotentnost kot embrionalne matične celice, vendar lahko nastanejo iz somatskih celic, kot so fibroblasti ali celice kože (Takahashi K. in Yamanaka S., 2006). Od vstavljenih faktorjev se je pri tem pojavu c-Myc izkazal za nepomembnega (Nakagawa M. in sod., 2007). Inducirane pluripotentne celice nastanejo šele po nekajdnevni izpostavljenosti diferenciranih celic faktorjem Oct-4, Sox2 in Klf4. Za reprogramiranje teh celic so potrebni 2 do 3 tedni, zato verjetno ne nosijo sami vloge in odgovornosti za določanje pluripotence, ampak jim pomagajo tudi drugi faktorji. Odkritja iz študij embrionalnih matičnih celic sicer kažejo, da je pluripotenca lahko vzdrževana le z ekspresijo gena *oct-4*, tudi če je gen *sox2* izbit (Masui S. in sod., 2007), vendar pa induciranih pluripotentnih matičnih celic ne moremo pridobiti brez prisotnosti faktorja Sox2 (Takahashi K. in Yamanaka S., 2006).

Zakaj je temu tako, se natančno še ne ve. Mogoče so nekateri geni v diferenciranem stanju regulirani z genom *sox2*, v pluripotentnih matičnih celicah pa so takšni geni izraženi brez njegove regulacije. Takšen primer predstavlja gen *nanog*, ki je v diferenciranem stanju odvisen od ojačevalca Oct-Sox in potrebuje za aktivacijo tako faktor Oct-4 kot Sox2, medtem ko je v pluripotentnem stanju lahko aktiviran tudi z drugimi faktorji Sox. Možno je, da lahko inducirane pluripotentne celice pridobimo tudi s Sox15 (Nakagawa M. in sod., 2007). Kljub temu preprosta povezava Nanoga z Oct-4 in Klf4 ni dovolj za nastanek induciranih pluripotentnih celic, ampak so za to potrebni številni geni, odvisni od ojačevalca Oct-Sox (Takahashi K. in Yamanaka S., 2006). Osnovni model reprogramiranja tako ostaja sledeč: faktorji Oct-4, Sox2 in Klf4 se vežejo na regulatorne regije ojačevalca Oct-Sox in tako aktivirajo gene, ki so specifični za pluripotenco, vendar ne dovolj, ker je v diferenciranih celicah genski kromatin v neaktivnem stanju in je posledično učinkovitost ekspresije genov slaba. Zato se med mitozo celic vključijo epigenetski faktorji, kot je polikombni represorski kompleks, ki omogočijo, da se ti faktorji najprej prepisujejo v populaciji delečih se celic (Egli D. in sod., 2008). Več je vezav teh treh transkripcijskih faktorjev, specifičnih za pluripotenco, na ustrezne lokuse, več bo ekspresije (Chen Y. in sod., 2008; Kim J.B. in sod., 2008).

2.7 GEN SOX2 KOT TARČA GENETSKIH SPREMEMB

Kromosomska regija 3q26.33, v kateri je tudi gen *sox2*, je pogosto tarča genetskih sprememb, predvsem povečanja števila kopij gena. Do danes je bilo povečano število kopij ali povišana ekspresija gena *sox2* dokumentirana v številnih različnih tumorjih, v nekaterih primerih je bila povezana celo s promocijo rasti, kot je v primeru raka dojke, pri katerem je gen *sox2* bolj izražen in naj bi spodbujal celično proliferacijo ter s tem kancerogenezo (Chen Y. in sod., 2008). Ekspresija je povišana tudi v rakavih celicah prostate (Sattler H.P. in sod., 2000), pri različnih rakih glave in vratu ter v ploščatoceličnih karcinomih požiralnika, pljuč in jajčnikov (Shinomiya T. in sod., 1999; Knuutila S. in sod., 1998). V

nasprotju je pri raku črevesja gen *sox2* pogosto utišan, verjetno zaradi hipermetilacije promotorja (Otsubo T. in sod., 2008).

Pomnoženost specifičnih kromosomskih regij DNA igra ključno vlogo v razvoju in napredovanju rakastih obolenj, predvsem kadar se zaradi tega poveča ekspresija protoonkogenov (Jiang W. in sod., 1992; Lu S.H. in sod., 1988).

2.7.1 Gen *sox2* kot onkogen

Onkogeni nastanejo zaradi mutacij v protoonkogenih, genih z zapisom za proteine, ki sodelujejo pri rasti in diferenciaciji celic. Med protoonkogene uvrščamo gene z zapisom za transkripcijske faktorje, receptorje, rastne dejavnike in signalne prenašalce. Navadno se spremenijo v promotorskih regijah, zato prihaja do sprememb v prepisovanju gena in nastajanju produkta. Ker se onkogeni na celičnem nivoju izražajo dominantno, je za delovanje onkogenega proteina potreben samo en mutiran alel. Germinalne mutacije protoonkogenov (in s tem nastanek onkogenov) so redkeje povezane z dednimi sindromi, so pa zato pogosto povezane s sporadičnimi oblikami raka (zaradi mutacij, ki nastanejo v somatskih celicah) (Novaković S. in sod., 2009: 30).

Bass A.J. in sod. so prvi poročali o genu *sox2* kot o novo odkritem potencialnem onkogenu ploščatoceličnega karcinoma požiralnika in pljuč. Njegove lastnosti ustrezajo vsem lastnostim onkogenov (Bass A.J. in sod., 2009). Gen *sox2* lahko s svojo ekspresijo aktivira pomembne genske kaskade, ki so vključene v iniciacijo tumorjev, progresijo in v vzdrževanje slabo diferenciranega stanja (Stolzenburg S. in sod., 2012).

Delovanje gena *sox2* kot onkogen se nanaša na model, ki predpostavlja, da so lahko geni določene celične linije, vključeni v razvoj, disregulirani in postanejo tako promotorji tumorogeneze (Garraway L.A. in Sellers W.R., 2006). To je podobna hipoteza kot hipoteza patogeneze levkemije, ki predpostavlja, da so ključni razvojni geni, vključno z nekaterimi transkripcijskimi faktorji, nepravilno aktivirani zaradi kromosomskih translokacij (Rabbitts T.H., 1991).

Kljub številnim raziskavam, delovanje gena *sox2* in njegova funkcija v tumorjih še nista natančno poznana. Predvideva se, da naj bi bil *sox2* povezan s progresijo rakastih obolenj, saj naj bi pospeševal maligno transformacijo in migracijo celic (McCaughan F. in sod., 2010).

2.8 METODI RAZISKOVANJA GENETSKIH SPREMENB IN GENSKE EKSPRESIJE, KI SMO JU UPORABILI V MAGISTRSKI NALOZI

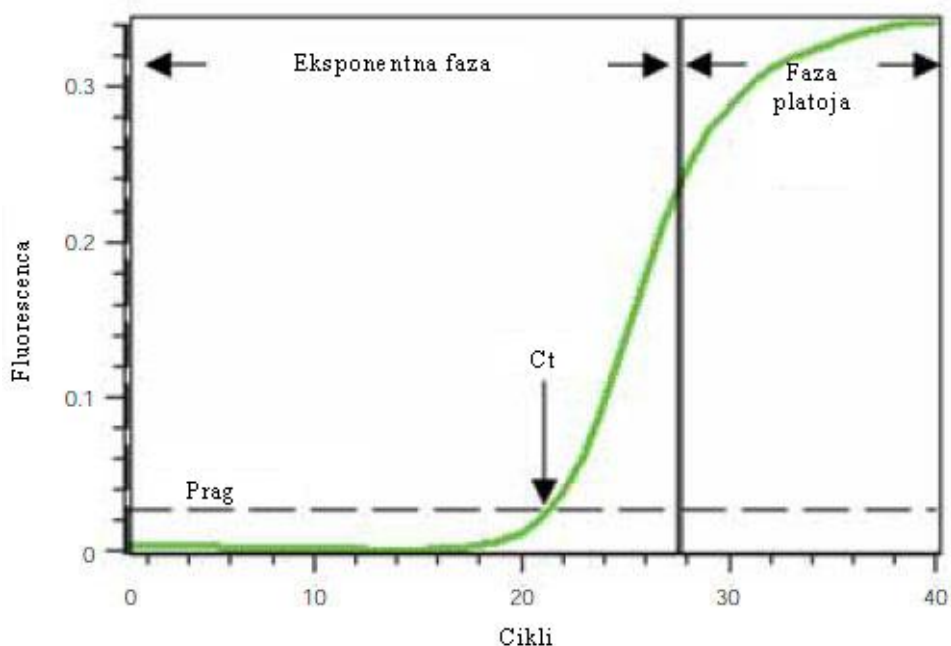
2.8.1 Fluorescentna *in situ* hibridizacija (angl. fluorescence *in situ* hybridisation-FISH)

Tehniko *in situ* hibridizacije sta prvič uporabila Gall in Pardue leta 1969, modificiral pa jo je Langer leta 1981, ki je uporabil neradioaktivne označevalce. Fluorescentna *in situ* hibridizacija je bila razvita kot komplementarna metoda za hitro genetsko mapiranje tekom projekta humanega genoma (Korenberg R.J. in sod., 1992) in omogoča povezavo med citogenetiko in molekularno genetiko (Sinclair A., 2002; Mark H.F. in sod., 1997). Metoda temelji na tvorbi hibridov, ki nastanejo zaradi komplementarnosti med odseki DNA ali RNA, zato je potrebno zagotoviti specifično, fluorescentno označeno sondo, ki se bo vezala na točno določen odsek DNA, ki nas zanima. Najprej na objektu steklo vezemo in fiksiramo tarčno DNA, nato si pripravimo fluorescentno označeno probo in oboje

denaturiramo s segrevanjem. Sledi hibridizacija (prileganje probe h komplementarnemu zaporedju), ki jo izvajamo čez noč pri določeni temperaturi. Ta zagotovi, poleg hibridizacijske mešanice, dodatno specifičnost. Po hibridizaciji speremo probe, ki se niso vezale na tarčno DNA in pregledamo vzorec pod fluorescentnim mikroskopom. (Kjeldsen E. in Kolvraa S., 2001). Občutljivost metode je lahko zelo visoka, do 10 kb, kar je nad ločljivostjo običajnih citogenetskih tehnik (Doug J in Demetrick, 1999; Fernhoff P.M., 2000). Metoda je uporabna za rutinske analize in prenatalno diagnostiko, detekcijo mikrodelecij, mikroduplicacij, markerskih kromosomov in za detekcijo drugih kromosomskih preureditev. Uporablja se tudi v raziskovalne namene, kot je genetsko mapiranje (Malcolm S., 1996; Waters J.J, 2000).

2.8.2 Verižna reakcija s polimerazo v realnem času (qRT-PCR)

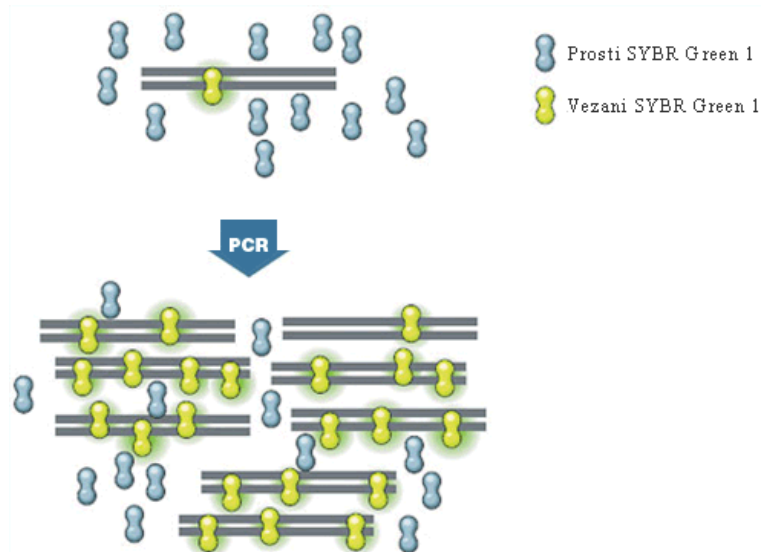
Verižno reakcijo s polimerazo v realnem času (v uporabi je tudi izraz kvantitativni PCR) so prvič predstavili Higuchi R. in sod. leta 1992, od takrat pa so vpeljali številne izboljšave in dopolnitve. Združuje pomnoževanje in detekcijo vzorca z uporabo fluorescentne kemije (Higuchi R. in sod., 1993). Reakcija je določena s časovnimi cikli. Kjer fluorescenca vzorca preseže fluorescenco ozadja, govorimo o pragu detekcije (C_t). Večja je začetna količina RNA v vzorcu, nižji bo prag detekcije (Heid C.A. in sod., 1996). Samo reakcijo lahko razdelimo v 4 faze: v linearno fazo, zgodnjo eksponentno fazo, eksponentno fazo in fazo platoja (Tichopad A. in sod., 2003). V eksponentni fazi so optimalne razmere za pomnoževanje PCR-pomnožka, ko pa je dosežen plato, postanejo razmere omejujoče, saj določenih reagentov zmanjka (Bustin S.A., 2000).



Slika 5: Primer amplifikacijske krivulje. Med eksponentno fazo se v vsakem ciklu količina PCR-pomnožkov podvoji. Reakcija se na koncu upočasni in ustavi v fazi platoja (cikli 28-40) (Real-time applications guide, 2006).

qRT-PCR lahko izvajamo na dva načina, kot enostopenjskega ali dvostopenjskega. Pri enostopenjskem potekata sinteza cDNA (komplementarne DNA) in samo pomnoževanje v eni reakciji, pri dvostopenjskem pa sta postopka ločena (Battaglia M. in sod., 1998).

Dobljene rezultate lahko kvantificiramo absolutno ali relativno. Pri absolutni kvantifikaciji potrebujemo redčitve z znano koncentracijo za izris standardne krivulje (Heid C.A. in sod., 1996), pri relativni kvantifikaciji pa uporabljamo referenco, na katero primerjamo našo tarčo, rezultat pa podajamo kot relativno razmerje med tarčo in referenco (Livak K.J. in Schmittgen T.D., 2001). Za detekcijo PCR-pomnožka so na voljo različna barvila in pristopi. Barvila, ki se vežejo na DNA (npr. SybrGREEN), oddajajo fluorescenco, ko so vezana. Ker se dvovertični pomnožek med reakcijo PCR kopiči, se povečuje tudi količina oddane fluorescence, le ta pa narašča sorazmerno količini DNA (Wittwer C.T. in sod., 1997). Takšna barvila so nespecifična in lahko dajo lažno pozitivne rezultate (npr. ko se vežejo na dimere začetnih oligonukleotidov) (Simpson D.A. in sod., 2000).



Slika 6: Princip delovanja barvila SYBR Green I. Fluorescenca močno naraste, ko se barvilo veže na DNA (Real-time PCR applications guide, 2006).

Dodatno možnost predstavljajo hibridizacijske probe, ki so označene z akceptorskim fluorescentnim barvilom na 3' koncu in donorskim barvilom na 5' koncu (Bernard P.S. in sod., 1998), kar omogoči učinek FRET (fluorescentni prenos resonančne energije) (Bernard P.S. in Wittwer C.T., 2000). Na voljo so še hidrolizne probe, kot so specifična barvila Taq-Man. Ta imajo na 5' koncu reportersko fluorescentno barvilo, na 3' koncu pa dušilec (Muller P.Y., 2002), kar omogoča dušilcu, da po principu učinka FRET, reducira emisijo reporterja, ko sta nedotaknjena (Clegg R.M., 1992). S številnimi možnostmi uporabe je verižna reakcija s polimerazo v realnem času ena najučinkovitejših, najboljčutljivejših, hitrih in natančnih metod, s katerimi merimo gensko ekspresijo (Wong M.L. in Medrano J.F., 2005).

3 MATERIAL IN METODE

3.1 MATERIAL

3.1.1 Seznam uporabljenih kemikalij in laboratorijskega materiala

V preglednicah 1-5 so prikazane vse kemikalije in laboratorijski material, ki smo jih uporabili pri magistrskem delu.

Preglednica 1: Seznam uporabljene laboratorijske opreme

Laboratorijska oprema	Proizvajalec
centrifuga Centric 150	Tehnica, Slovenija
centrifuga Heraeus Megafuge 11 Centrifuge	Thermo Scientific, ZDA
ledomat AF 80 Enodis	Scotsman, VB
Mini-Transilluminator	BioRad, ZDA
mikrovalovna pečica	Gorenje, Slovenija
Multiscan video Graphic printer UP-930	Sony, Japan
PowerPac 300 Power Supply	BioRad, ZDA
Rotor Gene 3000 (termocikler za qRT-PCR)	Qiagen, Nemčija
spektrofotometer Biophotometer	Eppendorf, Nemčija
spektrofotometer NanoDrop	Thermo Scientific, ZDA
tehnica Precisa 310C-3010D	Precisa Instruments AG, Švica
Tissue Lyser LT	Qiagen, Nemčija
TProfessional Basic Gradient (termocikler za PCR)	Biometra, Nemčija
Trinitron Super Fine Pitch monitor	Sony, Japan
vorteks Type reax 2000	Heidolph, Nemčija
zamrzovalna skrinja	Gorenje, Slovenija

Preglednica 2: Seznam uporabljenih kemikalij in pufrov

Kemikalija	Proizvajalec
absolutni etanol	Sigma-Aldrich, ZDA
agaroz	EuroClone, Nemčija
bromfenol modro	Sigma-Aldrich, ZDA
≥ 97 % DEPC	Sigma-Aldrich, ZDA
dimetil sulfoksid	Sigma-Aldrich, ZDA
etilen glikol	Sigma-Aldrich, ZDA
G+	Fermentas, Kanada
Tango	Fermentas, Kanada
16xA	Promega, ZDA
NEB1	Biolabs, VB
5x TBE elektroforetski puffer	Braun, Nemčija
varikina (10 %)	Sigma-Aldrich, ZDA

Preglednica 3: Seznam uporabljenih kompletov

Komplet	Proizvajalec
Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (2X), Rox Solution provided	Thermo Scientific, ZDA
RNeasy® Mini Kit	Qiagen, Nemčija
RNase-Free DNase Set	Qiagen, Nemčija
SuperScript® VILO™ cDNA Synthesis Kit	Invitrogen, ZDA

Preglednica 4: Seznam uporabljenih laboratorijskih pripomočkov

Laboratorijski pripomoček	Proizvajalec
avtomatska pipeta Multipetete Stream	Eppendorf, Nemčija
elektroforetska kadička	BioRad, ZDA

Se nadaljuje

Nadaljevanje preglednice 4. Seznam uporabljenih laboratorijskih pripomočkov

Laboratorijski pripomoček	Proizvajalec
jecklene kroglice 5mm (200) za Tissue Lyser LT	Qiagen, Nemčija
8,5 mm kiveta	Eppendorf, Nemčija
2 ml-mikrocentrifugirke brez RNaz	Eppendorf, Nemčija
nastavki za pipete brez RNaz velikosti 10 µl, 100 µl, 1000 µl	Ratiolab, Nemčija (10 in 100) in Thermo Scientific, ZDA (1000)
PCR-mikrocentrifugirke brez nukleaz	Eppendorf, Nemčija
polavtomatske pipete	Thermo Scientific, ZDA

Poleg naštetih pripomočkov smo potrebovali še merilni valj, čaše, stekleno ploščo, pinceto, skalpel, odlagalnik nastavkov za pipete, papirnate serviete in rokavice za enkratno uporabo.

Preglednica 5: Seznam uporabljenih reagentov

Reagent	Sestava
nanašalni pufer	1 µL barvila Sybr green I; 99 µL dimetil sulfoksida; 100 µL barvila bromfenol modro; 50 µL etilen glikola
raztopina varikine	10-odstotno varikino redčimo z vodo v razmerju 1:3
70-odstotni etanol	Za 1 liter potrebujemo 700 ml absolutnega etanola in 300 ml vode

3.1.2 Tkivni vzorci

3.1.2.1 Pridobivanje tkivnih vzorcev

Tkivni vzorci so bili odvzeti med operativnim posegom na Oddelku za otorinolaringologijo in so bili poslani v molekularno analizo v laboratorij za medicinsko genetiko Univerzitetnega kliničnega centra Maribor. Mesto odvzema vzorcev je izbral operater na podlagi makroskopske ocene. Tumorji in zdrava tkiva so bili odvzeti pri istih pacientih. Shranjeni so bili v raztopini »RNA later«, ki omogoča hitro stabilizacijo RNA. Raztopino smo pred zamrzovanjem vzorcev na -80 °C odstranili. Tako pripravljeni vzorci so bili shranjeni do nadaljnjih raziskav.

3.1.2.2 Pregled tkivnih vzorcev

Tkivni vzorci so bili tumorji in zdravo tkivo iz otorinolaringološkega področja. Zdrava tkiva smo uporabili kot kontrole. Naš raziskovalni vzorec je zajemal 49 tumorjev (pregl. 6) in 22 zdravih kontrolnih vzorcev.

Preglednica 6: Seznam tumorjev za izolacijo RNA

Oznaka tumorja	Starost pacienta	Diagnoza	Stadij	Histološki tip in maligna invazivnost (gradus)
1*	52	Ca hypopharyngis	pT4a N2a	ploščatocelični karcinom, G2
2	76	Ca cavi oris (linguae lat. sin.)	T3 N0	ploščatocelični karcinom, G2
3*	57	Ca cavi oris	T4a N2c	ploščatocelični karcinom, G3
4*	51	Ca oropharyngis st. post op.	pT4 pN2b	ploščatocelični karcinom, G2
5	58	Ca baseos oris, st. post op.	pT1 N1M0	ploščatocelični karcinom, G3

Se nadaljuje

Nadaljevanje preglednice 6. Seznam tumorjev za izolacijo RNA

Oznaka tumorja	Starost pacienta	Diagnoza	Stadij	Histološki tip in maligna invazivnost (gradus)
6	58	Ca hipopharyngis (sinus piriformis dex.)	pT4a N2c	ploščatocelični karcinom, G2
7*	52	Ca cavi oris	T4 N1	ploščatocelični karcinom, G2
8	53	Ca cavi oris st. post op.	pT4 N2b	ploščatocelični karcinom, G2
9	69	Ca oropharyngis	T4a N2c	ploščatocelični karcinom, G2
10*	57	Ca cavi oris	T3 N2c	ploščatocelični karcinom, G2
11	65	Ca supraglottidis (epiglottidis)	T2 N0	ploščatocelični karcinom, G2
12*	52	Ca oropharyngis (tonsillae dex.)	T1 N2a	ploščatocelični karcinom, G3
13	69	Ca oropharyngis (sulcus glosotonsillaris sin.)	T3	ploščatocelični karcinom, G1
14	69	Ca cavi oris (retromolaris dex. Sup.)	T4bN1	ploščatocelični karcinom, G2
15	71	Ca hypopharyngis	T4 bN1	ploščatocelični karcinom, G2
16	57	Ca oropharyngis (paries lat. dex.)	T3 N2c	ploščatocelični karcinom, G2
17	64	Ca baseos oris, st. post op.	pT2 N2c	ploščatocelični karcinom, G3
18	77	Ca cavi oris (linguae lat. dex.)	T3N0	ploščatocelični karcinom, G1
19*	58	Ca cavum oris (linguae dex.),st. post op.	pT2 pN2b	poščatocelični karcinom, G2
20	56	Ca oropharyngis	T4 N2b	ploščatocelični karcinom, G3
21*	69	Ca cavi oris et linguae	pT2 N0	ploščatocelični karcinom, G2
22	68	Ca. baseos oris	pT4 N0	ploščatocelični karcinom, G3
23*	39	Ca oropharyngis valecullae dex.	T4a N2	ploščatocelični karcinom, G2
24*	67	Ca cavum oris (baseos oris dex.)	T4a N1	poščatocelični karcinom, G2
25	50	Ca cavi oris (reg. retromolaris sin.)	T2N0 M0	ploščatocelični karcinom, G1
26	75	Ca cavum oris	T2 N0	ploščatocelični karcinom, G2
27	69	Ca cavi oris (basis oris anterior)	T4 N1	ploščatocelični karcinom, G1
28*	52	Ca cavi oris (basis oris sin.)	T4b N2b	ploščatocelični karcinom, G3
29*	72	Ca linguae, st. post op.	T2 N0	ploščatocelični karcinom, G2 ploščatocelični karcinom, G1
30	59	Ca oropharyngis	T3 N0	
31	75	Ca labii inf. st. p. op.	T1N0	ploščatocelični karcinom, G1
32	69	Ca cavi oris (processus alveolaris mandibule dex.)	T2 N2b	ploščatocelični karcinom, G2
33	67	Ca oropharyngis (paries lat. dex.)	T3 N2c	ploščatocelični karcinom, G2
34*	64	Ca cavi oris, st. post op.	pT2 N0	ploščatocelični karcinom, G1
35	52	Ca oropharyngis	T4b N2c M0	ploščatocelični karcinom, G2
36	47	Ca cavi oris basis oris lat. sin	T4a N1	ploščatocelični karcinom, G2

Se nadaljuje

Nadaljevanje preglednice 6. Seznam tumorjev za izolacijo RNA

Oznaka tumorja	Starost pacienta	Diagnoza	Stadij	Histološki tip in maligna invazivnost (gradus)
37	58	ca linguae st. post op.	pT4a N2c	ploščatocelični karcinom, G2
38*	60	Ca oropharyngis (palati molli sin.)	T1N0	ploščatocelični karcinom, G2
39*	64	Ca cavi oris et oropharyngis	pT4 N2b	ploščatocelični karcinom, G2
40	45	Ca oropharyngis (tonsillae sin)	T2 N3 M0	ploščatocelični karcinom, G2
41*	55	Ca basis oris st. post op.	pT4a N0	ploščatocelični karcinom, G2
42	66	Ca cavi oris (linguae lat. dex.)	T4a N2b	ploščatocelični karcinom, G2
43	64	Ca oropharyngis	T0N0	
44	46	Ca oropharyngis	T4N0	ploščatocelični karcinom, G3
45*	52	Ca oropharyngis	T4a N1	ploščatocelični karcinom, G2
46	49	Ca cavi oris (basis oris ant.)	T4a N1	ploščatocelični karcinom, G2
47*	52	Ca oropharyngis (tonsillae dex.)	pT2 pN2b	ploščatocelični karcinom, G2
48	61	Ca cavum oris (linguae T4N0)	T4N0	ploščatocelični karcinom, G2
49	58	Ca cavum oris (buccae dex.)	T4aN2bM0	ploščatocelični karcinom, G1

* pri označenih tumorjih smo od istega pacienta izolirali RNA iz zdravega tkiva

Tkivnim vzorcem smo zaradi anonimnosti dodelili številčno oznako, starost pacientov pa smo preračunali na leto 2012. Za oceno stadija smo navedli klinični TNM ali patohistološki (tudi pooperativni) pTNM. Klinični TNM podajamo na podlagi slikovne diagnostike in endoskopske preiskave, patohistološki TNM pa predstavlja dopolnitev kliničnega TNM (Hotimir L., 2009: 56-74).

Oznaka TNM pomeni:

- T (angl. tumor), s katero opišemo primarni tumor (T0-T4)
- N (angl. node), s katero opišemo razširitev obolenja na regionalne bezgavke (N0-N4)
- M (angl. metastasis), s katero opišemo odsotnost ali prisotnost oddaljenih zasevkov (M0-M1) (Hotimir L., 2009: 56-74)

Tako pri kliničnem kot pri patohistološkem TNM se uporablja merilo razvrstitvenega sistema TNM, ki ga določata Ameriška in Evropska zveza za boj proti raku, AJCC (angl. American Joint Comitee on Cancer) in UICC (fr. Union Internationale Contre le Cancer). Takšen sistem velja samo za karcinome (Hotimir L., 2009: 56-74; Strojan P. in sod., 2009: 254-271).

Preglednica 7: Razvrstitveni sistem UICC TNM za ORL-karcinome (prirejeno po Strojman P., 2009:103)

Ustna votlina, orofarinks, hipofarinks, grlo, nosne in obnosne votline, žleze slinavke		Nazofarinks	
Skupni stadij	Stadij TNM	Skupni stadij	Stadij TNM
I	T1N0M0	I	T1N0M0
II	T2N0 M0	IIA	T2aN0M0
		IIB	T1N1M0, T2aN1M0, T2bN0-1M0
III	T1-2N1M0, T3N0-1M0	III	T1N2M0, T2N2M0, T3N0-2M0
IVA	T1-3N2M0, T4aN0-2M0	IVA	T4N0-2M0
IVB	TvsiN3M0, T4bNvsiM0	IVB	TvsiN3M0
IVC	TvsiNvsiM1	IVC	TvsiNvsiM1

Podatke o histološkem tipu in invazivnosti smo pridobili od histopatologa. Pri vseh tumorjih gre za ploščatocelični karcinom, ki je najpogostejši histološki tip raka ušesa, nosu in žrela. Histopatolog določi stopnjo malignosti (gradus) ploščatoceličnega karcinoma glede na stopnjo polimorfije celic in jedra, glede na spremembo razmerja med citoplazmo in jedrom v korist jedra, glede na nepravilno razporeditev kromatina in zgostitev v jedrih, s številom in velikostjo jedrc in s številom mitoz in pojavom patoloških mitoz, in glede na diferenciacijo in anaplazijo tumorskih celic. Slabša je diferenciacija in višja je stopnja anaplazije tumorskih celic, tem bolj je tumor nagnjen k hitrejši rasti ter zasevanju (Strojman P. in sod., 2009: 254-271):

- tumorji nizke maligne stopnje, G1 (gradus 1): dobra diferenciacija, slaba anaplazija tumorskih celic
- tumorji srednje maligne stopnje, G2 (gradus 2): srednja diferenciacija, srednja anaplazija tumorskih celic
- tumorji visoke maligne stopnje, G3 (gradus 3): slaba diferenciacija, visoka anaplazija tumorskih celic (Bračko M., 2009: 84-88)

3.2 METODE

3.2.1 Fluorescentna *in situ* hibridizacija

Pred začetkom magistrskega dela smo razpolagali s podatki o številu kopij gena *sox2* na kromosomu 3 (pregl. 17), ki so bili pridobljeni z metodo FISH (metoda je opisana pod točko 2.8.1, vendar je pri magistrski nalogi nismo sami izvajali). Na podlagi teh rezultatov smo ocenili pričakovano ekspresijo gena v preiskovanih tumorjih.

3.2.2 Izolacija RNA iz tkivnih vzorcev

Pred in po delu smo delovno površino (delovni pult) očistili z raztopino varikine, nato s 70-odstotnim etanolom, nato pa še z vodo. Z varikino smo uničili RNaze (encime, ki lahko razgradijo RNA in zmanjšajo uspešnost izolacije), z etanolom in vodo pa smo odstranili ostanke varikine. Za odstranitev RNaz z laboratorijskih pripomočkov (pipete, škatle z nastavki za pipete (10 μ l, 100 μ l, 1000 μ l), pincete in skalpel) in delovne površine laminarja smo uporabili RNase ZAP. Ves čas izolacije smo uporabljali rokavice in jih redno menjavali.

3.2.2.1 Obdelava vode z DEPC (dietil pirokarbonat)

Za izolacijo RNA smo potrebovali vodo brez RNaz, zato smo si pripravili večjo količino vode (1 liter), ki smo jo obdelali z DEPC. 999 ml vode smo dodali 1 ml DEPC in dobro

premešali. Pripravljeno raztopino smo segrevali 2 uri na temperaturi 37 °C, nato pa jo dobro prevreli, da smo se znebili ostankov DEPC-a. Tako pripravljeno vodo smo hranili na 2-8 °C in jo uporabljali za čiščenje površin ter pripravo 70-odstotnega etanola.

3.2.2.2 Obdelava vzorcev z encimom DNaza

Za obdelavo vzorcev z encimom DNaza smo uporabili komplet RNase-Free DNase Set. Komplet vsebuje liofilizirano DNazo I brez RNaz, pufer RDD in vodo brez RNaz. Shranili smo ga na 2-8 °C.

V vialo, v kateri je liofilizirana DNaza I, smo z iglo dodali 550 µl priložene vode brez RNaz. Vsebino smo nežno premešali z obračanjem vial, nato pa jo z iglo prenesli v svežo mikrocentrifugirko in jo shranili na -20 °C. Tako pripravljeno raztopino DNaze I smo uporabili za izolacijo RNA, in sicer smo vsakemu vzorcu dodali 10 µl pripravljenega encima in 70 µl pufru RDD. S tem smo se znebili genomske DNA, ki se je med izolacijo vezala na membrano kolone.

3.2.2.3 Potek izolacije RNA

Za izolacijo RNA iz prejetih tkivnih vzorcev smo uporabili komplet RNeasy® Mini Kit. Tkivni vzorec smo stehali, saj smo potrebovali le 20 mg vzorca. Do prenosa na RNeasy Mini spin kolono je delo potekalo na delovnem pultu, po prenosu pa v laminarju.

Preglednica 8: Funkcija pufov, prisotnih v kompletu RNeasy® Mini Kitu. (povzeto po RNeasy Mini Kit Handbook, 2010)

Pufer	Funkcija pufru
pufer RLT	Povzroča lizo celic, hkrati pa vsebuje gvanidinijev izotiocianat, ki omogoča lažjo vezavo RNA na membrano kolone.
pufer RW1	Vsebuje gvanidinijevo sol in etanol ter tako učinkovito odstrani biomolekule, kot so ogljikovi hidrati, proteini in maščobne kisline, ki se nespecifično vežejo na membrano kolone. RNA, večja od 200 bp, ostane vezana na membrano kolone.
pufer RPE	V kompletu je koncentrat, zato mu moramo pred uporabo dodati 4x volumen 96-100% etanola. Odstrani vse ostanke soli, ki so ostale na koloni z uporabo predhodnih pufov.
Voda brez RNaz	Omogoči odstranitev RNA s kolone.

Izolacija enega tkivnega vzorca je potekala tako, da smo na stekleni podlagi s skalpelom razrezali tkivo na čim manjše koščke in ga prenesli v 2 ml-mikrocentrifugirko brez RNaz. Tkiva so bila pred zamrzovanjem shranjena v raztopini »RNA later« in so bila zato nekoliko trša, zato smo koščkom tkiva dodali 600 µl pufru RLT. V mikrocentrifugirko smo za homogenizacijo tkiva v aparatu Tissue Lyser LT dali 2 jekleni kroglici s premerom 5 mm. Tkiva smo homogenizirali 10 min pri 50 Hz oziroma dokler ni bilo več vidnih nobenih ostankov tkiva. Po končani homogenizaciji smo s pinceto odstranili jeklene kroglice in centrifugirali homogenat 3 min pri 13000 x g in prenesli supernatant v novo 2 ml-mikrocentrifugirko. Supernatantu smo dodali 1x volumen 70-odstotnega etanola in s pipeto dobro premešali. Z dodatkom 70-odstotnega etanola smo zagotovili selektivne razmere za vezavo RNA na membrano kolone. Na pripravljeno kolono, postavljeno v prazno 2 ml-zbirno mikrocentrifugirko, smo vnesli 700 µl vzorca, skupaj z morebitno oborino, in centrifugirali 15 s pri 8000 x g. S tem smo RNA vezali na kolono. Po

centrifugiranju smo odstranili tekočino iz zbirne mikrocentrifugirke in v kolono dodali 350 μ l pufra RW1 ter centrifugirali 15 s pri 8000 x g. Po prvem spiranju s pufrom RW1 smo RNA tretirali z DNazo I. V kolono smo odpipetirali 80 μ l pripravljene raztopine encima in pufra RDD (kot je opisano v točki 3.2.2.2) in jo pustili inkubirat 15 min na sobni temperaturi. Po inkubaciji smo v kolono spet odpipetirali 350 μ l pufra RW1 in centrifugirali 15 s pri 8000 x g. Po centrifugiranju smo odstranili tekočino iz zbirne mikrocentrifugirke. Nato smo vnesli v kolono 500 μ l pufra RPE in centrifugirali 15 s pri 8000 x g. Po centrifugiranju smo odstranili tekočino iz zbirne mikrocentrifugirke in ta korak še enkrat ponovili, vendar smo tokrat centrifugirali 2 min pri 8000 x g. V naslednjemkoraku smo prestavili kolono v novo sterilno zbirno mikrocentrifugirko in centrifugirali 1 min pri 13000 x g. Nato smo kolono prestavili v novo sterilno 1,5 ml-mikrocentrifugirko, dodali neposredno na membrano kolone 40 μ l vode brez RNaz in centrifugirali 1 min pri 8000 x g. S tem smo RNA odstranili s kolone. Ker smo potrebovali visoko koncentracijo RNA, smo eluat iz prejšnjega koraka ponovno nanesti na že prej uporabljeno kolono, postavljeno v 1,5 ml mikrocentrifugirko, ki je tudi že bila uporabljena, in spet centrifugirali 1 min pri 8000 x g, da se je RNA reeluirala. Izolirano RNA smo shranili na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (RNeasy Mini Handbook, 2010).



Slika 7: Shematični prikaz izolacije RNA iz tkiv (povzeto po RNeasy Mini Handbook, 2010)

3.2.3 Merjenje koncentracije izolirane RNA

Za merjenje koncentracije izolirane RNA smo uporabili program za merjenje RNA

spektrofotometer Biophotometer. Uporabili smo novo 8,5 mm-kiveto, umerili spektrofotometer z vodo brez RNaz, nato pa smo za vsak vzorec opravili 3 meritve koncentracije RNA, pri čemer smo 3 μ l RNA razredčili v 97 μ l vode brez RNaz in nato izračunali povprečno koncentracijo. Koncentracijo smo merili pri valovni dolžini 260 nm. Izračunane povprečne koncentracije smo upoštevali pri nadaljnjem delu.

3.2.4 Prepis RNA v komplementarno DNA (cDNA)

Za prepis izolirane RNA v cDNA smo uporabili komplet SuperScript® VILO™ cDNA Synthesis Kit.

Preglednica 9: Reagenti v kompletu SuperScript® VILO™ cDNA Synthesis Kit in njihova sestava

Reagent	Sestava reagenta
10X SuperScript®	SuperScript® III reverzna transkriptaza, RNaseOUT™ rekombinantni ribonukleazni inhibitor, ustrezni helper protein
5X VILO	dNTP-ji MgCl ₂ začetni oligonukleotidi ustrezen pufer, optimiziran za qRT-PCR

Za sintezo cDNA smo potrebovali 2,5 μ g RNA. Ustrezne količine smo si preračunali glede na izmerjene koncentracije RNA v vzorcu. Reakcijske mešanice smo pripravljali na ledu. Za pripravo mešanice za prepis v cDNA smo potrebovali:

- ustrezno količino RNA (2,5 μ g),
- 4 μ l reakcijske mešanice 5X VILO,
- 2 μ l 10X encimske mešanice,
- z DEPC tretirano vodo, s katero smo mešanico dopolnili do končnega volumna 20 μ l.

Vse pripravljene mešanice smo premešali na vorteksu in jih centrifugirali 2 min pri 2100 x g. Komplementarno DNA smo sintetizirali ob ustreznih razmerah z aparatom PCR TProfessional Basic Gradient po naslednjem programu:

1. 10 min inkubacija pri 25 °C, pri čemer pride do aktivacije reverzne transkriptaze
2. 60 min inkubacija pri 42 °C, kar predstavlja optimalne razmere, pri katerih reverzna transkriptaza sintetizira cDNA
3. 5 min inkubacija pri 85 °C, reverzna transkriptaza se inaktivira

Sintetizirano cDNA smo shranili na -20 °C do nadaljnje uporabe.

3.2.5 Verižna reakcija s polimerazo v realnem času

3.2.5.1 Osnove verižne reakcije s polimerazo v realnem času

qRT-PCR (angl. real time polymerase chain reaction) temelji na klasični metodi verižne reakcije s polimerazo (PCR), pri kateri termostabilna DNA-polimeraza (*Taq* polimeraza) pomnožuje določen odsek DNA (amplikon), ki ga lahko predstavlja tudi daljše zaporedje. Reakcija PCR zahteva številne cikle, vsak cikel pa je sestavljen iz 3 osnovnih korakov: (i) začetne denaturacije tarčne DNA pri 94-96 °C, (ii) cikličnega pomnoževanja, pri katerem pride v vsakem ciklu do denaturacije tarčne DNA, vezave začetnih oligonukleotidov (angl. primer) na enoverižno DNA, nato pa se veriga dopolni z manjkajočimi nukleotidi.

Temperatura ciklov je odvisna od talilne temperature začetnih oligonukleotidov. (iii) zaključnega podaljševanja DNA z DNA-polimerazo pri 72 °C. Delovanje DNA-polimeraze natančno usmerimo s pomočjo začetnih oligonukleotidov, ki označujejo začetni (angl. forward primer) in končni del (angl. reverse primer) odseka DNA, ki ga pomnožujemo. Teoretično imamo na koncu vsakega cikla dvakrat več pomnožkov kot na začetku (Kolmodin L.A. in Williams J.F., 2000). Pri klasičnem PCR je po zaključeni reakciji potrebna še končna analiza pomnoženega PCR-pomnožka z agarozno elektroforezo. qRT-PCR je kvantitativna metoda, pri kateri je kopičenje PCR-pomnožka možno opazovati tekom reakcije, torej v realnem času (»real time«). Takšna detekcija PCR-pomnožka je omogočena z uporabo fluorescentnih molekul, ki nam tekom reakcije posredujejo informacijo o povečevanju količine DNA. Pri tem je fluorescentni signal sorazmeren količini nastale DNA (večja je fluorescenca, več je DNA v vzorcu) (Real-time applications guide, 2006).

3.2.5.2 Izvedba verižne reakcije s polimerazo v realnem času

Metodo qRT-PCR v realnem času smo izvajali po navodilih Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (2X), Rox Solution provided. Komplet sestavljata reagenta Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (2X) in raztopina ROX ter voda brez nukleaz. Uporabili smo torej metodo, pri kateri spremljamo fluorescenco nespecifičnega, interkalirajočega fluorescentnega barvila SYBR® Green I.

Preglednica 10: Sestava reagenta Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (2X) in funkcija posameznih komponent

Kemikalija	Funkcija
Barvilo SYBR® Green I	Fluorescentno barvilo, ki začne močneje fluorescirati, šele ko se vstavi v dvoverižno DNA. Z večanjem količine PCR-pomnožka je vedno več zaznavane fluorescence.
Polimeraza Maxima® Hot Start <i>Taq</i> DNA	Pri sobni temperaturi je neaktivna in se aktivira šele pri 95 °C. Omogoča sintezo novih DNA verig.
Mešanica dNTP-jev	Nukleotidi (dATP, dCTP ...), ki so potrebni za sintezo nove DNA-verige.
Pufer PCR	Vsebuje KCl in (NH ₄) ₂ SO ₄ za zagotavljanje specifičnega prileganja začetnih oligonukleotidov.

Pri proizvajalcu Eurofins MWG Operon (Nemčija) smo kupili začetne oligonukleotide za pomnoževanje gena *sox2* in gena za β -aktin. β -aktin smo uporabili kot referenčni gen, torej kot endogeno kontrolo, saj je prisoten v vseh vzorcih, se ne spreminja in se vedno izraža. Gen *sox2* je tarčni gen, katerega stopnjo ekspresije v tumorjih smo primerjali s številom njegovih kopij v tumorju.

Preglednica 11: Nukleotidno zaporedje in T_m začetnih oligonukleotidov za pomnoževanje gena za β -aktin in pomnoževanje gena *sox2* v tkivnih vzorcih

Začetni oligonukleotid	Nukleotidno zaporedje	T_m (°C)*
ACTB-F	5' catcgagcagggcatcgta 3'	69,1
ACTB-R	5' tagcacagcctggatagcaac 3'	60,4
SOX2V2-F	5' caagatgcacaactcggaga 3'	60,0
SOX2V2-R	5' gggcagcgtgtactatcct 3'	59,2

*Temperatura, pri kateri je 50 % začetnih oligonukleotidov vezanih na tarčno DNA, 50 % pa jih je prosto v raztopini.

3.2.5.2.1 Začetna faza izvedbe qRT-PCR: priprava standardov, vzorcev in negativnih kontrol za qRT-PCR

Vzorci (tumorje in kontrole), negativno kontrolo in standarde smo pripravljali v dveh paralelkah po 20 μ l. Standarde smo uporabili za izris standardne krivulje, s pomočjo katere je program določil koncentracijo vzorcev.

Negativno kontrolo (NTC) smo pripravili tako, da smo reakcijski mešanici namesto vzorca cDNA dodali vodo, v paralelki pa smo imeli le 20 μ l vode, brez kemikalij.

Za pripravo standardov smo najprej pripravili založno raztopino iz vseh sintetiziranih cDNA iz tumorjev, tako da smo od vsake cDNA odvzeli 3 μ l in jih združili v eni mikrocentrifugirki. Iz te smo si pripravili 3 razredčine, in sicer v razmerju 1:4, 1:16 in 1:64, ter izmerili njihovo koncentracijo na aparatu NanoDrop 2000c spektrofotometer (pregl. 12). Nastavili smo program za merjenje DNA in aparat umerili z 1,5 μ l vode brez DNaz. Nato smo obrisali merilno ročico in na sprejemno vlakno nanесли 1,5 μ l vzorca cDNA. Koncentracije smo merili pri valovni dolžini 260 nm. Na koncu smo imeli pripravljene 4 standarde s koncentracijami, ki so prikazane v naslednji preglednici.

Preglednica 12: Pripravljene standardi in njihove koncentracije

Standard	Koncentracija (ng/ μ l)
Založna raztopina	2231,5
1:4	461,6
1:16	144,8
1:64	41,7

Za pripravo 1 reakcijske mešanice smo potrebovali 1 μ l cDNA (standarda, vzorcev) oziroma pri pripravi NTC 1 μ l vode, 10 μ l Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (2X), 0,5 μ l obeh začetnih oligonukleotidov (najprej smo vse vzorce pripravili za pomnoževanje β -aktina in šele nato za pomnoževanje gena *sox2*) in 8 μ l vode brez nukleaz. Da smo si olajšali delo, smo si pripravili reakcijsko mešanico za toliko reakcij, kolikor smo jih dali na qRT-PCR, po 20 μ l prenesli v mikrocentrifugirke in šele nato dodali cDNA.

3.2.5.2.2 Končna faza izvedbe qRT-PCR

PCR v realnem času je potekal v aparatu Rotor Gene 3000 po programu, prikazanem v naslednji preglednici.

Preglednica 13: Program qRT-PCR

Faza pomnoževanja	Temperatura in čas trajanja posamezne faze
Začetna denaturacija	95 °C, 10 min denaturacija 94 °C, 30 s
30 ciklov pomnoževanja	prileganje začetnih oligonukleotidov 60 °C, 30 s podaljševanje 72 °C, 60 s
Zaključno podaljševanje	72 °C, 10 min

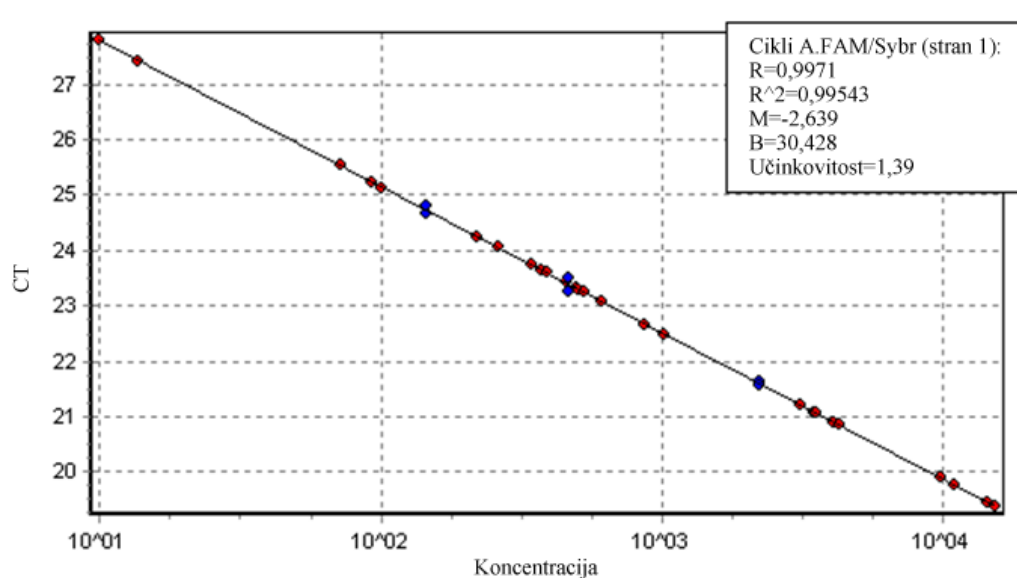
Aparat ima kovinski element s 36 odprtiniami za PCR-mikrocentrifugirke. Tako smo lahko naenkrat obdelali 13 vzorcev (pripravljenih v dveh vzporednih meritvah), saj smo v preostale odprtine dali standarde in negativno kontrolo. Tako smo najprej izvedli 6 serij

qRT-PCR za pomnožitev gena za β -aktin in nato še 6 serij qRT-PCR za pomnožitev gena *sox2*. PCR-pomnožke smo shranili na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.2.5.3 Relativna kvantifikacija rezultatov meritev ekspresije, dobljenih z metodo qRT-PCR

Dobljene rezultate meritev ekspresije genov *sox2* in β -aktina smo analizirali in relativno kvantificirali s pomočjo priložene programske opreme Rotor Gene 3000. Relativna kvantifikacija nam omogoča opazovanje količinskih razlik v ekspresiji posameznega gena med različnimi vzorci.

Relativno kvantifikacijo smo izvedli tako, da nam je program na osnovi nastavljene linije fluorescentnega praga detekcije (angl. threshold) izračunal vrednosti Ct vzorcev, na osnovi standardov, ki smo jih vključili v vsako reakcijo, pa nam je izrisal standardne krivulje (sl. 8) in tako izračunal še koncentracije vzorcev.



Slika 8: Standardna krivulja vzorcev s pomnoženim genom *sox2*. Prikazana krivulja je bila izrisana na osnovi standardov (pregl. 12). Zagotovili smo optimizacijo, saj je $R^2 > 0.980$.

Analizo smo nadaljevali v programu Microsoft Excel, kjer smo za posamezni vzorec izračunali razmerja med genom *sox2* in genom za β -aktin. Ker smo vzorce pripravljali v dveh vzporednih meritvah, smo najprej izračunali povprečne koncentracije vzorcev za gen β -aktin in gen *sox2*, nato pa izračunali relativno razmerje koncentracij PCR-pomnožkov genov *sox2*/ β -aktin po naslednji enačbi:

$$\text{Relativno razmerje koncentracij PCR-pomnožkov genov } sox2/\beta\text{-aktin} = \frac{\text{povprečna koncentracija gena } sox2}{\text{povprečna koncentracija } \beta\text{-aktina}} \dots(1)$$

Dobljena relativna razmerja koncentracij smo statistično analizirali (točka 3.2.7).

3.2.6 Analiza polimorfizma dolžin restrikcijskih fragmentov (RFLP)

3.2.6.1 Osnove metode RFLP

RFLP (angl. restriction fragment length polymorphism) je molekularna metoda, pri kateri s specifičnimi restrikcijskimi endonukleazami razrežemo DNA na različno dolge fragmente. Restrikcijski encimi so izolirani iz bakterij in imajo cepitvena mesta na različnih, specifičnih nukleotidnih sekvencah. Običajno tarčno DNA najprej pomnožimo z metodo verižne reakcije s polimerazo, nato pa ji dodamo restrikcijske encime in ustrezne pufre. Na koncu ločimo fragmente po velikosti z agarozno gelsko elektroforezo. Različni geni imajo različno nukleotidno zaporedje, zato jih restrikcijski encimi tudi drugače razrežejo. Zaradi tega je to učinkovita metoda za razlikovanje med geni, ki so si sorodni.

3.2.6.2 Namen uporabe metode RFLP

Z analizo polimorfizma dolžin restrikcijskih fragmentov PCR-pomnožkov smo preverili, če so začetni oligonukleotidi za gen *sox2* res pomnožili pravi gen (gen *sox2* na kromosomu 3) in ne slučajno gena *sox1* na kromosomu 15. To bi se lahko zgodilo zaradi tega, ker je gen *sox2* sestavljen iz enega eksona brez intronov, na koncih katerega najdemo neujemanja baz (angl. mismatch). Zaradi tega se lahko začetni oligonukleotidi nepravilno prilegajo.

3.2.6.3 Izvedba restrikcije

Restrikcijske mešanice smo pripravili tako, da smo 20 µl PCR-pomnožku gena *sox2* dodali 1 µl encima (pregl. 14), 2,5 µl ustreznega pufru za izbrani encim in 1,5 µl vode. Na koncu smo imeli pripravljenih 6 restrikcijskih mešanic (za vsak encim eno) in eno kontrolo, ki smo jih na plavajočem nosilcu inkubirali v vodni kopeli. Inkubacija je potekala čez noč na temperaturi 37 °C.

Preglednica 14: Seznam uporabljenih restrikcijskih encimov in njihovo število restrikcijskih mest

Restrikcijski encim v ustreznem pufru	Število cepitvenih mest v genu <i>sox2</i>	Število cepitvenih mest v genu <i>sox1</i>
<i>MnII</i> v pufru G+	1	2
<i>NlaIV</i> (<i>BspL</i>) v pufru Tango	2	1
<i>RsaI</i> v pufru Tango	1	2
<i>HpaII</i> v pufru 16xA	3	2
<i>HhaI</i> v pufru Tango	3	5
<i>HaeIII</i> v pufru NEB1	2	6

3.2.6.4 Izvedba agarozne gelske elektroforeze

Agarozna gelska elektroforeza je metoda, s katero ločujemo nukleinske kisline na osnovi velikosti in oblike. Potovanje nukleinskih kislin omogočimo z vzpostavitvijo električnega polja, hitrost potovanja pa je odvisna od gostote gela, velikosti in oblike nukleinskih kislin, sestave elektroforeznega pufru ter jakosti električnega polja. Ker so nukleinske kisline negativno nabite, potujejo vedno od katode k pozitivno nabiti anodi, pri čemer krajše potujejo dlje (Barril P. in Nates S., 2012).

Pripravili smo si 3-odstotni agarozni gel, s katerim lahko ločimo molekule velikosti 100 do 1000 bp (baznih parov) (Barril P. in Nates S., 2012). V erlenmajerico smo zatehtali 0,75 g agaroze in z merilnim valjem dodali 25 ml pufru 0,5X TBE. To smo segrevali v mikrovalovni pečici, dokler se agarozna ni popolnoma stopila. Gel smo vlili v nosilec za vlivanje gela, vanj vstavili glavniček za 8 žepkov in počakali, da se je gel strdil. Glavniček

smo odstranili iz strjenega gela, gel pa prenesli v elektroforetsko kadičko in jo napolnili s pufrom 0,5X TBE tako, da je bil gel popolnoma prekrit. Z avtomatsko pipeto smo vsaki restrikcijski mešanici dodali 3 μ l nanašalnega pufrja in jo vnesli v posamezne žepke gela (nanesli smo celotnih 23 μ l). Nanašalni pufer vsebuje SYBR Green I, ki se veže na dvoveržno DNA in pri izpostavitvi UV svetlobi fluorescira. Elektroforeza je potekala 40 min pri napetosti 160 V (Powerpac300 Power Supply).

Po končani elektroforezi smo gel prenesli v posebno temno sobo in ga položili na UV-transiluminator, ga presvetlili z UV svetlobo, posneli s kamero sliko in jo natisnili.

3.2.7 Statistična analiza

Podatke smo statistično analizirali z Mann-Whitney U-testom. Analizo smo izvedli s programom Univerze Vassar v New Yorku, ki je prosto dostopen na spletni strani <http://www.vassarstats.net/utest.html>. Ker je naš vzorec dovolj velik ($N \geq 20$), nam program opravi tudi z-test (nam izračuna z-vrednost), dobljene rezultate pa lahko posplošimo na celotno populacijo (Kirk E.R., 2008: 504).

Mann-Whitney U-test omogoča statistično primerjavo dveh neodvisnih vzorcev in ni občutljiv na obliko porazdelitve in enakost varianc podatkov. Predstavlja namreč neparametrično nasprotje parametričnemu t-testu, ki se prav tako uporablja za primerjavo dveh neodvisnih vzorcev. Test temelji na tem, da se podatki obeh vzorcev rangirajo, hkrati pa se določi stopnja tveganja (stopnja pomembnosti testa), pri čemer smo se odločili za $\alpha = 0,05$. Pri tej stopnji tveganja je kritična meja, ki določa kritično območje (območje zavrnitve), 1,96 (Jones D.S., 2002: 228-241; Kirk E.R., 2008: 504-505).

Za vsako statistično primerjavo smo si zastavili dve domnevi, od katerih je ena ničelna druga pa alternativna. Ničelna domneva ($H_0 = \mu = \mu_0$) predvideva, da ni statistično pomembnih razlik med dvema vzorcema oziroma predvideva enakost (enakost rezultatov meritev, npr. enakost povprečij) dveh vzorcev. Alternativna domneva ($H_1 = \mu \neq \mu_0$) je nasprotna ničelni in predvideva, da med dvema vzorcema obstajajo statistično pomembne razlike, torej neenakost vzorcev (Jones D.S., 2000: 228-241).

V osnovi nas je zanimalo, ali je ekspresija gena *sox2* v tumorjih povišana v primerjavi z ekspresijo v zdravem tkivu:

1. Ničelna domneva: Med ekspresijo gena *sox2* v tumorjih in ekspresijo gena *sox2* v zdravem tkivu ni razlik.
2. Alternativna domneva: Ekspresija gena *sox2* v tumorjih je povišana v primerjavi z zdravim tkivom.

Hkrati smo se odločili, da preverimo, če je ekspresija gena *sox2* povišana v tistih tumorjih, v katerih smo z metodo FISH ugotovili, da je gen prisoten v več kopijah:

1. Ničelna domneva: V ekspresiji gena *sox2* med tumorji, pri katerih je več kopij gena *sox2*, in tumorji, kjer ni več kopij, ni razlik.
2. Alternativna domneva: Ekspresija gena *sox2* je višja v tumorjih, kjer je več kopij tega gena, kot v tistih, ki nimajo več kopij gena *sox2*.

4 REZULTATI

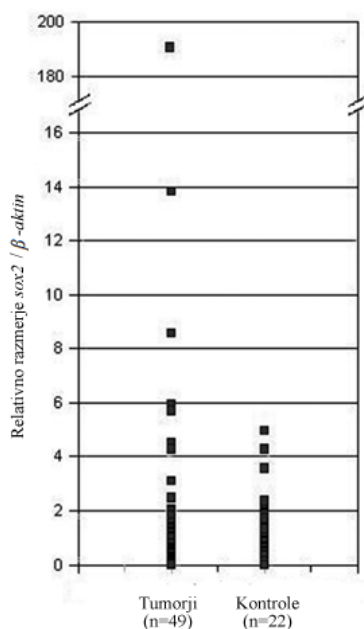
4.1 REZULTATI ANALIZE EKSPRESIJE GENA *SOX2*

Izračunana relativna razmerja povprečnih koncentracij PCR-pomnožkov genov *sox2/β-aktin* so nam omogočila primerjavo ekspresije gena *sox2* med:

- tumorji in zdravimi kontrolnimi vzorci,
- tumorji, ki imajo več kopij gena *sox2*, in tumorji, ki v celičnem genomu nimajo več kopij gena *sox2*.

Iz relativnih razmerij povprečnih koncentracij PCR-pomnožkov genov *sox2/β-aktin* smo s pomočjo programa OpenOffice.org Calc izdelali 2 razpršena grafa, ki prikazujeta porazdelitev podatkov (sl. 9 in sl. 10). Iz obeh je razvidno, da porazdelitev ni normalna, zato smo podatke statistično analizirali z neparametričnim Mann-Whitney testom.

4.1.1 Primerjava ekspresije gena *sox2* med tumorji in zdravim tkivom



Slika 9: Primerjava relativnih razmerij povprečnih koncentracij PCR-pomnožkov genov *sox2/β-aktin* med tumorji in kontrolami

Graf prikazuje primerjavo relativnih razmerij povprečnih koncentracij PCR-pomnožkov genov *sox2/β-aktin* med tumorji in zdravimi kontrolami. Podatki niso normalno porazdeljeni. Razvidno je, da je v obeh skupinah večina podatkov skoncentriranih v vrednostnem območju od 0 do 6 (z nekaj izjemami, ki pa ne vplivajo veliko na končni rezultat), zato predvidevamo, da med ekspresijo gena *sox2* v tumorjih in v zdravem tkivu ni razlik.

Preglednica 15: Primerjava relativnih razmerij povprečnih koncentracij PCR-pomnožkov genov *sox2/β-aktin* med tumorji in zdravimi kontrolami

	Velikost vzorca	Povprečni rang	Aritmetična sredina	Mediana	Standardna deviacija
Tumorji	49	34,2	5,28	0,55	26,33
Kontrole	22	40,2	1,46	1,46	1,38

Preglednica 16: Statistični rezultati testa Mann-Whitney

Vrednost Ua	Z vrednost	P vrednost (enostranska)	P vrednost (dvostranska)
613	-1,1	0,1357	0,2713

Ker p vrednost ne ustreza zahtevi $p \leq 0,05$, z vrednost pa pade znotraj kritičnih mej, lahko osnovno domnevo zavrnilo in potrdimo ničelno domnevo.

S 5-odstotnim tveganjem lahko trdimo, da ni statističnih razlik med ekspresijo gena *sox2* v tumorjih in ekspresijo gena *sox2* v zdravem tkivu.

4.1.2 Primerjava ekspresije gena *sox2* glede na rezultate metode FISH

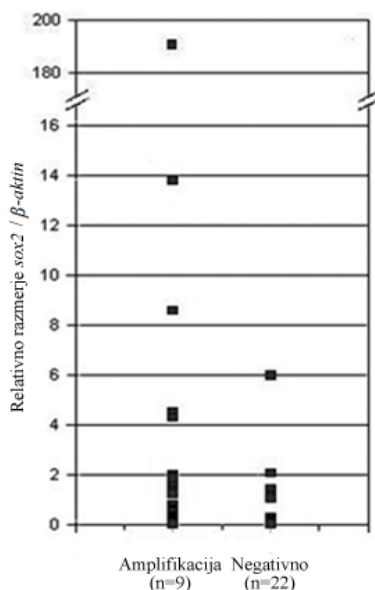
4.1.2.1 Pregled rezultatov metode FISH

Pred začetkom dela smo razpolagali s podatki o številu kopij gena *sox2* v genomu tumorskih celic, ki so bili pridobljeni z metodo FISH (pregl. 17).

Preglednica 17: Pregled rezultatov FISH

Oznaka tumorja	Rezultat FISH
3	negativen
4	negativen
5	negativen
6	negativen
7	negativen
8	negativen
9	več kopij
10	negativen
12	negativen
14	negativen
16	negativen
20	več kopij
22	negativen
23	negativen
26	več kopij
29	negativen
30	negativen
32	negativen
33	več kopij
35	negativen
36	več kopij
37	negativen
38	negativen
40	negativen
41	več kopij
42	negativen
44	več kopij
45	negativen
46	negativen
47	več kopij
48	negativen

4.1.2.2 Grafični prikaz ekspresije gena *sox2* glede na rezultate metode FISH



Slika 10: Primerjava relativnih razmerij povprečnih koncentracij PCR-pomnožkov genov *sox2*/ β -*aktin* med tumorji, ki imajo več kopij gena *sox2*, in tumorji, pri katerih gen ni pomnožen.

Graf prikazuje primerjavo relativnih razmerij koncentracij PCR-pomnožkov genov *sox2*/ β -*aktin* tumorjev. Zanimala nas je razlika med tumorji, kjer je več kopij gena *sox2*, in tumorji, pri katerih gen ni prisoten v več kopijah. Opazimo, da ni večjih razlik v porazdelitvi podatkov, saj je pri obeh skupinah večina podatkov skoncentriranih na dnu, v območju 0 do 2. Manjša razlika se pojavlja le zaradi tega, ker je bila ena skupina večja od druge.

Preglednica 18: Primerjava relativnih razmerij povprečnih koncentracij PCR-pomnožkov genov *sox2*/ β -*aktin* tumorjev glede na rezultat FISH

Rezultat FISH	Velikost vzorca	Povprečje rangov	Aritmetična sredina	Mediana	Standardna deviacija
Negativen	26	18,2	9,02	0,52	37,15
Več kopij gena	9	17,6	1,37	1,06	1,87

Preglednica 19: Statistični rezultati testa Mann-Whitney

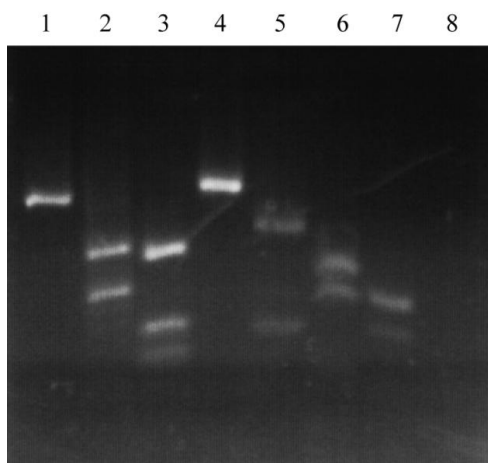
Vrednost Ua	Z vrednost	P vrednost (enostranska)	P vrednost (dvostranska)
113	0,13	0,4483	0,8986

Iz preglednice je razvidno, da sta povprečna ranga skupine tumorjev z negativnim rezultatom metode FISH in skupine tumorjev, ki imajo z metodo FISH dokazano več kopij gena *sox2*, približno enaka. Z vrednost je znotraj kritičnih mej normalne porazdelitve, $p \geq 0,05$, zato smo ovrgli osnovno domnevo in potrdili ničelno domnevo.

S 5-odstotnim tveganjem trdimo, da ni statistične razlike v ekspresiji gena med tumorji, kjer je v celicah več kopij gena *sox2*, in tumorji, kjer gen ni v več kopijah.

4.2 METODA RFLP

Z metodo RFLP smo preverili, ali smo z reakcijo qRT-PCR specifično pomnožili gen *sox2* na kromosomu 3.



Slika 11: Slika agarozne elektroforeze restrikcijskih fragmentov pomnožkov qRT-PCR gena *sox2*. qRT-PCR pomnožki, razrezani z encimi (od leve proti desni): 1) nerazrezana kontrola, 2) *MnII*, 3) *NlaIV BspL*, 4) *RsaI*, 5) *HpaII*, 6) *HhaI*, 7) *HaeIII*, 8) prazen žep.

Na sliki 11 vidimo restrikcijske fragmente, ki so nastali po tretiranju PCR-pomnožkov z restrikcijskimi encimi. S slike je razvidno, da se število fragmentov ujema s številom restrikcijskih mest (pregl. 14) za gen *sox2* na kromosomu 3. S tem smo ovrgli možnost, da smo zaradi sorodnosti med genoma pomnožili gen *sox1* na kromosomu 15.

5 RAZPRAVA

Gen *sox2* se je izkazal za potencialni onkogen pri raku pljuč in požiralnika (Bass A.J. in sod., 2009), njegova ekspresija, skupaj z ekspresijo gena *oct-4*, pa ima prognostični pomen pri ploščatoceličnem karcinomu žrela. Sox2 in Oct-4 sta glavna transkripcijska faktorja, povezana s samoobnovo in diferenciacijo celic. Pacienti z visoko ekspresijo genov *oct-4* in *sox2* so imeli najboljšo prognozo (Ge N. in sod., 2010). Pri raku pljuč je dokazano večje število kopij gena *sox2* in povišana ekspresija gena v ploščatoceličnih karcinomih v primerjavi z adenokarcinomi (Yuan P. in sod., 2010), zaradi česar bi lahko gen *sox2* uporabljali kot pomemben tumorski označevalec.

V magistrski nalogi smo želeli dokazati, da je ekspresija gena *sox2* v celicah tumorjev ušesa, nosu in žrela povišana v primerjavi z zdravim tkivom. Povišano ekspresijo gena *sox2* smo dokazovali z metodo qRT-PCR, pri čemer smo za referenčni gen uporabili gen za β -aktin. Dobljeni rezultati kažejo, da je izrazito povišana ekspresija gena *sox2* v analiziranih vzorcih tumorjev redka. S tem smo ugotovili, da med zdravim tkivom in tumorji ni razlik v ekspresiji gena *sox2* ($U_a=613$, $p=0,1357$, $z=-1,1$).

Razlogi za neujemanje so lahko sledeči. Naš vzorec tumorjev je obsegal le ploščatocelične karcinome, ki predstavljajo zelo heterogeno skupino tumorjev in nastanejo iz celic večvrstnega ploščatega epitela (Strojan P. in sod., 2009: 254-271). Vsebujejo lahko veliko normalnega tkiva, kar lahko zakrije povišano ekspresijo gena *sox2* v primerjavi z referenčnim genom β -aktin oziroma dobimo lažno negativne rezultate. Gen *sox2* je namreč prisoten tako v normalnem kot v rakavem tkivu. Problematično je tudi anatomsko področje odvzema vzorcev, ki je težko dostopno, kirurg pa opravi biopsijo na robu lezije, stran od nekrotičnega tkiva v središču tumorja (Strojan P. in sod., 2009: 254-271). Tkivni vzorec lahko tako sestavlja le majhen delež tumorja in velik del zdravega tkiva. Omejitev je predstavljala tudi količina vzorca, saj so le redki dosegali ustrezno težo (30 mg), ki je bila zahtevana v protokolu.

Namesto tkivnih vzorcev bi lahko uporabili celične kulture, kot so jih v svoji raziskavi Bass A.J. in sod. . Genotip in fenotip celičnih kultur se utegneta opazno razlikovati od vzorcev primarnih tumorjev, obstajajo pa še številne druge razlike ter prednosti uporabe. Celične linije so definirana populacija celic, medtem ko so tumorji sestavljeni iz več različnih populacij celic. Ustrezne celične linije lahko ohranjamo v kulturi v definiranih razmerah in nam omogočajo stalnost in ponovljivost rezultatov zaradi uporabe iste serije celic (Bass A.J. in sod., 2009).

Želeli smo tudi dokazati, da večje število kopij gena *sox2* v celicah tumorjev vpliva na povišano ekspresijo gena. Vendar v relativno majhnem številu vzorcev nismo ugotovili statistično pomembne povezave ($U_a=113$, $p=0,4483$, $z=0,13$). Kljub temu smo v nekaterih analiziranih vzorcih opazili povišano ekspresijo gena *sox2*, zato dobljeni rezultati ne odstopajo od že objavljenih, vendar jih ne moremo statistično potrditi. Mogoče bi jih lahko, če bi povečali vzorec.

Povezave najverjetneje nismo odkrili zaradi naslednjih vzrokov. Izhodišče naše raziskave so bili podatki o povečanem številu kopij gena *sox2* v tumorjih ušesa, nosu in žrela, pridobljeni z metodo FISH na brisih žrela in ustne votline. Pri metodi qRT-PCR je izvorni material vzorec tumorja, pridobljen s tkivnim odčipom, ne pa tumorske rezine. Rezultati qRT-PCR tako niso popolnoma primerljivi z rezultati metode FISH, kljub temu, da so vzorci pridobljeni pri istem pacientu. Metoda FISH je omejena s subjektivnostjo

interpretacije rezultatov (Brown L.A. in sod., 2008), pa tudi z majhnim številom predeterminiranih tarčnih lokusov (McCaughan F. in sod., 2010). Pomembno je tudi dejstvo, da FISH bolj kot večje število kopij gena na kromosomu, dokazuje poliploidijo, ki pa je značilna lastnost tumorskih celic. Alternativno metodama FISH in qRT-PCR predstavljajo mikročipi, za katere pa je iz majhnih heterogenih tumorjev pogosto težko pridobiti zadostne količine kvalitetne DNA (Pinkel D. in Albertson D.G., 2005).

Povišana ekspresija gena *sox2* je lahko posledica povečanega števila kopij gena, pa tudi drugih dejavnikov. Bass A.J. in sod. so ocenjevali vpliv pomnoženosti kromosomske regije 3q26.33 s pomočjo qRT-PCR na ekspresijo gena *sox2*. Odkrili so številne primere, ko niso dokazali večjega števila kopij gena *sox2*, čeprav je bila njegova ekspresija povečana, kar kaže na to, da obstajajo še drugi mehanizmi, ki vplivajo na povišano ekspresijo gena *sox2* (Bass A.J. in sod., 2009). Zato je treba najprej ugotoviti, kateri so ti mehanizmi in kako delujejo pri modulaciji genske ekspresije. Možnih vzrokov in mehanizmov povišane ekspresije je veliko, od sprememb signalnih poti, sprememb receptorjev (mutacije receptorjev, ki zaradi tega vse čas pošiljajo v celice signale za aktivacijo) in sprememb v povezavah z različnimi molekulami.

Na žalost so mehanizmi regulacije ekspresije gena *sox2* večinoma še neznani, vendar počasi prihaja do znanstvenega preboja. Fantes J. in sod. so pred kratkim odkrili, da je gen *sox2* v intronu dolge nekodirajoče RNA, imenovane *Sox2ot* (angl. *Sox2 overlapping transcript*), ki naj bi vplival na regulacijo ekspresije oziroma na aktivacijo gena *sox2* v določenih tkivih. Gen *sox2* in *sox2ot* se prepisujeta v isti orientaciji, tako je lahko gen *sox2* prepisan iz več različnih promotorjev, ki se nahajajo na 5' strani kodirajočega zaporedja gena. Celotna genomski regija se prepisuje, vendar se ne prevaja, kar lahko posledično vpliva na ekspresijo gena *sox2* (Fantes J. in sod., 2003). Sikorska M. in sod. so dokazali vpliv epigenetskih modifikacij na oba ojačevalca (SRR1 in SRR2) gena *sox2*. V delečih nevrlnih progenitornih celicah naj bi nemetilirana DNA in acetilacija histonov na obeh ojačevalcih vplivala na povišano ekspresijo gena *sox2* (Sikorska M. in sod., 2008). Na regulacijo ekspresije gena *sox2* naj bi vplivali tudi številni transkripcijski faktorji in njihove medsebojne povezave (Boyer L. in sod., 2005) ter spremembe na posttranslacijskem nivoju zaradi miRNA (Tay Y. in sod., 2008). Našteti mehanizmi lahko vplivajo na povišano ekspresijo in s tem na povečano nastajanje določenega transkripta ter posledično do maligne transformacije celic (Jezeršek Novaković B., 2009: 158-171).

Povzamemo lahko, da nismo ugotovili povezave med povečanim številom kopij gena *sox2*, dokazano z metodo FISH, in izrazitim povišanjem ekspresije gena *sox2*. Razlogov za neujemanje je več. Rezultatov, pridobljenih z metodo FISH, ne moremo popolnoma primerjati z rezultati metode qRT-PCR, saj izhodiščni vzorec ni popolnoma enak (čeprav pripada istemu pacientu). Poleg tega so tumorji ušesa, nosu in žrela zelo heterogeni in lahko vsebujejo veliko zdravega tkiva, kar lahko vpliva na lažno negativne rezultate. Raziskovalni vzorec tumorjev bi lahko povečali. Raziskavo bi lahko tudi ponovili z uporabo mikročipov. Eden glavnih razlogov za dobljene rezultate pa se verjetno skriva v tem, da večje število kopij gena ni edini vzrok za povišano ekspresijo gena, ampak obstajajo še drugi vzroki in mehanizmi. Kljub temu smo pri nekaterih vzorcih, s predhodno dokazanim večjim številom kopij gena *sox2*, opazili povišano ekspresijo. S tem naši rezultati ne odstopajo od že objavljenih rezultatov, vendar kljub temu ne moremo dokazati statistične povezave med metodama FISH in qRT-PCR. Opisano neujemanje bi bilo

mogoče pojasniti z nadaljnji raziskavami mehanizmov, ki vplivajo na ekspresijo gena *sox2* in se spremenijo med procesom kancerogeneze.

6 SKLEPI

V sklopu magistrskega dela smo z metodo qRT-PCR preverili, kakšna je ekspresija gena *sox2* v tumorjih ušesa, nosu in žrela ter jo primerjali z rezultati metode FISH:

- a) ekspresija gena *sox2* v tumorjih ušesa, nosu in žrela ni statistično pomembno povišana v primerjavi z zdravim tkivom (zdravimi kontrolami);
- b) ekspresija gena *sox2* ni statistično pomembno pogosteje povišana v tumorjih, pri katerih je bilo z metodo FISH dokazano povečano število kopij gena *sox2*;
- c) v redkih analiziranih vzorcih je večje število kopij gena *sox2* sovpadalo s povečano ekspresijo, vendar je takšnih vzorcev premalo, da bi povezavo lahko statistično potrdili. Večje število kopij gena *sox2* verjetno ni edini vzrok povišane ekspresije tega gena;
- d) metoda qRT-PCR se ni izkazala za ustrezno metodo dokazovanja povišane ekspresije gena *sox2* kot potencialnega tumorskega označevalca, prav tako pa rezultatov, dobljenih s to metodo, ne moremo statistično povezati z rezultati, dobljenimi z metodo FISH.

7 POVZETEK

Tumorji ušesa, nosu in žrela se po pojavnosti uvrščajo v sam svetovni vrh, histološko gledano pa jih je večina ploščatoceličnih karcinomov. Nastanek tumorjev naj bi, po hipotezi rakaste matične celice, bil povezan z nastankom subpopulacije celic, ki imajo lastnosti matičnih celic in jih imenujemo rakaste matične celice. Pomembno vlogo v zgodnjem razvoju vretenčarjev ima gen *sox2*, ki se nahaja na kromosomski regiji 3q26.33. Produkt gena *sox2* regulira diferenciacijo živčnih matičnih in progenitornih celic v centralnem živčnem sistemu, ključen je za razvoj notranjega ušesa in mrežnice, skupaj s transkripcijskim faktorjem Oct-4 deluje kot glavni regulator embriogeneze sesalcev in je pomemben pri vzdrževanju pluripotentnosti ter samoobnove embrionalnih matičnih celic. Pomemben je tudi pri reprogramiranju diferenciranih celic v pluripotentne celice oziroma pri nastanku induciranih pluripotentnih celic. Predvideva se, da naj bi bil gen *sox2* povezan s progresijo rakastih obolenj.

V magistrski nalogi smo želeli z metodo qRT-PCR dokazati, da je ekspresija potencialnega tumorskega označevalca, gena *sox2*, v tumorjih ušesa, nosu in žrela povečana. S tem bi metodo qRT-PCR potrdili kot uporabno metodo za dokazovanje povečane ekspresije gena *sox2* v tumorjih ušesa, nosu in žrela, gen *sox2* pa kot tumorski označevalec. Delo smo opravljali na tkivnih vzorcih, ki so bili odvzeti tekom operacij otorinolaringološkega področja. Vzorci so bili ustrezno klasificirani in razdeljeni na 2 skupini: na bolne tumorske vzorce ter zdrave kontrolne vzorce. Z uporabo ustreznega kita smo iz posameznih vzorcev izolirali RNA in izmerili koncentracijo izolata. RNA smo nato prepisali v komplementarno cDNA in jo uporabili pri metodi qRT-PCR, tako da smo iz vzorcev cDNA pripravili ustrezne reakcijske mešanice vzorcev, standardov in negativnih kontrol. Z metodo qRT-PCR smo v pripravljenih reakcijskih mešanicah pomnožili gen *sox2* in gen β -*aktin*. Dobljene rezultate smo relativno kvantificirali, z analizo pa nadaljevali tako, da smo izračunali razmerja med povprečnimi koncentracijami PCR-pomnožkov gena *sox2* in gena za β -*aktin*. Z metodo RFLP smo izključili možnost, da smo zaradi sorodnosti genov namesto gena *sox2* na kromosomu 3 pomnožili gen *sox1* na kromosomu 15. Poleg kvantifikacije ekspresije gena *sox2* smo dobljene rezultate primerjali še z rezultati metode FISH, s katero smo pridobili podatke o povečanem številu kopij gena *sox2* v tumorskih celicah. Predvidevali smo, da bo ekspresija gena *sox2* povečana v tistih vzorcih, kjer je dokazano več kopij tega gena.

Rezultate smo statistično obdelali in analizirali z neparametričnim testom Mann-Whitney, ki omogoča primerjavo dveh neodvisnih vzorcev in ni občutljiv na obliko porazdelitve ter enakost varianc podatkov.

Ugotovili smo, da ni statistično pomembne razlike v deležu povišane ekspresije gena *sox2* pri tumorjih glede na zdrave vzorce ($U_a=613$, $p=0,1357$, $z=-1,1$). Prav tako ekspresija gena *sox2* ni statistično pomembno pogosteje povišana v tumorjih s predhodno odkritim večjim številom kopij gena *sox2* z metodo FISH ($U_a=113$, $p=0,4483$, $z=0,13$). V redkih analiziranih vzorcih, pri katerih je bilo dokazano večje število kopij gena *sox2*, smo dokazali tudi povečano ekspresijo.

Iz rezultatov magistrskega dela je razvidno, da ne obstaja enostavna povezava med številom kopij gena *sox2* in njegovo stopnjo ekspresije pri tumorjih ušesa, nosu in žrela. Z metodo qRT-PCR nismo dokazali povišane ekspresije gena *sox2* v tumorjih. Prav tako nismo dokazali povišane ekspresije gena *sox2* vedno, ko je prisotnih več kopij gena.

Dobljeni rezultati sicer ne odstopajo od že objavljenih, ne moremo pa dokazati statistične povezave med rezultati, dobljenimi z metodama FISH in qRT-PCR. Podali smo predloge, kako raziskovanje ekspresije gena *sox2* dopolniti in izpopolniti. Uporabili bi lahko večji raziskovalni vzorec tumorjev in dodatne molekularne metode. Vsekakor je z raziskavami ekspresije gena *sox2* in drugih potencialnih tumorskih označevalcev smiselno nadaljevati, saj lahko veliko doprinesejo k izboljšanju diagnostike in prognoze raka ušesa, nosu in žrela.

8 VIRI

- Al-Hajj M., Wicha M.S., Benito-Hernandez A., Morrison S.J in Clarke M.F. 2003. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100, 7: 3983-3988
- Ambrosetti D.C., Basilico C. in Dailey L. 1997. Synergistic activation of the fibroblast growth factor 4 enhancer by Sox2 and Oct-3 depends on protein-protein interactions facilitated by a specific spatial arrangement of factor binding sites. *Molecular and cellular biology*, 17, 11: 6321-6329
- Ambrosetti D.C., Scholer H.R., Dailey L. in Basilico C. 2000. Modulation of the activity of multiple transcriptional activation domains by the DNA binding domains mediates the synergistic action of Sox2 and Oct-3 on the fibroblast growth factor-4 enhancer. *The Journal of Biological Chemistry*, 275, 30: 23387-23397
- Avilion A.A., Nicolis S.K., Pevny L.H., Perez L., Vivian N. in Lovell-Badge R. 2003. Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. *Genes and Development*, 17: 126-140
- Baltus G.A., Kowalski M.P., Zhai H., Tutter A.V., Quinn D., Wall D. in Kadam S. 2009. Acetylation of Sox2 induces its nuclear export in embryonic stem cells. *Stem Cells*, 27, 9: 2175-2184
- Bani-Yaghoob M., Tremblay R.G., Lei J.X., Zhang D., Zurakowski B., Sandhu J.K., Smith B., Ribocco-Lutkiewicz M., Kennedy J., Walker P.R., Sikorska M. 2006. Role of Sox2 in the development of the mouse neocortex. *Developmental Biology*, 295, 1: 52-66
- Barril P. in Nates S. 2012. Introduction to agarose and polyacrylamide gel electrophoresis matrices with respect to their detection sensitivities, V: *Gel Electrophoresis-Principles and Basics*. Magdeldin S. (ur.), Rijeka, InTech: 3-14
- Bass A.J., Watanabe H., Mermel C.H., Yu S., Perner S., Verhaak R.G., Kim S.Y. in sod. 2009. SOX2 Is an Amplified Lineage Survival Oncogene in Lung and Esophageal Squamous Cell Carcinomas. *Nature Genetics*, 41, 11: 1238-1242
- Battaglia M. in sod., 1998. Epithelial tumour cell detection and the unsolved problems of nested RT-PCR: a new sensitive one step method without false positive results. *Bone Marrow Transplant*, 22, 7: 693-698
- Beltran A.S., Rivenbark A.G., Richardson B.T., Yuan X., Quian H., Hunt J.P., Zimmerman E., Graves L.M. in Blancafort P. 2011. Generation of tumor initiating cells by exogenous delivery of OCT4 Transcription Factor. *Breast Cancer Research*, 13, 5: R94
- Ben-Porath I., Thomson M.W., Carey V.J., Ge R., Bell G.W., Regev A. in sod. 2008. An embryonic stem cell-like gene expression signature in poorly differentiated aggressive human tumors. *Nature Genetics*, 40: 499-507

- Bernard, P.S. in sod., 1998. Homogeneous multiplex genotyping of hemochromatosis mutations with fluorescent hybridization probes. *The American journal of Pathology*, 153, 4: 1055-1061
- Bernard, P.S. in Wittwer C.T. 2000. Homogeneous amplification and variant detection by fluorescent hybridization probes. *Clinical Chemistry*, 46, 2: 147-148
- Bonnet D. in Dick J.E. 1997. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nature Medicine*, 3, 7: 730-737
- Bowles J., Schepers G. in Koopman P. 2000. Phylogeny of the SOX family of developmental transcription factors based on sequence and structural indicators. *Developmental biology*, 227: 239-255
- Boyer L.A., Lee T.I., Cole M.F., Johnstone S.E., Levine S.S., Zucker J.P., Guenther M.G., Kumar R.M., Murray H.L., Jenner R.G., Gifford D.K., Melton D.A., Jaenisch D.K. in Young R.A. 2005. Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell*, 122, 6: 947-956
- Boyer L.A., Plath K., Zeitlinger J., Brambrink T., Medeiros L.A., Lee T.I., Levine S.S., Wernig M., Tajonar A., Ray M.K., Bell G.W., Otte A.P., Vidal M., Gifford D.K., Young R.A. in Jaenisch R. 2006. Polycomb complexes repress developmental regulators in murine embryonic stem cells. *Nature*, 441: 349-353
- Bračko M. 2009. Patologija v onkologiji V: Onkologija. Raziskovanje, diagnostika in zdravljenje raka. Novaković S., Hočevan M., Jezeršek Novaković B., Strojani P., Žgajnar J. (ur.). 1. izd. Ljubljana, Mladinska knjiga: 84-88
- Brown L.A., Hoog J., Chin S.F., Tao Y., Zayed A.A., Chin K., Teschendorff A.E., Quackenbush J.F., Marioni J.C., Leung S. in sod. 2008. ESR1 gene amplification in breast cancer: a common phenomenon? *Nature Genetics*, 40, 7: 806-812
- Bustin, S.A. 2000. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of molecular endocrinology*, 25, 2: 169-193
- Campbell L.L. in Polyak K. 2007. Breast tumor heterogeneity: cancer stem cells or clonal evolution? *Cell Cycle*, 6, 19: 2332-2338
- Catena R., Tiveron C., Ronchi A., Porta S., Ferri A., Tatangelo L., Cavallaro M., Favaro R., Ottolenghi S., Reinbold R., Scholer H. in Nicolis S.K. 2004. Conserved POU binding DNA sites in the Sox2 upstream enhancer regulate gene expression in embryonic and neural stem cells. *The Journal of biological chemistry*, 279, 40: 41846-41857
- Cavallaro M., Mariani J., Lancini C., Latorre E., Caccia R., Gullo F., Valotta M., DeBiasi S., Spinardi L., Ronchi A. in sod. 2008. Impaired generation of mature neurons by neural stem cells from hypomorphic Sox2 mutants. *Development*, 135, 3: 541-557

- Chambers I. in Tomlinson S.R. 2009. The transcriptional fundation of pluripotency. *Development*, 136: 2311-2322
- Chen S., Shi L., Zhang L., Li R., Liang J., Yu W., Sun L., Yang X., Wang Y., Zhang Y. in Shang Y. 2012. SOX2 Gene Regulates the Transcriptional Network of Oncogenes and Affects Tumorigenesis of Human Lung Cancer Cells. *PloS one*, 7, 5: e36326
- Chen Y., Shi L., Zhang L., Li R., Liang J., Yu W. in sod. 2008. The molecular mechanism governing the oncogenic potential of SOX2 in breast cancer. *The Journal of biological chemistry*, 283, 26: 17969-17978
- Chew J.L., Loh Y.H., Zhang W., Chen X., Tam W.L., Yeap L.S., Li P., Ang Y.S., Lim B., Robson P. in Ng H.H. 2005. Reciprocal transcriptional regulation of Pou5f1 and Sox2 via the Oct4/Sox2 complex in embryonic stem cells. *Molecular and cellular biology*, 25, 14: 6031-6046
- Clegg, R.M. 1992. Fluorescence resonance energy transfer and nucleic acids. *Methods in Enzymology*, 211: 353-388
- Clevers H. 2006. Wnt/ β -catenin signaling in development and disease. *Cell*, 127, 3: 469-480
- Cowan C.A., Atienza J., Melton D.A. in Eggan K. 2005. Nuclear reprogramming of somatic cells after fusion with human embryonic stem cells. *Science*, 309: 1369-1373
- D'Amour K.A. in Gage F.H. 2003. Genetic and functional differences between multipotent neural and pluripotent embryonic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100: 11866-11872
- Darnell J.E. Jr. 2002. Transcription factors as targets for cancer therapy. *Nature Reviews Cancer*, 2, 10: 740-749
- Demetrick D.J. 1997. Gone FISHin' for genes. *Canadian Medical Association Journal*, 161, 9: 1138
- Egli D., Birkhoff G., Eggan K. 2008. Mediators of reprogramming: transcription factors and transitions through mitosis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9: 505-516
- Endoh M., Endo T.A., Endoh T., Fujimura Y., Ohara O., Toyoda T., Otte A.P., Okano M., Brockdorff N., Vidal M. in Koseki H. 2008. Polycomb group proteins Ring1A/B are functionally linked to the core transcriptional regulatory circuitry to maintain ES cell identity. *Development*, 135, 8: 1513-1524
- Evan M.J. in Kaufman M.H. 1981. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*, 292: 154-156
- Faivre L., Williamson K.A., Faber V., Laurent N., Grimaldi M., Thauvin-Robinet C., Durand C., Mugneret F., Gouyon J.B., Bron A., Huet F., Hayward C., Heyningen V.V.

- in Fitzpatrick D.R. 2006. Recurrence of SOX2 anophthalmia syndrome with gonosomal mosaicism in a phenotypically normal mother. *American journal of medical genetics Part A*, 140A, 6: 636-639
- Fantes J., Ragge N.K., Lynch S.A., McGill N.I., Collin J.R., Howard- Peebles P.N., Hayward C., Vivian A.J., Williamson K., van Heyningen V. in FitzPatrick D.R. 2003. Mutations in SOX2 cause anophthalmia. *Nature Genetics*, 33, 4: 461-463
- Fernhoff P.M., 2002. The 22q11.2 deletion syndrome: More answers but more questions. *The journal of pediatrics*, 137, 2: 145-147
- Fong H., Hohenstein K.A. in Donovan P.J. 2008. Regulation of self-renewal and pluripotency by Sox2 in human embryonic stem cells. *Stem Cells*, 26, 8: 1931-1938
- Fukushima A., Okuda A., Nishimoto M., Seki N., Hori T. in Muramatsu M. 1998. Characterization of functional domains of an embryonic stem cell coactivator UTF1 which are conserved and essential for potentiation of ATF-2 activity. *The Journal of biological chemistry*, 273, 40: 25840-25849
- Garraway L.A. in Sellers W.R. 2006. Lineage dependency and lineage-survival oncogenes in human cancer. *Nature Reviews Cancer*, 6, 8: 593-602
- Ge N., Lin H.X., Xiao X.S., Guo L., Xu H.M., Wang X., Jin T., Cai X.Y., Liang Y., Hu W.H. in Kang T., 2010. Prognostic significance of Oct4 and Sox2 expression in hypopharyngeal squamous cell carcinoma. *Journal of translational medicine*, 8: 94
- Gontan C., Guttler T., Engelen E., Demmers J., Fornerod M., Grosveld F.G., Tibboel D., Gorlich D., Poot R.A. in Rottier R.J. 2009. Exportin 4 mediates a novel nuclear import pathway for Sox family transcription factors. *The Journal of cell biology*, 185, 1: 27-34
- Graham V., Khudyakou J., Ellis P. in Pevny L. 2003. SOX2 functions to maintain neural progenitor identity. *Neuron*, 39, 5: 749-765
- Gu P., Goodwin B., Chung A.C., Xu X., Wheeler D.A., Price R.R., Galardi C., Peng L., Latour A.M., Koller B.H., Gossen J., Kliewer S.A. in Cooney A.J. 2005. Orphan nuclear receptor LRH-1 is required to maintain Oct4 expression at the epiblast stage of embryonic development. *Molecular and cellular biology*, 25, 9: 3492-3505
- Gubbay J., Collignon J., Koopman P., Capel B., Economou A., Munsterberg A., Vivian N., Goodfellow P. in 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
- Hagstrom S. A., Pauer G. J., Reid J., Simpson E., Crowe S., Maumenee I.H. in Traboulsi E. I. 2005. SOX2 mutation causes anophthalmia, hearing loss, and brain anomalies. *American journal of medical genetics Part A*, 138A, 2: 95-98
- Harley V.R., Lovell-Badge R. in Goodfellow P.N. 1994. Definition of a consensus DNA binding site for SRY. *Nucleic Acids Research*, 22, 8: 1500-1501

- Heid C.A. in sod., 1996. Real time quantitative PCR. *Genome Research*, 6, 10: 986-994
- Higuchi R. in sod., 1993. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology*, 11, 9: 1026-1030
- Hochedlinger K. in Plath K. 2009. Epigenetic reprogramming and induced pluripotency. *Development*, 136, 4: 509-523
- Hotimir L. 2009. Osnove klinične onkologije V: Onkologija. Raziskovanje, diagnostika in zdravljenje raka. Novaković S., Hočevnar M., Jezeršek Novaković B., Strojjan P., Žgajnar J. (ur.). 1. izd. Ljubljana, Mladinska knjiga: 56-74
- Inoue M., Kamachi Y., Matsunami H., Imada K., Uchikawa M. in Kondoh H. 2007. PAX6 and SOX2-dependent regulation of the Sox2 enhancer N-3 involved in embryonic visual system development. *Genes to cells*, 12, 9: 1049-1061
- Ishii Y., Rex M., Scotting P.J. in Yasugi S. 1998. Region-specific expression of chicken Sox2 in the developing gut and lung epithelium: regulation by epithelial-mesenchymal interactions. *Developmental dynamics*, 213, 4: 464-475
- Ivanova N., Dobrin R., Lu R., Kotenko L., Levorse J., DeCoste C., Schafer X., Lun Y. in Lemischka I.R. 2006. Dissecting self-renewal in stem cells with RNA interference. *Nature*, 442: 533-538
- Jemal A., Siegel R., Ward E., Murray T., Xu J. in Thun M.J. 2007. Cancer statistics 2007. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 57, 1: 43-66
- Jezeršek Novaković B. 2009. Sistemsko zdravljenje V: Onkologija. Raziskovanje, diagnostika in zdravljenje raka. Novaković S., Hočevnar M., Jezeršek Novaković B., Strojjan P., Žgajnar J. (ur.). 1. izd. Ljubljana, Mladinska knjiga: 158-171
- Jiang W., Kahn S.M., Tomita N., Zhang Y.J., Lu S.H. in Weinstein I.B. 1992. Amplification and expression of the human cyclin D gene in esophageal cancer. *Cancer research*, 52, 10: 2980-2983
- Jones D.S. 2002. *Pharmaceutical statistics*. 1st ed. London, Pharmaceutical Press: 586 str.
- Jordan C.T., Guzman M.L. in Noble M. 2006. Cancer stem cells. *The New England journal of medicine*, 355, 12: 1253-1261
- Josephson R., Muller T., Picket J., Okabe S., Reynolds K., Turner P.A., Zimmer A. in McKay R.D. 1998. POU transcription factors control expression of CNS stem cell-specific gene. *Development*, 125, 16: 3087-3100
- Kamachi Y., Uchikawa M. in Kondoh H. 2000. Pairing SOX off: with partners in the regulation of embryonic development. *Trends in genetics*, 16, 4: 182-187
- Kamachi Y., Uchikawa M., Tanouchi A., Sekido R. in Kondoh H. 2001. Pax6 and SOX2 form a co-DNA-binding partner complex that regulates initiation of lens development. *Genes and Development*, 15, 10: 1272-1286

- Kiefer J.C. 2007. Back to basics: Sox genes. *Developmental dynamics*, 236, 8: 2356-2366
- Kiernan A.E., Pelling A.L., Leung K.K., Tang A.S., Bell D.M., Tease C. in sod. 2005. Sox2 is required for sensory organ development in the mammalian inner ear. *Nature*, 434: 1031-1035
- Kim J.B., Zaehres H., Wu G., Gentile L., Ko K., Sebastiano V., Arauzo-Bravo M.J., Ruau D., Han D.W., Zenke M. in Scholer H.R. 2008. Pluripotent stem cells induced from adult neural stem cells by reprogramming with two factors. *Nature*, 454: 646-650
- Kirk E.R. 2008. *Statistics An introduction*. 5th ed. Belmont, Thomson higher education: 649 str.
- Kjeldsen E., Kolvraa S. 2001. FISH techniques, FISH probes and their application in medicine and biology-An overview. V: *FISH Technology, Springer Lab Manual*. Rautenstraß B.W., Liehr T. (ur.). Berlin, Springer-Verlag: 3-8
- Knuutila S., Björkqvist A.M., Autio K., Tarkkanen M., Wolf M., Monni O. in sod. 1998. DNA copy number amplifications in human neoplasms: review of comparative genomic hybridization studies. *The American journal of pathology*, 152, 5: 1107-1123
- Kolmodin L.A. in Williams J.F. 2000. *Polymerase chain reaction. Basic principles and routine practice V: The nucleic acid protocols handbook*. Rapley R. (ur.). Totowa, New Jersey, Humana Press: 569-580
- Kondoh H., Uchikawa M. in Kamachi Y. 2004. Interplay of Pax6 and SOX2 in lens development as a paradigm of genetic switch mechanisms for cell differentiation. *The International journal of developmental biology*, 48, 8-9: 819-827
- Korenberg, J.R., Feng T.Y., Schreck R. in Chen X.N. 1992. Using fluorescence *in situ* hybridization (FISH) in genome mapping. *Trends in Biotechnology*, 10: 27-32
- Kuroda T., Tada M., Kubota H., Kimura H., Hatano S.Y., Suemori H., Nakatsuji N. in Tada T. 2005. Octamer and Sox elements are required for transcriptional cis regulation of Nanog gene expression. *Molecular and cellular biology*, 25, 6: 2475-2485
- Lapidot T., Sirard C., Vormoor J., Murdoch B., Hoang T., Caceres-Cortes J. in sod. 1994. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature*, 367: 645-648
- Lee T.I., Jenner R., Boyer L.A., Guenther M.G., Levine S.S., Kumar R.M., Chevalier B., Johnstone S.E., Cole M.F., Isono K., Koseki H., Fuchikami T., Abe K., Murray H.L., Zucker J.P., Yuan B., Bell G.W., Herbolsheimer E., Hannett N.M., Sun K., Odom D.T., Otte A.P., Volkert T.L., Bartel D.P., Melton D.A., Gifford D.K., Jaenisch R. in Young R.A. 2006. Control of developmental regulators by polycomb in human embryonic stem cells. *Cell*, 125, 2: 301-313
- Lehnerdt G.F., Franz P., Zaqoul A., Schmitz K.J., Grehl S., Lang S., Schmid K.W., Siffert W., Jahnke K. in Frey U.H. 2008. Overall and relapse-free survival in oropharyngeal

and hypopharyngeal squamous cell carcinoma are associated with genotypes of T393C polymorphism of the GNAS1 gene. *Clinical Cancer Research*, 14: 1753-1758

Li J., Pan G., Cui K., Liu Y., Xu S. in Pei D. 2007. A dominant-negative form of mouse SOX2 induces trophectoderm differentiation and progressive polyploidy in mouse embryonic stem cells. *The Journal of biological chemistry*, 282, 27: 19481-19492

Livak K.J. in Schmittgen T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ method. *Methods*, 25, 4: 402-408

Loh Y.H., Wu Q., Chew J.L., Vega V.B., Zhang W., Chen X., Bourque G., George J., Leong B., Liu J., Wong K.Y., Sung K.W., Lee C.W., Zhao X.D., Chiu K.P., Lipovich L., Kuznetsov V.A., Robson P., Stanton L.W., Wei C.L., Ruan Y., Lim B. in Ng H.H. 2006. The Oct4 and Nanog transcription network regulates pluripotency in mouse embryonic stem cells. *Nature Genetics*, 38, 4: 431-440

Lu S.H., Hsieh L.L., Luo F.C. in Weinstein I.B. 1988. Amplification of the EGF receptor and c-myc genes in human esophageal cancers. *International Journal of Cancer*, 42, 4: 502-505

Malcolm S., 1996. Microdeletion and microduplication syndromes. *Prenatal diagnosis*, 16, 13: 1213-1219

Mark H.F. in sod., 1997. Current applications of molecular cytogenetic technologies. *Annals of clinical and laboratory science*, 27, 1: 47-56

Marson A., Levine S.S., Cole M.F., Frampton G.M., Brambrink T., Johnstone S., Guenther M.G., Johnston W.K., Wernig M., Newman J., Calabrese J.M., Dennis L.M., Volkert T.L., Gupta S., Love J., Hannett N., Sharp P.A., Bartel D.P., Jaenisch R., Young R.A. 2008. Connecting microRNA genes to the core transcriptional regulatory circuitry of embryonic stem cells. *Cell*, 134, 3: 521-533

Martin G.R. 1981. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 78, 12: 7634-7638

Maruyama M., Ichisaka T., Nakagawa M. in Yamanaka S. 2005. Differential roles of Sox15 and Sox2 in transcriptional control in mouse embryonic stem cells. *The Journal of biological chemistry*, 280, 26: 24371-24379

Masui S., 2011. Function of Oct3/4 and Sox2 in Pluripotency. V: Nuclear Reprogramming and Stem Cells, *Stem Cell Biology and Regenerative Medicine*. Ainscough J., Yamanaka S. in Tada T. (ur.). New York, Humana Press: 113-125

Masui S., Nakatake Y., Toyooka Y., Shimosato D., Yagi R., Takahashi K., Okochi H., Okuda A., Matoba R., Sharov A.A. in sod. 2007. Pluripotency governed by Sox2 via regulation of Oct3/4 expression in mouse embryonic stem cells. *Nature cell biology*, 9, 6: 625-635

- McCaughan F., Pole J.C., Bankier A.T., Konfortov B.A., Carroll B., Falzon M., Rabbitts T.H., George P.J., Dear P.H. in Rabbitts P.H. 2010. Progressive 3q Amplification Consistently Targets SOX2 in Preinvasive Squamous Lung Cancer. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 182, 1: 83-91
- Miyagi S., Kato H. in Okuda A. 2009. Role of SoxB1 transcription factors in development, *Cellular and molecular life sciences*, 66, 23: 3675-3684
- Miyagi S., Saito T., Mizutani K., Masuyama N., Gotoh Y., Iwama A., Nakauchi H., Masui S., Niwa H., Nishimoto M., Muramatsu M. in Okuda A. 2004. The Sox-2 regulatory regions display their activities in two distinct types of multipotent stem cells. *Molecular and cellular biology*, 24, 10: 4207-4220
- Muller P.Y., Janovjak H., Miserez A.R. in Dobbie Z. 2002. Processing of gene expression data generated by quantitative real-time RT-PCR. *BioTechniques* 32, 6: 1372-1379
- Nakagawa M., Koyanagi M., Tanabe K., Takahashi K., Ichisaka T., Aoi T., Okita K., Mochiduki Y., Takizawa N., Yamanaka S. 2007. Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nature biotechnology*, 26, 1: 101-106
- Nakatake Y., Fukui N., Iwamatsu Y., Masui S., Takahashi K., Yagi R., Yagi K., Miyazaki J., Matoba R., Ko M.S. in Niwa H. 2006. Klf4 cooperates with Oct3/4 and Sox2 to activate the Lefty1 core promoter in embryonic stem cells. *Molecular and cellular biology*, 26, 20: 7772-7782
- Nishimoto M., Fukushima A., Okuda A. in Muramatsu M. 1999. The gene for the embryonic stem cell coactivator UTF1 carries a regulatory element which selectively interacts with a complex composed of Oct-3/4 and Sox-2. *Molecular and cellular biology*, 19, 8: 5453-5465
- Niwa H., Toyooka Y., Shimosato D., Strumpf D., Takahashi K., Yagi R. in Rossant J. 2005. Interaction between Oct3/4 and Cdx2 determines trophectoderm differentiation. *Cell*, 123, 5: 917-929
- Novaković S. 2009. Molekularni mehanizmi nastanka raka-karcinogeneza V: Onkologija. Raziskovanje, diagnostika in zdravljenje raka. Novaković S., Hočevnar M., Jezeršek Novaković B., Strojan P., Žgajnar J. (ur.). 1. izd. Ljubljana, Mladinska knjiga: 24–35
- Nowell P.C. 1976. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science*, 194: 23-28
- Nowling T., Bernadt C., Johnson L., Desler M. in Rizzino A. 2003. The co-activator p300 associates physically with and can mediate the action of the distal enhancer of the FGF-4 gene. *The Journal of biological chemistry*, 278, 16: 13696-13705
- Nowling T.K., Johnson L.R., Wiebe M.S. in Rizzino A. 2000. Identification of the transactivation domain of the transcription factor Sox-2 and an associated co-activator. *The Journal of biological chemistry*, 275, 6: 3810-3818

- O'Brien C.A., Pollett A., Gallinger S. in Dick J.E. 2007. A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature*, 445: 106-110
- Okamoto K., Okazawa H., Okuda A., Sakai M., Muramatsu M. in Hamada H. 1990. A novel octamer binding transcription factor is differentially expressed in early embryonic cells. *Cell*, 60, 3: 461-472
- Okuda A., Fukushima A., Nishimoto M., Orimo A., Yamagishi T., Nabeshima Y., Kuro-o M., Nabeshima Y., Boon K., Keaveney M., Stunnenberg H.G. in Muramatsu M. 1998. UTF1, a novel transcriptional coactivator expressed in pluripotent embryonic stem cells and extra-embryonic cells. *The EMBO journal*, 17, 7: 2019-2032
- Okumura-Nakanishi S., Saito M., Niwa H. in Ishikawa F. 2005. Oct-3/4 and Sox2 regulate Oct-3/4 gene in embryonic stem cells. *The Journal of biological chemistry*, 280, 7: 5307-5317
- Otsubo T., Akiyama Y., Yanagihara K. in Yuasa Y. 2008. SOX2 is frequently downregulated in gastric cancers and inhibits cell growth through cell-cycle arrest and apoptosis. *British journal of cancer*, 98: 824-831
- Ozer E., Grecula J.C., Agrawal A., Rhoades C.A., Young D.C. in Schuller D.E. 2006. Longterm results of a multimodal intensification regimen for previously untreated advanced resectable squamous cell cancer of the oral cavity, oropharynx, or hypopharynx. *The Laryngoscope*, 116, 4: 607-612
- Pardal R., Clarke M.F. in Morrison S.J. 2003. Applying the principles of stem-cell biology to cancer. *Nature reviews cancer*, 3, 12: 895-902
- Parkin D.M. 2001. Global cancer statistics in the year 2000. *The lancet oncology*, 2, 9: 533-543
- Parkin D.M., Pisani P. in Ferlay J. 1999. Global cancer statistics. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 49, 1: 33-64
- Pevny L.H. in Lovell-Badge R. 1997. Sox genes find their feet. *Current opinion in genetics and development*, 7, 3: 338-344
- Pinkel D. in Albertson D.G. 2005. Array comparative genomic hybridization and its applications in cancer. *Nature genetics*, 37: 11-17
- Que J., Luo X., Schwartz R.J. in Hogan B.L.M. 2009. Multiple roles for Sox2 in the developing and adult mouse trachea. *Development*, 136, 11: 1899-1907
- Que J., Okubo T., Goldenring J.R., Nam K.T., Kurotani R., Morrissey E.E. in Sodt 2007. Multiple dose-dependent roles for Sox2 in the patterning and differentiation of anterior foregut endoderm. *Development*, 134, 13: 2521-2531
- Rabbitts T.H. 1991. Translocations, master genes, and differences between the origins of acute and chronic leukemias. *Cell*, 67, 4: 641-644

- Ragge N.K., Lorenz B., Schneider A., Bushby K., de Sanctis L., Salt A., Collin J.R., Vivian A.J., Free S.L., Thompson P., Williamson K.A., Sisodiya S.M., van Heyningen V. in Fitzpatrick D.R. 2005. SOX2 anophthalmia syndrome. *American journal of medical genetics Part A*, 135A, 1: 1-7
- Real time PCR applications guide. 2006. Berkeley, California, BIO-RAD Laboratories: 100 str.
- Reya T. in Clevers H. 2005. Wnt signaling in stem cells and cancer. *Nature*, 434: 843-850
- Reya T., Morrison S.J., Clarke M.F. in Weissman I.L. 2001. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*, 414: 105-111
- RNeasy Mini Handbook. 2010. 4. Izd. Nemčija, Qiagen: 80 str.
- Rock J.R., Onaitis M.W., Rawlins E.L., Lu Y., Clark C.P., Xue Y., Randell S.H. in Hogan B.L.M. 2009. Basal cells as stem cells of the mouse trachea and human airway epithelium. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106, 13: 12771-12775
- Rodda D.J., Chew J.L., Lim L.H. in sod. 2005. Transcriptional regulation of *nanog* by OCT4 and SOX2. *The Journal of biological chemistry*, 280, 26: 24731-24737
- Rosner M.B., Vigano M.A., Ozato K., Timmons P.M., Poirier F., Rigby P.W.J. in Staudt L.M. 1990. A POU-domain transcription factor in early stem cells and germ cells of the mammalian embryo. *Nature*, 345: 686-692
- Sattler H.P., Lensch R., Rohde V., Zimmer E., Meese E., Bonkhoff H. in sod. 2000. Novel amplification unit at chromosome 3q25-q27 in human prostate cancer. *The Prostate*, 45, 3: 207-215
- Scholer H.R., Ruppert S., Suzuki N., Chowdhury K. in Gruss P. 1990. New type of POU domain in germ line-specific protein Oct-4. *Nature*, 344: 435-439
- Schoorlemmer J., van Puijenbroek A., van Den Eijnden M., Jonk L., Palas C., Kruijer W. 1994. Characterization of a negative retinoic acid response element in the murine Oct4 promoter. *Molecular and cellular biology*, 14, 2: 1122-1136
- Shinomiya T., Mori T., Ariyama Y., Sakabe T., Fukuda Y., Murakami Y. in sod. 1999. Comparative genomic hybridization of squamous cell carcinoma of the esophagus: the possible involvement of the DP1 gene in the 13q34 amplicon. *Genes, chromosomes and cancer*, 24, 4: 337-344
- Sikorska M., Sandhu J.K., Deb-Rinker P., Jezierski A., Leblanc J., Charlebois C., Ribocco-Lutkiewicz M., Bani-Yaghoub M. in Walker P.R. 2008. Epigenetic modifications of SOX2 enhancers, SRR1 and SRR2, correlate with in vitro neural differentiation. *Journal of neuroscience research*, 86, 8: 1680-1693
- Silveira N.J., Varuzza L., Machado-Lima A., Lauretto M.S., Pinheiro D.G., Rodrigues R.V., Severino P., Nobrega F.G., Silva W.A., B Pereira C.A., Tajara E.H. 2008.

- Searching for molecular markers in head and neck squamous cell carcinomas by statistical and bioinformatic analysis of larynx-derived SAGE libraries. *BioMed central medical genomics*, 1: 56
- Simpson, D.A., Feeney S., Boyle C. in Stitt A.W. 2000. Retinal VEGF mRNA measured by SYBR green I fluorescence: A versatile approach to quantitative PCR. *Molecular vision*, 6: 178-183
- Sinclair A., 2002. *Genetics 101: cytogenetics and FISH*. Canadian Medical Association Journal, 167, 4, 373-74
- Sinclair A.H., Berta P., Palmer M.S., Hawkins J.R., Griffiths B.L, Smith M.J, Foster J.W., Frischauf A.M., Lovell-Badge R. in Goodfellow P.N. 1990. A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature*, 346: 240-244
- Stolzenburg S. Rots M.G., Beltran A.S., Rivenbark A.G., Yuan X., Qian H., Strahl B.D. in Blancafort P. 2012. Targeted silencing of the oncogenic transcription factor SOX2 in breast cancer. *Nucleic acids research*, 40, 14: 6725-6740
- Strojan P. 2009. Smernice za obravnavo rakov glave in vratu, *Radiology and Oncology*, 2: 103-104
- Strojan P. in Zakotnik B. 2010. Timski pristop k zdravljenju raka glave in vratu. Ljubljana, Onkološki inštitut: 32 str.
- Strojan P., Šmid L. in Zakotnik B. 2009. Raki glave in vratu V: Onkologija. Raziskovanje, diagnostika in zdravljenje raka. Novaković S., Hočevar M., Jezeršek Novaković B., Strojan P., Žgajnar J. (ur.). 1. izd. Ljubljana, Mladinska knjiga: 254-271
- Takahashi K. in Yamanaka S. 2006. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 126, 4: 663-676
- Takahashi K., Tanabe K., Ohnuki M., Narita M., Ichisaka T., Tomoda K. in sod. 2007. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*, 131, 5: 861-872
- Tanaka S., Kamachi Y., Tanouchi A., Jing N. in Kondoh H. 2004. Interplay of SOX and POU factors in regulation of the Nestin gene in neural primordial cells. *Molecular and cellular biology*, 24, 20: 8834-8846
- Taranova O.V., Magness S.T., Fagan B.M., Wu Y., Surzenko N., Hutton S.R. in sod. 2006. SOX2 is a dose-dependent regulator of retinal neural progenitor competence. *Genes and development*, 20, 9: 1187-1202
- Tata M., Takahama Y., Abe K., Nakatsuji N. in Tada T. 2001. Nuclear reprogramming of somatic cells by in vitro hybridization with ES cells. *Current biology*, 11, 19: 1553-1558

- Tay Y., Zhang J., Thomson A.M., Lim B. in Rigoutsos I. 2008. MicroRNAs to Nanog, Oct4 and Sox2 coding regions modulate embryonic stem cell differentiation. *Nature*, 455, 7216: 1124-1128
- Tichopad, A., 2003. Standardized determination of real-time PCR efficiency from a single reaction set-up. *Nucleic acids research*, 31, 20: e122
- Tokuzawa Y., Kaiho E., Maruyama M., Takahashi K., Mitsui K., Maeda M., Niwa H. in Yamanaka S. 2003. Fbx15 is a novel target of Oct3/4 but is dispensable for embryonic stem cell self-renewal and mouse development. *Molecular and cellular biology*, 23, 8: 2699-2708
- Tomioka M., Nishimoto M., Miyagi S. in sod. 2002. Identification of Sox- 2 regulatory region which is under the control of Oct-3/4-Sox-2 complex. *Nucleic acids research*, 30,14: 3202-3213
- Van de Wetering M. in Clevers H. 1992. Sequence-specific interaction of the HMG box proteins TCF-1 and SRY occurs within the minor groove of a Watson-Crick double helix. *EMBO Journal*, 11, 8: 3039-3044
- Visvader J.E. in Lindeman G.J. 2008. Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions. *Nature reviews cancer*, 8, 10: 755-768
- Waters J.J. 2000. The principles of clinical cytogenetics. *Journal of Medical Genetics*, 37, 5: 399
- Wegner M. 1999. From head to toes: the multiple facets of Sox proteins. *Nucleic acids research*, 27, 6: 1409-1420
- Wegner M. 2005. Secrets to a healthy Sox life: lessons for melanocytes. *Pigment cell research*, 18, 2: 1874-1885
- Wiebe M.S., Nowling T.K. in Rizzino A. 2003. Identification of novel domains within Sox-2 and Sox-11 involved in autoinhibition of DNA binding and partnership specificity. *The Journal of biological chemistry*, 278, 20: 17901-17911
- Williamson K.A., Hever A.M., Rainger J., Rogers R.C., Magee A., Fiedler Z. in sod. 2006. Mutations in SOX2 cause anophthalmiaesophageal- genital (AEG) syndrome. *Human molecular genetics*, 15, 9: 1413-1422
- Wilmot I., Schnieke A.E., Mcwhir J., Kind A.J. in Campbell K.H. 1997. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*, 385: 810-813
- Wittwer, C.T., Herrmann M.G., Moss A.A. in Rasmussen R.P. 1997. Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *BioTechniques*, 22, 1: 134-138

- Wong M.L. in Medrano J.F., 2005. Real-time PCR form RNA quantitation, *Biotechniques*, 39, 1: 3-11
- Wood H.B. in Episkopou V. 1999. Comparative expression of the mouse Sox1, Sox2 and Sox3 genes from pre-gastrulation to early somite stages. *Mechanisms of development*, 86: 197-201
- Wright E.M., Snopek B. in Koopman P.1993. Seven new members of the Sox gene family expressed during mouse development. *Nucleic acids research*, 21, 3: 744
- Yamanaka S. 2007. Strategies and new developments in the generation of patient-specific pluripotent stem cells. *Cell stem cell*, 1, 1: 39-49
- Yan W., Wistuba I.I., Emmert-Buck M.R. in Erickson H.S. 2011. Squamous cell carcinoma-similarities and differences among anatomical sites. *American journal of cancer research*, 1, 3: 275-300
- Yasuyuki G., Kohichiroh Y., Yoh Z., Keika Z. in sod. 2010. Sox2 identified as a target gene for the amplification at 3q26 that is frequently detected in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer genetics and cytogenetics*, 202, 2: 82-93
- Yu J.Y., Vodyanik M.A., Smuga-Otto K., Antosiewicz-Bourget J., Frane J.L., Tian S.in sod. 2007. Induced pluripotent stem cells lines derived from human somatic cells. *Science*, 318: 1917-1920
- Yuan H., Corbi N., Basilico C. in Dailey L. 1995. Developmental specific activity of the FGF-4 enhancer requires the synergistic action of Sox2 and Oct-3. *Genes and development*, 9, 21: 2635-2645
- Yuan P., Kadara H., Behrens C., Tang X., Woods D., Solis L.M. in sod. 2010. Sex determining region Y-Box2 (SOX2) is a potential cell-lineage gene highly expressed in the pathogenesis of squamous cell carcinomas of the lung. *PLoS One*, 5, 2: 9112
- Zappone M.V., Galli R., Catena R., Meani N., De Biasi S., Mattei E., Tiveron C., Vescovi A.L., Lovell-Badge R., Ottolenghi S. in Nicolis S.K. 2000. Sox2 regulatory sequences direct expression of a b-geo transgene to telencephalic neural stem cells and precursors of the mouse embryo, revealing regionalization of gene expression in CNS stem cells. *Development*, 127, 11: 2367-2382
- Zhang Z. in sod., 2012. The biology of head and neck cancer stem cells, *Oral Oncology*, 48, 1: 1-9

8.1 ELEKTRONSKI VIRI

- Sox2 gene. 2009. Genetics home reference. Your guide to understanding genetic conditions.ZDA, Nacionalna medicinska knjižnica.
<http://ghr.nlm.nih.gov/gene/SOX2> (maj 2013)

Na koncu bi se rada zahvalila...

mentorici doc. dr. Jerneji Ambrožič Avguštin za korektno popravo naloge in vse informacije v zvezi s tem...

somentorici doc. dr. Špeli Stangler Herodež, ki me je vodila pri delu, mi svetovala, mi pomagala in še in še....res hvala!

prof. dr. Nadji Kokalj Vokač, ki mi je omogočila delo v laboratoriju, zaradi česar sem lahko več časa preživela v Mariboru, namesto v Ljubljani in se naučila nekaj novega...

asist. dr. Borisu Zagradišniku, za različne predloge, nasvete in za pomoč pri statistični obdelavi rezultatov...

vsem zaposlenim v laboratoriju za družbo, pomoč pri iskanju laboratorijske opreme, vse kavice in pogovore.

Hvala staršem, ki so me ves čas študija spodbujali in mi stali ob strani...

Hvala sestrama, predvsem Neli za pomoč pri oblikovanju slik...pač nisem ravno računalniški mojster =)

Hvala Davidu za pomoč pri oblikovanju in Maši za lektoriranje...

Hvala Mateju...saj ne vem kaj ti naj napišem=)...hvala, da si ob meni..

Hvala vsem prijateljem za vse skupno preživete trenutke...bilo je super!

PRILOGE

Priloga A

Prikaz restrikcijskih mest encimov, uporabljenih pri metodi RFLP

Encim *MnlII*

5'...C C T C (N)₇↓...3'
3'...G G A G (N)₆↑...5'

Encim *NlaIV* (*BspLI*)

5'...G G N↓N C C...3'
3'...C C N↑N G G...5'

Encim *RsaI*

5'...G T↓A C...3'
3'...C A↑T G...5'

Encim *HpaII*

5'...C↓C G G...3'
3'...G G C↑C...5'

Encim *HhaI*

5'...G C G↓C...3'
3'...C↑G C G...5'

Encim *HaeIII*

5'...G G↓C C...3'
3'...C C↑G G...5'

Priloga B

Rezultati qRT-PCR za referenčni gen β -aktin in gen *sox2*

Preglednica 20: Povprečne vrednosti koncentracij PCR-pomnožkov pri meritvah ekspresije gena za β -aktin (pridobljenih iz 2 vzporednih meritev)

β-aktin	Povprečna koncentracija
vzorec a	31,42
vzorec b	2542,305
vzorec c	1582,85
vzorec 1	17,565
vzorec 2	7282,567227
vzorec 4	1123,798233
vzorec 5	0,155
vzorec 6	98,03939955
vzorec 7	4,39
vzorec 8	1951,434575
vzorec 10	3003,529538
vzorec 11	19,97723617
vzorec 12	432,2487243
vzorec 13	343,3395386
vzorec 15	1734,431412
vzorec 17	4210,68295
vzorec 18	0,745
vzorec 19	1730,263034
vzorec 20	1044,273935
vzorec 21	1163,906513
vzorec 23	1041,030256
vzorec 24	4427,602855
vzorec 25	3643,826037
vzorec 26	1269,384584
vzorec 27	4472,326813
vzorec 28	891,1685871
vzorec 29	1454,71668
vzorec 30	3819,873244
vzorec 31	2314,243705
vzorec 32	3791,953717
vzorec 33	344,2423397
vzorec 34	6401,365842
vzorec 35	3788,925
vzorec 36	546,725
vzorec 37	1608,335
vzorec 38	3,42
vzorec 39	2592,05
vzorec 40	591,55

Se nadaljuje

Nadaljevanje preglednice 20. Povprečne vrednosti koncentracij PCR-pomnožkov pri meritvah ekspresije gena za *β-aktin* (pridobljenih iz 2 vzporednih meritev)

<i>β-aktin</i>	povprečna koncentracija
vzorec 41	1558,165
vzorec 42	895,255
vzorec 43	1343,065
vzorec 44	2493,295
vzorec 45	0,54
vzorec 46	3402,66
vzorec 47	543,24
vzorec 48	1195,01
vzorec 49	1222,14
vzorec 50	1602,995
vzorec 51	1455,585
vzorec 52	1920,34
vzorec 53	1626,77
vzorec 55	924,865
vzorec 56	148,88
vzorec 57	1821,32
vzorec 58	1285,72
vzorec 59	1537,815
vzorec 60	1497,845
vzorec 61	1638,885
vzorec 63	219,635
vzorec 65	426,35
vzorec 66	1217,075
vzorec 67	1253,9
vzorec 69	207,905
vzorec 70	1589,695
vzorec 71	1608,815
vzorec 72	1543,915
vzorec 73	392,105
vzorec 74	1312,67
vzorec 75	2109,695
vzorec 76	2012,285
vzorec 77	3837,385

Preglednica 21: Povprečne vrednosti koncentracij PCR-pomnožkov pri meritvah ekspresije gena *sox2* (pridobljenih iz 2 vzporednih meritev)

<i>sox2</i>	Povprečna koncentracija
vzorec a	156,31
vzorec b	1299,735
vzorec c	1047,015
vzorec 1	16,495

Se nadaljuje

Nadaljevanje preglednice 21. Povprečne vrednosti koncentracij PCR-pomnožkov pri meritvah ekspresije gena *sox2* (pridobljenih iz 2 vzporednih meritev)

<i>sox2</i>	povprečna koncentracija
vzorec 2	3683,56
vzorec 4	3500,005
vzorec 5	0
vzorec 6	443,13
vzorec 7	10,515
vzorec 8	533,46
vzorec 10	941,745
vzorec 11	3806,445
vzorec 12	240,51
vzorec 13	71,885
vzorec 15	10357,54
vzorec 17	96,675
vzorec 18	0
vzorec 19	14859,225
vzorec 20	514,785
vzorec 21	358,475
vzorec 23	1942,56
vzorec 24	702,995
vzorec 25	475,09
vzorec 26	381,96
vzorec 27	585,515
vzorec 28	484,08
vzorec 29	946,165
vzorec 30	4610,91
vzorec 31	595,735
vzorec 32	791,94
vzorec 33	535,235
vzorec 34	873,02
vzorec 35	701,91
vzorec 36	1252,06
vzorec 37	1761,755
vzorec 38	4,095
vzorec 39	36,175
vzorec 40	33,69
vzorec 41	1790,805
vzorec 42	630,53
vzorec 43	38,785
vzorec 44	727,04
vzorec 45	0,835
vzorec 46	2872,24
vzorec 47	10,165
vzorec 48	165,06
vzorec 49	751,295
vzorec 50	9170,42
vzorec 51	20152,875
vzorec 52	2689,705
vzorec 53	6966,935
vzorec 55	964,37
vzorec 56	14,095
vzorec 57	3658,345
vzorec 58	362,62

Se nadaljuje

Nadaljevanje preglednice 21. Povprečne vrednosti koncentracij PCR-pomnožkov pri meritvah ekspresije gena *sox2* (pridobljenih iz 2 vzporednih meritev)

<i>sox2</i>	povprečna koncentracija
vzorec 59	1654,425
vzorec 60	343,605
vzorec 61	671,44
vzorec 63	783,655
vzorec 65	871,145
vzorec 66	2281,18
vzorec 67	2181,86
vzorec 69	274,815
vzorec 70	6832,845
vzorec 71	1602,62
vzorec 72	1378,245
vzorec 73	756,9
vzorec 74	500,49
vzorec 75	1846,955
vzorec 76	1411,45
vzorec 77	1823,945

Priloga C

Prikaz končnih rezultatov meritev (relativnih razmerij povprečnih koncentracij PCR pomnožkov genov *sox2/β-aktin*)

Preglednica 22: Relativna razmerja povprečnih koncentracij PCR-pomnožkov genov *sox2/β-aktin* (tumorji)

oznaka vzorca	Relativno razmerje povprečnih koncentracij
vzorec 1	0,505805149
vzorec 2	3,114442518
vzorec 3	4,519917523
vzorec 4	0,273368119
vzorec 5	0,313546109
vzorec 6	190,53912
vzorec 7	0,556415754
vzorec 8	0,209370002
vzorec 9	5,971720719
vzorec 10	0,022959458
vzorec 11	8,587841679
vzorec 12	0,492959733
vzorec 13	0,30799295
vzorec 14	1,865997638
vzorec 15	0,158775532
vzorec 16	0,300901716
vzorec 17	0,130919547
vzorec 18	0,543196884
vzorec 19	0,650411873
vzorec 20	1,207084556
vzorec 21	0,257421031
vzorec 22	0,208847486
vzorec 23	1,554820364
vzorec 24	0,13638027
vzorec 25	0,185253073
vzorec 26	2,290109287
vzorec 27	1,095390575
vzorec 28	0,013956135
vzorec 29	0,056952075
vzorec 30	1,117161937
vzorec 31	0,704302126
vzorec 32	0,028877977
vzorec 33	0,291598066
vzorec 34	1,546296296
vzorec 35	0,844116074
vzorec 36	0,018711803
vzorec 37	0,138124367
vzorec 38	0,614737264
vzorec 39	5,72080387
vzorec 40	13,84520657
vzorec 41	1,400639991
vzorec 42	4,282679789
vzorec 43	1,042714342
vzorec 44	0,094673563
vzorec 45	2,008622867
vzorec 46	0,282036524

Se nadaljuje

Nadaljevanje preglednice 22: Relativna razmerja povprečnih koncentracij PCR-pomnožkov genov *sox2/β-aktin* (tumorji)

oznaka vzorca	Relativno razmerje povprečnih koncentracij
vzorec 47	1,075828367
vzorec 48	0,229399571
vzorec 49	0,409693176

Preglednica 23: Relativna razmerja povprečnih koncentracij PCR-pomnožkov genov *sox2/β-aktin* (kontrolne)

oznaka vzorca	Relativno razmerje povprečnih koncentracij
vzorec 1	0,939083404
vzorec 3	0
vzorec 4	2,395216401
vzorec 7	4,974856779
vzorec 10	0,51124275
vzorec 10	0
vzorec 12	0,38127633
vzorec 19	0,661474555
vzorec 19	2,043262578
vzorec 21	0,99614934
vzorec 23	0,875460671
vzorec 24	1,740059016
vzorec 28	4,298211292
vzorec 29	1,321829682
vzorec 34	3,567987798
vzorec 38	1,874313415
vzorec 39	0,475309358
vzorec 41	1,930350289
vzorec 45	0,89269487
vzorec 47	0,701416549

Preglednica 24: Relativna razmerja povprečnih koncentracij PCR-pomnožkov genov *sox2/β-aktin* glede na FISH metodo

oznaka vzorca	FISH rezultat		Relativno razmerje povprečnih koncentracij PCR-pomnožkov genov <i>sox2/β-aktin</i>
3	negativno	negativen	4,519917523
4	34Z 56R	negativen	0,273368119
5	negativno: 46Z, 6R	negativen	0,313546109
6	2Z3R	negativen	190,53912
7	Negativno	negativen	0,556415754
8	negativno	negativen	0,209370002
9	Amplifikacije: >2	več kopij	5,971720719
10	večinoma 4Z 4R	negativen	0,022959458
11	negativno	negativen	8,587841679
12	Negativno	negativen	0,492959733
14	razmerje Z:R = 1,9	negativen	1,865997638
	amplifikacije:		
15	3Z68R	več kopij	0,158775532
16	negativno: 4-6Z, 6R, 6R	negativen	0,300901716

Se nadaljuje

Nadaljevanje preglednice 24. Relativna razmerja povprečnih koncentracij PCR-pomnožkov genov *sox2/β-aktin* glede na FISH metodo

oznaka vzorca	FISH rezultat		Relativno razmerje povprečij koncentracij PCR- pomnožkov genov <i>sox2/β-aktin</i>
20	amplifikacija 67R	več kopij	1,207084556
22	negativno:6Z, 6R	negativen	0,208847486
23	Negativno	negativen	1,554820364
26	Amplifikacije : >2	več kopij	2,290109287
29	negativno: 4Z5R, 3Z5R	negativen	0,056952075
30	razmerje Z:R = 1,5	negativen	1,117161937
32	Negativno	negativen	0,028877977
33	Amplifikacije : 2,4	več kopij	0,291598066
35	negativno	negativen	0,844116074
36	Amplifikacije : >2	več kopij	0,018711803
37	Negativno : 2R4Z – večina Posamične	negativen	0,138124367
38	amplifikacije:1,6	negativen	0,614737264
40	negativno	negativen	13,84520657
41	Amplifikacije: >2	več kopij	1,400639991
42	negativno	negativen	4,282679789
44	Amplifikacije: 4Z68R	več kopij	0,094673563
45	negativno: 4Z4R	negativen	2,008622867
46	negativno	negativen	0,282036524
47	Amplifikacije : >2	več kopij	1,075828367
48	razmerje Z:R = 1,7	negativen	0,229399571

