

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Sveučilište u Dubrovniku

Institut Ruđer Bošković

Poslijediplomski interdisciplinarni sveučilišni studij Molekularne bioznanosti

Diana Trnski

**ULOGA PROTEIN-KINAZE GSK3 β U AKTIVACIJI SIGNALNOG PUTA
HEDGEHOG-GLI U STANICAMA KARCINOMA DEBELOG CRIJEVA ČOVJEKA**

Doktorska disertacija

Osijek, 2015.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Sveučilište u Dubrovniku
Institut Ruđer Bošković
Sveučilišni poslijediplomski interdisciplinarni
doktorski studij Molekularne bioznanosti

Doktorska disertacija

Znanstveno područje: Biomedicina i zdravstvo
Znanstveno polje: Temeljne medicinske znanosti

ULOGA PROTEIN-KINAZE GSK3 β U AKTIVACIJI SIGNALNOG PUTA HEDGEHOG-GLI U STANICAMA KARCINOMA DEBELOG CRIJEVA ČOVJEKA

Diana Trnski

Disertacija je izrađena u Laboratoriju za nasljedni rak Zavoda za molekularnu medicinu Instituta Ruđer Bošković

Mentor: prof. dr. sc. Sonja Levanat, znanstvena savjetnica

Kratki sažetak doktorske disertacije:

Ovaj doktorski rad ispitaio je mehanizam aktivacije signalnog puta Hedgehog-Gli (Hh-Gli) u stanicama karcinoma debelog crijeva čovjeka. Signalni put aktivan je u dvije stanične linije karcinoma debelog crijeva, a okidač aktivacije je poremećena funkcija protein-kinaze GSK3 β . Inhibicija GSK3 β litijem, utišava signalni put Hh-Gli, a mehanizam inhibicije uključuje efikasnije stvaranje kompleksa GSK3 β -SuFu-Gli3 te procesiranje Gli3 u transkripcijski represor. Inhibicija rezultira smanjenom proliferacijom i smanjenom tumorigeničnosti stanica, a dolazi i do aktivacije apoptoze i autofagije.

Broj stranica: 123

Broj slika: 43

Broj tablica: 5

Broj literaturnih navoda: 176

Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: signalni put Hedgehog-Gli, protein-kinaza GSK3 β , Gli3, karcinom debelog crijeva

Datum obrane: 24. ožujka 2015.

Stručno povjerenstvo za obranu:

1. dr. sc. Neda Slade, viša znanstvena suradnica Instituta Ruđer Bošković, predsjednica
2. prof. dr. sc. Sonja Levanat, znanstvena savjetnica, mentor i član
3. prof. dr. sc. Vera Cesar, redovita profesorica Odjela za biologiju Sveučilišta J. J. Strossmayera u Osijeku, član
4. dr. sc. Vesna Musani, znanstvena suradnica Instituta Ruđer Bošković, zamjena člana

Rad je pohranjen u: Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici Zagreb, Ul. Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb; Gradskoj i sveučilišnoj knjižnici Osijek, Europska avenija 24, Osijek; Sveučilištu Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Trg sv. Trojstva 3, Osijek

BASIC DOCUMENTATION CARD

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek
University of Dubrovnik
Ruđer Bošković Institute
University Postgraduate Interdisciplinary Doctoral Study of
Molecular biosciences

PhD thesis

Scientific Area: Biomedicine and health

Scientific Field: Basic medical sciences

THE ROLE OF PROTEIN KINASE GSK3 β IN THE ACTIVATION OF HEDGEHOG-GLI SIGNALING IN HUMAN COLON CANCER CELLS

Diana Trnski

Thesis performed at the Laboratory for Hereditary Cancer, Division of Molecular Medicine, Rudjer Boskovic Institute

Supervisor: prof. Sonja Levanat, PhD, senior scientist

Short abstract:

The aim of this thesis was to investigate the mechanism of Hedgehog-Gli (Hh-Gli) signaling activation in human colon cancer cells. The pathway is active in two colon carcinoma cell lines and with the activation trigger being deregulated GSK3 β activity. GSK3 β inhibition with lithium downregulates Hh-Gli signaling. The mechanism involves enhanced GSK3 β -SuFu-Gli3 complex formation and thus enhanced Gli3 processing into its transcriptional repressor form. Inhibition results in decreased cell proliferation and tumorigenicity, as well as apoptosis and autophagy activation.

Number of pages: 123

Number of figures: 43

Number of tables: 5

Number of references: 176

Original in: Croatian

Key words: Hedgehog-Gli signaling, protein kinase GSK3 β , Gli3, colon cancer

Date of the thesis defense: March 24th, 2015

Reviewers:

1. Neda Slade, PhD, senior research associate, Rudjer Boskovic Institute, commission president
2. prof. Sonja Levanat, PhD, senior scientist, Rudjer Boskovic Institute, supervisor and member
3. prof. Vera Cesar, PhD, Full professor, Department of Biology, J. J. Strossmayer University of Osijek, member
4. Vesna Musani, PhD, research associate, Rudjer Boskovic Institute, substitute member

Thesis deposited in: National and University Library in Zagreb, Ul. Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb; City and University Library of Osijek, Europska avenija 24, Osijek; Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Trg sv. Trojstva 3, Osijek

Ova doktorska disertacija izrađena je u Laboratoriju za nasljedni rak Zavoda za molekularnu medicinu Instituta „Ruđer Bošković“ pod vodstvom prof. dr. sc. Sonje Levanat u sklopu projekta Ministarstva znanosti, obrazovanja i sporta RH „Hh-Gli put, interakcije i potencijalne terapije“ (098-0982464-2461).

Zahvala

Veliko hvala:

- ❖ mentorici dr. sc. Sonji Levanat na ukazanom povjerenju te pomoći i strpljenju prilikom izrade ovog rada*

- ❖ kolegama iz labosa, Maji, Petru, Vesni i Mireli što su sa mnom podijelili svoje znanje te na savjetima i pomoći pri izradi rada*

- ❖ svim kolegama sa Zavoda za molekularnu medicinu i šire na pomoći, vrijednim savjetima i nesebičnom dijeljenju materijala i kemikalija*

- ❖ mom suprugu, roditeljima i sestri, koji su uvijek uz mene, neizmjereno hvala na svesrdnoj podršci, strpljenju i razumijevanju*

- ❖ široj obitelji i svim prijateljima na zanimanju i ohrabrirvanju*

Sadržaj

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA	I
BASIC DOCUMENTATION CARD	II
Zahvala	IV
Sadržaj	V
1. UVOD.....	1
1.1. Signalni put Hedgehog-Gli.....	1
1.1.1. Povijesni pregled	1
1.2. Prijenos signala	3
1.2.1. Inicijacija prijenosa signala – protein Hedgehog	4
1.2.2. Primanje signala – receptor Patched i koreceptor Smoothened.....	6
1.2.3. Prijenos signala u citoplazmi – aktivacija transkripcijskih faktora Gli.....	9
1.3. Kinaza glikogen sintaze 3β (GSK3 β)	13
1.4. Spojevi koji modificiraju aktivnost signalnog puta Hh-Gli	15
1.5. Uloga signalnog puta Hh-Gli u embrionalnom razvoju i razvoju gastrointestinalnog trakta.....	19
1.6. Uloga signalnog puta Hh-Gli u odraslom organizmu	20
1.7. Uloga signalnog puta Hh-Gli u karcinogenezi	22
1.8. Karcinom debelog crijeva.....	27
2. CILJ ISTRAŽIVANJA.....	29
3. MATERIJALI I METODE	31
3.1. Materijali.....	31
3.2. Rad sa staničnim kulturama	31
3.2.1. Odmrzavanje stanica.....	31
3.2.2. Presađivanje i održavanje stanica u kulturi	32

3.2.3.	Zamrzavanje stanica.....	33
3.3.	Tretmani stanica u kulturi	33
3.4.	Unos malih interferirajućih RNA (siRNA) koje koče ekspresiju GSK3 β i SuFu.....	34
3.5.	Test MTT.....	35
3.6.	Analiza sposobnosti klonalnog rasta stanica	37
3.7.	Izdvajanje RNA iz stanica.....	38
3.7.1.	Mjerenje koncentracije RNA	38
3.8.	Reverzna transkripcija	39
3.9.	Kvantitativni PCR (PCR u stvarnom vremenu)	40
3.10.	Izdvajanje proteina iz stanica	43
3.10.1.	Mjerenje koncentracije proteina	43
3.11.	Western blot	45
3.12.	Ko-imunoprecipitacija	49
3.13.	Imunofluorescentno bojanje stanica	51
3.14.	Bojanje stanica bojom akridin oranž i analiza na protočnom citometru.....	55
3.15.	Statistička obrada podataka.....	56
4.	REZULTATI	57
4.1.	Ekspresija komponenti signalnog puta Hh-Gli u stanicama karcinoma debelog crijeva	57
4.1.1.	Genska ekspresija komponenti signalnog puta Hh-Gli	57
4.1.2.	Ekspresija proteina signalnog puta Hh-Gli	58
4.2.	Mogućnost modulacije signalnog puta specifičnim aktivatorom i inhibitorom	59
4.2.1.	Aktivacija signalnog puta Hh-Gli	59
4.2.2.	Inhibicija signalnog puta Hh-Gli	61
4.3.	Inhibicija GSK3 β smanjuje proliferaciju stanica karcinoma debelog crijeva te smanjuje aktivnost signalnog puta Hh-Gli	63
4.3.1.	Učinak inhibicije GSK3 β na proliferaciju i tumorigenični potencijal stanica karcinoma debelog crijeva	64
4.3.2.	Učinak inhibicije GSK3 β na aktivnost signalnog puta Hh-Gli	65
4.3.3.	LiCl potiče inhibitornu fosforilaciju GSK3 β	67

4.3.4.	Inhibicija GSK3 β dovodi do efikasnijeg stvaranja kompleksa GSK3 β -SuFu-Gli3.	69
4.3.4.1.	Lokalizacija proteina Gli3 i GSK3 β	69
4.3.4.2.	Ko-imunoprecipitacija proteina Gli3, SuFu i GSK3 β	72
4.3.5.	Učinak utišavanja ekspresije GSK3 β i SuFu na aktivnost signalnog puta Hh-Gli u stanicama SW480.....	74
4.3.5.1.	Utišavanje GSK3 β	74
4.3.5.2.	Utišavanje SuFu.....	75
4.4.	Tretman litij-kloridom inducira autofagiju te apoptozu	76
4.4.1.	Analiza autofagije.....	76
4.4.2.	Analiza apoptoze.....	79
5.	RASPRAVA	81
6.	ZAKLJUČCI.....	91
7.	LITERATURA.....	92
8.	SAŽETAK	106
9.	SUMMARY	107
10.	POPIS KRATICA	108
11.	ŽIVOTOPIS	112

1. UVOD

1.1. *Signalni put Hedgehog-Gli*

1.1.1. Povijesni pregled

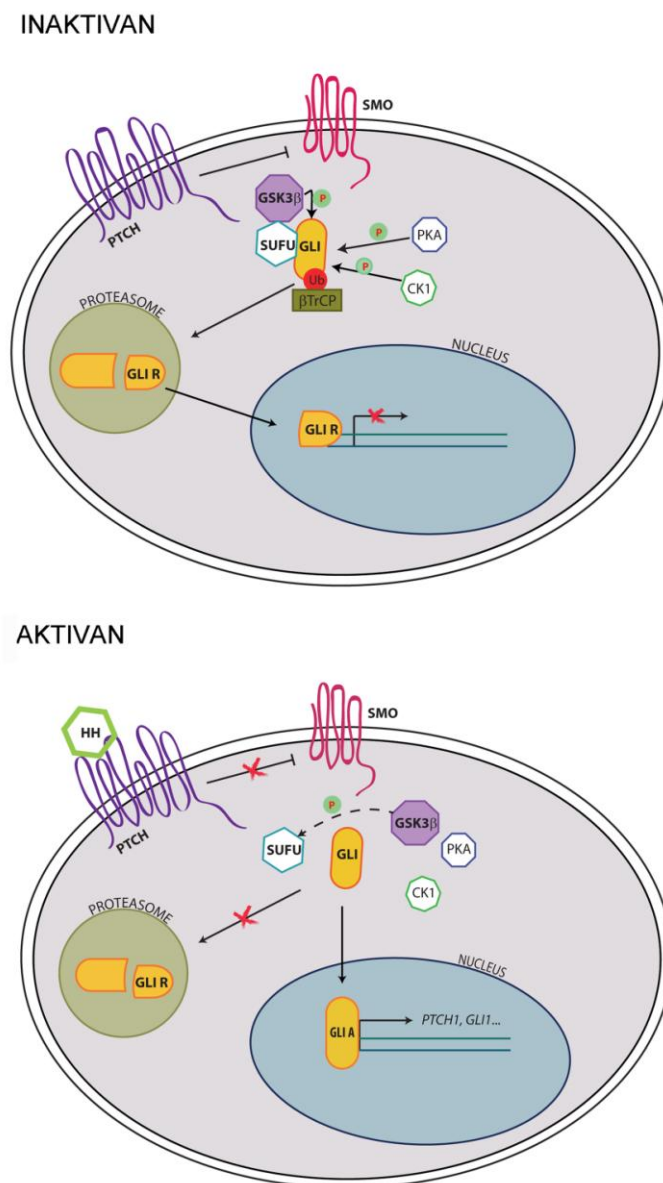
Priča o signalnom putu Hedgehog-Gli (Hh-Gli) započinje osamdesetih godina prošlog stoljeća, Nobelovom nagradom nagrađenim radom Christiane Nüsslein-Volhard i Erica Wieschusa. U svom radu pretraživali su mutacije koje dovode do razvojnih deformacija ličinke vinske mušice (*Drosophila melanogaster*). Mutacija u jednom genu narušavala je segmentaciju tijela ličinke, a kao posljedica izgubili su se karakteristični segmenti s „bodljama“ te su one bile ravnomjerno raspoređene. Takav izgled ličinke podsjetio je znanstvenike na bodlje ježa te je stoga gen dobio ime *hedgehog* (hrv. jež) (Nüsslein-Volhard i Wieschus, 1980). Njegova molekularna karakterizacija uslijedila je tek nakon 12 godina i pokazala da se radi o sekrecijskom proteinu koji regulira razvoj susjednih stanica (Ingham, 2001). Ubrzo nakon toga otkrivena su i tri homologa kod sisavaca, *Sonic Hedgehog (SHH)*, *Desert Hedgehog (DHH)* i *Indian Hedgehog (IHH)* kao i njihova evolucijski očuvana uloga u razvoju organizma. Glavne komponente signalnog puta također su identificirane uglavnom pomoću genetike vinske mušice. One su također evolucijski konzervirane, a nazivi su u skladu s fenotipskim karakteristikama mutiranih ličinki vinske mušice. Prvi identificirani receptor bio je Ptc (*Patched*, hrv. zakrpan), transmembranski protein koji sprječava prijenos signala kada ligand nije vezan za njega. Ključnu ulogu ima i koreceptor Smo (*Smoothened*, hrv. zaglađen), također transmembranski protein te transkripcijski posrednik signalnog puta *Cubitus interruptus (Ci)*, odnosno obitelj Gli transkripcijskih faktora kod kralješnjaka (Briscoe i Théron, 2013). Protein Gli identificiran je 1987. godine, kada je ustanovljeno da je i do 50 puta amplificiran u malignim gliomima, po čemu je i dobio ime (Kinzler i sur., 1987). Ubrzo je uslijedila i identifikacija proteina Gli2 i Gli3 (Ruppert i sur., 1988), te otkriće funkcije proteina Gli kao transkripcijskih faktora (Kinzler i sur., 1988). Kristalna struktura proteina Gli i njegovog vezanja na DNA razjašnjena je početkom devedesetih (Pavletich i Pabo, 1993).

Osim njegove kristalne strukture, danas su poznate i one proteina Shh, koji je kristaliziran sredinom devedesetih te proteina Smo, čija je struktura razjašnjena tek 2013. godine (Wang i sur., 2013a).

Signalni put Hh-Gli otkriven je u kontekstu embrionalnog razvoja, kako kod vinske mušice tako i kod viših organizama, gdje je prepoznata njegova ključna uloga u pravilnom razvoju brojnih tkiva i organa. Međutim, nakon što je 1996. godine povezan s nastankom Gorlinovog sindroma (također poznatog i kao sindrom nevoidnih bazeocelularnih karcinoma, NBCCS), nasljedne bolesti karakterizirane razvojnim deformacijama te podložnosti razvoja velikog broja tumora (Hahn i sur., 1996; Johnson i sur., 1996) počelo je prepoznavanje njegove uloge, ne samo u razvoju nasljednih bolesti, već i u nastanku mnogih sporadičnih tumora, kao i njegova uloga u održavanju somatskih i tumorskih matičnih stanica.

S obzirom da je ovaj rad izrađen na humanom modelu karcinoma debelog crijeva, primarno će biti prikazana funkcija i mehanizam prijenosa signala kod ljudi, odnosno sisavaca.

1.2. Prijenos signala



Slika 1.1 Shematski prikaz signalnog puta Hh-Gli. Na gornjem dijelu slike prikazan je inaktivan signalni put – u odsustvu liganda receptor Ptch inhibira koreceptor Smo, što koči prijenos signala u citoplazmu. Proteini Gli tada su vezani za protein SuFu koji sprječava njihovu translokaciju u jezgru i omogućuje njihovo obilježavanje za razgradnju/cijepanje na proteasomu. Cijepanjem nastaje transkripcijski represor koji koči ekspresiju ciljnih gena. Kanonički se signalni put aktivira vezanjem liganda Hh za receptor Ptch. Time prestaje inhibicija koreceptora Smo, što aktivira daljnju signalnu kaskadu. Pritom se Gli otpušta sa SuFu i nepocijepan se translocira u jezgru, gdje potiče transkripciju ciljnih gena.

1.2.1. Inicijacija prijenosa signala – protein Hedgehog

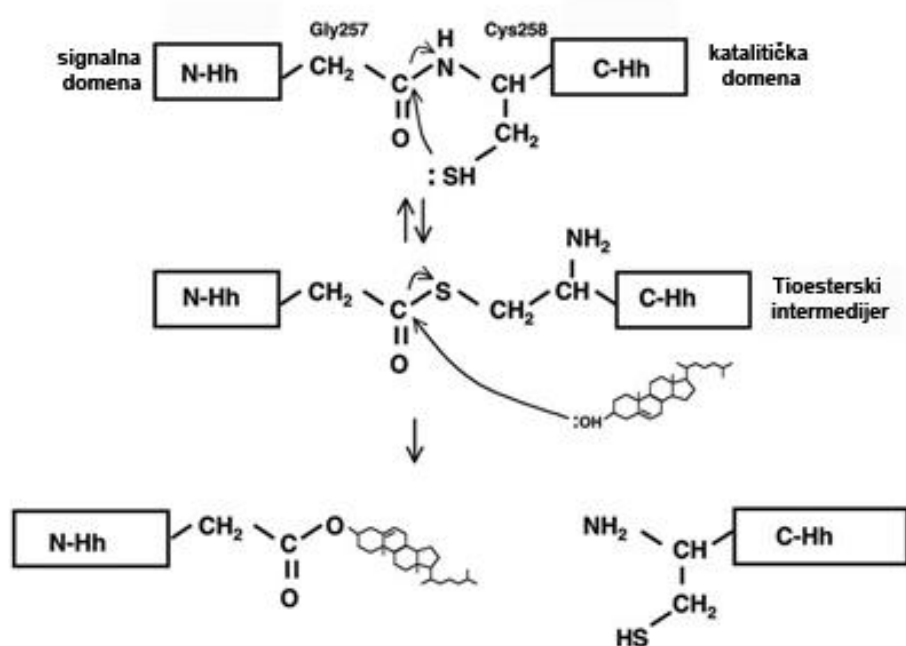
Obitelj gena *hedgehog* (*HH*) kodira skupinu sekretornih signalnih molekula, koje su ključne za rast i formiranje mnogih dijelova embrija. Obitelj proteina Hh, osim što djeluje na stanice u blizini izvora signala, može djelovati i na udaljenije stanice, što im daje karakteristike morfogena. Morfogeni stvaraju koncentracijski gradijent na širem području tkiva te izazivaju različite odgovore stanica, ovisno o njihovom položaju u gradijentu (Jeong i McMahon, 2002). Kod sisavaca postoje tri izoforme proteina Hedgehog (Hh): Sonic Hedgehog (Shh), Desert Hedgehog (Dhh) i Indian Hedgehog (Ihh). Od ova tri proteina najbolje je istražen Shh (Slika 1.2), a eksprimiran je u širokom spektru tkiva (Murone i sur., 1999). Zbog visoke homologije među ovim proteinima zaključilo se da su im i funkcije slične, međutim dokazano je da se razlikuju u načinu i jačini djelovanja (Pathi i sur., 2001).



Slika 1.2 Kristalna struktura proteina Shh (slika preuzeta s www.ebi.ac.uk)

Jedna od najznačajnijih karakteristika proteina Hh je njihovo procesiranje. Intramolekularnim cijepanjem proteina prekursora (45 kDa za Shh) nastaju C-terminalni fragment molekularne mase 25 kDa i N-terminalni fragment (Hh-N) molekularne mase 19 kDa. C-terminalni fragment odgovoran je za autokatalitičko cijepanje prekursora, kao i za kovalentno vezanje kolesterola na C-kraj N-terminalnog fragmenta. N-terminalni fragment odgovoran je za svu

signalnu aktivnost (Porter i sur., 1996). Shematski prikaz autoprocisiranja prikazan je na Slici 1.3.



Slika 1.3 Mehanizam autoprocisiranja proteina Hh kod vinske mušice. U prvom koraku tioletna skupina cisteina258 napravi nukleofilni napad na karbonilnu skupinu glicina257 kako bi se peptidna veza zamjenila tioesterom. Kolesterol zatim napada isti ugljik u tioesterskom intermedijeru, što rezultira kovalentnim vezanjem kolesterola za Hh-N i otpuštanjem Hh-C. Oba događaja katalizirana su Hh-C fragmentom (slika preuzeta i prilagođena iz Jeong i McMahan, 2002).

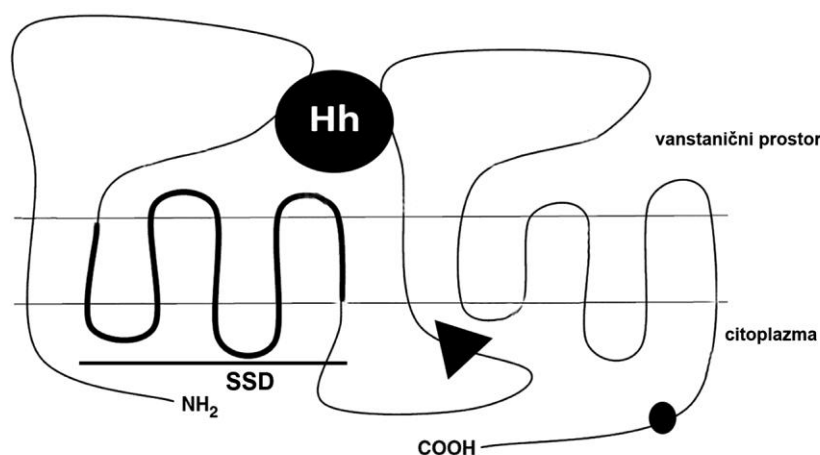
Osim kolesterola, da bi signalna molekula bila zrela potrebno je i vezanje palmitoilne skupine na visoko očuvani cistein na N-terminusu Hh-N, što je katalizirano acil-transferazom Hhat (engl. *Hedgehog acyltransferase*) (Pepinsky i sur., 1998). Dvostruka lipidna modifikacija ima značajan utjecaj na svojstva proteina Hh: pospješuju njegovu vezu s membranom, potenciraju njegovu sekreciju te određuju područje djelovanja u tkivu (Ingham i sur., 2011). Za izlučivanje proteina Hh iz stanica koje ga proizvode potreban je veliki transmembranski protein Dispatched (Disp), a pri tom značajnu ulogu ima kolesterol vezan za Hh-N (Burke i

sur., 1999). Kada se Hh-N izluči iz stanica, kreće se kroz izvanstanični prostor do ciljnih stanica (Hooper i Scott, 2005).

1.2.2. Primanje signala – receptor Patched i koreceptor Smoothened

Patched (Ptch) je primarni receptor proteina Hh. Za razliku od vinske mušice, kod sisavaca su prisutna dva homologa, Ptch1 i Ptch2 (Carpenter i sur., 1998). Ptch2 nije toliko uključen u nastanak bolesti kao Ptch1 te je stoga i slabije istražen (Jögi i sur., 2000; Smyth i sur., 1999).

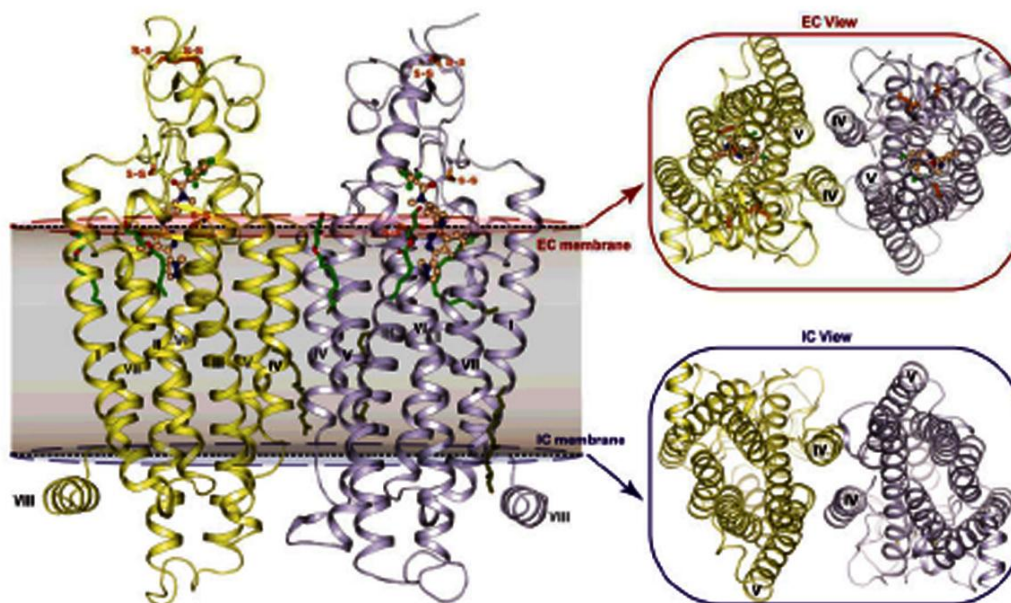
Ptch je protein koji se sastoji od 12 transmembranskih područja i dvije velike izvanstanične petlje (Slika 1.4). S obzirom na topologiju i primarnu sekvencu, Ptch najviše homologije dijeli s obitelji bakterijskih transportera, koji služe za izbacivanje toksina i teških metala iz stanice, a pokreću se protonskim gradijentom. Iako postoji malo primjera takvih gradijenata u eukariotskim stanicama, mutiranjem visoko konzerviranih aminokiselina u proteinu Ptch, koje su ključne za transportersku funkciju, utišava se aktivnost ovog proteina (Taipale i sur., 2002). Ptch također sadrži i područje osjetljivo na sterole SSD (engl. *Sterol Sensing Domain*), motiv koji se pronalazi u mnogim proteinima koji vežu kolesterol (Martín i sur., 2001). Mutacije koje mijenjaju konzervirane aminokiseline unutar SSD proteina Ptch, utječu na njegovu sposobnost regulacije ciljnih gena, bez da utječu na sposobnost vezanja proteina Hh (Robbins i sur., 2012). Osim što vezanjem proteina Hh, Ptch inicira signalni put, Ptch također mijenja izvanstanični gradijent proteina Hh, što predstavlja samoograničavajući mehanizam kojim se kontrolira područje djelovanja proteina Hh (Chen i Struhl, 1996). Pokazano je da proteini Ptch i Hh kolokaliziraju u unutarstaničnim vezikulama, što ukazuje na činjenicu da se nakon vezanja za Ptch, kompleks Hh-Ptch internalizira u ciljnim stanicama, nakon čega se uglavnom upućuje na razgradnju u lizosom (Ingham, 2001; Sabol i sur., 2012).



Slika 1.4 Shematski prikaz proteina Patched (Ptch). Između dvije izvanstanične petlje nalazi se vezno mjesto za protein Hh. SSD označava domenu osjetljivu na sterole (slika preuzeta i prilagođena iz Yu i sur., 2014).

Vežanje proteina Hh za receptor Ptch ukida inhibiciju koreceptora Smoothened (Smo). Protein Smo prema strukturi pripada superobitelji receptora vezanih za G-protein (engl. *G Protein Coupled Receptor*, GPCR), koji se sastoje od 7 transmembranskih domena. Međutim, danas ne postoje čvrsti dokazi da je aktivnost proteina Smo povezana s G-proteinom (Ingham, 2001). Kristalna struktura ovog proteina (Slika 1.5) razriješena je 2013. godine te je pokazala slabu sličnost proteina Smo s drugim proteinima iz obitelji GPCR (Wang i sur., 2013a). Još jedna razlika u odnosu na klasične proteine iz obitelji receptora vezanih za G-protein je to što Smo ne stupa u interakciju direktno s aktivirajućim signalom (ligandom), već vežanje liganda za protein Ptch dokida inhibitorni efekt koji Ptch ima na protein Smo. Priroda ove inhibitorne interakcije jedna je od najvećih nerazjašnjenih misterija u sklopu signalnog puta Hh-Gli. U početku se smatralo da su Ptch i Smo u direktnoj interakciji te da stvaraju receptorski kompleks vezan za membranu. Vežanjem liganda za Ptch, kompleks prolazi kroz konformacijsku promjenu koja aktivira Smo (Murone i sur., 1999; Stone i sur., 1996). Međutim, daljnja istraživanja pokazala su da Smo ne kolokalizira s proteinom Ptch u ciljnim stanicama (Denef i sur., 2000) te nije pokazana fizička interakcija između ova dva proteina (Johnson i sur., 2000). Novije teorije okreću se mogućnosti da Ptch regulira unutarstaničnu koncentraciju endogene male molekule koja modulira aktivnost koreceptora Smo.

Homologija proteina Ptch s transporterima i prisutnost domene osjetljive na sterole daju naslutiti da bi mala molekula mogla biti sterol ili lipid. Do danas je nekoliko grupa identificiralo različite klase oksisterolskih modulatora proteina Smo, od kojih neki aktiviraju Smo, a drugi ga inhibiraju (Robbins i sur., 2012).



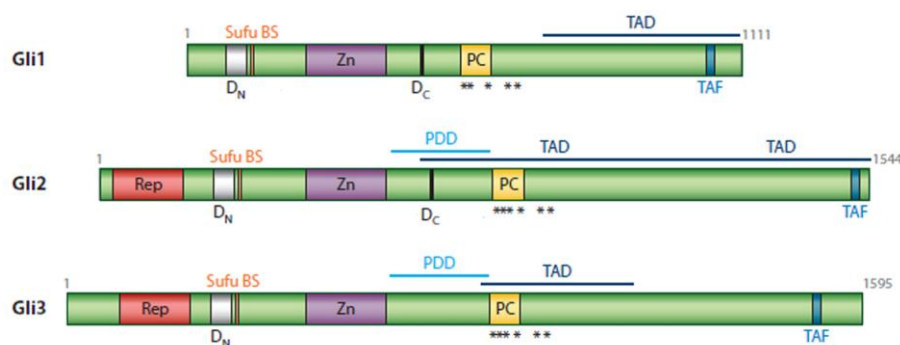
Slika 1.5 Kristalna struktura humanog koreceptora Smo vezan za spoj LY2940680. Protein je kristaliziran kao dimer (slika preuzeta iz Wang i sur., 2013a).

Aktivacija proteina Smo se događa u dva koraka: 1) fosforilacija i 2) translokacija Smo iz unutarstaničnih vezikula na površinu stanice. Protein Smo sadrži dugačku karboksiterminalnu domenu, koja je neophodna za Hh-ovisni prijenos signala. Vežanje liganda za Ptch potiče fosforilaciju karboksiterminalnog repa i dovodi do konformacijske promjene te dimerizacije/oligomerizacije karboksiterminalnih repova (Chen i Jiang, 2013; Corbit i sur., 2005; Zhao i sur., 2007). Točan način na koji se signal prenosi na nizvodne komponente signalnog puta još nije poznat. Kod vinske mušice protein Costal-2 (Cos-2), direktno stupa u interakciju s karboksiterminalnim krajem proteina Smo i regrutira nizvodne regulatore transkripcijskih faktora. Kod sisavaca nije pronađena aktivnost slična proteinu

Cos-2, a dva strukturna homologa Kif7 i Kif27 nisu neophodna za provođenje Hh signala. Posljednjih godina se spekulira da bi kao signalni intermedijer između plazma membrane i citoplazme kod sisavaca mogla djelovati primarna cilija. Primarna cilija je senzorni organel na površini stanica koje nastaju iz bazalnog tjelešca, pomoću kompleksa intraflagelarnih transportnih proteina (IFT), odgovornih za rast i održavanje cilije. Kod miševa gubitak funkcije IFT rezultira istim fenotipom kao i gubitak signalizacije Hh-Gli. Zanimljivo je i da su aktivatorske funkcije proteina Gli2 i Gli3, kao i procesiranje Gli3, poremećeni u IFT-mutantima. Proteini Smo, Gli1, Gli2 i Gli3 nakupljaju se u primarnoj ciliji nakon stimulacije ligandom. Dakle, moguće je da je kod sisavaca funkciju proteina Cos-2 preuzela primarna cilija, iako još nije poznato na koji način, odnosno radi li se o samom organelu ili sustavu za prijenos proteina unutar organela (Wang i sur., 2007).

1.2.3. Prijenos signala u citoplazmi – aktivacija transkripcijskih faktora Gli

Glavni za izvršenje signalne aktivnosti kod sisavaca su članovi obitelji transkripcijskih faktora Gli, Gli1, Gli2 i Gli3, koji kontroliraju aktivaciju ili inhibiciju signalnog puta na transkripcijskoj razini. To su transkripcijski faktori s motivom cinkovog prsta, kojim se vežu za specifični slijed (5'-GACCACCCA-3') u promotorima ciljnih gena (Kinzler i Vogelstein, 1990). Na proteinskoj razini Gli2 i Gli3 dijele mnoge karakteristike, dok je Gli1 nešto drugačiji. Gli2 i Gli3 na N-terminalnom kraju imaju represorsku domenu, dok kod Gli1 takva domena ne postoji (Slika 1.6). To znači da Gli2 i Gli3 mogu djelovati kao aktivatori ili represori signalnog puta, dok Gli1 djeluje isključivo kao aktivator. Gli2 i Gli3 odgovorni su za primarni odgovor na Hh-signal, dok je transkripcija gena *Gli1* posljedica aktivacije Gli2/3 (Bai i sur., 2002; Dai i sur., 1999; Hui i Angers, 2011; Sasaki i sur., 1999). Koraci koji dovode do njihove aktivacije, slabije su poznati kod sisavaca u odnosu na vinsku mušicu, ali se i među vrstama ti koraci znatno razlikuju.

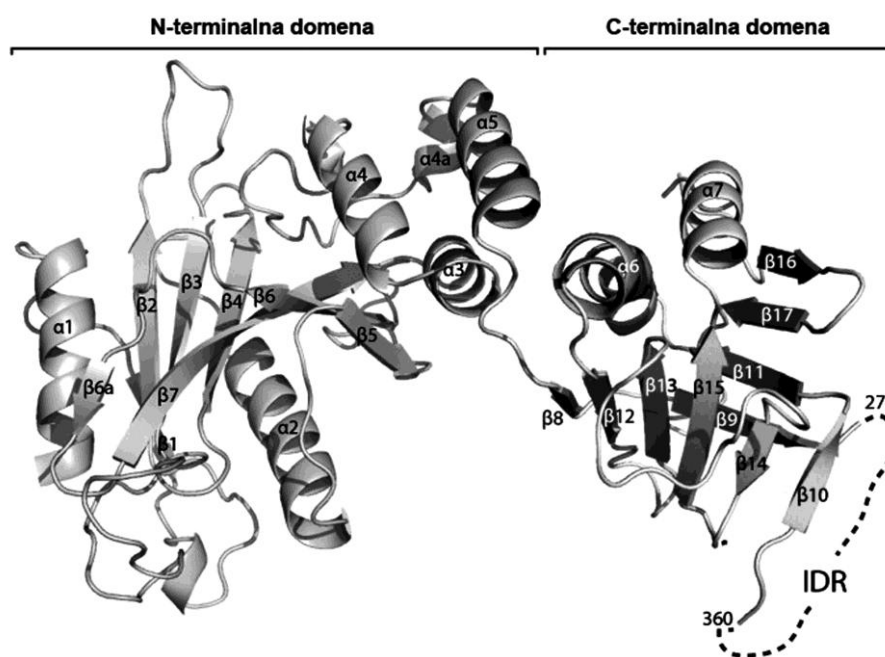


Slika 1.6 Shematski prikaz područja i motiva u proteinima Gli1, Gli2 i Gli3. Zn - motiv cinkovog prsta, DNA vezujuće područje; TAD – transaktivirajuće područje; TAF – vezno mjesto za protein TAF (protein vezan uz TBP); Rep – represorsko područje; Sufu BS – vezno mjesto za protein SuFu; * mjesto fosforilacije PKA; PC – fosforilacijski klaster; PDD – domena za određivanje procesiranja; D_N, D_C – N- i C-terminalni degroni, slijedovi aminokiselina koji određuju početno mjesto degradacije. Slika je preuzeta i prilagođena iz Hui i Angers, 2011.

Glavni regulator aktivnosti proteina Gli kod sisavaca je tumorsupresorski protein SuFu koji je negativni regulator signalnog puta (Stone i sur., 1999). Dok kod vinske mušice nema značajniju ulogu u embriogenezi, kod sisavaca je ključan za razvoj, a delecija gena *SuFu* kod miševa dovodi do aktivacije signalnog puta neovisne o ligandu i embrionalne letalnosti (Svärd i sur., 2006). Nadalje, gubitak aktivnosti proteina SuFu u humanim stanicama povezan je s nastankom različitih oblika tumora (Taylor i sur., 2002; Tostar i sur., 2006).

Glavni predloženi modeli regulacije transkripcijskih faktora Gli putem SuFu uključuju zadržavanje u citoplazmi (Kogerman i sur., 1999), dovođenje korepresorskog kompleksa na promotore za koje se veže transkripcijski faktor Gli (Cheng i Bishop, 2002) i poticanje konverzije proteina Gli2 i Gli3 iz aktivatorskog u represorski oblik (Wang i sur., 2010). Mehanizam zadržavanja proteina Gli u citoplazmi razjašnjen je u novijoj studiji koja je pokazala da vezanje SuFu za protein Gli maskira njegovu sekvencu za lokalizaciju u jezgru, što sprječava vezanje importina Kap β 2, proteina koji omogućuje unos proteina u jezgru (Shi i sur., 2014). Dokazano je da se protein SuFu direktno veže sa sva tri proteina Gli (Dunaeva, 2002; Kogerman i sur., 1999; Merchant i sur., 2004; Stone i sur., 1999), a razdvajanje kompleksa SuFu-Gli ključan je korak u aktivaciji signalnog puta (Humke i sur., 2010;

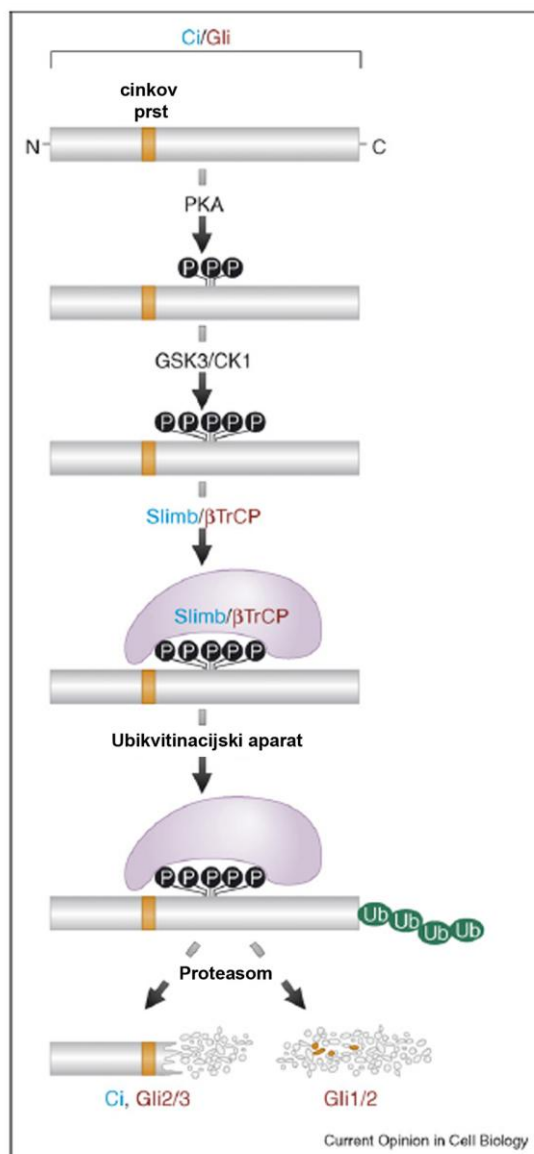
Tukachinsky i sur., 2010). 2013. godine razrješana je kristalna struktura proteina SuFu (Slika 1.7) kao i kompleksa SuFu-Gli te je pokazano da slobodni SuFu ima otvorenu konformaciju, a nakon vezanja proteina Gli dolazi do konformacijske promjene u kojoj se N- i C-terminalna područja približavaju i uklješćuju visokokonzervirane aminokiseline u proteinu Gli (Cherry i sur., 2013).



Slika 1.7 Kristalna struktura humanog proteina SuFu (slika preuzeta i prilagođena iz Cherry i sur., 2013).

Dok je signalni put inaktivan, dolazi do potpune degradacije proteina Gli1 te procesiranja proteina Gli2 i Gli3 u transkripcijske represore. Degradacija odnosno procesiranje odvija se ubikvitin proteasomalnim putem. Prvo dolazi do fosforilacije proteina Gli pomoću protein kinaze A (PKA), nakon čega slijede fosforilacije pomoću kinaze glikogen sintaze 3β (GSK3β) i kasein kinaze 1 (CK1). Fosforilacije su znak za vezanje E3 ubikvitin ligaze βTrCP, koja veže ubikvitin za protein Gli te ga na taj način obilježava za razgradnju, odnosno procesiranje u proteasomu (Huntzicker, 2006; Pan i sur., 2006; Tempe i sur., 2006). Proces je shematski

prikazan na Slici 1.8. Gli1 za degradaciju može biti obilježen i dodatnim mehanizmom, pomoću adapterskog proteina Numb i E3 ubikvitin ligaze Itch (Di Marcotullio i sur., 2006).



Slika 1.8 Shematski prikaz regulacije cijepanja i/ili degradacije proteina Gli1, Gli2 i Gli3 (Ci kod vinske mušice). PKA: protein kinaza A, GSK3: kinaza glikogen sintaze 3, CK1: kazein kinaza 1 (slika preuzeta i prilagođena iz Wang i sur., 2007).

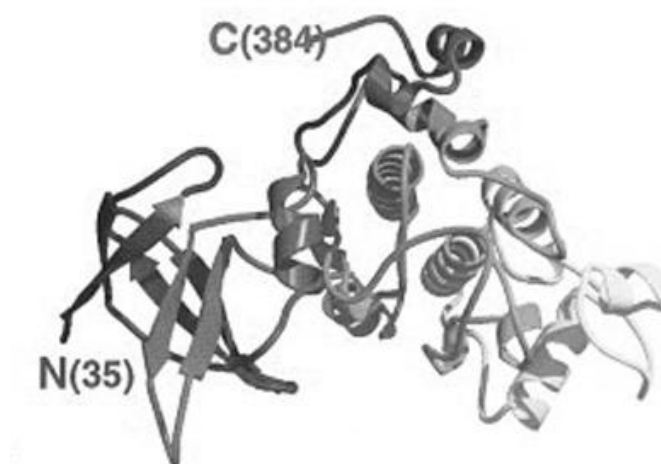
Aktivacijom signalnog puta ligandom, dolazi do otpuštanja transkripcijskih faktora Gli s proteina SuFu, što omogućuje njihovu translokaciju u jezgru. Pokazano je da u stanicama koje su stimulirane ligandom Hh, GSK3 β veže i fosforilira SuFu umjesto proteina Gli te na taj način potiče razdvajanje kompleksa SuFu-Gli, odnosno pozitivno regulira signalni put (Takenaka i sur., 2007). Također, jedno neovisno istraživanje je pokazalo da aktivacija signalnog puta ligandom dovodi do degradacije proteina SuFu posredovane ubikvitinom, iako još nije poznato koja ubikvitin ligaza katalizira proces (Yue i sur., 2009). Oslobođeni aktivatorski oblici transkripcijskih faktora Gli u jezgri se vežu za promotore ciljnih gena i potiču njihovu ekspresiju. Proteini Gli kontroliraju transkripciju brojnih gena uključenih u razne stanične funkcije, primjerice gena uključenih u stanični ciklus i proliferaciju (*Ciklin D*, *Ciklin E*, *N-Myc*, *FOXM1*, *PDGFR α*), adheziju (*Osteopontin*), preživljenje (*BCL-2*), proces epitelijalno-mezenhimalne tranzicije (EMT) (*SNAIL*, *ZEB1*, *ZEB2*, *TWIST2*) samoobnavljanje (*BMI1*, *NANOG*), angiogenezu (*VEGF*) te gene za autoregulaciju signalnog puta Hh-Gli (*PTCH1*, *GLI1*) (Katoh i Katoh, 2009; Stecca i Ruiz i Altaba, 2010; Yoon, 2001). Omjer aktivatorskih i represorskih oblika transkripcijskih faktora vrlo je dinamičan i ovisan o staničnom kontekstu i kao takav ključan je za pravilne odgovore na specifične signale, što ga čini ključnim za održavanje homeostaze (Aberger i Ruiz i Altaba, 2014).

1.3. Kinaza glikogen sintaze 3 β (GSK3 β)

Kinaza glikogen sintaze 3 β je multifunkcionalna serin/treonin kinaza. Ime je dobila prema prvoj funkciji s kojom je bila povezana, a to je funkcija u metaboličkim signalnim putevima. Danas je, međutim, poznato da je kinaza GSK3 neophodna za višestanični razvoj i za širok spektar staničnih funkcija, kao što su obnavljanje matičnih stanica, diferencijacija, apoptoza te čak i cirkadijani ritam. Aberacije u proteinu GSK3 mogu potencirati nastanak tumora, neurodegeneracije, dijabetesa i otpornost na inzulin (Frame i Cohen, 2001; Jope i Johnson, 2004).

Sisavci imaju dva oblika proteina GSK3: GSK3 α i GSK3 β (prikazan na Slici 1.9). Katalitičke domene su im gotovo identične, dijele mnoge oblike regulacije, međutim funkcije im se ne

preklapaju potpuno. Funkcija GSK3 β je mnogo bolje istražena. Glavni način regulacije aktivnosti ove kinaze je putem fosforilacijskih događaja. Postoje dvije aminokiseline na kojima ova kinaza može biti fosforilirana. Fosforilacija GSK3 β Ser9 od strane kinaze Akt i drugih kinaza je inhibitorna. Fosforilacija Ser9 funkcionira kao pseudo-supstrat te blokira pristup u aktivno mjesto. Za razliku od Ser9, fosforilacija Tyr216 pojačava kinaznu aktivnost GSK3 β . Fiziološka aktivnost ove kinaze regulirana je ravnotežom između aktivacijske i inhibitorne fosforilacije (Doble i Woodgett, 2003; Grimes i Jope, 2001; Jope i Johnson, 2004).



Slika 1.9 Kristalna struktura GSK3 β (slika preuzeta iz Dajani i sur., 2001).

GSK3 β sudjeluje u brojnim signalnim putevima koji su uključeni u razvojne procese, između ostalog i signalni put Hh-Gli. Kao što je prethodno već opisano, GSK3 β je negativni regulator signalnog puta Hh-Gli, jer fosforilacijom obilježava transkripcijske faktore Gli za razgradnju ili procesiranje u represorske oblike u nedostatku liganda (Wang i sur., 2007).

Za razliku od većine protein-kinaza, GSK3 β je konstitutivno aktivna u stanju mirovanja stanica i prolazi kroz brzu i prolaznu inhibiciju u odgovoru na vanstanične signale. Većinu svojih supstrata GSK3 β funkcionalno inaktivira, dakle djeluje kao represor u uvjetima mirovanja. S obzirom da GSK3 β negativno regulira mnoge proto-onkogene i regulatore staničnog ciklusa, moglo bi se zaključiti da ova kinaza sprječava tumorigenezu. Ovaj zaključak podupiru brojna

istraživanja u kojima je pokazano da je u nekim oblicima tumora, kao što su tumori kože i dojke, smanjena aktivnost ove kinaze (Luo, 2009). S druge strane, sve je više istraživanja koja pokazuju da GSK3 β može poticati razvoj tumora, odnosno da ima onkogenu funkciju. Prekomjerna ekspresija ove kinaze primijećena je u tumorima debelog crijeva (Shakoori i sur., 2005), gušterače (Ougolkov et al., 2005), jajnika (Rask i sur., 2003), bubrega (Bilim i sur., 2009), štitnjače (Kunnimalaiyaan i sur., 2007), jetre (Erdal i sur., 2005) i prostate (Mazor i sur., 2004). Konkretno za karcinom debelog crijeva pokazano je da su razina ekspresije i količine proteina GSK3 β s prisutnom aktivirajućom fosforilacijom u stanicama karcinoma mnogo veće nego u normalnim stanicama debelog crijeva. GSK3 β povezan je s pojačanom proliferacijom i preživljenjem stanica ovog karcinoma (Shakoori i sur., 2005).

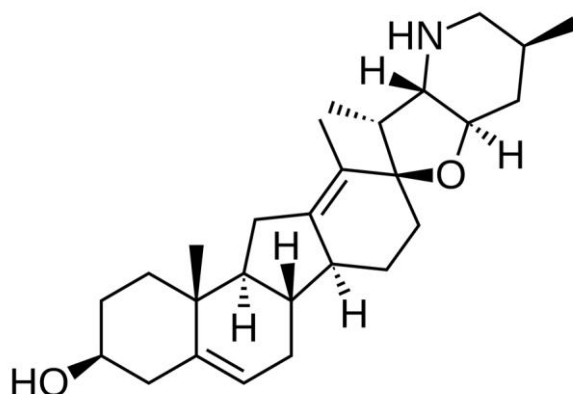
S obzirom na uključenost u razvoj nekih tumora i onkogeno djelovanje, kinaza GSK3 β je postala vrlo zanimljiva kao nova meta za razvoj protutumorskih terapija. Danas je poznat cijeli niz farmakoloških inhibitora GSK3 β . Najpoznatiji je litij, koji se već 50 godina koristi u liječenju bipolarnog poremećaja, u kojem GSK3 β ima ključnu ulogu. Litij, za razliku od drugih inhibitora, koji se većinom natječu s ATP-om za ATP vezno mjesto kinaze, inhibira GSK3 β na dva načina, direktni i indirektni. Direktni način uključuje kompeticiju za vezno mjesto Mg²⁺, a indirektna inhibicija uključuje poticanje inhibitorne fosforilacije Ser9 (Jope, 2003; Meijer i sur., 2004). Zanimljivo je da je zabilježen smanjen rizik od tumora kod bipolarnih pacijenata koji su liječeni litijem u odnosu na opću populaciju te postoji obrnuta korelacija između doze litija i razvoja tumora (Cohen i sur., 1998).

Međutim, budući da još nije razjašnjena priroda razlike u funkciji u pojedinim tumorima, prije nego što se razvije terapijska strategija detaljno treba istražiti mehanizam djelovanja GSK3 β .

1.4. Spojevi koji modificiraju aktivnost signalnog puta Hh-Gli

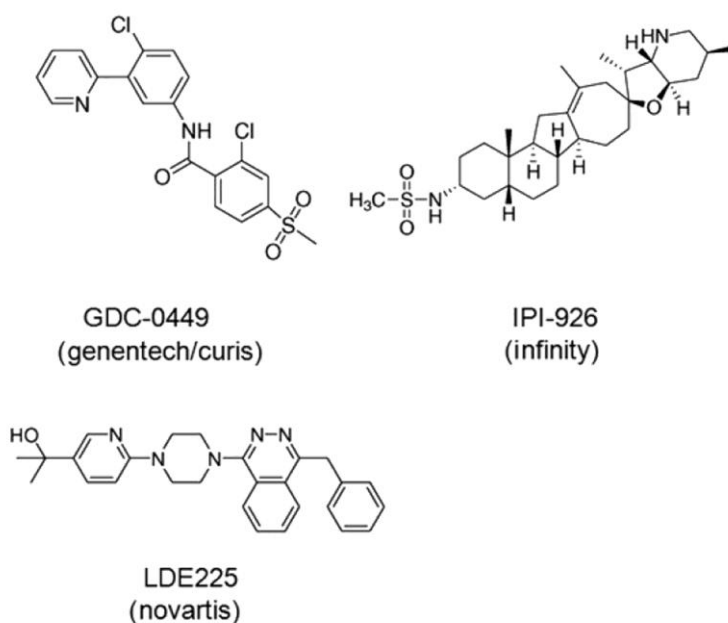
Šezdesetih godina prošlog stoljeća uočen je teratogeni efekt biljke *Veratrum californicum*, kada je primijećeno da uzrokuje ciklopiju kod potomstva ovaca koje su se tom biljkom

hranile. Naknadno je otkriveno da je aktivna supstanca steroidni alkaloid ciklopamin, koji inhibira signalni put Hh-Gli djelujući na razini koreceptora Smo. Kemijska struktura ciklopamina prikazana je na Slici 1.10. Ciklopamin se direktno veže za protein Smo i mijenja njegovu konformaciju (Binns i sur., 1963; Chen i sur., 2002a; Cooper i sur., 1998).



Slika 1.10 Kemijska struktura ciklopamina (slika preuzeta iz Heretsch i sur., 2010).

Iako je ciklopamin i dalje najčešće korišten spoj za inhibiciju signalnog puta Hh-Gli *in vitro*, razvijene su i druge male molekule kojima je cilj inhibicija ovog signalnog puta. Većina tih malih molekula su antagonisti koreceptora Smo, a danas je 7 od njih u postupku kliničkih ispitivanja za tumore. To su Vismodegib (GDC-0449), BMS-833923 (XL139), IPI-926 (Saridegib), LDE-225, PF-04449913, LEQ 506 i TAK-441. Kemijske strukture GDC-0449, IPI-926 i LDE-225 prikazani su na Slici 1.11. Za sve spojeve u postupku kliničkih ispitivanja karakteristično je da su najbolje odgovore dali kod onih tumora koji ovise o mutacijama u komponentama signalnog puta Hh-Gli, kao što su bazeocelularni karcinom (BCC) i meduloblastom. Izazov predstavlja liječenje drugih tipova tumora, kod kojih mehanizam aktivacije Hh-Gli signalnog puta nije tako jasan (Low i de Sauvage, 2010; Sahebjam i sur., 2012). Primjerice, djelovanje Vismodegiba ispitano je u kombinaciji s klasičnom terapijom kod pacijenata s metastatskim karcinomom debelog crijeva, međutim rezultati su pokazali kako u tom slučaju Vismodegib ne daje povoljnije učinke u odnosu na samu kemoterapiju (Curis Inc., 2010).



Slika 1.11 Poznate strukturne formule inhibitora koreceptora Smo koji su u postupku kliničkih ispitivanja. U zagradama su naznačene farmaceutske kompanije koje pojedini spoj razvijaju (slika preuzeta iz Onishi i Katano, 2011).

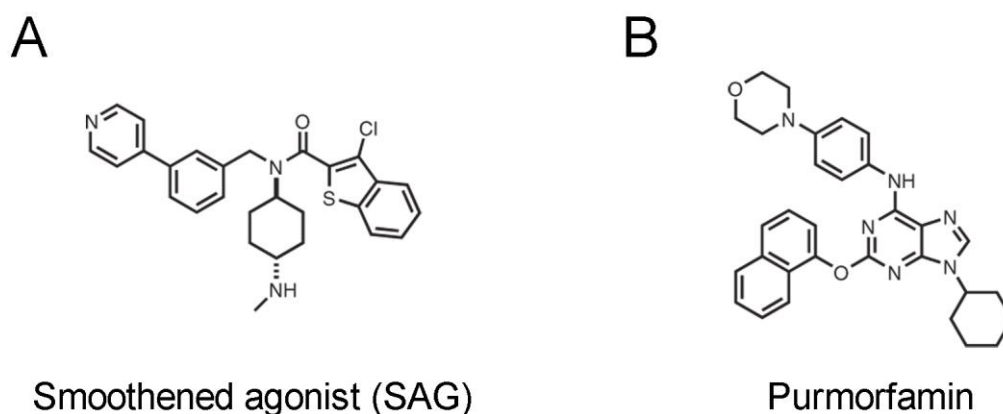
Vrlo zanimljiva meta za inhibiciju signalnog puta Hh-Gli su komponente koje se nalaze nizvodno od koreceptora Smo, odnosno transkripcijski faktori Gli1, Gli2 i Gli3. Danas postoji nekoliko spojeva koji djeluju na razini proteina Gli, međutim svi su još u pretkliničkim fazama. Najpoznatije male molekule su GANT58 i GANT61 (engl. *Gli antagonist*), koje direktno blokiraju vezanje Gli1 i Gli2 za promotore ciljnih gena. Ispitivanja *in vitro* pokazala su da imaju jače djelovanje od ciklopamina u nekoliko različitih tumorskih linija. Također su otkriveni i spojevi koji djeluju na razini proteina SuFu te na taj način djeluju na procesiranje i aktivaciju proteina Gli. Arsen trioksid (ATO) posljednjih je godina prepoznat kao inhibitor transkripcijskih faktora Gli te je zanimljiv s obzirom da je već u postupku kliničkih ispitivanja u drugom kontekstu, ali zbog pleiotropnih učinaka interpretacija će biti otežana (Amakye i sur., 2013). Svi dosada poznati inhibitori transkripcijskih faktora Gli inhibiraju samo aktivnost Gli1 i Gli2, ali ne i aktivnost Gli3.

Veliki problem u klinici predstavlja otpornost na inhibitore signalnog puta Hh-Gli. Najčešći mehanizam otpornosti su novostečene mutacije u koreceptoru Smo, koje onda

onemogućuju vezanje inhibitora. Nadalje, primijećen je i alternativni mehanizam, amplifikacija ili pojačana ekspresija transkripcijskog faktora Gli2 i ciklina D. Kao kompenzatorni mehanizam javlja se i pojačana aktivacija signalnog puta IGF-1R/PI3K, iako se ova pojava može zaobići dodatkom inhibitora PI3K uz inhibitore proteina Smo (Sahebjam i sur., 2012).

Iako je jasno da je signalni put Hh-Gli vrlo zanimljiva meta u kontekstu protutumorskih terapija, potrebna su daljnja istraživanja mehanizama njegove aktivacije u onim tumorima koji nisu ovisni o mutacijama njegovih komponenata. Važno je razlikovati Smo-ovisne i Smo-neovisne kanoničke ili nekanoničke aktivacije. Samo detaljno poznavanje mehanizma koji dovodi do aktivacije transkripcijskih faktora Gli u svakom pojedinom tumoru omogućiti će izbor optimalnog inhibitora ili kombinacije inhibitora (Amakye i sur., 2013).

Osim antagonista, poznati su i agonisti signalnog puta Hh-Gli, dakle male molekule koje pospješuju aktivnost signalnog puta. Prirodni agonist je ligand Hh, međutim vrlo je skup te su stoga sintetizirane male molekule koje imaju isti učinak na signalni put. Prva takva mala molekula bila je SAG (engl. *Smoothed Agonist*), koja aktivira signalni put direktnim vezanjem za koreceptor Smo (Chen i sur., 2002b). Prva primjena SAG-a bila je u diferencijaciji embrionalnih matičnih stanica (Frank-Kamenetsky i sur., 2002). Ubrzo nakon SAG-a opisan je drugi agonist signalnog puta Hh-Gli, purmorfamin. Purmorfamin se kao i SAG veže direktno na Smo (Sinha i Chen, 2006). Kemijske strukture SAG-a i purmorfamina prikazane su na Slici 1.12. Terapijske mogućnosti ovih spojeva su velike te se radi na ispitivanju njihove primjene kod zarastanja rana, poticanja ulaska folikula dlake u anagenu fazu, odnosno za poboljšanje rasta kose. Također postoje naznake da bi ovi agonisti mogli imati neuroprotektivna svojstva (Carney i Ingham, 2013).



Slika 1.12 Kemijske strukture agonista signalnog puta Hh-Gli koji djeluju na razini proteina Smo. (A) kemijska struktura agonista proteina Smo (SAG) (B) Kemijska struktura purmorfamina. Slika preuzeta i prilagođena iz Sinha i Chen, 2006.

1.5. Uloga signalnog puta Hh-Gli u embrionalnom razvoju i razvoju gastrointestinalnog trakta

Pravilno funkcioniranje signalnog puta Hh-Gli ključno je tijekom embrionalnog razvoja. Svaka deregulacija može dovesti do poremećaja u razvoju i rezultirati malformacijama. Prvi primjer učinka deregulacije je već prije spomenuta ciklopija kod janjadi čije su se majke hranile biljkom *Veratrum californicum*, koja sadrži ciklopamin, inhibitor signalnog puta Hh-Gli (Heretsch i sur., 2010).

Tijekom embrionalnog razvoja ligand Shh je eksprimiran u ograničenom setu stanica u notokordu, neuralnoj cijevi i pupoljcima ekstremiteta. Nakon otpuštanja iz stanica aktivni protein Shh-N djeluje kao difuzna molekula koja pokreće morfogenezu okolnih stanica. Shh kontrolira asimetriju lijeve i desne strane tijela, ključan je za pravilan razvoj udova, neuralne cijevi, cerebeluma, probavnog sustava i kože. Dhh je ključan za pravilan razvoj testisa, a Ihh je uglavnom uključen u morfogenezu kostiju (Jia i Jiang, 2006). Dokaz za kritičnu funkciju ovog proteina su mutacije u genu *SHH* koje rezultiraju holoprosencefalijom, a ponekad i ciklopijom (Cordero i sur., 2004; Roessler i sur., 1997). Kod ljudi mutacije u genu *PTCH* uzrokuju nastanak Gorlinovog sindroma kojeg karakteriziraju poremećaji skeleta, povećan

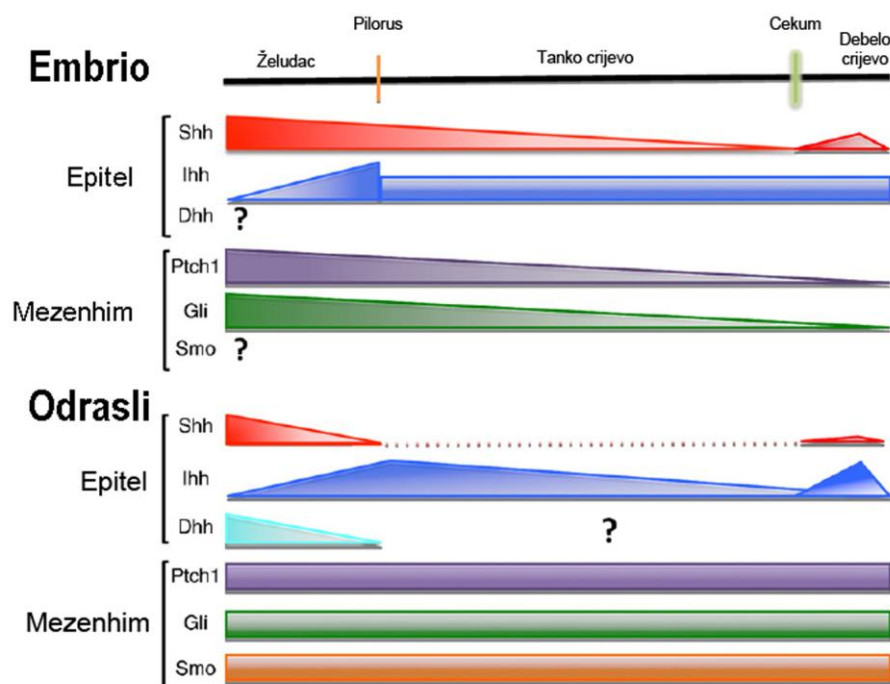
rast, abnormalnosti u strukturi lica te podložnost pojedinim tumorima kao što su meduloblastomi i bazeocelularni karcinomi (Hooper i Scott, 2005; Uden i sur., 1996). Mutacije u genu *SHH* ili obitelji gena *GLI*, posebno *GLI3*, mogu rezultirati Greigovim cefalopolisindaktilnim sindromom i Pallister-Hall sindromom koje karakteriziraju polidaktilija, poremećaji u razvoju traheja, bubrega te makrocefalija (Ogden i sur., 2004; Villavicencio i sur., 2000).

Geni *HH* eksprimirani su u endodermu crijeva svih kralješnjaka. Kod miša, *SHH* i *IHH* su koeksprimirani s djelomično preklapajućim uzorkom od stadija ranih somita. Miševi s homozigotnim mutacijama *SHH* i *IHH* pokazuju razne abnormalnosti probavila i pokazuju fenotipske sličnosti s malformacijama probavila kod ljudi. *SHH* i *IHH* reguliraju razvoj glatkih mišića probavila i enterički živčani sustav. *SHH* je bitan za razvoj epitela želuca, a *IHH* za proliferaciju i diferencijaciju intestinalnih matičnih stanica (Ramalho-Santos i sur., 2000). Što se tiče razvoja crijeva, *SHH* i *IHH* eksprimirani su u cijelom endodermu crijeva. Ekspresija *SHH* se utišava u tankom crijevu kada se formiraju vili i kada dolazi do diferencijacije. *IHH* je eksprimiran u tankom i debelom crijevu tijekom cijelog razvoja. Kasnije tijekom razvoja se ekspresija oba gena ograničava na epitel između vilusa tankog crijeva. U debelom crijevu *SHH* je eksprimiran u bazi kripti, dok je *IHH* eksprimiran u cijelom epitelu. Smjer slanja signala tijekom razvoja tankog i debelog crijeva je iz epitela u mezenhim, s obzirom da su *PTCH1* i *GLI1* eksprimirani isključivo u mezenhimu tijekom razvoja (Van den Brink, 2007).

1.6. Uloga signalnog puta Hh-Gli u odraslom organizmu

U odraslom organizmu signalni put Hh-Gli većinom je inaktivan ili slabo aktivan. Međutim, mogućnost aktivacije zadržana je u matičnim i progenitorskim stanicama, odgovornim za regeneraciju tkiva. U mirujućim somatskim matičnim stanicama ekspresija proteina Gli1 je niska, a signalni put Hh-Gli odgovoran je za njihovu aktivaciju, poticanje samoobnavljanja i produkciju stanica kćeri s ograničenim potencijalom (Ruiz i Altaba i sur., 2007). Do sada je signalni put Hh-Gli povezan s nizom somatskih matičnih stanica. Primjerice, poznato je da Shh igra bitnu ulogu u neurogenezi u odraslom mozgu sisavaca. Receptor Ptch i koreceptor

Smo eksprimirani su u odrasлом hipokampusu i progenitorskim stanicama porijeklom iz ove regije. Pokazano je da neuralne matične stanice, kao i neuralne progenitorske stanice odgovaraju na signalizaciju Shh i doprinose neurogenezi u odrasлом mozgu. Osim što Shh ima ulogu u poticanju samoobnavljanja i proliferacije matičnih stanica, također ima ulogu u regulaciji migracije stanica u odrasлом mozgu sisavaca (Faigle i Song, 2013). U zdravoj odrasloj jetri ekspresija komponenti signalnog puta Hh-Gli je niska, međutim pokazano je da ekspresija postoji u progenitorskim stanicama te da je ovaj signalni put nužan za regeneraciju nakon akutne ozljede (Omenetti i sur., 2011). Geni *PTCH1*, *GLI1* i *GLI2* eksprimirani su u normalnim humanim matičnim i progenitorskim stanicama dojke, a ekspresija se smanjuje tijekom diferencijacije. Pojačana aktivnost signalnog puta Hh-Gli ima važnu ulogu tijekom povećanja mliječnih žlijezda u trudnoći (Hui i sur., 2013). Također, u koži sisavaca ovaj signalni put ima ključnu ulogu u kontroli rasta folikula dlake te je eksprimiran u epidermalnim matičnim stanicama (Zhou i sur., 2006). U odrasлом gastrointestinalnom sustavu Hh-Gli signalizacija ima važnu ulogu u održavanju i funkciji pojedinih stanica, iako se mehanizmi razlikuju u pojedinim dijelovima sustava (Van den Brink, 2007). U održavanju i homeostazi odraslog debelog crijeva Ihh je glavna signalna molekula, koja se proizvodi u epitelnim stanicama i signal se šalje u mezenhimalne stanice. Ihh je signal koji označava integritet epitela. Gubitak tog signala usljed ozljede, pokreće proces zarastanja rana s programom popravka epitela te privlači fibroblaste i makrofage, a također aktivira mezenhimalni imuni odgovor. Detalji ovih procesa još nisu poznati te su potrebna daljnja istraživanja kako bi se razjasnili (Buller i sur., 2012). Na Slici 1.13 shematski je prikazana dinamika ekspresije komponenti signalnog puta Hh-Gli u pojedinim dijelovima gastrointestinalnog sustava.



1.13 Ekspresija molekula iz signalnog puta Hh-Gli duž gastrointestinalnog trakta tijekom razvoja embrija i u odrasлом organizmu. Tijekom razvoja embrija Shh je visokoekspimiran u želucu, a razina ekspresije se smanjuje duž crijeva. Shh je ekspimiran i u žlijezdama debelog crijeva. Najveća ekspresija Ihh je u pilorusu, a duž crijeva je konstantna. Za Dhh još nisu provedene adekvatne studije. Gli1 i Ptch1 ekspimirani su u mezenhimu i zrcalna su slika ekspresije Shh u epitelu. U odrasлом gastrointestinalnom traktu Shh je većinom ekspimiran u želucu. Ihh pokazuje visoke razine ekspresije u tankom crijevu te u debelom crijevu. Ekspresija Dhh primijećena je u želučanoj mukozii, ali nije primijećena u tankom crijevu. Ptch1, Gli1 i Smo ekspimirani su u mezenhimu odraslog gastrointestinalnog trakta (slika preuzeta i prilagođena iz Saqui-Salces i Merchant, 2010).

1.7. Uloga signalnog puta Hh-Gli u karcinogenezi

Ključni događaj koji rezultira razvojem tumora je neprekidna deregulirana proliferacija tumorskih stanica. Tumorske stanice ne odgovaraju na signale koji kontroliraju ponašanje normalnih stanica, već se nekontrolirano dijele, prodiru u zdravo tkivo i organe te se u konačnici šire kroz cijeli organizam. Gubitak kontrole rasta rezultat je nakupljenih promjena u genima koji kontroliraju ključne regulatorne procese u stanici. Te gene čine proto-onkogeni i tumor-supresorski geni. Proto-onkogeni su geni koji u zdravim stanicama potiču prolazak

stanice kroz stanični ciklus, reguliraju diferencijaciju ili inhibiraju staničnu smrt. Međutim, u tumorima ti su geni često promijenjeni te se tada nazivaju onkogenima. U takvim stanicama gubi se fina regulacija procesa koje oni kontroliraju i dolazi do pojačane proliferacije i izbjegavanja stanične smrti. Za razliku od proto-onkogeni, tumor-supresorski geni u zdravim stanicama sprječavaju diobu stanice i potiču staničnu smrt. U tumorima su često inaktivirani, čime se gubi njihova funkcija. Prekomjerna aktivacija onkogeni ili inaktivacija tumorskih supresora dovodi do deregulacije signalnih puteva čiji su članovi te do deregulacije procesa koje kontroliraju, što su ključni koraci u karcinogenezi (Cooper, 2000). Članovi signalnog puta Hh-Gli također se mogu svrstati u onkogene i tumorske supresore. Kada je otkriveno da mutacija u genu *PTCH* uzrokuje Gorlinov sindrom, rijedak sindrom kojeg između ostalog karakterizira pojava tumora: bazeocelularnih karcinoma, meduloblastoma, rabdomiosarkoma, fibroma srca i jajnika, meningeoma i cisti čeljusti, tada je ustanovljena funkcija gena *PTCH* kao tumor-supresorskog gena i povezan nastanak ovih tumora s poremećenom funkcijom signalnog puta Hh-Gli (Hahn i sur., 1996; Levnat i sur., 1996). Nakon toga, otkriveno je da većina sporadičnih bazeocelularnih karcinoma ima hiperaktivirani signalni put Hh-Gli, te da osim inaktivirajućih mutacija gena *PTCH*, nastanak ovih karcinoma mogu uzrokovati i aktivirajuće mutacije gena *SMO*. Kožne promjene slične BCC bile su vidljive kod transgeničnih miševa koji prekomjerno ekspimiraju mutirani *Smo*, čime je pokazano da *Smo* ima funkciju onkogeni (Xie i sur., 1998). Slično proteinu *Ptch*, i protein *SuFu* je identificiran kao tumorski supresor kada je otkriveno da inaktivirajuće mutacije u genu *SUFU* uzrokuju nastanak meduloblastoma (Taylor i sur., 2002). Daljnja istraživanja su pokazala da su genetske promjene *SUFU* ipak vrlo rijetka pojava u humanim meduloblastomima (Koch i sur., 2004). Međutim, kada je pokazano da *SUFU*^{+/-} miševi razvijaju fenotip kože s mnogim značajkama karakterističnim za Gorlinov sindrom, a da je nedostatak gena *SuFu* letalan za miševе te da pokazuju sličnosti s miševima kojima nedostaje gen *PTCH*, potvrđena je njegova uloga negativnog regulatora signalnog puta Hh-Gli te tumorskog supresora (Svärd i sur., 2006). Transkripcijski faktor *Gli1* identificiran je kao onkogen odmah kod otkrića, kada je ustanovljeno da je gen *GLI1* i do 50 puta amplificiran u malignom gliomu, po čemu je i dobio ime (*Glioma-associated oncogene homolog 1*) (Kinzler i sur., 1987). Za razliku od drugih komponenata signalnog puta Hh-Gli, u genu *GLI1* nisu

pronađene mutacije. Iako je identificiran kao amplificirani gen u stanicama glioma, amplifikacija ovog gena zapravo nije česta pojava u većini tumora. Najvišu frekvenciju amplifikacije (28%) pokazuje u alveolarnim rabdomiosarkomima, dok je u gliomima ta frekvencija niža. Istraživanja ranih devedesetih su pokazala relativno rijetku pojavu amplifikacije gena *GLI1* u humanim malignim gliomima (1,6-3,3%), međutim novije istraživanje zabilježilo je amplifikaciju gena *GLI1* u 22,6% uzoraka glioma (Zhu i Lo, 2010). Iako je razina promjena ovog gena u tumorima vrlo niska, danas je poznato da onkogeno djelovanje gena *GLI* može biti rezultat modulacije signalima izvan signalnog puta Hh-Gli. Kao što je prethodno objašnjeno, u homeostatskim uvjetima precizno je regulirana ravnoteža signala Hh-Gli te proto-onkogenih i tumorsupresorskih signalnih puteva što osigurava precizno kontroliran omjer aktivatorskih i represorskih oblika transkripcijskih faktora Gli. U tumorima, gubitak tumorskih supresora i prekomjerna aktivacija onkogeno direktno utječe na deregulaciju omjera Gli aktivatora i represora i pomiče ravnotežu prema transkripcijskim aktivatorima Gli (Aberger i Ruiz i Altaba, 2014).

Aberantna aktivacija signalnog puta Hh-Gli pronađena je u velikom broju tumora. Danas se pretpostavlja da ovaj signalni put igra ulogu u tumorima koji su odgovorni za više od trećine smrti povezanih s karcinomima (Barakat i sur., 2010).

Identifikacija ciljnih gena signalnog puta Hh-Gli pridonijela je razumijevanju procesa inicijacije tumora i njegovog održavanja. Ovaj signalni put kontrolira ekspresiju niza gena uključenih u važne biološke procese, koji su ključni i za karcinogenezu. Primjerice aktivacija signalnog puta može stimulirati proliferaciju aktivacijom ključnih regulatora progresije staničnog ciklusa, kao što su ciklin D i E2F, može inhibirati apoptozu direktnom indukcijom BCL-2 te može pojačati invazivnost i potaknuti metastaziranje aktivacijom faktora koji potiču epitelno-mezehimalnu tranziciju (EMT), kao što je SNAIL (Kasper i sur., 2006).

Načini aktivacije signalnog puta Hh-Gli različiti su u različitim tipovima tumora. Kao što je već rečeno, tumori povezani s Gorlinovim sindromom te njihovi sporadični oblici ovisni su o mutacijama u pojedinim komponentama signalnog puta, najčešće Ptch i Smo, a rjeđe i SuFu.

S obzirom da su mutacije glavni način aktivacije, a ne ligand, ovi tumori nazivaju se ligand-neovisni.

Za razliku od njih, velik broj tumora je ligand-ovisan. Kod njih dolazi do prekomjerne ekspresije liganda Hh, koji kod jednog dijela tumora djeluje na autokrini način, odnosno nastali ligand djeluje na samu tumorsku stanicu i potiče proliferaciju i preživljenje. Kod drugih oblika tumora eksprimirani ligand djeluje na stanice strome, odnosno parakrino. U autokrine ligand-ovisne tumore ubrajaju se tumori gušterače (Berman i sur., 2003; Thayer i sur., 2003), pluća (Watkins i sur., 2003; Yuan i sur., 2006), gornjeg gastrointestinalnog trakta (Berman i sur., 2003; Ma i sur., 2006), debelog crijeva (Qualtrough i sur., 2004), prostate (Karhadkar i sur., 2004; Sanchez i sur., 2004), dojke (Mukherjee i sur., 2006) i melanomi (Stecca i sur., 2007). Karakteristično za ove tumore je da osim liganda, eksprimiraju i nizvodne komponente signalnog puta te je njihov rast moguće inhibirati *in vitro*, u odsustvu stromalnih stanica, pomoću inhibitora signalnog puta. Postoji nekoliko nedoumica, vezano za ovu skupinu tumora. U eksperimentima su korištene vrlo visoke koncentracije ciklopamina, u nekim slučajevima, iako je bio inhibiran rast stanica, nisu padale ekspresije ciljnih gena, a ugibale su i stanice koje nemaju eksprimiran protein Smo, ciljnu molekulu ciklopamina. Ipak, druge studije uspjele su ponoviti inhibiciju rasta ciklopaminom *in vivo*, koristeći neutralizirajuće protutijelo za Hh ili utišavanjem *GLI1* i *SMO*. Zbog mogućih nespecifičnih učinaka ciklopamina, postojanje ove skupine tumora *in vivo* treba se još dokazati (Scales i de Sauvage, 2009).

Kod parakrinih ligand-ovisnih tumora, ligand se proizvodi u tumorskim stanicama te on djeluje na stanice strome u kojima se aktivira signalni put Hh-Gli. Na određenim mišjim modelima za tumor prostate (Fan i sur., 2004), gušterače i debelog crijeva (Yauch i sur., 2008) pokazano je da ligand iz tumorskih stanica potiče ekspresiju *GLI1*, *GLI2* i *PTCH1* u stromalnim stanicama, ali ne i u stanicama tumora. Nadalje u uzorcima humanih tumora prostate i gušterače zabilježeno je da tumorski epitel eksprimira *HH*, a *GLI1* se eksprimira u okolnim stanicama strome (Bailey i sur., 2008; Fan i sur., 2004; Tian i sur., 2009). Postoji i reverzno parakrini model tumora, kod kojeg ligand proizvode stanice strome, a signalni put

se aktivira u tumorskim stanicama. Zasad je takav model opisan u modelima limfoma B stanica, multiplog mijeloma i leukemije (Scales i de Sauvage, 2009).

Jedan od novijih modela je, da je signalni put Hh-Gli (autokrini ili parakrini) bitan samo za održavanje tumorskih matičnih stanica. Tumorske matične stanice su mala skupina stanica koje imaju sposobnost samoobnavljanja i multipotentne su, odnosno imaju sposobnost obnavljanja svih stanica u tumoru. Zbog otpornosti ovih stanica na kemoterapiju i zračenje, smatra se da su odgovorne za ponovno pojavljivanje tumora nakon navedenih tretmana. Idealan lijek za tumor uključivao bi eliminaciju matičnih stanica. Aktivnost signalnog puta Hh-Gli zabilježena je u tumorskim matičnim stanicama glioma (Clement i sur., 2007), gušterače (Li i sur., 2007) i dojke (Liu i sur., 2006). Istraživanja pokazuju da inhibicija signalnog puta Hh-Gli uništava ovu populaciju stanica te bi mogla biti dobra terapija u kombinaciji s klasičnom. Međutim, budući da su tumorske matične stanice vrlo slične somatskima, potrebno je dobro istražiti učinak na samoobnavljajuća tkiva (Scales i de Sauvage, 2009).

Osim ovih skupina tumora, kod kojih je signalni put aktiviran kanonički, postoji i velik broj tumora kod kojih je signalni put aktiviran nekanonički, odnosno kao rezultat međudjelovanja s drugim signalnim putevima. Do danas je pokazano da razni drugi signalni putevi koji reguliraju (proto)-onkogene mogu aktivirati signalni put Hh-Gli, neovisno o ligandu. Riobó i sur. pokazali su da signalni put PI3K/Akt može poništiti djelovanje PKA i na taj način spriječiti procesiranje Gli2 i posljedično aktivirati put (Riobó i sur., 2006). Jedna studija pokazala je da NF- κ B direktno regulira *SHH in vitro* i *in vivo* te pospješuje proliferaciju tumorskih stanica i njihovu otpornost na apoptozu (Kasperczyk i sur., 2009). U stanicama karcinoma želuca koje eksprimiraju estrogenski receptor (ER), estrogen aktivira signalni put ER, koji inducira stvaranje Shh. Posljedična aktivacija signalnog puta Hh-Gli pojačava proliferaciju tumorskih stanica (Kameda i sur., 2010). U tumorskim stanicama gušteračnog voda Smo nije potreban za aktivaciju signalnog puta Hh-Gli, već K-Ras i TGF β aktiviraju transkripciju ovisnu o Gli. Gli1 je u ovim stanicama neophodan za preživljenje i transformaciju (Nolan-Stevaux i sur., 2009). U melanomima je pokazano da tumorske stanice ovise o aktivnosti transkripcijskog faktora Gli1, ali da do njegove aktivacije i nuklearne translokacije dolazi putem signalnih puteva Ras/MEK i Akt (Stecca i sur., 2007). Također Shh može transaktivirati receptor epidermalnog

faktora rasta (EGFR), a EGF može aktivirati signalni puta Ras/MEK, koji tada aktivira Gli1 (Aberger i Ruiz i Altaba, 2014; Reinchisi i sur., 2013). Zanimljiva je i interakcija između signalnih puteva Hh-Gli i Wnt, posebno u kontekstu karcinoma debelog crijeva. Pojačana ekspresija Gli1 inhibira signalni put Wnt, a inhibicija signalnog puta Wnt dovodi do aktivacije signalnog puta Hh-Gli. Ova interakcija značajna je u kontekstu metastatske tranzicije stanica karcinoma debelog crijeva, naime, samo pacijenti s metastazama imaju primarne tumore koje karakterizira inhibirani signalni put Wnt te pojačana aktivnost signalnog puta Hh-Gli (Varnat i sur., 2010). Osim onkogeno pokazano je i da tumorski supresori reguliraju aktivnost signalnog puta Hh-Gli. Pokazana je međusobna inhibitorna regulacija Gli1 i p53, prisutna u normalnim stanicama i koja osigurava broj stanica prekursora i matičnih stanica. Gubitak p53, što je česta pojava u humanim tumorima, može dovesti do neregulirane aktivnosti Gli1, što uzrokuje pojačanu proliferaciju tumorskih stanica i pojačano samoobnavljanje tumorskih matičnih stanica (Stecca i Ruiz i Altaba, 2009).

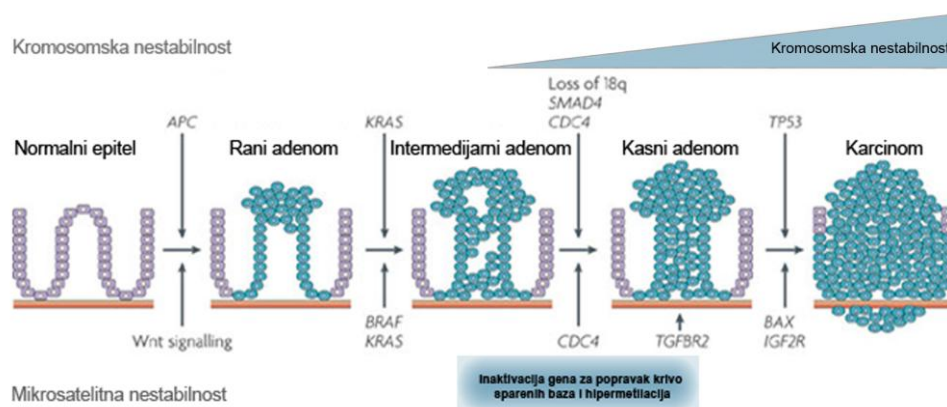
1.8. *Karcinom debelog crijeva*

Karcinom debelog crijeva u Hrvatskoj treći je po incidenciji i kod muškaraca i kod žena. Kod muškaraca čini 15% svih tumora, dok kod žena 13% svih tumora (Hrvatski Zavod za Javno Zdravstvo, 2011). U Europi je jedan od najčešće dijagnosticiranih tumora te značajno doprinosi smrtnosti povezanom s rakom u cijelom svijetu. Posljednjih godina naglasak je stavljen na rano otkrivanje i razvoj novih tretmana pa je mortalitet pao za 5% u posljednjem desetljeću. Međutim, opće razine mortaliteta i morbiditeta i dalje su visoke (Reimers i sur., 2013). Oko 90% karcinoma debelog crijeva je sporadično, bez obiteljske povijesti ili genske predispozicije. U manje od 10% identificirana je uzročna genska promjena.

Zahvaljujući genetičkoj revoluciji, došlo je do velikog napretka u razumijevanju molekularne osnove sporadičnog karcinoma debelog crijeva. 1990. godine Fearon i Vogelstein su opisali da nakupljanjem genskih mutacija dolazi do selektivne prednosti u rastu epitelnih stanica debelog crijeva. Također opisali su da je ukupna akumulacija mutacija bitna za biološki

učinak, a ne njihov redosljed. U ovom modelu mutacija u genu *APC* je inicijalni događaj pri formiranju adenoma, nakon čega slijedi niz drugih mutacija (Fearon i Vogelstein, 1990).

Opisana su najmanje tri molekularna puta koja mogu dovesti do karcinoma debelog crijeva, a sažeti su i shematski prikazani na Slici 1.14. Najčešći put je onaj kojeg karakterizira kromosomska nestabilnost, zbog čega dolazi do kromosomskih abnormalnosti. Kao rezultat dolazi do kariotipske varijabilnosti od stanice do stanice, a česta je pojava gubitka heterozigotnosti (eng. *Loss of heterozygosity*, LOH) na lokusima tumorsupresorskih gena, kao i kromosomskih prekrajanja. Ovu skupinu karakteriziraju mutacije u specifičnim onkogenima i tumorskim supresorima (*APC*, *KRAS*, *PIK3CA*, *BRAF*, *SMAD4*, *TP53* i dr.), što aktivira signalne puteve kritične za razvoj karcinoma debelog crijeva. Još jedan važan molekularni put nastanka ovog karcinoma je preko mikrosatelitne nestabilnosti, koju uzrokuje nefunkcionalan proces popravka krivo sparenih baza DNA. U konačnici to rezultira brojnim mutacijama. Osim što je ovaj molekularni put karakterističan za nasljedni nepolipozni karcinom debelog crijeva (engl. *Hereditary non-polyposis colorectal cancer*, HNPCC), nađen je i u 15% sporadičnih karcinoma. U sporadičnim slučajevima nefunkcionalan put popravka uzrokovan je hipermetilacijom promotora gena neke od komponenti puta popravka, što dovodi do utišavanja iste. Treći molekularni put je prisutnost opće metilacije CpG otoka u karcinomima debelog crijeva. Ova tri puta nisu međusobno isključiva, te pojedini karcinomi mogu pokazivati karakteristike više puteva (Bogaert i Prenen, 2014).



Slika 1.14 Genetički model za nastanak karcinoma debelog crijeva. Slika je preuzeta i prilagođena iz Walther i sur., 2009).

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Signalni put Hedgehog-Gli aberantno se aktivira u stanicama velikog broja tumora te stoga predstavlja zanimljivu metu za razvoj novih terapija. Međutim, načini aktivacije ovog signalnog puta razlikuju se od tumora do tumora, te su mnogi mehanizmi još neistraženi. Cilj ovog istraživanja bio je pobliže istražiti aktivnost i mehanizme aktivacije ovog signalnog puta u stanicama karcinoma debelog crijeva čovjeka, s posebnim naglaskom na kinazu glikogen sintaze 3β (GSK3 β). Prethodna istraživanja u Laboratoriju za nasljedni rak pokazala su pojačanu ekspresiju transkripcijskog faktora Gli3, ali i protein-kinaze GSK3 β u kliničkim uzorcima karcinoma debelog crijeva. S obzirom da je otkrivena deregulacija i potencijalna onkogen funkcija kinaze GSK3 β u stanicama karcinoma debelog crijeva, cilj ovog istraživanja bio je pokušati odrediti ima li i kakav efekt deregulirana kinaza GSK3 β na signalni put Hh-Gli, čiji je regulator. U tu svrhu su izabrane dvije stanične linije karcinoma debelog crijeva čovjeka, SW480 i SW620 na kojima se detaljnije ispitala uloga GSK3 β u aktivaciji signalnog puta Hh-Gli.

Osnovna hipoteza ovog istraživanja je da poremećena funkcija GSK3 β proteina u stanicama karcinoma debelog crijeva dovodi do pojačane aktivnosti signalnog puta Hh-Gli, što omogućava preživljenje stanica.

Specifični ciljevi istraživanja na staničnim linijama karcinoma debelog crijeva SW480 i SW620 su:

1. Utvrditi ekspresiju komponenti signalnog puta Hh-Gli u staničnim linijama karcinoma debelog crijeva čovjeka SW480 i SW620
2. Utvrditi aktivnost signalnog puta Hh-Gli te potvrditi onkogenu funkciju protein-kinaze GSK3 β
3. Utvrditi efekt farmakološke inhibicije GSK3 β na signalni put Hh-Gli te na stanice karcinoma debelog crijeva

4. Utvrditi učinak dokidanja ekspresije protein-kinaze GSK3 β na signalni put Hh-Gli te utvrditi potencijalne razlike u odnosu na farmakološku inhibiciju.
5. Utvrditi potencijalni mehanizam onkogenog djelovanja deregulirane protein-kinaze GSK3 β putem signalnog puta Hh-Gli

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

Stanična linija karcinoma debelog crijeva čovjeka SW480 (ATCC[®] CCL-228[™]) dobivena je na dar od dr.sc. Sanje Kapitanović, Institut Ruđer Bošković, dok je stanična linija SW620 (ATCC[®] CCL-227[™]) dobivena na dar od dr.sc. Marijete Kralj, Institut Ruđer Bošković.

Stanična linija SW480 uzgojena je iz primarnog adenokarcinoma kolona stadija B prema klasifikaciji po Dukes-u. Stanična linija SW620 dobivena je iz metastaze u limfnom čvoru primarnog tumora iz kojeg je dobivena stanična linija SW480 godinu ranije. Stanice adenokarcinoma kolona SW620 klasificiraju se kao stadij C prema klasifikaciji po Dukes-u.

3.2. Rad sa staničnim kulturama

Sav rad sa staničnim kulturama odvija se u sterilnim uvjetima. Svo posuđe, otopine, puferi i mediji su sterilni. Rukovanje svime što je vezano uz stanične kulture odvija se u kabinetu za rad u sterilnim uvjetima s laminarnim protokom zraka. Radna površina se briše alkoholom prije i nakon svake upotrebe, a sterilizira se UV svjetlom.

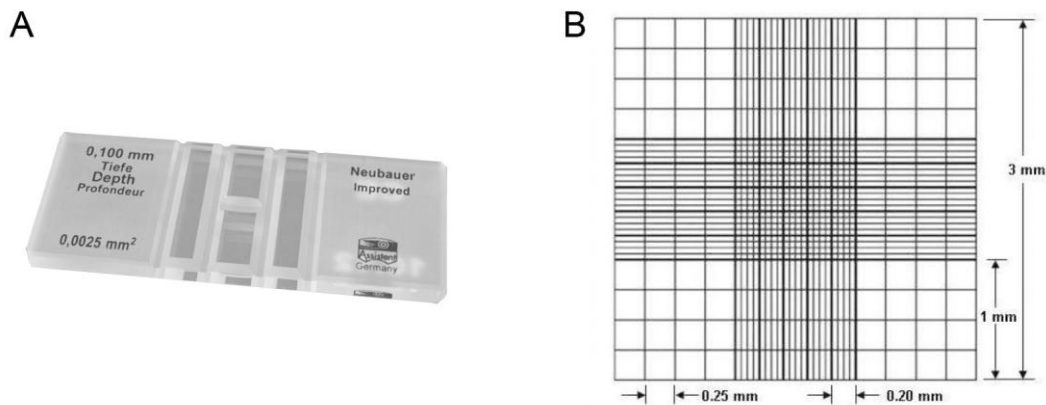
3.2.1. Odmrzavanje stanica

Stanice su pohranjene u mediju za zamrzavanje (45% serum, 45% medij, 10% DMSO) u krio-ampulama u tekućem dušiku. Bitno je odmrzavanje stanica izvršiti što prije, zbog toksičnosti krioprotektanta DMSO. U sterilnu staklenu epruvetu se stavi 5 ml medija u kojem stanice rastu, DMEM medij (Gibco, Life Technologies, SAD) kompletiran s 10% FBS (fetalni goveđi serum, GE Healthcare, UK), osim ako nije naglašeno drugačije. Ampula sa zamrznutim stanicama se malo zagrije u ruci, toliko da se zaleđena smjesa odvoji od stijenke ampule, ali da većina sadržaja još ostane zaleđena. Sadržaj se brzo prelije u staklenu epruvetu s medijem, te centrifugira na 3 000 x g 5 minuta. Na taj način se stanice isperu od

krioprotektanta DMSO i istalože na dno epruvete. Odmah nakon centrifugiranja supernatant se odlije, a talog stanica se resuspendira u 10 ml medija i prenese u petrijevku promjera 10 cm (Sarstedt, Njemačka). Petrijevka se lagano protrese da se stanice jednoliko rasporede, te se pohrani u inkubator (37°C, 5% CO₂).

3.2.2. Presađivanje i održavanje stanica u kulturi

Stanicama u kulturi medij se mijenja svaka dva do tri dana. Za promjenu medija pipetom se skupi sav medij iz petrijevke i baci se. Nakon toga, čistom pipetom se dodaje 10 ml svježeg medija. Kada stanice narastu toliko da gotovo potpuno prekriju podlogu (postanu konfluentne) treba ih se presaditi. Kod presađivanja, prvo im se pipetom ukloni sav medij. Tada se na stanice stavi 5 ml fosfatnog pufera (PBS bez Ca i Mg) (1,7 mM KH₂PO₄, 136 mM NaCl, 1 mM Na₂HPO₄, KH₂PO₄, pH 7,2), petrijevka se kratko proljulja i PBS se izvadi i baci. Time se stanice isperu od zaostalog seruma iz medija, jer serum inaktivira djelovanje tripsina. Zatim se na stanice doda 1 ml tripsina (0,05% w/v) te ostavi da djeluje 5-10 min, toliko da se stanice odvoje od podloge (tripsinizacija). Kada se stanice odvoje, na njih se doda 5 ml kompletiranog medija i dobro resuspendira propuhivanjem kroz pipetu. 1 ml otopine se nasadi u čistu petrijevku, te dopuni do 10 ml medijem. Kada se stanice nasađuju u pločice sa 6 ili više bunarića, trebaju se prethodno izbrojati, kako bi se odgovarajući broj stanica nasadio u svaki bunarić. Da bi se stanice izbrojale, nakon tripsinizacije na njih se doda 5 ml kompletiranog medija te se sadržaj prenese u sterilnu staklenu epruvetu. Prije brojanja stanice se 5 puta razrijede u metilenskom modrilu, koje služi za raspoznavanje mrtvih i živih stanica. Žive stanice aktivno izbacuju plavu boju, dok mrtve to ne mogu te se one onda raspoznaju po plavoj boji. Stanice se broje u Neubauerovoj komorici (Slika 3.1). Broj izbrojanih stanica uvrštava se u formulu [(potreban broj stanica/broj izbrojanih stanica)*razrjeđenje*10³] pomoću koje se izračunava broj stanica po mililitru te se dalje može izračunati volumen potreban za odgovarajući broj stanica po bunariću. Dobiveni volumen prenese se u novu sterilnu epruvetu te se nadopuni s odgovarajućim volumenom medija potrebnim za nasađivanje u bunariće.



Slika 3.1 Brojanje stanica. (A) prikaz Neubauerove komorice za brojanje stanica; (B) uvećani prikaz rasporeda polja za brojanje stanica. Slike preuzete i prilagođene s <http://lifescience.kinesio.co.uk> i <https://proscitech.com>.

3.2.3. Zamrzavanje stanica

Za dugotrajno pohranjivanje stanice je najbolje zamrznuti. Bitno je zamrzavati stanice kada su optimalne gustoće (80-90% konfluentne). Postupak zamrzavanja počinje slično kao postupak presađivanja, dakle stanice se tripsiniziraju. Tripsinizirane stanice se resuspendiraju u 5 ml medija i prenesu u sterilnu staklenu epruvetu, te ostave na hladnom (na ledu) pola sata do sat da se polako ohlade. Nakon toga se stanice centrifugiraju na 3 000 x g 5 min u centrifugi ohlađenoj na +4°C. Odmah nakon centrifugiranja sa stanica se odlije supernatant, a talog se resuspendira u 1 ml hladnog medija za zamrzavanje (45% serum, 45% medij, 10% DMSO) i odmah prebaci u krio-ampulu. Takva ampula se odmah pohranjuje u frižider na -80°C, gdje treba stajati barem 1-2 dana (a može i do nekoliko mjeseci). Za dulje skladištenje takve ampule se pohranjuju u tekući dušik.

3.3. *Tretmani stanica u kulturi*

4×10^5 stanica je nasađeno u pločice sa 6 bunarića u 1,5 ml medija. Nakon 24 sata, što je stanicama dovoljno da se uhvate za podlogu, promijenjen je medij te dodane odgovarajuće kemikalije. Za inhibiciju signalnog puta Hh-Gli korišten je specifičan inhibitor ciklopamin

($M_r=411,63$, Toronto Research Chemicals, Kanada, konačna koncentracija $10 \mu\text{M}$) u trajanju 48 sati, a za stimulaciju signalnog puta korišteni su Smoothened agonist (SAG, $M_r=490,06$, Santa Cruz Biotechnology, SAD, konačna koncentracija $0,5 \mu\text{M}$) u trajanju 24 sata ili protein Shh ($M_w=19 \text{ kDa}$, poklon dr. A. Kenney, konačna koncentracija $3 \text{ ng}/\mu\text{l}$) u trajanju 24 sata. Za inhibiciju protein-kinaze GSK3 β korišten je specifični inhibitor litij-klorid (LiCl, $M_r=42,4$, Kemika, Hrvatska, konačna koncentracija $20 - 40 \text{ mM}$) u trajanju od 24, 48 ili 72 sata. Pri analizi autofagije korišten je inhibitor autofagije, točnije inhibitor lizosomalnih proteaza amonij-klorid (NH_4Cl , $M_r=53.49$, Kemika, Hrvatska, konačna koncentracija 10 mM), s kojim su stanice inkubirane 1 sat prije tretmana litij-kloridom.

Nakon navedenih perioda inkubacije s odgovarajućim spojevima iz stanica su izdvojeni RNA i proteini.

3.4. Unos malih interferirajućih RNA (siRNA) koje koče ekspresiju GSK3 β i SuFu

Utišavanje RNA učinkovit je način utišavanja ekspresije gena od interesa u živim stanicama. Prolazno utišavanje radi se pomoću malih interferirajućih molekula RNA (siRNA) koje se transfeciraju u stanice. Transfeciraju se stanice nasađene u pločice sa 6 bunarića kada su otprilike 50-70% konfluentne. Za svaki od bunarića pomiješa se 50 nM siRNA s $250 \mu\text{l}$ Opti-MEM-a (medij s reduciranim udjelom seruma, Life Technologies, SAD) i ostavi da odstoji 5 minuta. U zasebnoj mikroepreveti pomiješa se $1,25 \mu\text{l}$ transfekcijskog reagensa siPORT NeoFX (Life Technologies, SAD) s $250 \mu\text{l}$ Opti-MEM-a i također ostavi da odstoji 5 minuta. Po isteku tog vremena pomiješa se sadržaj mikroepreveta i ostavi da odstoji 20 minuta. U međuvremenu stanice se isperu 2 puta s PBS-om te se u svaki bunarić doda $1,5 \text{ ml}$ medija bez seruma i bez antibiotika. Nakon isteka vremena u svaki bunarić se nakapa $500 \mu\text{l}$ mješavine siRNA i transfekcijskog reagensa. Nakon 24 sata, medij se zamijeni kompletiranim medijem.

U ovom radu korištene su 3 siRNA molekule:

siNK – kontrolna siRNA koja nema homologiju niti s jednim poznatim genom u sisavaca (Ambion Silencer Negative Control #1 siRNA, Life Technologies, SAD)

siGSK3 β – specifična za *GSK3 β* (sc-35527, Santa Cruz Biotechnology, SAD)

siSuFu – specifična za *SUFU* (Ambion Silencer Select siRNA, s28522, Life Technologies, SAD).

3.5. Test MTT

MTT (3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolij bromid) je žuti spoj koji se u živim stanicama reducira u ljubičasti formazan. Koristi se za mjerenje proliferacije stanica nakon tretmana kemijskim agensima. U ovom radu test MTT korišten je za praćenje rasta i preživljenja stanica nakon tretmana ciklopaminom i litij-kloridom.

Suspenzija stanica, gustoće 5×10^4 stanica/ml, nasadi se u pločicu s 96 bunarića, u ukupnom volumenu od 180 μ l po bunariću, u četiriplikatima. Uz to se na dodatnu pločicu s 96 bunarića nasade stanice u još 4 bunarića za kontrolno očitavanje, tzv. „0. dan“. 24 sata nakon nasađivanja, kada se stanice uhvate za podlogu, na stanice se dodaje po 20 μ l kemijskih spojeva koje testiramo u različitim koncentracijama, prema shemi na Slici 3.2.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
A	netretirane stanice	2.5 μ M ciklopamin	5 μ M ciklopamin	7.5 μ M ciklopamin	10 μ M ciklopamin	12.5 μ M ciklopamin	15 μ M ciklopamin							
B														
C														
D														
E	10 mM LiCl	15 mM LiCl	20 mM LiCl	25 mM LiCl	30 mM LiCl	35 mM LiCl	40 mM LiCl	45 mM LiCl	50 mM LiCl					
F														
G														
H														

Slika 3.2 Shematski prikaz rasporeda tretmana stanica u pločici s 96 bunarića za test MTT, s označenim konačnim koncentracijama spojeva. Svaki tretman analiziran je u četiriplikatu.

U Tablici 3-1 prikazano je na koji način su spojevi razrjeđivani u mediju u kojem se uzgajaju stanice.

Tablica 3-1 Shema razrjeđivanja kemijskih spojeva u mediju za MTT test.

	Koncentracija početne otopine	Volumen spoja	Volumen medija	Koncentracija radne otopine	Volumen nanesen u bunarić	Konačna koncentracija u bunariću
ciklopamin	2,5 mM	1 µl	99 µl	25 µM	20 µl	2,5 µM
	2,5 mM	2 µl	98 µl	50 µM	20 µl	5 µM
	2,5 mM	3 µl	97 µl	75 µM	20 µl	7,5 µM
	2,5 mM	4 µl	96 µl	100 µM	20 µl	10 µM
	2,5 mM	5 µl	95 µl	125 µM	20 µl	12,5 µM
	2,5 mM	6 µl	94 µl	150 µM	20 µl	15 µM
litij-klorid	1 M	10 µl	90 µl	100 mM	20 µl	10 mM
	1 M	15 µl	85 µl	150 mM	20 µl	15 mM
	1 M	20 µl	80 µl	200 mM	20 µl	20 mM
	1 M	25 µl	75 µl	250 mM	20 µl	25 mM
	1 M	30 µl	70 µl	300 mM	20 µl	30 mM
	1 M	35 µl	65 µl	350 mM	20 µl	35 mM
	1 M	40 µl	60 µl	400 mM	20 µl	40 mM
	1 M	45 µl	55 µl	450 mM	20 µl	45 mM
	1 M	50 µl	50 µl	500 mM	20 µl	50 mM

Isti taj dan stanice nasađene za „0. dan“ tretiraju se otopinom MTT, na način da se ukloni medij sa stanica te se na njih doda 40 µl MTT otopine koncentracije 1 mg/ml, pločica se zamota u aluminijsku foliju kako bi se zaštitila od svjetla, i inkubira 5 sati u inkubatoru na 37°C i pri 5% CO₂. Osim na stanice, čisti MTT se dodaje u 4 dodatna bunarića kako bi se

izmjerila osnovna obojenost MTT otopine za normalizaciju. Nakon 5 sati na stanice s otopinom MTT doda se 160 μ l DMSO i stavi na tresilicu 10 minuta kako bi se kristalići formazana dobro otopili. Što je otopina ljubičastija to je više vijabilnih stanica, dok bunarići s mrtvim stanicama uglavnom ostaju obojani žuto. Obojenost otopine mjeri se na spektrofotometru (Labsystems Multiskan MS, Finska) pri apsorpciji od 570 nm. Isto očitavanje napravi se i u pločicama koje su tretirane kemijskim spojevima, 72 sata nakon tretmana. Sve vrijednosti se unesu u Excel program te se matematički obrade kako bi se dobio postotak preživljenja stanica pri svakoj koncentraciji kemijskog agensa u odnosu na netretirane stanice.

3.6. *Analiza sposobnosti klonalnog rasta stanica*

Za ovaj pokus stanice se nasaduju u pločice sa 6 bunarića. U svaki bunarić nasadi se mali broj stanica, 10^3 te se nakon što se uhvate za podlogu gleda njihova sposobnost stvaranja kolonija. U ovom radu pratio se utjecaj 20 i 30 mM LiCl na stvaranje kolonija. Nakon što su se pojedinačne stanice prihvatile za podlogu, promijenjen im je medij te im je dodan odgovarajući tretman. Uz tretirane stanice kao kontrola su se pratile i netretirane stanice. Rast kolonija pratio se dva tjedna, a stanicama se svaka tri dana mijenjao medij s tretmanom. Nakon dva tjedna, stanicama je odstranjen medij i isprane su 2 puta u PBS-u bez Ca i Mg. Nakon toga, stanice su fiksirane u 3,6% paraformaldehidu, 10 minuta na sobnoj temperaturi, nakon čega su ponovno isprane 2 puta u PBS-u bez Ca i Mg. Da bi kolonije postale vidljive golim okom, bojane su otopinom 1% kristal violeta tijekom 1 sata na sobnoj temperaturi. Po isteku vremena kristal violet se odstrani, a kolonije ispiru vodovodnom vodom 4 puta, ili dok se podloga ne odboja, a kolonije ostanu obojane u ljubičasto.

3.7. Izdvajanje RNA iz stanica

Svi koraci izdvajanja RNA iz stanica rade se na ledu, kako bi se očuvao njen integritet. Također, svi koraci centrifugiranja rade se u centrifugi ohlađenoj na +4°C. Stanice u pločicama stave se na led, s njih se ukloni medij i doda im se 1 ml PBS-a bez Ca i Mg. Stanice se sastružu s podloge koristeći posebni strugač te se suspenzija stanica u PBS-u prenese u mikroeprevetu, i zatim centrifugira na 3000 x g 5 min u centrifugi ohlađenoj na +4°C. Odmah nakon centrifugiranja sa stanica se odlije supernatant. Za izolaciju RNA korištena je otopina TRIzol (Life Technologies, SAD). Talog stanica iz jednog bunarića pločice sa 6 bunarića resuspendira se u 500 µl TRIzola te se inkubira na sobnoj temperaturi 5 minuta. Nakon toga doda se 100 µl kloroforma, sadržaj mikroeprevete se dobro promiješa i inkubira na sobnoj temperaturi tijekom 10 minuta. Zatim slijedi centrifugiranje u centrifugi ohlađenoj na +4°C, 15 minuta na 16000 x g. Centrifugiranjem se razdvoje vodena faza, interfaza i organska faza. U gornjoj, vodenoj fazi nalazi se RNA te se ta faza prebaci u čistu mikroeprevetu. Za precipitaciju RNA doda se 250 µl izopropanola, dobro se promiješa i ostavi na sobnoj temperaturi tijekom 10 minuta. Nakon inkubacije, centrifugira se 30 minuta na 16000 x g u ohlađenoj centrifugi. Potom se odlije supernatant, a RNA ostaje u talogu. Talog RNA se ispere sa 750 µl 70% etanola i centrifugira u ohlađenoj centrifugi na 16 000 x g 10 minuta. Ponovno se odlije supernatant, a mikroepreveta se ostavi otvorena, kako bi zaostali etanol ishlapio, ali pazeći da se sam talog ne presuši. RNA se otopi u 30 µl sterilne vode i pohranjuje u frižideru na -80°C.

3.7.1. Mjerenje koncentracije RNA

Koncentracija RNA mjeri se na spektrofotometru BioSpec-nano Micro-volume UV-Vis Spectrophotometer (Shimadzu, Japan). Uređaj mjeri apsorbanciju pri valnim duljinama od 230 nm, 260 nm i 280 nm. Uređaj se kalibrira nanošenjem 1 µl vode u kojoj je RNA otopljena te se zatim prelazi na mjerenje koncentracije RNA, također na način da se 1 µl uzorka nanese na uređaj. Uređaj je spojen na računalo na kojem se prikazuje koncentracija RNA te omjeri A_{260}/A_{280} te A_{260}/A_{230} . Omjer A_{260}/A_{280} govori o čistoći RNA te što je taj omjer bliži 2 to je RNA čišća, ako je omjer niži može se raditi o kontaminaciji proteinima koji apsorbiraju pri 280 nm.

Omjer A_{260}/A_{230} također govori o čistoći uzorka te je on za čist uzorak u rasponu 2 – 2,2, a ako je niži može značiti da je u uzorku zaostalo TRIzola koji apsorbira pri 230 nm.

3.8. Reverzna transkripcija

Budući da je RNA vrlo osjetljiva molekula, prije analize ekspresije gena kvantitativnim PCR-om, potrebno ju je prevesti u cDNA, koja je znatno stabilnija. To se radi pomoću enzima reverzna transkriptaza, koja prepisuje RNA u sebi komplementarnu cDNA.

Reakcija reverzne transkripcije radi se s 1 μ g RNA. U ukupni volumen od 50 μ l ulazi 30,75 μ l reakcijske smjese, 1 μ g RNA te se nadopunjuje vodom do konačnog volumena (Tablica 3-2).

Tablica 3-2 Sastav reakcijske smjese za reverznu transkripciju.

komponenta	početna koncentracija	konačna koncentracija	volumen (reakcija od 50 μ l)
10x pufer	10 x	1 x	5 μ l
MgCl ₂	25 mM	5,5 mM	11 μ l
dNTP	10 mM	2 mM	10 μ l
oligo dT	50 μ M	1,25 μ M	1,25 μ l
nasumični heksameri	50 μ M	1,25 μ M	1,25 μ l
inhibitor RNaze	20 U/ μ l	20 U	1 μ l
reverzna transkriptaza	50 U/ μ l	62,5 U	1,25 μ l

Reakcija se odvija u uređaju za PCR (Applied Biosystems GeneAmp PCR System 2700, SAD) prema sljedećem programu:

25°C 10:00 min

37°C 60:00 min

95°C 5:00 min

4°C ∞

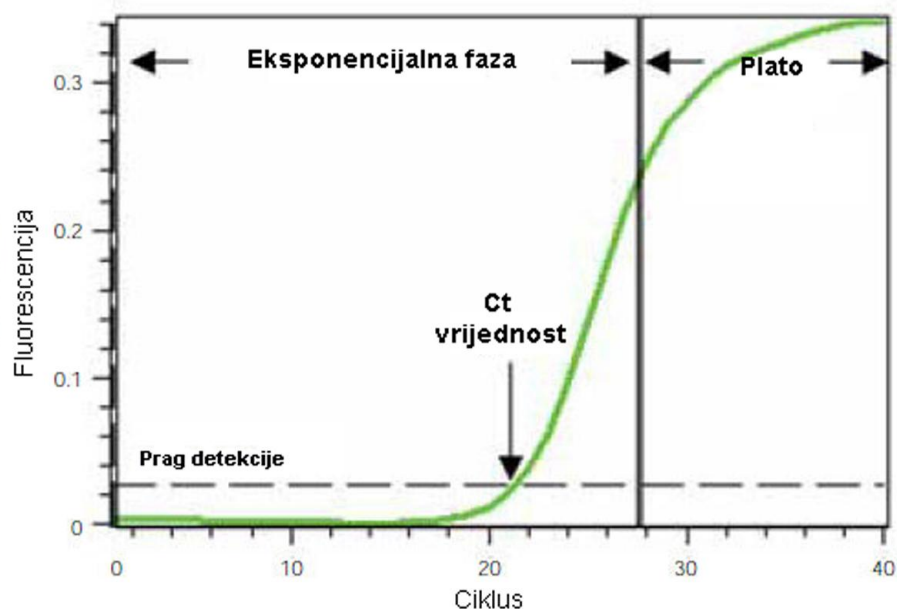
Nakon reakcije cDNA se pohranjuje na -20°C do korištenja.

3.9. Kvantitativni PCR (PCR u stvarnom vremenu)

Karakteristika kvantitativnog PCR-a je mogućnost praćenja novonastalih molekula DNA sa svakim ciklusom. Tijekom PCR reakcije svakim ciklusom eksponencijalno se povećava količina DNA u uzorku, što se prati fluorescentnom bojom SYBR Green, koja se interkalira u novostvorene lance DNA. Fluorescencija se povećava svakim ciklusom, a ciklus u kojem ima dovoljno DNA da bi fluorescencija porasla iznad praga detekcije naziva se vrijednost Ct (Slika 3.3). Što neke DNA u uzorku ima više, ranije će se umnožiti dovoljno da prijeđe prag detekcije, odnosno vrijednost Ct će biti manja, dok će uzorak s manje DNA imati veću vrijednost Ct.

Eventualne razlike u početnoj koncentraciji uzorka ispravljaju se pomoću tzv. referentnog gena (engl. *housekeeping gene*), koji služi kao kontrola jer je njegova ekspresija stabilna i u svim tkivima ga u bilo kojem trenutku ima jednaka količina. Sve vrijednosti Ct normaliziraju se prema vrijednosti referentnog gena. Za usporedbu razina ekspresije gena između dvije stanične linije, ekspresija gena izražena je kao promjena ekspresije u odnosu na referentni gen, i izračunata kao $2^{-\Delta Ct}$, gdje je ΔCt razlika u ekspresiji (Ct [ciljni gen] – Ct [referentni gen]). Za izračunavanje razlike u ekspresiji gena između tretiranih i netretiranih uzoraka korištena je formula $2^{-\Delta\Delta Ct}$, gdje je $\Delta\Delta Ct$ razlika između ΔCt tretiranog uzorka i ΔCt netretiranog uzorka.

Kvantitativni PCR se radi u posebnim optičkim mikroepruvetama ili pločicama s 96 bunarića da bi se mogla očitavati fluorescencija na određenom uređaju.



Slika 3.3 Izgled krivulje fluorescencije kod kvantitativnog PCR-a. Vrijednost fluorescencije eksponencijalno raste sa svakim ciklusom, dok ne dosegne plato, gdje dolazi do zasićenja reakcije. Ct vrijednost označava broj ciklusa u kojem vrijednost fluorescencije prelazi prag detekcije. Shema preuzeta i prilagođena s www.bio-rad.com.

Za detekciju bazalne ekspresije gena koji kodiraju za komponente signalnog puta Hh-Gli, analizirano je 8 gena: *SHH*, *PTCH1*, *SMO*, *SUFU*, *GSK3 β* , *GLI1*, *GLI2* i *GLI3* te referentni gen *RPLP0*. Za analizu aktivacije i inhibicije signalnog puta analizirala se ekspresija gena koji su markeri aktivnosti puta *GLI1* i *PTCH1* te referentni gen *RPLP0*. Reakcijska smjesa se radi za svaki gen posebno. U smjesu se dodaje SsoFast™ EvaGreen supermix 2x (50% v/v, Bio-Rad, SAD), početnica F (0,3 mM), početnica R (0,3 mM) te voda do ukpnog volumena 9 μ l po uzorku. Kvantitativni PCR se izvodi minimalno u duplikatu za svaki uzorak, a za reakcijsku mješavinu za svaki gen radi se i jedna dodatna negativna kontrola, u koju se ne stavlja uzorak. Nukleotidne sekvence korištenih početnica navedene su u Tablici 3-3. Korištene su optičke mikroepruvete i pločice s 96 bunarića proizvođača Bio-Rad, SAD, a reakcija se

odvijala u aparatu za kvantitativni PCR Bio-Rad CFX96 (Bio-Rad, SAD). Reakcija se odvijala prema sljedećim uvjetima: 95°C 30 s, zatim 40 ciklusa (95°C 5 s, 61°C 5 s) te je na kraju analizirana krivulja mekšanja od 70 do 95°C.

Tablica 3-3 Slijedovi početnica korišteni za kvantitativni PCR. Oznaka F označava „forward“ odnosno 5'→3' smjer sekvence gena, dok su R „reverse“, odnosno u 3'→5' smjeru.

naziv početnice	nukleotidni slijed	referenca
<i>RPLP0 F</i>	5' GGCACCATTGAAATCCTGAGTGATGTG 3'	(Eichberger i sur., 2004)
<i>RPLP0 R</i>	5' TTGCGGACACCCTCCAGGAAGC 3'	
<i>SHH F</i>	5' GAAAGCAGAGAACTCGGTGG 3'	(Kallassy i sur., 1997)
<i>SHH R</i>	5' GGTAAGTGAGGAAGTCGCTG 3'	
<i>PTCH1 F</i>	5' TCCTCGTGTGCGCTGTCTTCCTTC 3'	(Regl i sur., 2002)
<i>PTCH1 R</i>	5' CGTCAGAAAGGCCAAAGCAACGTGA 3'	
<i>SMO F</i>	5' CTGGTACGAGGACGTGGAGG 3'	(Kallassy i sur., 1997)
<i>SMO R</i>	5' AGGGTGAAGAGCGTGCAGAG 3'	
<i>SUFU F</i>	5' AACAGCAAACCTGTCCTTCC 3'	(Koch i sur., 2004)
<i>SUFU R</i>	5' TCAGATGTACGCTCTCAAGC 3'	
<i>GSK3B F</i>	5'-GGAGAACTGGTCGCCATCAAG-3'	(Pandey i sur., 2009)
<i>GSK3B R</i>	5'-ACATTGGGTTCTCCTCGGACC-3'	
<i>GLI1 F</i>	5' GCCGTGTAAAGCTCCAGTGAACACA 3'	(Regl i sur., 2002)
<i>GLI1 R</i>	5' TCCCACTTTGAGAGGCCCATAGCAAG 3'	
<i>GLI2 F</i>	5'-GCCATCAAGACCGAGAGCTC-3'	(Tojo i sur., 2003)
<i>GLI2 R</i>	5'-CGGCCCATGAGCAGGAATCC-3'	
<i>GLI3 F</i>	5'-CACTACCTCAAAGCGGGAAG-3'	(Sacedón i sur., 2003)
<i>GLI3 R</i>	5'-TGTTGGACTGTGTGCCATTT-3'	

3.10. Izdvajanje proteina iz stanica

Proteini se iz stanica izdvajaju koristeći pufer za lizu, koji se sastoji od RIPA pufera (25 mM Tris-HCl, 1% Na-deoksiholat, 1% Nonidet P-40, 150 mM NaCl, 0,1% SDS) i inhibitora proteaza, uz sonifikaciju. Inhibitori se dodaju u obliku tablete (Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail Tablets, Roche, Švicarska), jedna tableta na 10 ml RIPA pufera. Stanice se sakupe na isti način kao i kod izdvajanja RNA i cijelo vrijeme se drže na ledu: ukloni se medij, doda se 1 ml PBS-a bez Ca i Mg i stanice se sastružu s podloge. Suspenziju stanica u PBS-u se tada centrifugira pri 3000 x g tijekom 5 min u centrifugi ohlađenoj na +4°C. Supernatant se odlije, a talog stanica resuspendira se u 50 µl pufera za lizu i stavi u posudu s ledom te sonificira dva puta po 15 sekundi pomoću sonifikatora Labsonic M (Sartorius, Njemačka). Uzorak se nakon toga centrifugira pri 16000 x g tijekom 20 minuta u centrifugi ohlađenoj na +4°C. Nakon centrifugiranja se supernatant s izdvojenim proteinima sakupi i prebaci u čistu mikroeprevetu. Proteini se pohranjuju u frižider na -80°C.

Kada se žele analizirati fosforilirani proteini u pufer za lizu se uz inhibitore proteaza dodaju i inhibitori fosfataza (PhosSTOP – Phosphatase Inhibitor Cocktail Tablets, Roche, Švicarska), koje sprječavaju otklanjanje fosfatnih skupina. Daljnji postupak je isti.

Za pokus ko-imunoprecipitacije potrebna je velika količina proteina, a također je bitno očuvati interakcije među proteinima. Zato se proteini izoliraju iz stanica koje su rasle u dvije petrijevke promjera 10 cm. Stanice se u 5 ml PBS-u sastružu s podloge, skupe u epruvetu i centrifugiraju pri 3000 x g 5 min u centrifugi ohlađenoj na +4°C. Talog se resuspendira u 150 µl blagog pufera za lizu, TENN (50 mM Tris pH 7,4, 5 mM EDTA, 150 mM NaCl, 0,5% (v/v) Nonidet P-40, inhibitori proteaza), koji omogućava očuvanje interakcija među proteinima. Uzorak se sonificira dva puta po 10 sekundi. Daljnji postupak izdvajanja je isti.

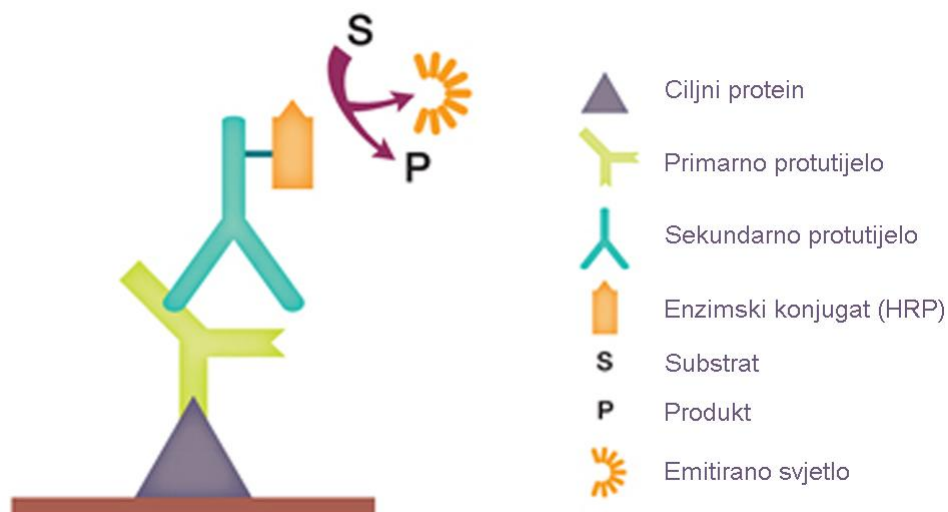
3.10.1. Mjerenje koncentracije proteina

Koncentracija proteina određuje se metodom po Bradfordu, koristeći komercijalnu otopinu (Bio-Rad Protein Assay, Bio-Rad, SAD). Mjerenje se zasniva na svojstvu boje Coomassie Brilliant Blue da promijeni boju prilikom vezanja na bazične i aromatične aminokiseline u

proteinima. Nakon vezanja na proteine dolazi do promjene u apsorbanciji boje sa 465 nm na 595 nm, što se jednostavno detektira spektrofotometrijskim mjerenjem. Usporedbom vrijednosti apsorbancije sa standardnom krivuljom poznatih koncentracija jednostavno se može odrediti koncentracija proteina. Prvo se napravi niz serijskih razrjeđenja poznatog standarda proteina, 2,5 mg/ml BSA (goveđi albumin iz seruma). Razrjeđenja se rade u konačnom volumenu od 50 μ l, redom: 0 mg/ml, 0,05 mg/ml, 0,1 mg/ml, 0,15 mg/ml, 0,2 mg/ml i 0,25 mg/ml. Također se pripreme razrjeđenja proteina koji se mjere (5 μ l proteina + 45 μ l vode). Zatim se napravi radna otopina za bojanje, na način da se otopina Bio-Rad Protein Assay razrijedi pet puta s destiliranom vodom. Radna otopina se nanese u pločicu s 96 bunarića, za svaki uzorak koji se mjeri po dva bunarića, i po dva bunarića za svaki u nizu serijskih razrjeđenja, po 190 μ l po bunariću. Iz svakog razrjeđenja standarda i uzoraka uzima se po 10 μ l i nanosi u 190 μ l radne otopine. Pločica se tada stavi na tresilicu da se otopine dobro pomiješaju, 10 minuta. Očitavanje apsorbancije pri 595 nm se radi na čitaču za pločice (Labsystems Multiskan MS, Finska). Dobivene vrijednosti se unesu u računalo, prema vrijednostima standarda nacrtana se standardna krivulja na temelju koje određujemo koncentraciju proteina u uzorcima.

3.11. Western blot

Western blotom se detektiraju proteini u određenom uzorku pomoću specifičnih protutijela. Daje nam informaciju o tome je li protein i u kojoj mjeri eksprimiran (Slika 3.4).



Slika 3.4 Princip detekcije proteina protutijelima u Western analizi. Na protein vezan na membrani veže se primarno protutijelo specifično za taj protein. Na primarno protutijelo veže se sekundarno protutijelo specifično za Fab fragment primarnog protutijela. Sekundarno protutijelo konjugirano je s peroksidazom, koja djeluje na kemiluminiscentni reagens (substrat) te on počinje svijetliti. Slika preuzeta o prilagođena s www.bio-rad.com.

Prvi korak kod Western blot analize je razdvajanje proteina na SDS-poliakrilamidnom (PAA) gelu. Gel se izlijeva između vertikalnih stakalaca, u dva koraka. Prvo se izlijeva gel za razdvajanje. Gel za razdvajanje može biti različitih gustoća, ovisno o molekularnoj masi proteina koji se želi detektirati. Gušći gelovi imaju manje pore te se u njima bolje razdvajaju manji proteini, dok rjeđi gelovi imaju veće pore i bolji su za razdvajanje proteina većih molekularnih masa. Veličina pora određena je udjelom akrilamida u gelu, više akrilamida dati će manje pore. Sastav gela je sljedeći: voda, 30%-tna akrilamidna mješavina, 1,5 M Tris-HCl pH 8,8, SDS, 10%-tni amonij-persulfat (APS) i TEMED. APS i TEMED se dodaju neposredno prije izlijevanja gela među stakla. Gel za razdvajanje napuni se do otprilike $\frac{3}{4}$ stakala, jer

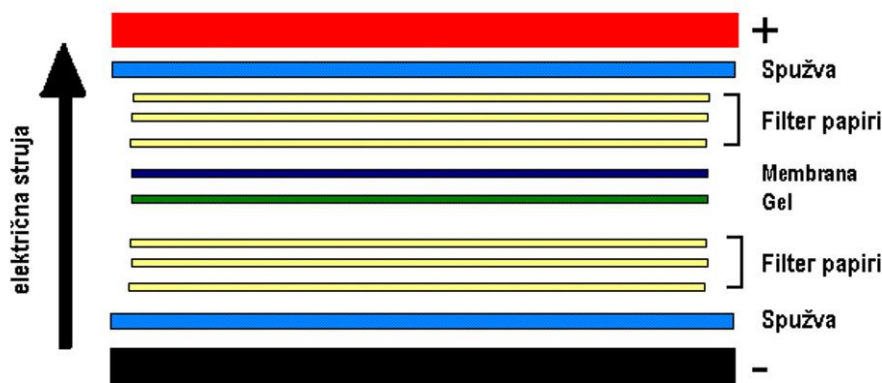
treba ostaviti dovoljno mjesta za gel za sabijanje. Gel se nadsvodi s izopropanolom i ostavi da polimerizira otprilike pola sata. Sastav gela za sabijanje je sljedeći: voda 68%, 30%-tna akrilamidna mješavina 17%, 1 M Tris-HCl pH 6,8 12,5%, SDS 0,1%, 10%-tni amonij-persulfat 1%, TEMED 0,01%. Isto kao i s gelom za razdvajanje, u gel za sabijanje se amonij-persulfat i TEMED dodaju neposredno prije izlijevanja. Prije izlijevanja gela za sabijanje treba ukloniti izopropanol. Gel za sabijanje se nalijeva do vrha stakala, i onda se umeće češljic pomoću kojeg se formiraju jažice, pazeći da ne ostanu mjehurići zraka. Gel za sabijanje također polimerizira oko pola sata.

50 µg proteina se odpipetira u čistu mikropruvetu i u njega se doda jedna četvrtina konačnog volumena 4x pufera za nanošenje (pufer LB, sastav: 0,2 M Tris-HCl pH 6,8, 0,4 M DTT, 8% SDS, 40% glicerol, 0,001% bromfenol blue). Uzorak pomiješan s puferom LB se zagrije tijekom 5 minuta na 95°C i centrifugira 1 minutu pri 16 000 x g. Tako denaturirani uzorci spremni su za nanošenje na gel.

Nakon što je gel polimerizirao, izvade se češljici i stakla s gelom se postave u sustav za vertikalnu elektroforezu Mini-Protean III (Bio-Rad, SAD) s puferom za elektroforezu (1 M glicin, 50 mM Tris, 1% SDS). Tada se u jažice nanese proteinski marker BioRad Precision Plus Protein Dual Color Standard (Bio-Rad, SAD) i redom uzorci. Elektroforeza se odvija pri konstantnom naponu otprilike 2,5 h pri 100 V.

Kada je fronta boje iz pufera LB stigla do donjeg ruba gela, elektroforeza se zaustavlja. Nakon elektroforeze razdvojeni proteini se s gela prenose na nitroceluloznu membranu (Protran BA83, GE Healthcare, UK, veličina pora 0,2 µm). Za prijenos se slaže tzv. sendvič u plastičnom nosaču koji se sastoji od: spužvice, dva komada filterpapira, nitrocelulozne membrane, gela, dva komada filter papira i spužvice. Bitno je paziti na orijentaciju membrane i gela u nosaču, odnosno da membrana bude okrenuta prema anodi (+) (Slika 3.5). Kada je „sendvič“ složen, nosač se postavi u sustav za prijenos na membranu Mini-PROTEAN III (Bio-Rad, SAD) u pufer za prijenos (200 mM Tris, 1,5 M glicin, svježe se dodaje još 10-20% metanola). Uvjeti prijenosa ovise molekularnoj masi proteina od interesa. Uobičajeno se prijenos odvija pri

konstantnoj jakosti struje od 200 mA, tijekom 1 sata. Međutim za proteine većih molekulskih masa prijenos se odvija pri 100 V do 80 minuta.



Slika 3.5 Slaganje slojeva „sendviča“ za prijenos na membranu. Strelica označava smjer putovanja proteina (koji su negativno nabijeni) prema pozitivnoj elektrodi. Slika preuzeta i prilagođena s <http://en.wikipedia.org/wiki/Electroblotting>.

Nakon što prijenos završi, membrana se izvadi u kadu za bojanje. Membrana se oboji bojom Naphtol Blue (10% metanol, 2% octena kiselina, 0,1% Naphtol Blue Black) nekoliko sekundi, a zatim se membrana odbojava otopinom za odbojavanje (50% metanol, 7% octena kiselina u vodi) dok sama membrana ne bude bijela, a pruge proteina ostanu plave. Na taj način se može provjeriti količina nanesenih proteina prije detekcije protutijelima, te se također proteini malo bolje fiksiraju na membrani. Nakon odbojavanja, membrana se ispiru u puferu TBST (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 0.05% (v/v) Tween 20, pH 7,5) na tresilici. Prema proteinskom markeru membrana se može izrezati na trakice te se na taj način na istoj membrani u isto vrijeme može detektirati više proteina različitih veličina. Membrane se blokiraju u 5% otopini mlijeka u prahu u puferu TBST pola sata na sobnoj temperaturi na tresilici. Primarna protutijela razrjeđuju se u 5% mlijeku u puferu TBST kako je navedeno u Tablici 3-4. Kao kontrola količine nanesenih proteina koristi se aktin. Nakon blokiranja, trakice membrana se upakiraju u plastičnu foliju s otopinom primarnih protutijela, paketići

se zavare kako tekućina ne bi iscurila, te se inkubiraju preko noći na +4°C na njihalici kako bi se protutijela cijelo vrijeme miješala.

Tablica 3-4 Protutijela korištena za Western blot analizu. Sekundarna protutijela su konjugirana s peroksidazom (HRP). pPt = poliklonalno protutijelo, mPt = monoklonalno protutijelo.

primarno protutijelo	razrjeđenje	sekundarno protutijelo	razrjeđenje
Aktin kozje pPt (Santa Cruz, SAD, sc-1616)	1:500	protu-kozji IgG-HRP (Santa Cruz, SAD, sc-2350)	1:3000
Gli2 kozje pPt (Santa Cruz, SAD, sc-20290)	1:250		
Gli3 kozje pPt (R&D Systems, SAD, AF3690)	1:500		
GSK3β mišje mPt (Cell Signaling, SAD, #9832)	1:1000	protu-mišji IgG-HRP (Santa Cruz, SAD, sc-2371)	1:2000
PARP mišje mPt (BD Pharmingen, SAD, 556362)	1:2000		
kaspaza-3 mišje mPt (Santa Cruz, SAD, sc-7272)	1:200		
Shh zečje pPt (Santa Cruz, SAD, sc-9024)	1:250	protu-zečji IgG-HRP (Cell Signaling, SAD, #7074)	1:2000
Ptch1 zečje pPt (Proteintech, SAD, 17520-1-AP)	1:600		
Smo zečje pPt (Santa Cruz, SAD, sc-13934)	1:250		
SuFu zečje mPt (Cell Signaling, SAD, #2520)	1:1000		
Gli1 zečje pPt (Proteintech, SAD, 25733-1-AP)	1:250		
Gli3 zečje pPt (Santa Cruz, SAD, sc-20688)	1:250		
Gli3 zečje pPt (Proteintech, SAD, 19949-1-AP)	1:600		
phospho-Ser9 GSK3β zečje mPt (Cell Signaling, SAD, #5558)	1:1000		
MAP LC3α/β zečje pPt (Santa Cruz, SAD, sc-292354)	1:250		

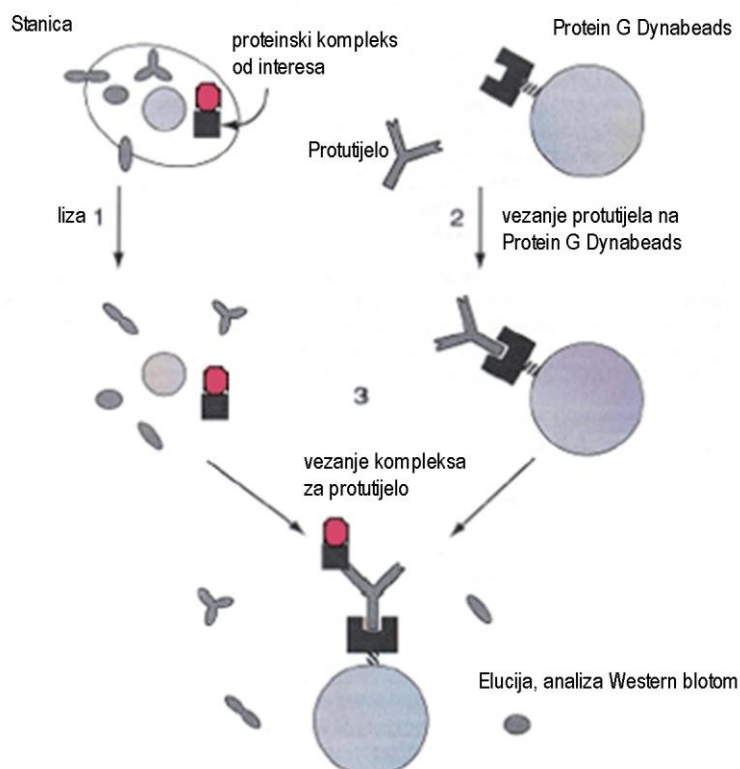
Sljedeći dan membrane se ispiru 3x5 minuta u puferu TBST. Zatim se napravi otopina sekundarnih protutijela odgovarajućih razrjeđenja u 5% otopini mlijeka u TBST-u (Tablica 3-4). Membrane se inkubiraju u otopini sekundarnih protutijela tijekom sat vremena na sobnoj temperaturi na njihalici. Nakon inkubacije membrane se ispiru u puferu TBST 3x5 minuta.

Za detekciju signala koristi se kombinacija kemiluminiscentnih reagensa SuperSignal West PICO i SuperSignal West FEMTO (Thermo Scientific, SAD), koji se međusobno miješaju u omjeru 3:1. Membrane se poslože u suhu kadnicu te se na njih nakapa kemiluminiscentni reagens i inkubira tijekom 5 minuta. Nakon toga membrane se prenesu na otklopljenu prozirnu foliju, odstrani se višak kemiluminiscentnog reagensa pomoću papirnatog ubrusa i membrane se prekriju prozirnom folijom kako bi zadržale vlagu. Membrane u foliji stave se u aparat za slikanje Alliance 4.7 (UVITEC Cambridge, UK). Duljina ekspozicije ovisi o jačini signala te može biti od nekoliko sekundi do 5 minuta.

3.12. Ko-imunoprecipitacija

Ko-imunoprecipitacija je metoda koja omogućava analizu interakcija među pojedinim proteinima pomoću specifičnih protutijela vezanih za magnetne kuglice. Proteini se u tu svrhu izoliraju iz većeg broja stanica u blagim uvjetima kako se ne bi narušile proteinske interakcije. Postupak izdvajanja proteina za ko-imunoprecipitaciju te mjerenje njihove koncentracije opisano je u poglavlju 3.10. Kada se izračuna koncentracija proteina za reakciju ko-imunoprecipitacije se odvoji 800 µg – 1 mg proteina (za svaki uzorak ista količina), te se za svaki uzorak odvoji još 50 µg proteina za Western analizu ukupnih proteina stavljenih u reakciju ko-imunoprecipitacije, koji se pripremaju kako je opisano u poglavlju 3.11.

Za ko-imunoprecipitaciju koriste se magnetne kuglice Dynabeads obložene proteinom G (Life Technologies, SAD), koji omogućava vezanje protutijela preko Fc domene, te magnet DynaMag (Life Technologies, SAD). Shema postupka prikazana je na Slici 3.6.



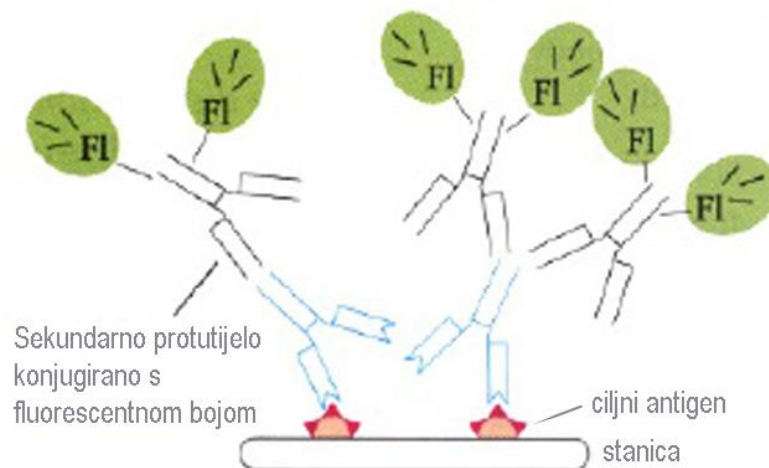
Slika 3.6 Princip ko-immunoprecipitacije. Slika preuzeta i prilagođena s www.molecularsciences.org.

Po uzorku se koristi 50 μl otopine magnetnih kuglica koje se prebace u mikropruvetu od 1,5 ml. Mikropruveta se postavi na magnet koji na sebe privuče magnetne kuglice, koje se sada nalaze prilijepljene za stijenku mikropruvete te to dozvoljava uklanjanje supernatanta. Magnetne kuglice se nakon toga isperu u 200 μl pufera Wash & Bind (0,1 M natrij fosfat, 0,01% (v/v) Tween20, pH 9) te se nakon toga inkubiraju na roteksu s otopinom protutijela odgovarajuće koncentracije u puferu Wash & Bind, 20 minuta na sobnoj temperaturi. Za ko-immunoprecipitaciju Gli3 korišteno je 4 μg Gli3 protutijela (kozje, R&D Systems, SAD, AF3690) po uzorku, a za SuFu i GSK3 β ko-immunoprecipitaciju korištena su protutijela SuFu (zečje, Cell Signaling, SAD, #2520) i GSK3 β (mišje, Cell Signaling, SAD, #9832), oba razrijeđena 1:25. Nakon inkubacije mikropruveta se stavi na magnet i supernatant se odstrani. Magnetne kuglice, za koje je sada vezano protutijelo, se sada ispiru 3 puta u 200 μl pufera TBST (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,05% (v/v) Tween 20, pH 7,5). Nakon zadnjeg ispiranja magnetne kuglice

se pomiješaju s prethodno određenim volumenom uzorka proteina te se inkubiraju na rotoksu u hladnoj komori na +4°C, preko noći. Tijekom tog vremena, za specifična protutijela vezao se ciljani protein, koji za sebe veže proteine interaktore. Kompleks se ispiri 3 puta u 200 µl pufera TBST. Prije elucije, kompleks se resuspendira u 100 µl pufera TBST i prenese u čistu mikroeprijetu, kako se ne bi eluirali i proteini nespecifično vezani za stijenku mikroeprijetu. Kada se kompleks prebaci u čistu mikroeprijetu, supernatant se odstrani, dodaje se 20 µl 1X pufera LB (0,05 M Tris-HCl pH 6,8, 0,1 M DTT, 2% SDS, 10% glicerol, 0,00025% bromfenol blue) te se uzorci zagriju na 70°C tijekom 10 minuta, što omogućava eluciju ko-imunoprecipitiranog kompleksa proteina. Nakon elucije, pomoću magnetna se odvoje sada prazne kuglice, a supernatant, koji sadrži kompleks proteina prenese se u čistu mikroeprijetu. Za svaki set uzoraka analizira se i negativna kontrola, što su magnetne kuglice bez vezanih protutijela. Daljnji protokol isti je kao i za standardne uzorke te nam ova kontrola daje uvid u eventualno nespecifično vezanje proteina na magnetne kuglice. Nakon elucije, uzorak je spreman za analizu Western blotom. Uz ko-imunoprecipitirane uzorke analiziraju se i prethodno pripremljeni uzorci ukupnih proteina s kojima se išlo u reakciju, koji služe kao kontrola da je u uzorku bio prisutan protein od interesa. Metodom Western blota analizira se protein koji je bio ciljani protein korištenog protutijela kao kontrola da je reakcija bila uspješna te protein za kojeg se želi ispitati veže li se za ciljani protein.

3.13. *Imunofluorescentno bojanje stanica*

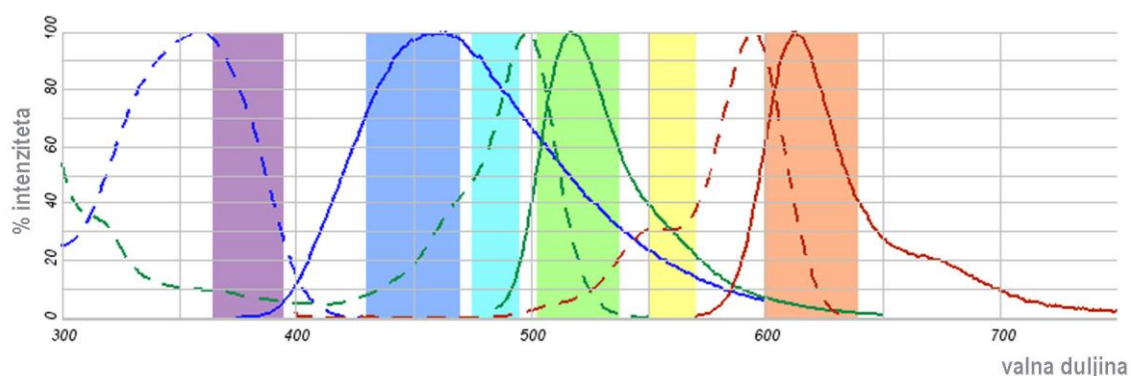
Imunofluorescentno bojanje je metoda koja se bazira na detekciji proteina od interesa specifičnim protutijelom u stanici, a signal se detektira pomoću fluorescentno obilježenog sekundarnog protutijela (Slika 3.7). Fluorescentne boje omogućuju istovremenu detekciju više proteina u stanici, na način da se svaki od njih detektira protutijelom druge boje.



Slika 3.7 Princip imunofluorescentnog bojanja protutijelima. Na protein u stanici veže se primarno protutijelo specifično za taj protein. Na primarno protutijelo veže se sekundarno protutijelo specifično za Fab fragment primarnog protutijela. Sekundarno protutijelo konjugirano je sa fluorescentnom bojom koja fluorescira kada se pobudi određenom valnom duljinom. Slika preuzeta i prilagođena s <http://biosiva.50webs.org>.

Na Slici 3.8 prikazani su emisijski i apsorpcijski spektri korištenih fluorofoora, DAPI (plavo), fluorescein (zeleno) i Texas Red (crveno). Idealno bi bilo da se spektri ne preklapaju, međutim zbog širokog emisijskog spektra boje DAPI, ona djelomično pobuđuje fluorescein. Zbog toga je ključno svaki od fluorofoora snimati kao odvojeni kanal, te naknadno preklopiti dobivene slike.

Da bi se stanice mogle promatrati pod mikroskopom prvo ih je potrebno uzgojiti na staklenim pokrovnicama. Za rukovanje pokrovnicama koristi se sterilna pinceta finog vrha. Pokrovnice se prvo isperu u 70% alkoholu i provuku kroz plamen kako bi se sterilizirale te isperu u sterilnom PBS-u bez Ca i Mg. Pokrovnice se stave u pločicu sa 6 bunarića u koje se onda nasadi odgovarajući broj stanica, kako je opisano u poglavlju 3.2.2. Stanice se ostave u inkubatoru tijekom 24 sata da bi se prilijepile za podlogu.



Slika 3.8 Prikaz ekscitacijskih (crtkane linije) i emisijskih (pune linije) spektara za DAPI (plavo), fluorescein (FITC, zeleno) i Texas Red (crveno). Fluorescein i Texas Red se minimalno preklapaju, dok se emisijski spektar boje DAPI djelomično preklapa sa ekscitacijskim spektrom fluoresceina. Slika preuzeta i prilagođena s <http://physwiki.apps01.yorku.ca>.

Sljedeći dan stanicama se mijenja medij i dodaju odgovarajući tretmani, odnosno 20 i 30 mM LiCl te se inkubiraju tijekom 16 sati. Nakon isteka vremena tretmana stanice se prvo dobro isperu PBS-om bez Ca i Mg, na način da se prvo sa njih pipetom ukloni medij, doda se 2-3 ml PBS-a bez Ca i Mg u svaki bunarić, pločica se kratko proljulja i pipetom se izvadi PBS. Takvo ispiranje ponavlja se tri puta, nakon čega se stanice fiksiraju 3,6%-tnom (v/v) otopinom paraformaldehida, te se inkubiraju 15 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon toga se stanice ponovno ispiru PBS-om bez Ca i Mg tri puta, te se na njih dodaje metanol i ostavi 15 minuta na sobnoj temperaturi, što služi za permeabilizaciju stanica. Slijedi ispiranje u PBS-u bez Ca i Mg tri puta, nakon čega se na stanice stavlja u prethodno zagrijani (85°C) pufer za renaturaciju proteina (10mM Natrij-citrat, 0,05% Tween 20, pH 6,0). Pločica s puferom se inkubira u hibridizacijskoj pećnici 10 minuta na 85°C, nakon čega se izvadi na sobnu temperaturu gdje se hladi sljedećih 20 minuta. Nakon što se otopina ohladila, pokrovnica se kratko ispere u PBS-u bez Ca i Mg. Pripremi se parafilm na ravnoj podlozi na koji se nakapa, onoliko razdvojenih kapljica koliko ima pokrovnica, otopine koja sprječava nespecifično vezanje protutijela (Protein Block, Dako, Danska). Pokrovnica se pincetom s finim vrhom izvadi iz bunarića i stranom na kojoj su prilijepljene stanice se okrene u jednu od kapljica. Na taj način otopina se ravnomjerno rasporedi po cijelom stakalcu. Inkubacija u otopini koja

sprječava nespecifično vezanje traje 30 minuta na sobnoj temperaturi. Tijekom tog vremena pripreme se otopine primarnih protutijela u 2% (w/v) BSA u PBS-u (Tablica 3-5). Otopine protutijela se na isti način kao i Protein Block nakapaju na parafilm (50 µl po pokrovnici). Po isteku vremena se s pokrovnica filter-papirom (uz rubove) pokupi višak Protein Blocka te se pokrovnice sa stranom na kojoj su prihvaćene stanice okrenu u kapljicu otopine protutijela. Inkubacija primarnim protutijelom odvija se preko noći na +4°C.

Tablica 3-5 Popis protutijela korištenih za imunofluorescentno bojanje. Sva navedena protutijela su poliklonalna. Sekundarna protutijela su konjugirana sa fluorescentnim bojama Texas Red (TR) ili fluorescein (FITC). pPt = poliklonalno protutijelo, mPt = monoklonalno protutijelo.

primarno protutijelo	razrjeđenje	sekundarno protutijelo	razrjeđenje
Gli3 kozje pPt (R&D Systems, SAD, AF3690)	10 µg/ml	protu-kozji IgG-TR (Santa Cruz, SAD, sc-2783)	1:100
GSK3β mišje mPt (Cell Signaling, SAD, #9832)	1:150	protu-mišji IgG-FITC (Santa Cruz, SAD, sc-2099)	

Sljedeći dan pokrovnice se prvo prenesu u odgovarajuće bunariće u pločici sa 6 bunarića i ispiru tri puta po 5 minuta u PBS-u bez Ca i Mg. Pritom se pripremi otopina fluorescentno obilježenih sekundarnih protutijela u 2% BSA/PBS (Tablica 3-5). Pokrovnice se na isti način stavljaju u sekundarno protutijelo kao i u primarno. Inkubacija sekundarnim protutijelom odvija se na sobnoj temperaturi tijekom sat vremena, u mraku. Na kraju se pokrovnice opet dobro isperu, tri puta po 5 minuta u PBS-u bez Ca i Mg, također u mraku. Nakon ispiranja stanice se uklapaju u mediju za uklapanje koji sadrži DAPI (Mounting Meduim with DAPI, Life Technologies, SAD), na način da se pokrovnica izvrne u 10 µl medija za uklapanje na

predmetnom stakalcu, pazeći da ne ostanu mjehurići zraka. Medij se suši preko noći na sobnoj temperaturi, u mraku, nakon čega se rubovi pokrovnice obrube lakom. Takvi uzorci spremni su za promatranje pod mikroskopom. Slike u ovom radu snimljene su na konfokalnom mikroskopu Leica TCS SP2 AOBS (Leica Microsystems, Njemačka, Laboratorij za elektronsku mikroskopiju, Zavod za molekularnu biologiju, IRB).

3.14. Bojanje stanica bojom akridin oranž i analiza na protočnom citometru

Akridin oranž je boja koja ulazi u kisele odjeljke u stanici gdje se protonira. Pod utjecajem niskog pH akridin oranž emitira u crvenom spektru, dok pri neutralnom pH emitira u zelenom. Zbog toga se ova boja između ostalog koristi i u detekciji kiselih vezikularnih organela, koji su karakteristični za autofagiju. Na protočnom citometru očitavaju se crvena i zelena fluorescencija. Uobičajeno se broji 10 000 stanica po uzorku te se može odrediti udio stanica u kojima su detektirani kiselih vezikularni organeli koji emitiraju u crvenom spektru.

Za analizu, stanice se nasađuju u triplikatu u pločice s 12 bunarića. Nasađuje se 4×10^4 stanica po bunariću u kompletiranom mediju. Nakon 24 sata stanicama se promijeni medij i dodaju tretmani (20 mM LiCl, 30 mM LiCl i 40 mM LiCl) te se jedan triplikat ostavi bez tretmana koji služi kao kontrola. Nakon 72 sata stanicama se odstrani medij te im se dodaje medij bez seruma u koji je prethodno dodano 2 µg/ml akridin oranž boje. Inkubacija traje 30 minuta, u mraku, u inkubatoru, nakon čega se stanice isperu PBS-om bez Ca i Mg. Stanice se potom tripsiniziraju, prebace u epruvete od 5 ml za protočni citometar i centrifugiraju 5 minuta pri 3 000 x g u ohlađenoj centrifugi na +4°C. Odstrani se supernatant i talog se resuspendira u 0,5 ml PBS bez Ca i Mg u koji je dodano 2µg/ml akridin oranž boje. Epruvete se stavljaju u posudu s ledom te slijedi mjerenje na protočnom citometru (BD FACSCalibur, BD Biosciences, SAD). Analiza podataka vršena je pomoću programa FlowJo v. 7.6.5 (FlowJo, LLC, SAD).

3.15. Statistička obrada podataka

Za analizu genske ekspresije, svi su eksperimenti provedeni najmanje u duplikatu, a za svaki uzorak izračunate su srednje vrijednosti i standardna pogreška. Za analizu autofagije, odnosno analizu udjela stanica s kiselim vezikularnim organelima korištena je jednosmjerna analiza varijance (ANOVA). Za analizu razlike u kolokalizaciji crvenog i zelenog signala između tretiranih i netretiranih uzoraka na imunofluorescentnim slikama također je korištena jednosmjerna analiza varijance (ANOVA). Sve P-vrijednosti testova s dvosmjernom vjerojatnošću manje od 0,05 smatrane su statistički značajnim. Analiza je provedena u programu MedCalc za Windowse verzija 11.4.2.0 (MedCalc Software, Belgija).

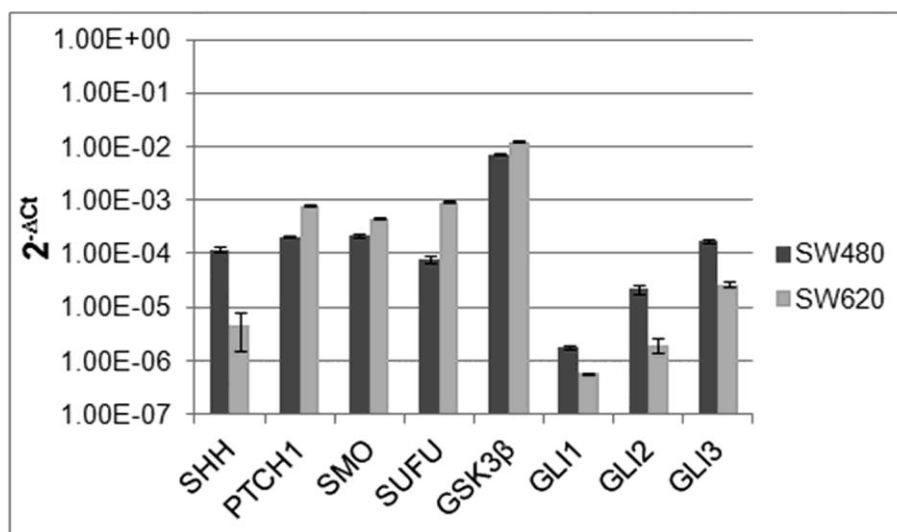
4. REZULTATI

Prethodna istraživanja u našem laboratoriju pokazala su da postoji ekspresija komponenti Hh-Gli signalnog puta u uzorcima tkiva karcinoma debelog crijeva. Najjači intenzitet imunohistokemijskog bojanja pokazivali su proteini GSK3 β i Gli3. Intenzitet bojanja za GSK3 β korelirao je sa stadijem bolesti po Dukes-u, što znači da su viši stadiji imali jače bojanje. Gli3 je pokazivao sličan trend, međutim nije bio statistički značajan ($P=0,058$) (Gojević, 2011). Pojačana ekspresija GSK3 β u višim stadijima bolesti sukladna je literaturnim navodima o njegovoj onkogenoj funkciji u stanicama karcinoma debelog crijeva. Ova istraživanja bila su povod detaljnijem istraživanju mehanizma aktivacije signalnog puta Hh-Gli u stanicama karcinoma debelog crijeva s naglaskom na ulogu protein-kinaze GSK3 β na aktivaciju kao i uloge proteina Gli3 kao mogućeg glavnog efektor signalnog puta u ovim stanicama. Istraživanje je dakle usmjereno na dio signalne kaskade Hh-Gli koja se događa u citoplazmatskom dijelu stanice, odnosno prvenstveno na odnos između GSK3 β i transkripcijskog faktora Gli3. U tu svrhu izabrane su dvije stanične linije karcinoma debelog crijeva koje su korištene kao modeli *in vitro* za temeljito ispitivanje signalnog puta Hh-Gli u stanicama karcinoma debelog crijeva.

4.1. Ekspresija komponenti signalnog puta Hh-Gli u stanicama karcinoma debelog crijeva

4.1.1. Genska ekspresija komponenti signalnog puta Hh-Gli

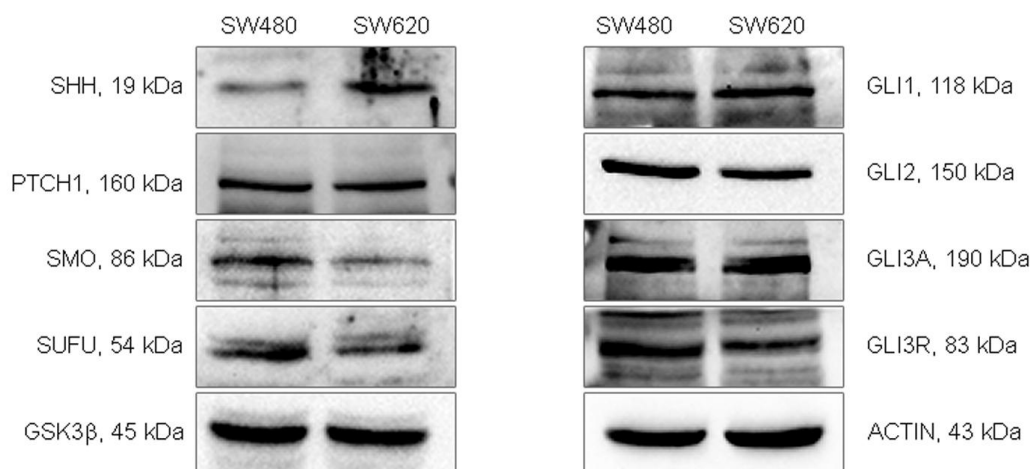
Praćena je genska ekspresija komponenti Hh-Gli signalnog puta, *SHH*, *PTCH1*, *SMO*, *SUFU*, *GSK3 β* , *GLI1*, *GLI2* i *GLI3* u staničnim linijama SW480 i SW620. Za usporedbu razine ekspresije korištene su Δ Ct vrijednosti, odnosno Ct vrijednosti za svaki gen normalizirane prema Ct vrijednosti referentnog gena, *RPLP0*. Razine ekspresije prikazane su kao $2^{-\Delta Ct}$. Pokazano je da su u obje stanične linije eksprimirani geni *SHH*, *PTCH1*, *SMO*, *SUFU*, *GSK3 β* i *GLI3*, dok su *GLI1* i *GLI2* nešto slabije eksprimirani (Slika 4.1).



Slika 4.1 Razine genske ekspresije komponenti signalnog puta Hh-Gli u staničnim linijama SW480 i SW620. Na apscisi su prikazani pojedini geni, a na ordinati je izražena razina ekspresije normalizirana prema genu *RPLP0*.

4.1.2. Ekspresija proteina signalnog puta Hh-Gli

Stanične linije SW480 i SW620 analizirane su Western blotom na prisutnost proteina signalnog puta Hh-Gli. Na proteinskoj razini detektirana je ekspresija svih komponenti signalnog puta. Vidljivo je da se u obje stanične linije eksprimira aktivni oblik liganda Shh (Shh-N, 19kDa), što ukazuje na mogućnost autokrine regulacije. U stanicama SW620 ekspresija proteina Shh je jača nego u stanicama SW480 te je sukladno tome jača i ekspresija proteina Gli1 te slabije procesiranje proteina Gli3, što se vidi po manjem udjelu oblika Gli3R u tim stanicama. U obje stanične linije ekspimirana su sva 3 proteina Gli, iako Gli3 pokazuje najjaču ekspresiju (Slika 4.2).



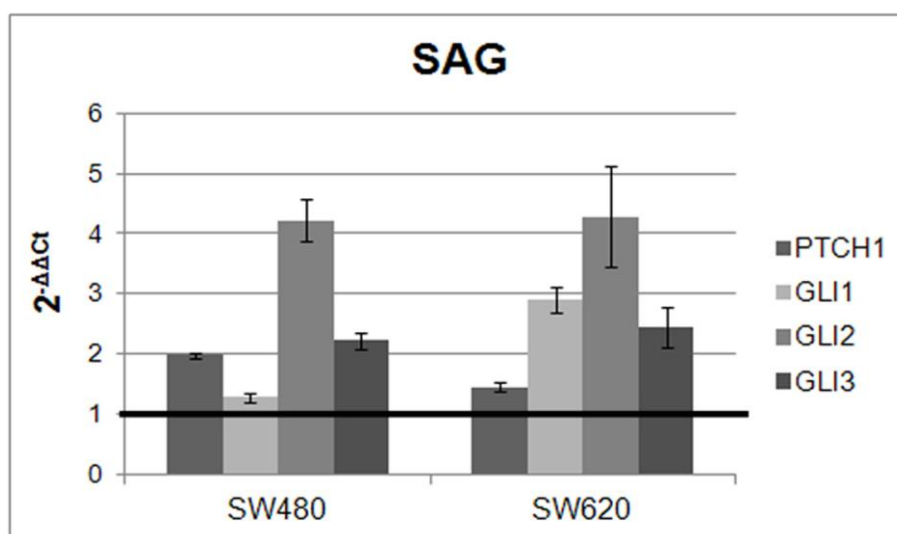
Slika 4.2 Proteinska ekspresija komponenti signalnog puta Hh-Gli u SW480 i SW620 stanicama te ekspresija aktina koji služi kao kontrola nanošenja.

4.2. Mogućnost modulacije signalnog puta specifičnim aktivatorom i inhibitorom

4.2.1. Aktivacija signalnog puta Hh-Gli

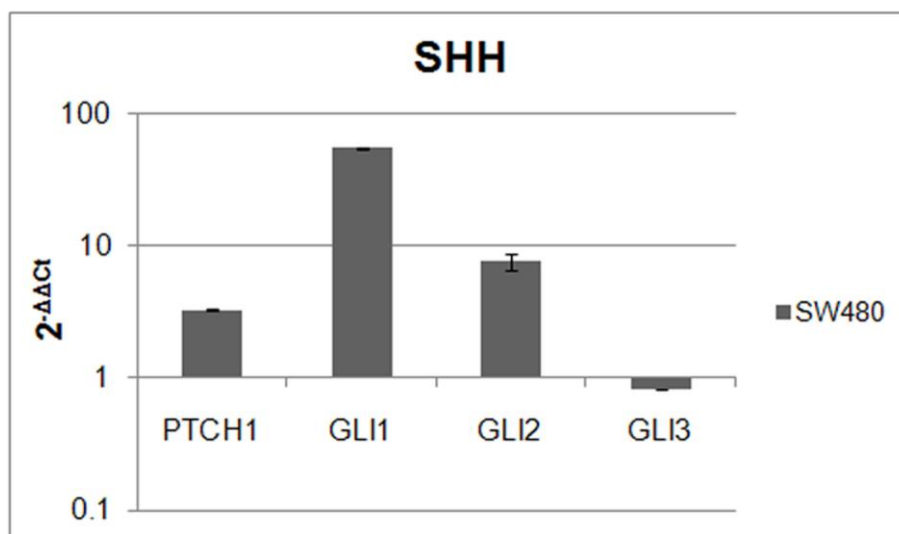
Stanične linije SW480 i SW620 tretirane su specifičnim aktivatorom signalnog puta, agonistom proteina Smo (engl. *Smoothened agonist, (SAG)*), kako bi se ispitala mogućnost dodatne stimulacije. Učinak stimulacije pratio se na razini gena čija je ekspresija kontrolirana signalnim putem, *PTCH1* i *GLI1*, a praćeni su i geni *GLI2* i *GLI3*. Za računanje ekspresije korištena je formula $FC=2^{-\Delta\Delta Ct}$, gdje je $\Delta\Delta Ct$ razlika ΔCt vrijednosti u svakom od uzoraka od ΔCt vrijednosti referentnog uzorka. Kao referentni uzorak korištene su stanice koje nisu tretirane te je njihova vrijednost prikazana kao 1.

Obje stanične linije reagirale su na stimulaciju spojem SAG povećanjem razine ekspresije *PTCH1* i *GLI1*, što ukazuje na aktivaciju puta, a također je zabilježen i porast ekspresije *GLI2* i *GLI3* (Slika 4.3).



Slika 4.3 Stimulacija signalnog puta Hh-Gli specifičnim aktivatorom SAG. Ekspresija ciljnih gena signalnog puta Hh-Gli, *PTCH1* i *GLI1* te gena *GLI2* i *GLI3* nakon 24-satne stimulacije agonistom proteina Smo (SAG) u staničnim linijama SW480 i SW620. Prikazana je relativna ekspresija u odnosu na netretirani uzorak, čija je vrijednost označena s 1, što je označeno zadebljanom crtom.

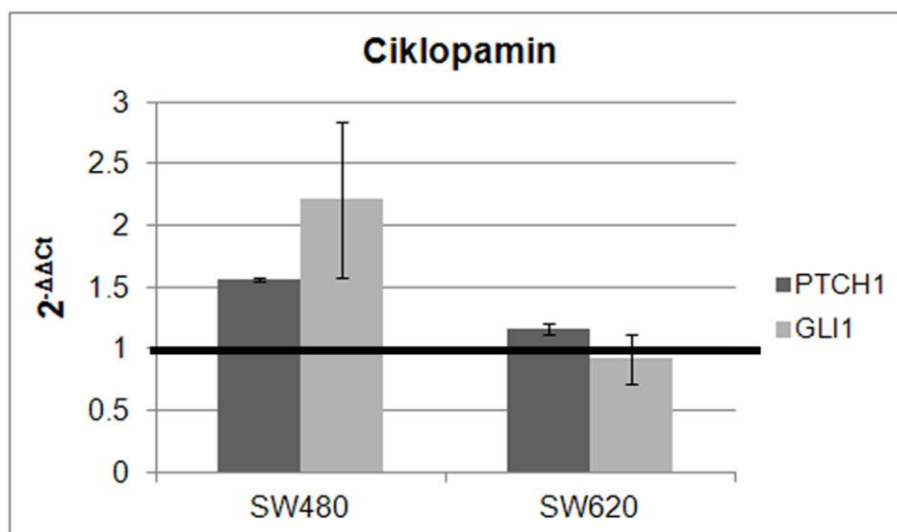
S obzirom da je u staničnoj liniji SW480 bila nešto slabija indukcija ekspresije *GLI1*, ta je linija dodatno tretirana ligandom signalnog puta, Shh, kako bi potvrdili mogućnost stimulacije signalnog puta. Tretman egzogenim proteinom Shh, potvrdio je mogućnost dodatne stimulacije signalnog puta u stanicama SW480, budući da je nakon tretmana zabilježen porast ekspresije i *PTCH1* i *GLI1*. Shh je također pojačao ekspresiju *GLI2*, ali za razliku od tretmana spojem SAG, nije imao utjecaja na ekspresiju *GLI3* (Slika 4.4).



Slika 4.4 Stimulacija signalnog puta Hh-Gli specifičnim aktivatorima. Ekspresija ciljnih gena signalnog puta Hh-Gli *PTCH1* i *GLI1* te gena *GLI2* i *GLI3* u stanicama SW480 nakon 24-satne stimulacije egzogenim proteinom Shh. Prikazana je relativna ekspresija u odnosu na netretirani uzorak čija je vrijednost 1. Vrijednosti su prikazane na logaritamskoj skali.

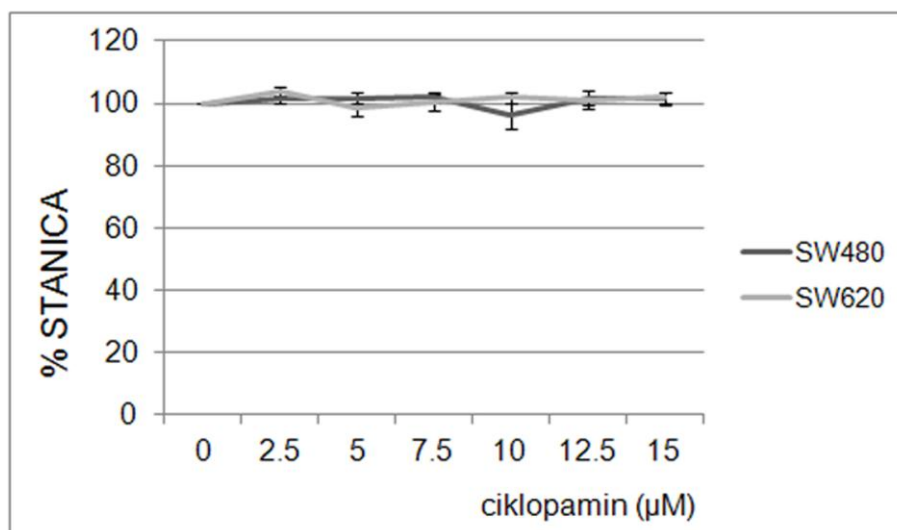
4.2.2. Inhibicija signalnog puta Hh-Gli

Ciklopamin je korišten kao inhibitor signalnog puta. Ovaj spoj blokira prijenos signala na razini proteina Smo. Stanične linije SW480 i SW620 tretirane su ciklopaminom 48h te je učinak na aktivnost signalnog puta praćena kvantitativnim PCR-om, na razini ekspresije ciljnih gena *PTCH1* i *GLI1*. Ciklopamin nije imao učinka na aktivnost signalnog puta Hh-Gli, što je vidljivo iz razina ekspresije gena *PTCH1* i *GLI1*, koje nisu snižene nakon tretmana ciklopaminom u odnosu na netretirani uzorak (Slika 4.5).



Slika 4.5 Ekspresija ciljnih gena signalnog puta Hh-Gli u staničnim linijama SW480 i SW620 nakon tretmana specifičnim inhibitorom ciklopaminom. Na apscisi su prikazane pojedine stanične linije, a na ordinati promjena ekspresije gena u odnosu na netretirani uzorak, čija je vrijednost 1 i označena je zadebljalom crtom.

Utjecaj ciklopamina praćen je i na razini proliferacije stanica. Stanice su tetirane nizom koncentracija ciklopamina nakon čega je praćena njihova proliferacija testom MTT nakon 72 sata. Kada ciklopamin djeluje inhibitorno na signalni put Hh-Gli, dolazi do smanjene proliferacije stanica. Ciklopamin nije imao učinka na razinu proliferacije ni stanične linije SW480 niti SW620 (Slika 4.6), što je u skladu s prethodnim rezultatom koji je pokazao da niti ne djeluje na aktivnost signalnog puta Hh-Gli.



Slika 4.6 Utjecaj rastućih koncentracija ciklopamina, inhibitora signalnog puta Hh-Gli, na proliferaciju staničnih linija SW480 i SW620. Na apscisi su izražene koncentracije ciklopamina, dok je na ordinati izražen postotak rasta stanica.

Ciklopamin se pokazao neučinkovitim u inhibiciji signalnog puta Hh-Gli u staničnim linijama SW480 i SW620 te nema učinka na njihovu proliferaciju, što ukazuje na mogućnost kontinuirane aktivacije signalnog puta Hh-Gli nizvodno od koreceptora Smo, što bi imalo poništavajući efekt na ciklopamin.

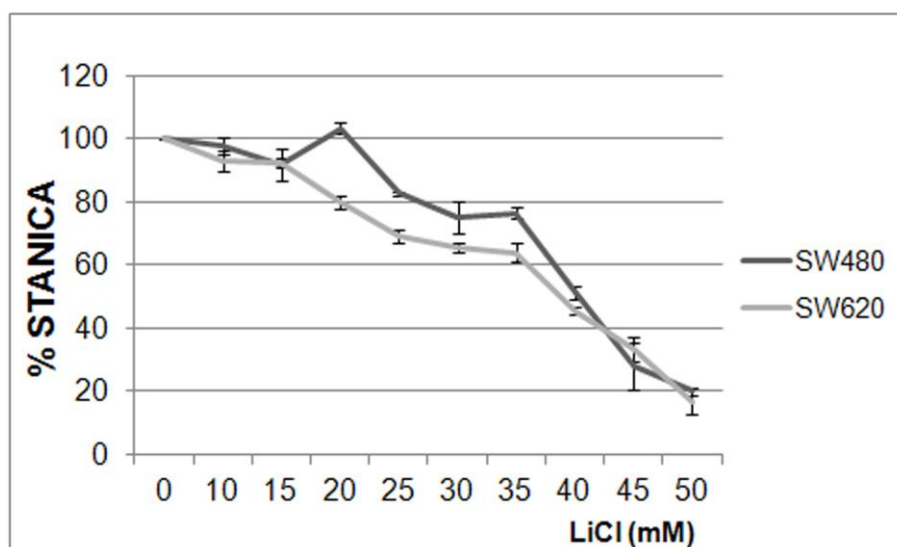
4.3. Inhibicija GSK3β smanjuje proliferaciju stanica karcinoma debelog crijeva te smanjuje aktivnost signalnog puta Hh-Gli

Literaturni podaci pokazuju da je kinaza GSK3β deregulirana u karcinomu debelog crijeva te da ima onkogenu funkciju. To podupiru i prethodni nalazi u našem laboratoriju, gdje viši stadiji karcinoma debelog crijeva imaju jaču ekspresiju GSK3β (Gojević, 2011). Nepravilna aktivnost GSK3β može dovesti do aktivacije signalnog puta Hh-Gli. Tome u prilog ide i nemogućnost inhibicije signalnog puta Hh-Gli ciklopaminom koji djeluje na Smo, a koji se u signalnoj kaskadi nalazi uzvodno od GSK3β.

Iz tog razloga praćen je učinak inhibicije GSK3 β specifičnim inhibitorom litij-kloridom (LiCl) na proliferaciju stanica, tumorigenični potencijal stanica te aktivnost signalnog puta Hh-Gli.

4.3.1. Učinak inhibicije GSK3 β na proliferaciju i tumorigenični potencijal stanica karcinoma debelog crijeva

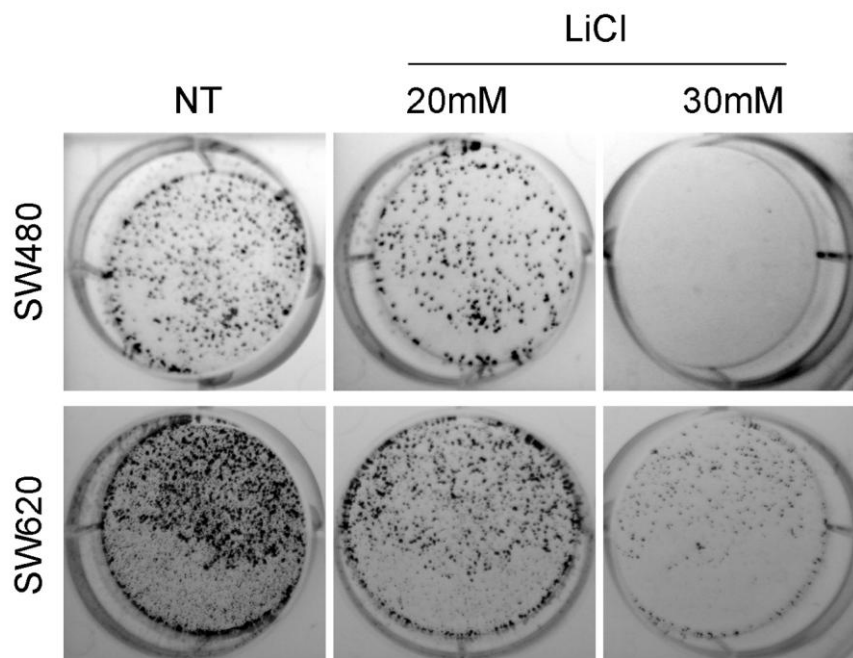
Stanične linije SW480 i SW620 tretirane su s nizom koncentracija LiCl (0 – 50 mM) te je proliferacija praćena testom MTT nakon 72 sata. Dobivene krivulje na Slici 4.7 jasno prikazuju da se proliferacija obiju staničnih linija smanjuje s povećanjem koncentracije LiCl.



Slika 4.7 Učinak rastućih koncentracija LiCl na proliferaciju stanica SW480 i SW620. Na apscisi su izražene koncentracije LiCl, dok je na ordinati izražen postotak rasta stanica nakon 72 sata.

Za analizu tumorigeničnog potencijala stanica korištena je metoda klonalnog rasta stanica. Rezultati ove analize pokazuju da sposobnost stvaranja kolonija stanica SW480 nakon tretmana s 20 mM LiCl nije promjenjena o odnosu na netretirane stanice, međutim 30 mM LiCl gotovo u potpunosti dokida sposobnost stvaranja kolonija stanica SW480. Kod stanica

SW620, već i 20 mM LiCl smanjuje sposobnost stvaranja kolonija, a 30 mM LiCl ima još izraženiji učinak (Slika 4.8).



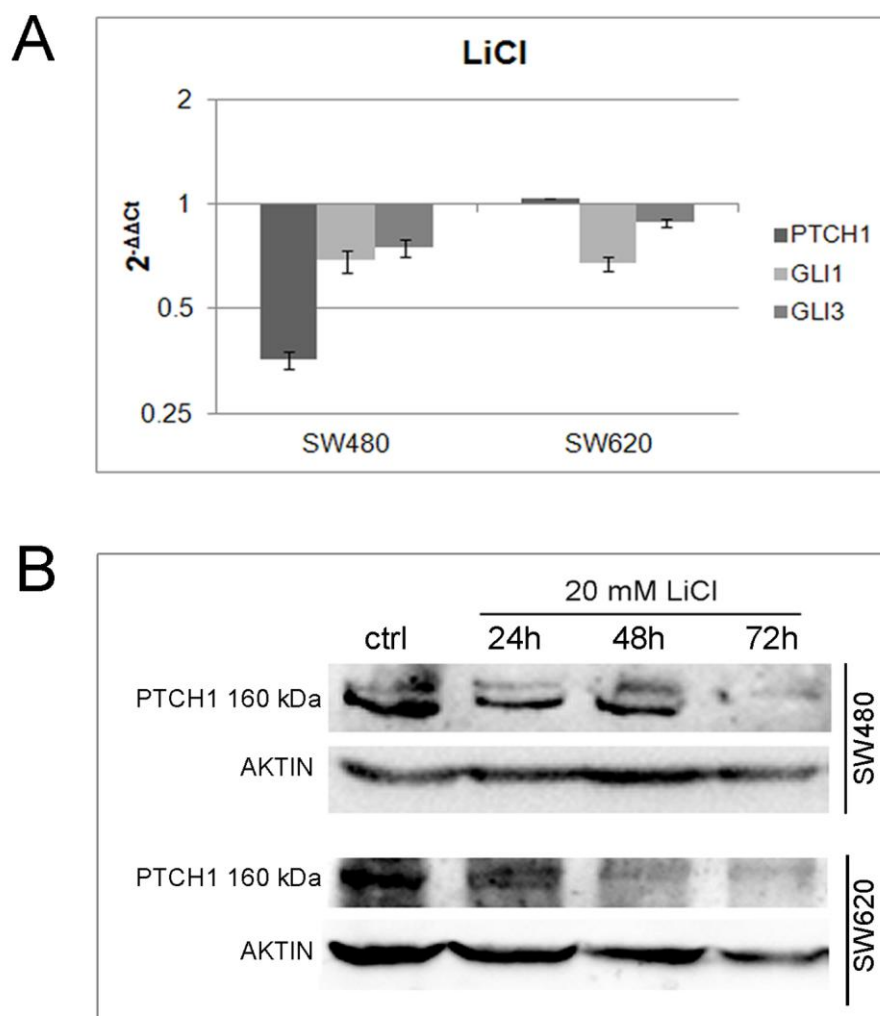
Slika 4.8 Utjecaj LiCl na sposobnost stvaranja kolonija stanica SW480 i SW620. 20mM LiCl u manjoj mjeri smanjuje sposobnost stvaranja kolonija, što je bolje vidljivo kod stanica SW620. 30mM LiCl gotovo u potpunosti inhibira sposobnost stvaranja kolonija u obje stanične linije. NT-netretirane stanice.

Smanjena proliferacija i tumorigenični potencijal stanica karcinoma debelog crijeva nakon inhibicije GSK3 β ukazuje na ključnu ulogu GSK3 β u preživljavanju staničnih linija SW480 i SW620.

4.3.2. Učinak inhibicije GSK3 β na aktivnost signalnog puta Hh-Gli

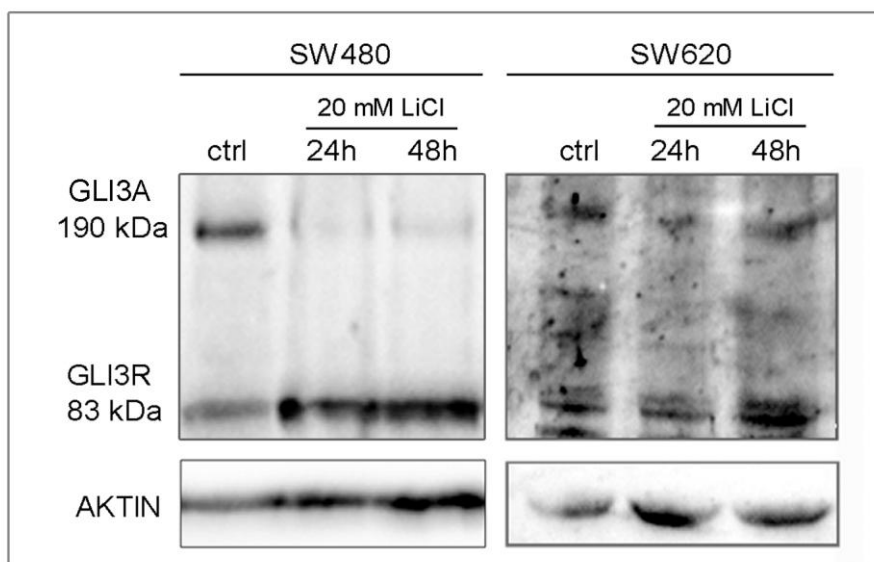
Inhibicija GSK3 β s LiCl dovela je do utišavanja signalnog puta Hh-Gli u staničnim linijama SW480 i SW620, što je vidljivo po smanjenju ekspresije ciljnih gena signalnog puta *PTCH1* i *GLI1* (Slika 4.9A). Smanjena aktivnost puta nešto je manje izražena u stanicama SW620 gdje je tretman s LiCl smanjio ekspresiju *GLI1*, ali ne i *PTCH1*. Na razini proteina se, međutim, vidi

da u obje stanične linije dolazi do smanjenja količine proteina Ptch1 nakon tretmana te je smanjenje proporcionalno koncentraciji LiCl (Slika 4.9B).



Slika 4.9 Učinak tretmana s LiCl na aktivnost signalnog puta Hh-Gli u staničnim linijama karcinoma debelog crijeva. (A) LiCl u koncentraciji od 20 mM smanjuje ekspresiju ciljnih gena signalnog puta Hh-Gli *PTCH1* i *GLI1* te gena *GLI3* u staničnoj liniji SW480. U stanicama SW620 snižava ekspresiju ciljnih gena *GLI1* te gena *GLI3*, ali ne i ciljnih gena *PTCH1*. Na apscisi su prikazane pojedine stanične linije, a na ordinati razlika u ekspresiji u odnosu na netretirane stanice, čija ekspresija ima vrijednost 1. (B) Smanjenje ekspresije proteina Ptch u obje stanične linije ukazuje na utišavanje signalnog puta. Aktin je prikazan kao kontrola nanošenja.

Također je praćen i utjecaj LiCl na transkripcijske faktore te je zabilježen zanimljiv utjecaj na Gli3. Naime, nakon tretmana s 20 mM LiCl, vidljivo se smanjuje količina Gli3A, a raste udio Gli3R u obje stanične linije (Slika 4.10). To ukazuje na pojačano procesiranje Gli3 uslijed inhibicije GSK3 β , što u konačnici može uzrokovati opaženu inhibiciju signalnog puta.

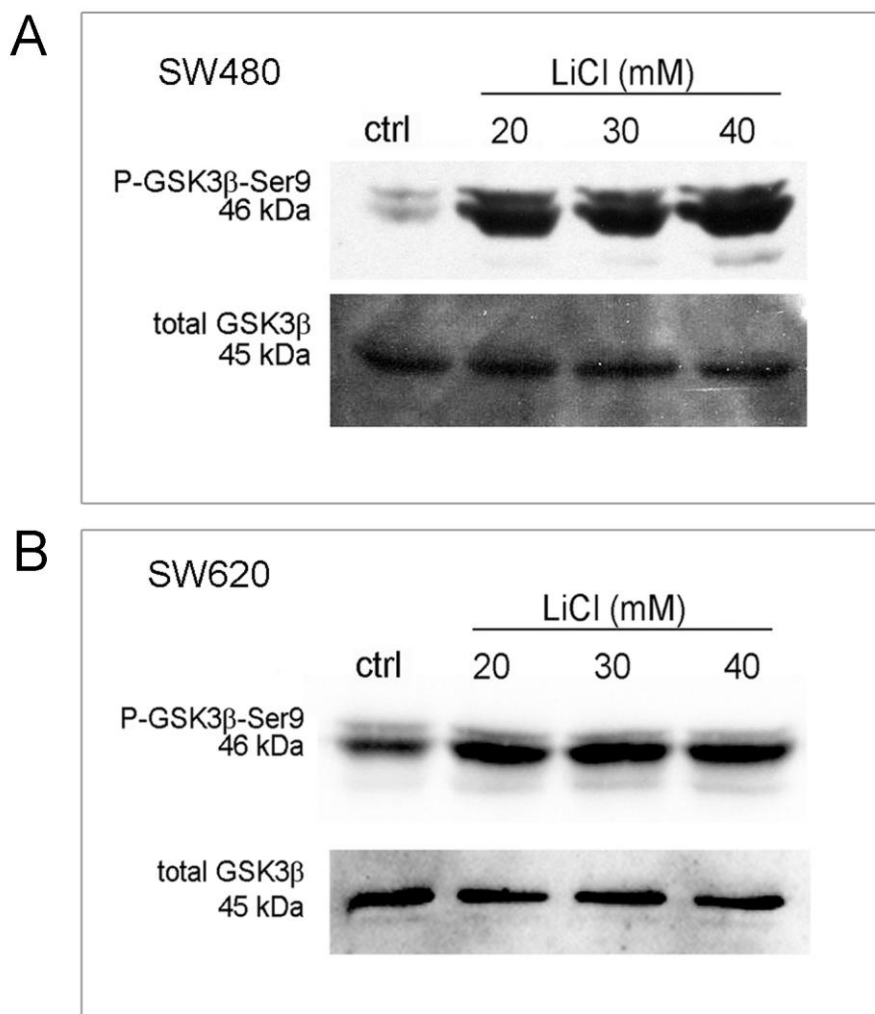


Slika 4.10 Učinak tretmana s LiCl na transkripcijski faktor Gli3 u staničnim linijama karcinoma debelog crijeva. Na razini proteina Gli3 uočava se njegovo pojačano cijepanje na represorski oblik (Gli3R) uslijed tretmana s LiCl u koncentraciji od 20 mM, što upućuje na utišavanje signalnog puta. Aktin je prikazan kao kontrola nanošenja.

4.3.3. LiCl potiče inhibitornu fosforilaciju GSK3 β

S obzirom da je iz literature poznato da LiCl potiče inhibitornu fosforilaciju proteina GSK3 β na poziciji Ser9 (Jope, 2003) ispitano je je li to i slučaj i u ovim stanicama.

Na Slici 4.11 može se vidjeti da uistinu dodatak već i nižih koncentracija LiCl dovodi do značajnog povećanja udjela GSK3 β fosforiliranog na aminokiselini Ser9 u staničnim linijama SW480 (A) i SW620 (B), dok ukupna količina proteina GSK3 β ostaje konstantna.



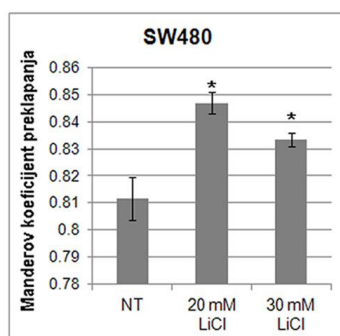
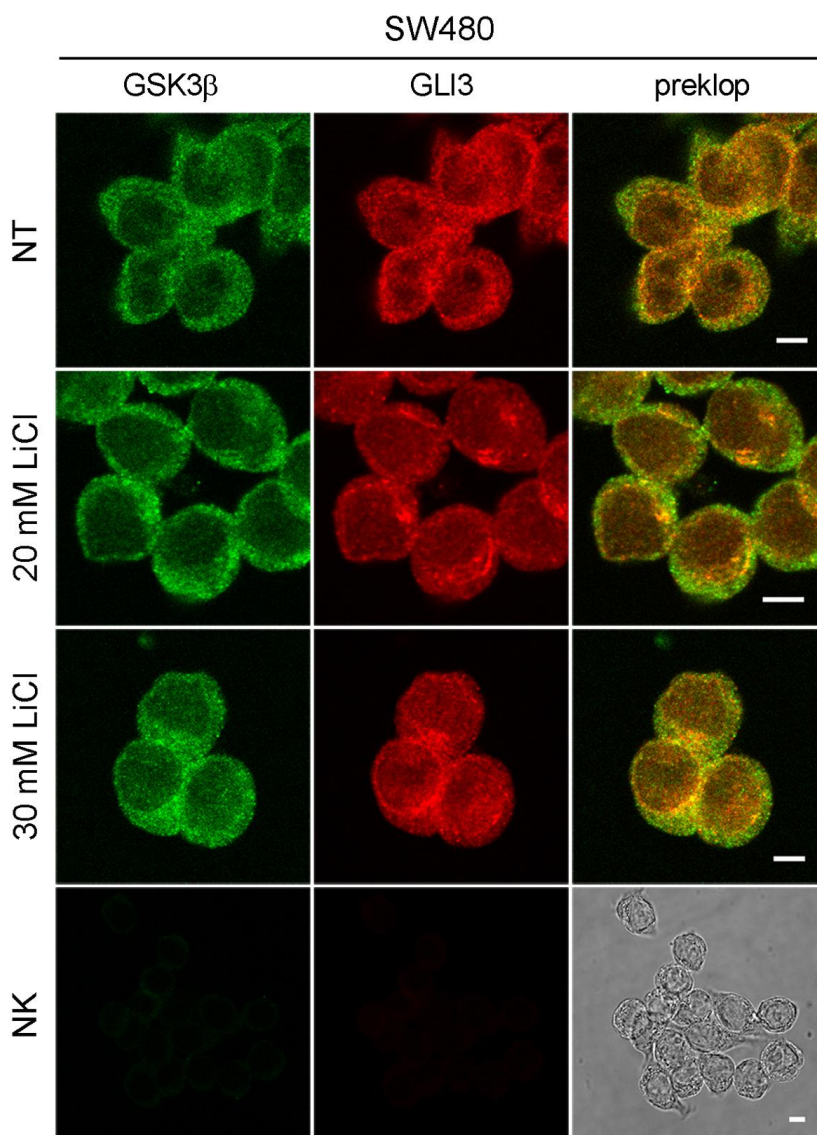
Slika 4.11 LiCl pospješuje fosforilaciju na aminokiselini Ser9 proteina GSK3 β . (A) Pojačana fosforilacija GSK3 β na poziciji Ser9 u staničnoj liniji SW480 usljed tretmana s rastućim koncentracijama LiCl. Ukupna količina proteina GSK3 β je konstantna bez obzira na tretman. (B) Pojačana fosforilacija GSK3 β na poziciji Ser9 u staničnoj liniji SW620 usljed tretmana s rastućim koncentracijama LiCl. Ukupna količina proteina GSK3 β u obje stanične linije je konstantna bez obzira na tretman.

Iz ovoga se može zaključiti da pojačana fosforilacija proteina GSK3 β na poziciji Ser9 mijenja djelovanje samog proteina i dovodi do povećane sposobnosti fosforilacije proteina Gli3 od strane GSK3 β , što u konačnici omogućava efikasno cijepanje Gli3 na represorski oblik te utišavanje signalnog puta Hh-Gli.

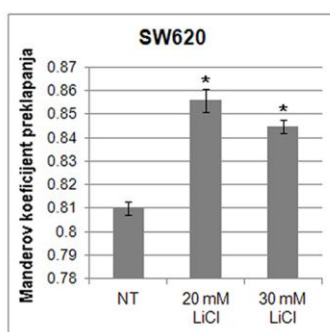
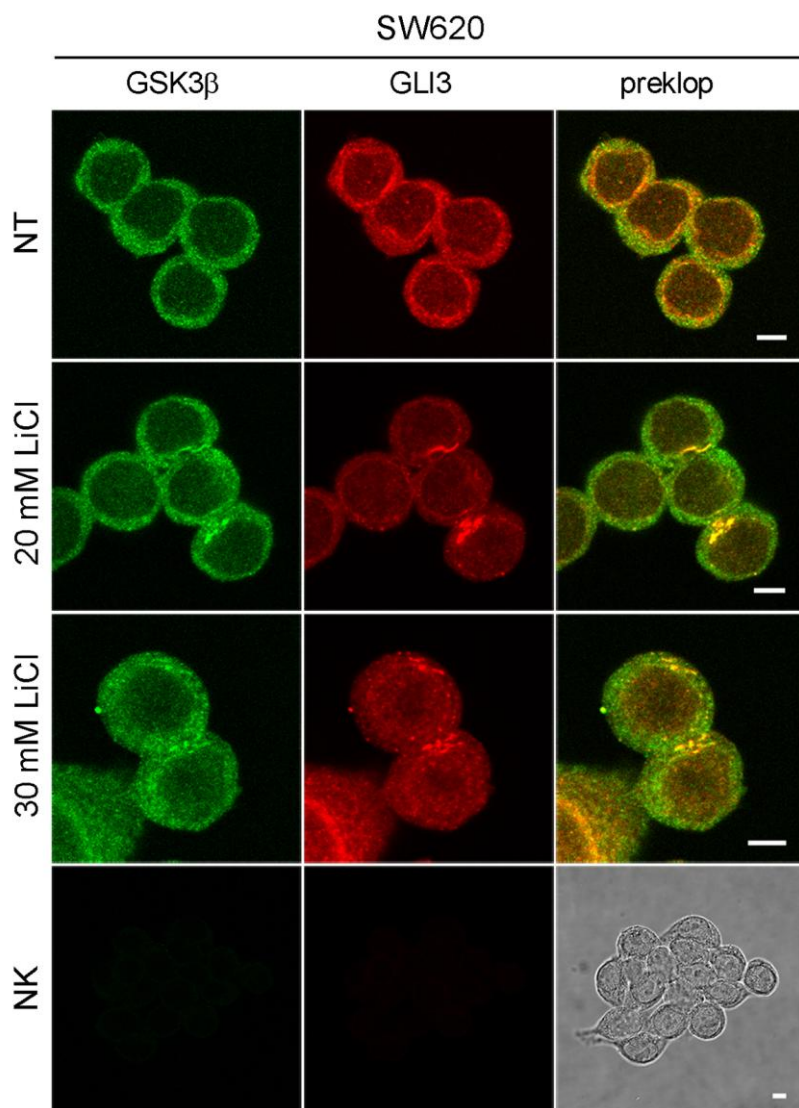
4.3.4. Inhibicija GSK3 β dovodi do efikasnijeg stvaranja kompleksa GSK3 β -SuFu-Gli3

4.3.4.1. Lokalizacija proteina Gli3 i GSK3 β

Da bi se potvrdio prethodni zaključak, da fosforilacija aminokiseline Ser9 u proteinu GSK3 β mijenja djelovanje ove kinaze tako da omogućuje efikasniju fosforilaciju proteina Gli3, što je onda direktni znak za njegovo procesiranje, ispitana je lokalizacija proteina GSK3 β i Gli3 u stanicama SW480 i SW620 prije i nakon tretmana s LiCl. Lokalizacija ova dva proteina može ukazati na eventualne razlike u međusobnoj interakciji. Lokalizacija proteina praćena je imunofluorescencijom, a rezultati su prikazani na Slici 4.12 te Slici 4.13. Lokalizacija proteina GSK3 β prikazana je zelenim signalom, lokalizaciju proteina Gli3 označava crveni signal, a područja preklapanja signala su žuta. Korištene su dvije koncentracije LiCl, 20 i 30 mM. U obje stanične linije uočen je sličan trend. Već nakon tretmana nižom koncentracijom značajno je povećana razina ko-lokalizacije između proteina GSK3 β i Gli3, te se ona značajnije ne mijenja s porastom koncentracije, što je sukladno udjelu GSK3 β fosforiliranom na aminokiselini Ser9, koji također ne raste s koncentracijom. U netretiranim stanicama postoji određena razina ko-lokalizacije te je ona uglavnom difuzna. Zanimljivo je da dodatkom LiCl dolazi do pojačane ko-lokalizacije proteina GSK3 β i Gli3 u specifičnim regijama perinuklearnog prostora. Povećana razina ko-lokalizacije upućuje na moguću povećanu razinu interakcije između ova dva proteina, odnosno povećanu razinu fosforilacije transkripcijskog faktora Gli3 od strane protein-kinaze GSK3 β .



Slika 4.12 Lokalizacija proteina GSK3 β i Gli3 u stanicama SW480. Dodatkom 20 i 30 mM LiCl dolazi do pojačane ko-lokalizacije ova dva proteina u specifičnim regijama perinuklearnog prostora. Skala predstavlja 5 μ m. Na grafu su prikazane razine ko-lokalizacije crvenog i zelenog signala, izražene preko Manderovog koeficijenta preklapanja. *P<0.05. NT – netretirane stanice, NK – negativna kontrola.

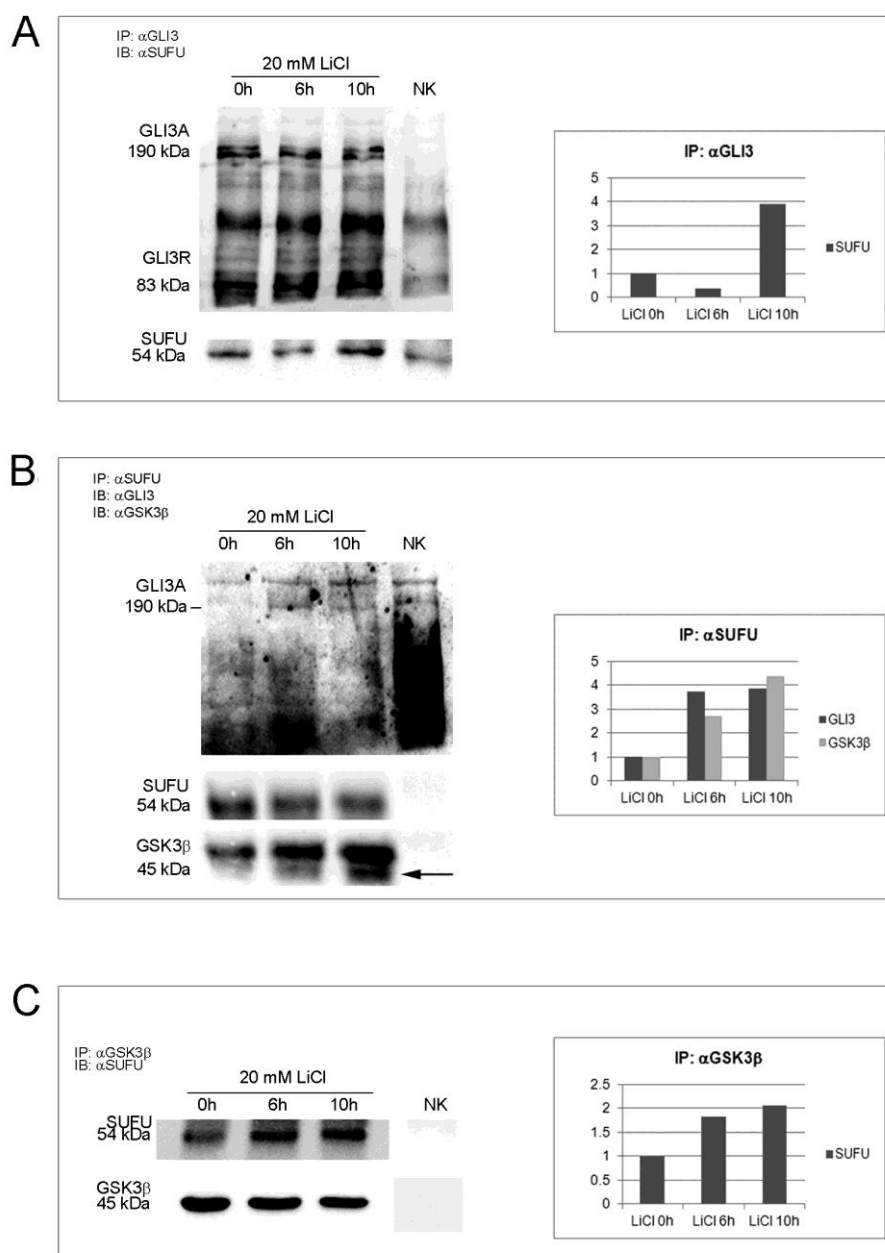


Slika 4.13 Lokalizacija proteina GSK3 β i Gli3 u stanicama SW620. Dodatkom 20 i 30 mM LiCl dolazi do pojačane ko-lokalizacije ova dva proteina u specifičnim regijama perinuklearnog prostora. Skala predstavlja 5 μ m. Na grafu su prikazane razine ko-lokalizacije crvenog i zelenog signala, izražene preko Manderovog koeficijenta preklapanja. * $P < 0.05$. NT – netretirane stanice, NK – negativna kontrola.

4.3.4.2. Ko-immunoprecipitacija proteina Gli3, SuFu i GSK3 β

Kako bi se sa sigurnošću potvrdilo da nakon tretmana s LiCl dolazi do efikasnije fosforilacije Gli3 od strane GSK3 β te posljedično i efikasnijeg cijepanja Gli3, ispitana je direktna interakcija između proteina GSK3 β , Gli3 i SuFu prije i nakon tretmana s 20 mM LiCl. Prema podacima iz literature poznato je da protein SuFu predstavlja platformu koja veže protein Gli3 te regrutira GSK3 β i omogućuje mu da fosforilira Gli3 (Kise i sur., 2009). Interakcija među proteinima GSK3 β , SuFu i Gli3 praćena je u staničnoj liniji SW480. Rezultati prikazani na Slici 4.14 pokazuju da već 10 sati nakon tretmana dolazi do pojačane interakcije između proteina SuFu i Gli3 (Slika 4.14 A i B), kao i između proteina SuFu i GSK3 β (Slika 4.14 B i C), što je potvrđeno ko-immunoprecipitacijama u oba smjera. Direktna interakcija proteina GSK3 β i Gli3 nije pokazana, što znači da je ona vjerojatno prekratka da bi je se moglo detektirati, međutim efikasnost vezanja GSK3 β za protein SuFu direktno govori o njegovoj sposobnosti fosforilacije Gli3, s obzirom da je SuFu protein koji tu reakciju omogućuje.

Iz ovih rezultata nameće se zaključak da, fosforilacija GSK3 β na poziciji Ser9 usljed tretmana s LiCl, uspostavlja ravnotežu između inhibitorne fosforilacije na poziciji Ser9, i aktivirajuće fosforilacije na poziciji Tyr216, koja je u karcinomu debelog crijeva izgubljena. Time se omogućuje pravilna funkcija kinaze GSK3 β , odnosno u određenoj mjeri se vraća sposobnost fosforilacije proteina Gli3, koji se time obilježava za procesiranje u represorski oblik.

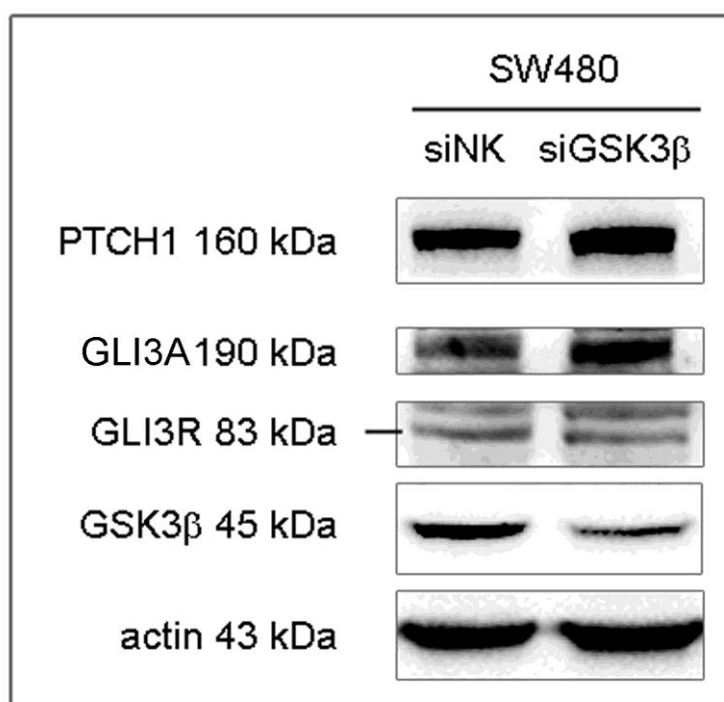


Slika 4.14 Rezultati eksperimenata ko-imunoprecipitacije. (A) Reakcija ko-imunoprecipitacije proteina Gli3 pokazala je da zajedno s njim ko-imunoprecipitira protein SuFu, što ukazuje na njihovu direktnu interakciju. Interakcija postoji i u netretiranim uvjetima, ali pojačava se nakon tretmana s 20 mM LiCl tijekom 10 sati. (B) Reakcija ko-imunoprecipitacije proteina SuFu pokazuje da zajedno s njim ko-imunoprecipitiraju i proteini Gli3 u GSK3 β . (C) Ko-imunoprecipitacija proteina GSK3 β ukazuje na njegovu direktnu vezu s proteinom SuFu. Pokraj slika Western blota grafički su prikazani rezultati denzitometrijskog mjerenja.

4.3.5. Učinak utišavanja ekspresije GSK3 β i SuFu na aktivnost signalnog puta Hh-Gli u stanicama SW480

4.3.5.1. Utišavanje GSK3 β

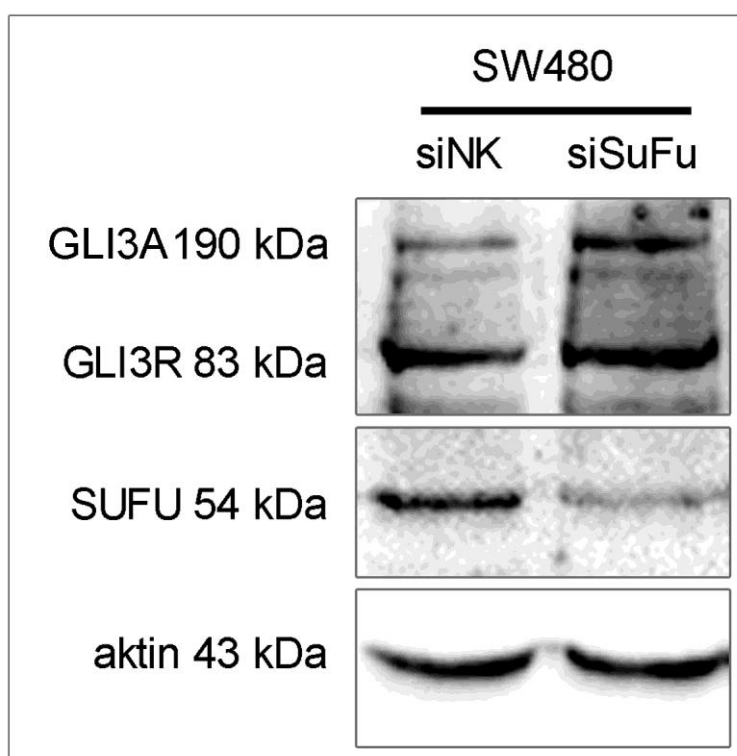
S obzirom da inhibicija deregulirane protein-kinaze GSK3 β u stanicama karcinoma debelog crijeva učinkovito smanjuje aktivnost signalnog puta Hh-Gli, ispitan je i učinak utišavanja njegove ekspresije na aktivnost puta u stanicama SW480. Ekspresija GSK3 β uspješno je utišana, što je prikazano na Slici 4.15. Za razliku od inhibicije litijem, utišavanje ove kinaze dovodi do potpuno suprotnog učinka. Na Slici 4.15 se može vidjeti da raste ekspresija proteina Ptch1, kao i udio aktivatorskog oblika transkripcijskog faktora Gli3 (Gli3A), što upućuje na aktivaciju signalnog puta.



Slika 4.15 Western blot analiza ekspresije proteina nakon utišavanja ekspresije GSK3 β . Uspješnost utišavanja manifestira se sniženom ekspresijom proteina GSK3 β . Posljedica utišavanja su pojačana ekspresija proteina Ptch1 i Gli3FL, što ukazuje na aktivaciju signalnog puta.

4.3.5.2. Utišavanje *SuFu*

Utišavanjem ekspresije *SuFu* htjelo se pokazati da je njegova funkcija neophodna za procesiranje Gli3 u ovim stanicama. Uspješnost utišavanja *SuFu* prikazana je na Slici 4.16. Na istoj slici se također vidi učinak na signalni put Hh-Gli. Dolazi do nakupljanja aktivatorskog oblika transkripcijskog faktora Gli3 (Gli3A), što potvrđuje da smanjenjem količine proteina *SuFu* opada učinkovitost procesiranja Gli3, što dovodi do aktivacije signalnog puta.



Slika 4.16 Western blot analiza ekspresije proteina nakon utišavanja *SuFu*. Uspješnost utišavanja vidljiva je po smanjenoj količini proteina *SuFu* u odnosu na uzorak transfeciran s nespecifičnom siRNA. Kao posljedica utišavanja *SuFu* dolazi do nakupljanja aktivatorskog oblika Gli3 (Gli3A), što ukazuje na aktivaciju signalnog puta.

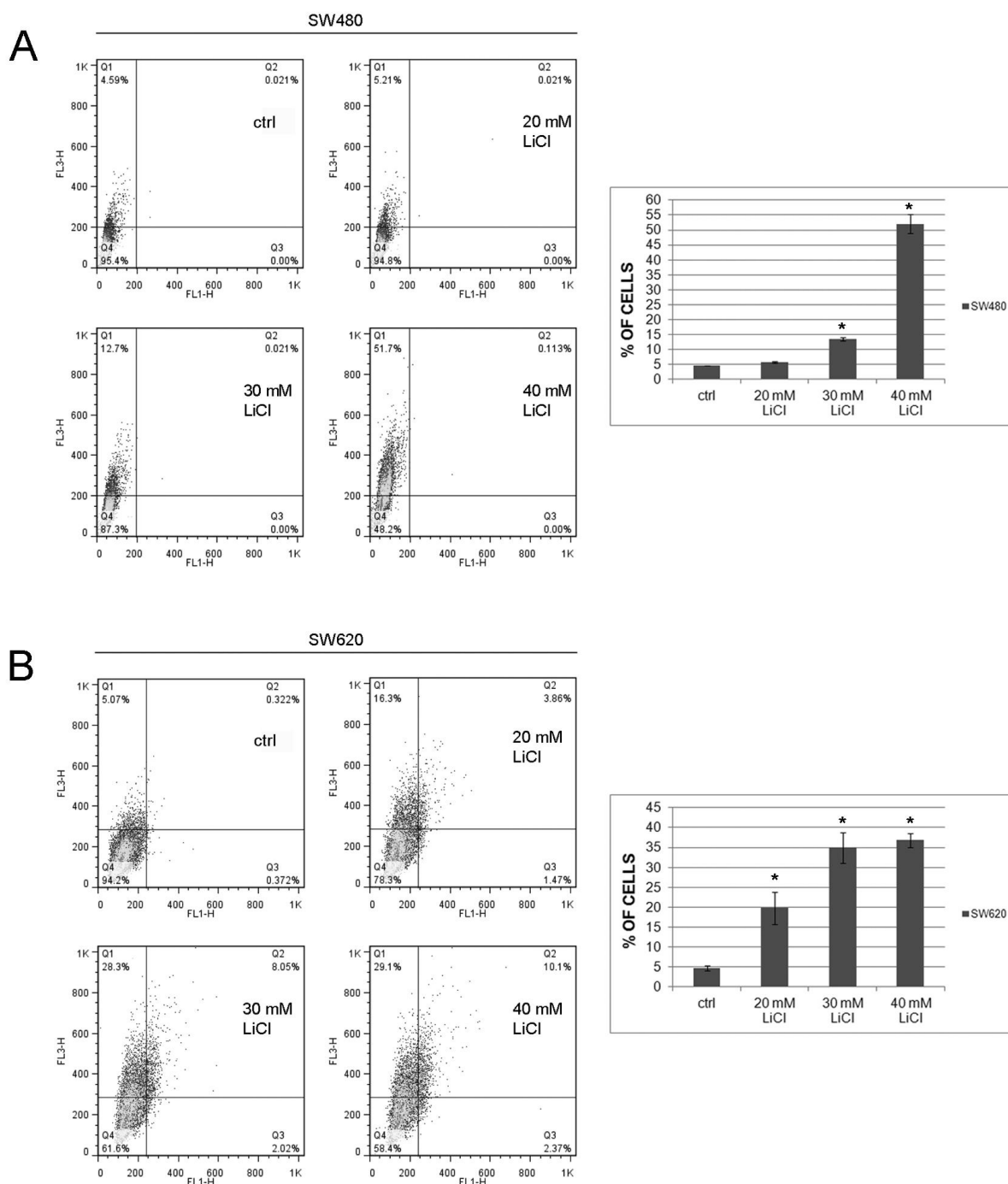
4.4. *Tretman litij-kloridom inducira autofagiju te apoptozu*

S obzirom da je primijećeno značajno smanjenje proliferacije stanica SW480 i SW620 nakon tretmana s LiCl ispitano je dolazi li do stanične smrti prilikom tretmana. Ispitana su dva oblika stanične smrti, autofagija i apoptoza. Autofagija je ispitana s obzirom da postoje literaturni navodi da Hh-Gli signalni put može imati ulogu u regulaciji autofagije (Jimenez-Sanchez i sur., 2012; Wang i sur., 2013b) kao i da sam LiCl može aktivirati autofagiju (Sarkar, 2005). Također je poznato da inhibicija signalnog puta Hh-Gli dovodi do apoptoze (Varnat i sur., 2009).

4.4.1. Analiza autofagije

Autofagija je generalni naziv za razgradnju citoplazmatskih komponenti u lizosomima, međutim autofagija je uključena u velik broj staničnih procesa. Ključna je pri adaptaciji na izgladnjivanje, prilikom odstranjivanja proteina i organela, u razvoju, starenju, pri eliminaciji mikroorganizama, supresije tumora te staničnoj smrti. Nakon inicijacije procesa autofagije dolazi do formiranja autofagosoma oko organela ili proteina. Autofagosomi se zatim spajaju s lizosomima, pri čemu nastaju autolizosomi, u kojima dolazi do razgradnje sadržaja autofagosoma putem lizosomalnih proteaza (Mizushima, 2007). Bojom akridin oranž, mogu se detektirati kiseli vezikularni organeli, u koje se ubrajaju i autolizosomi. Akridin oranž ulazi u kisele vezikularne organele te pri tom mijenja boju iz zelene u crvenu.

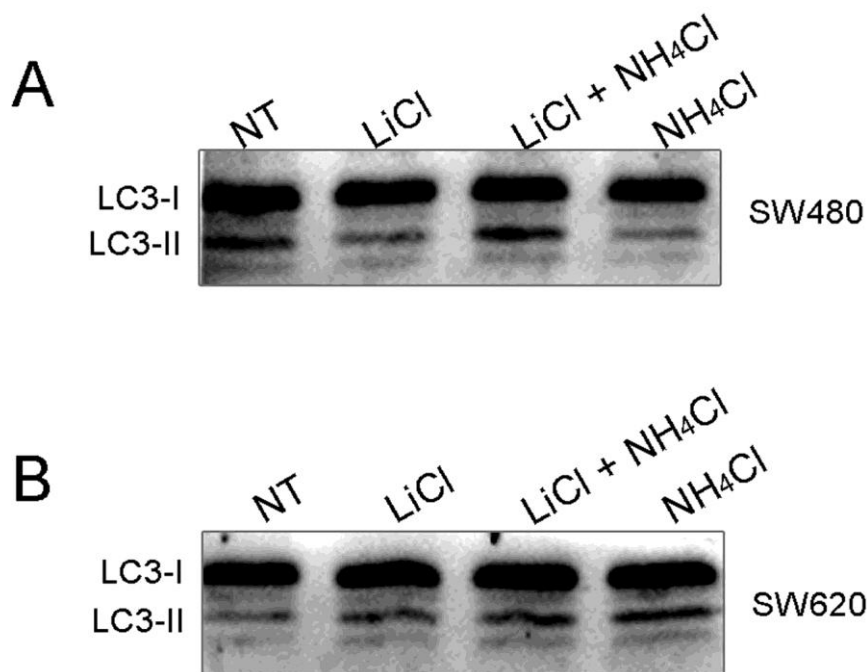
U ovom radu pokazano je da nakon tretmana s 20 mM LiCl nema značajne promjene u količini kiselih vakuola kod stanične linije SW480. Međutim, pri tretmanu s 30 i 40 mM LiCl značajno se povećava udio stanica s nakupljenim kiselim vezikulama, koje emitiraju crvenu boju, što je posebno izraženo pri najvišoj koncentraciji (Slika 4.17A). Kod stanične linije SW620 bojanje bojom akridin oranž nakon tretmana s LiCl ukazuje na značajno povećanje broja kiselih vezikularnih organela već pri koncentraciji LiCl od 20 mM, a taj broj raste pri višim koncentracijama (Slika 4.17B).



Slika 4.17 Rezultati analize kiselih vezikularnih organela u staničnim llinijama SW480 i SW620. (A) Rezultati bojanja bojom akridin oranž pokazuju povećanje udjela stanica SW480 s kiselim vakuolama s koncentracijom LiCl, što je kvantificirano i prikazano na grafu pored točkastog prikaza rezultata. * označava $P < 0.05$. (B) Rezultati bojanja bojom akridin oranž pokazuju povećanje udjela stanica SW620 s kiselim vakuolama s koncentracijom LiCl, što je kvantificirano i prikazano na grafu pored točkastog prikaza rezultata. * označava $P < 0.05$.

S obzirom da se u kisele vezikularne organele ubrajaju i lizosomi i endosomi nije moguće sa sigurnošću zaključiti da se radi o indukciji autofagije odnosno povećanju broja autolizosoma. Zbog toga je napravljena analiza specifičnog markera autofagije, proteina LC3, koji se nalazi na unutarnjoj membrani autofagosoma. Protein LC3 se cijepa, čime nastaje topivi oblik proteina LC3-I. Dodatkom fosfolipidne modifikacije LC3-I se procesira u LC3-II koji lokalizira u autofosome i autolizosome. Zbog toga je LC3-II dobar rani marker za nastanak autofosoma. Nakon spajanja autofosoma s lizosomima dolazi i do razgradnje LC3-II.

Analiza proteina LC3 pokazala je da tretman s LiCl dovodi do smanjenja udjela LC3-II u stanicama SW480, što daje naslutiti da dolazi do njegove brze razgradnje u autolizosomima (Sato i sur., 2007; Tanida i sur., 2005). Dodatkom inhibitora lizosomalnih proteaza, čime se inhibira razgradnja u autolizosomima, dolazi do nakupljanja LC3-II, što potvrđuje da se on brzo razgrađuje u autolizosomima nakon tretmana s LiCl, odnosno da tretman s LiCl dovodi do tjeka autofagije, a ne samo nakupljanja autolizosoma (Slika 4.18A). Analiza proteina LC3 u stanicama SW620 pokazala je nakupljanje LC3-II nakon tretmana s 30 mM LiCl, što ukazuje na nastanak autofosoma, a dodatak inhibitora lizosomalnih proteaza je pojačao nakupljanje LC3-II, što potvrđuje protok autofagije (Slika 4.18B).



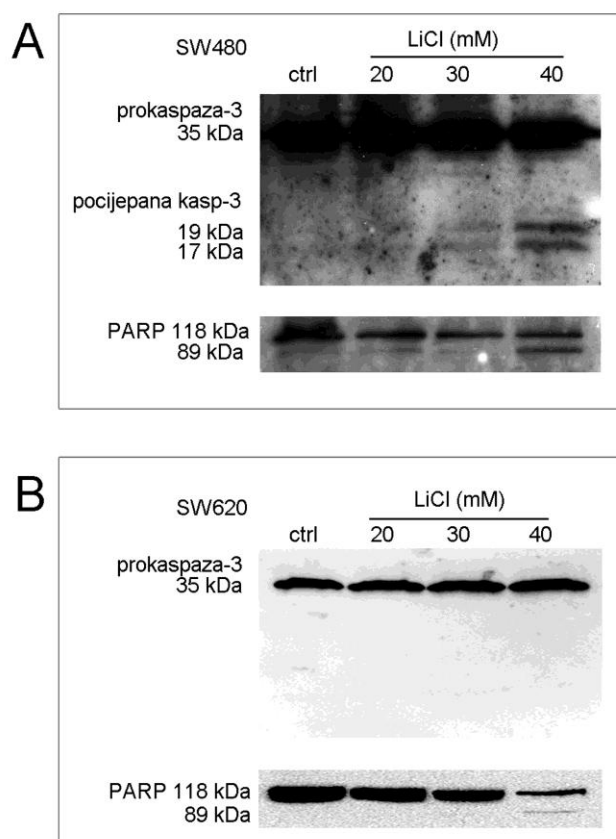
Slika 4.18 Western blot analiza procesiranja proteina LC3. (A) Analiza procesiranja proteina LC3 u stanicama SW480 ukazuje na protok procesa autofagije. (B) Analiza procesiranja proteina LC3 u stanicama SW620 također ukazuje na protok procesa autofagije.

4.4.2. Analiza apoptoze

Apoptoza je praćena analizom specifičnih markera Western analizom. Kao specifični markeri praćeni su cijepanje kaspaze-3 i cijepanje proteina PARP nakon tretmana s LiCl.

Apoptoza je oblik programirane smrti stanica čije izvršenje osiguravaju specifične cisteinske proteaze, kaspaze. Kaspaze se sintetiziraju kao zimogeni, a aktivacijom apoptoze dolazi do njihovog cijepanja čime nastaju zreli proteini s pojačanom enzimskom aktivnošću. Kaspaza 3 ubraja se u efektorske kaspaze, koje se nalaze na kraju proteolitičke kaskade i cijepanjem supstrata osiguravaju kontroliranu razgradnju stanice. Jedan od najranijih supstrata efektorskih kaspaza je i polimeraza poli-(ADP-riboze), PARP (engl. *Poly (ADP-ribose) polymerase*), protein ukljućen u popravak DNA (Earnshaw i sur., 1999).

Kod stanične linije SW480 jasno se vidi cijepanje prokaspaze-3, kao i cijepanje proteina PARP već pri koncentraciji od 20 mM LiCl, a cijepanje se pojačava s koncentracijom LiCl. Ovi rezultati ukazuju na aktivaciju apoptoze uslijed tretmana s LiCl (Slika 4.19A). Kod stanične linije SW620 iz dobivenih rezultata nije potpuno jasna slika o aktivaciji apoptoze. Primijećeno je cijepanje proteina PARP samo pri najvišoj koncentraciji LiCl, dok cijepanje prokaspaze-3 nije zabilježeno (Slika 4.19B). Cijepanje proteina PARP ukazuje na aktivaciju apoptoze, međutim u manjoj mjeri nego u staničnoj liniji SW480. Isto tako, izostanak cijepanja prokaspaze-3 ukazuje na mogućnost aktivacije apoptoze/cijepanja PARP-a putem neke druge kaspaze koja nije ispitana.



Slika 4.19 Western analiza markera apoptoze, kaspaze-3 i proteina PARP. **(A)** Kod stanične linije SW480 uočava se pojačano cijepanje kaspaze-3 i proteina PARP s porastom koncentracije LiCl. **(B)** Kod stanica SW620 pri najvišoj koncentraciji LiCl dolazi do cijepanja proteina PARP, ali nije zabilježeno cijepanje kaspaze-3.

5. RASPRAVA

Glavna uloga signalnog puta Hh-Gli je tijekom embrionalnog razvoja, kada su njegove komponente ključne za pravilan razvoj brojnih tkiva i organa, između ostalog i gastrointestinalnog trakta, čijim dijelom se bavi i ovaj rad. Tijekom razvoja gastrointestinalnog sustava Hh je ključan za razvoj glatkih mišića povezanih s ovim sustavom kao i enteričkog živčanog sustava. U crijevu je bitan za proliferaciju i diferencijaciju stanica (Ramalho-Santos i sur., 2000). Kao što je već opisano u uvodu, funkcija signalnog puta Hh-Gli u odraslom organizmu zadržava se samo u maloj skupini stanica, matičnim stanicama, važnim za obnovu tkiva. Tako se i u crijevu odraslog organizma funkcija ovog signalnog puta zadržava u intestinalnim matičnim stanicama, ključnim za odgovor na oštećenje (Buller i sur., 2012). S obzirom na ključnu ulogu u razvoju brojnih organa i matičnim stanicama u odraslom organizmu, i na stanične procese koje kontrolira, nije neobično da se poremećena aktivacija signalnog puta Hh-Gli nalazi u podlozi mnogih tumora.

Karcinom debelog crijeva jedan je od najčešće dijagnosticiranih tumora u Europi. Danas je, bez obzira na napore da se optimizira dijagnostički proces i poboljša režim liječenja, stopa mortaliteta i dalje visoka (Reimers i sur., 2013). Ta činjenica upućuje na potrebu za daljnjim istraživanjima, kako bi se produbilo razumijevanje ove bolesti te otvorili novi putevi za razvoj terapija.

Istraživanje signalnog puta Hh-Gli u kontekstu karcinoma debelog crijeva počelo je prije desetak godina. Prve studije bile su dosta oprečne. Dvije studije pokazivale su da signalni put Hh-Gli nije aktivan u stanicama karcinoma debelog crijeva (Berman i sur., 2003; Chatel i sur., 2007). Treba napomenuti da su te studije pratile samo ekspresiju liganda (*SHH* i *IHH*), *PTCH1* i *GLI1*, te su put smatrale aktivnim isključivo u prisustvu sve tri komponente, a nisu uzimale u obzir mogućnost aktivacije transkripcijskih faktora Gli2 i/ili Gli3 niti mogućnost nekanoničke aktivacije signalnog puta. Druge studije su pokazivale aktivnost puta u stanicama karcinoma debelog crijeva. Douard i sur. pokazali su pozitivnu korelaciju između ekspresije *Shh* i ekspresije *Gli1* u kliničkim uzorcima karcinoma debelog crijeva (Douard i sur., 2006), a

Qualtrough i sur. su pokazali ekspresiju Shh i Ihh kao i ekspresiju Ptch1, Smo i Gli1 u staničnim linijama karcinoma debelog crijeva. Pokazali su i da ciklopamin inducira apoptozu u ovim stanicama (Qualtrough i sur., 2004).

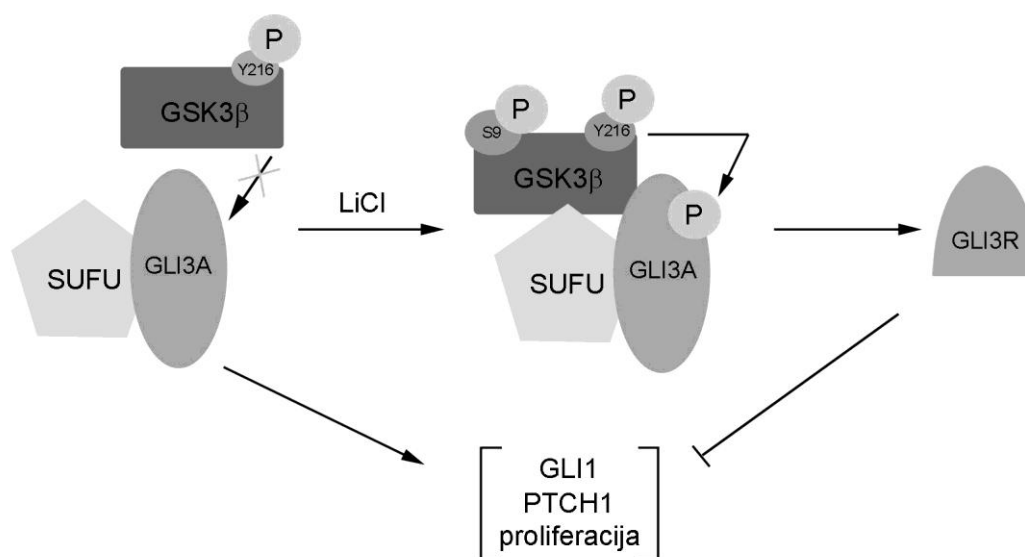
Novije studije su opsežnije i pokazuju aktivnost signalnog puta Hh-Gli u stanicama karcinoma debelog crijeva. Opsežna studija koju su proveli Varnat i sur. pokazala je da tumorske epitelne stanice karcinoma debelog crijeva imaju aktivan signalni put Hh-Gli, dok u stromi nije bilo izraženije ekspresije. Aktivna signalizacija Hh-Gli neophodna je za proliferaciju i preživljenje stanica karcinoma debelog crijeva *in vitro* i *in vivo*, a ciklopamin inducira apoptozu. Ekspresija Gli1 povećava broj stanica i pojačava proliferaciju, dok represorski oblik Gli3 smanjuje broj stanica i razinu proliferacije. U ovom radu također je pokazano da je signalni put Hh-Gli neophodan za metastatski rast stanica karcinoma debelog crijeva (Varnat i sur., 2009). Mazumdar i sur. u panelu su staničnih linija karcinoma debelog crijeva pronašli sve komponente kanoničkog signalnog puta Hh-Gli. Također, ustvrdili su da je inhibicija transkripcijskih faktora Gli pomoću inhibitora GANT61 efikasnija u induciranju stanične smrti od tretmana ciklopaminom, koji je pokazao ograničen učinak (Mazumdar i sur., 2011). Iako se dugo smatralo da transkripcijski faktor Gli3 ima pretežno represorsku funkciju, danas mu se pridaje sve više pažnje jer je sve očitije da je njegov aktivatorski kapacitet velik. U jednom istraživanju pokazano je da inhibicija Gli3 smanjuje proliferaciju stanica karcinoma debelog crijeva tako što pojačava funkciju p53, što smanjuje preživljenje. Također je pokazano da utišavanje Gli3 pojačava osjetljivost stanica na protutumorske agense (Kang i sur., 2011). Nadalje, jedna novija studija pokazala je da aktivatorski oblik Gli3 pridonosi tumorigenosti stanica karcinoma debelog crijeva na način da pojačavaju ekspresiju gena ključnih za adherenciju (Iwasaki i sur., 2013).

Prethodna istraživanja u Laboratoriju za nasljedni rak, imunohistokemijskim bojanjem pokazala su ekspresiju svih komponenti signalnog puta Hh-Gli u kliničkim uzorcima karcinoma debelog crijeva. Najjači intenzitet bojanja imali su upravo GSK3 β i protein Gli3. Ekspresija GSK3 β bila je u pozitivnoj korelaciji sa stadijem bolesti po Dukes-u, odnosno viši stadiji pokazivali su jaču ekspresiju. Ovaj podatak govori u prilog deregulacije i onkogenog djelovanja ove kinaze u karcinomima debelog crijeva. Sličan trend pokazao je i protein Gli3,

međutim nije bio statistički značajan ($P < 0.058$) (Gojević, 2011). Potrebno je obraditi veći broj kliničkih uzoraka da bi se sa sigurnošću potvrdila korelacija Gli3 sa stadijem bolesti. Ti rezultati predstavljali su temelj na kojem se gradila ideja za ovo istraživanje. Cilj je bio detaljnije ispitati ulogu GSK3 β i signalnog puta Hh-Gli na modelu staničnih linija karcinoma debelog crijeva te mehanizam njihovog međudjelovanja. U posljednje vrijeme postalo je sve očitije da protein-kinaza GSK3 β može imati promjenjenu, onkogenu funkciju u pojedinim tipovima tumora (Cao i sur., 2006; Kunnimalaiyaan i sur., 2007; Nowicki i sur., 2008), što je pokazano i za karcinom debelog crijeva. Međutim, mehanizam izvršenja te onkogene funkcije nije pokazan, ustanovljeno je samo da se u karcinomu debelog crijeva onkogene funkcija ne provodi preko signalnog puta Wnt, kojeg GSK3 β također regulira (Shakoori i sur., 2005, 2007). Ovim radom htjelo se istražiti djeluje li takva deregulirana kinaza na aktivaciju signalnog puta Hh-Gli. Prisutnost komponenti signalnog puta ispitana je na genskoj i proteinskoj razini, te je pokazano da su u obje stanične linije karcinoma debelog crijeva eksprimirane sve komponente (Slika 4.1 i Slika 4.2). Sukladno prethodnim rezultatima ekspresije komponenti u uzorcima tkiva pacijenata, potvrđena je visoka razina ekspresije GSK3 β u obje linije, a Gli3 je od tri transkripcijska faktora pokazivao najjaču ekspresiju. Zanimljivo je da obje stanične linije pokazuju ekspresiju i liganda i svih nizvodnih komponenti signalnog puta, što upućuje na mogućnost autokrine regulacije. Također, treba naglasiti da je stanična linija SW620 metastatska, a signalni put Hh-Gli ima sličnu razinu ekspresije svih komponenti kao i stanice primarnog tumora SW480 te GSK3 β također aktivira put preko transkripcijskog faktora Gli3. Ove činjenice ukazuju na važnost signalnog puta Hh-Gli i ovog mehanizma u metastatskom rastu stanica karcinoma debelog crijeva. Sposobnost kanoničkog prijenosa signala dokazana je egzogenom aktivacijom puta pomoću agonista koreceptora Smo, gdje je pokazano da stanice reagiraju na dodatnu stimulaciju (Slika 4.3 i Slika 4.4). Međutim, stanice nisu odgovarale na inhibiciju signalnog puta ciklopaminom, molekulom koja inhibira koreceptor Smo. Nije opaženo niti smanjenje aktivnosti puta, kao ni utjecaj na proliferaciju staničnih linija (Slika 4.5 i Slika 4.6). Ovo opažanje zapravo je u skladu s deregulacijom GSK3 β , s obzirom da ova kinaza djeluje nizvodno od Smo, logično je da će njena onkogene aktivnost poništiti bilo kakvu inhibiciju na uzvodnim razinama signalnog puta. Dokaz aktivnosti puta i nemogućnost inhibicije uzvodno od GSK3 β usmjerilo je

istraživanje prema inhibiciji kinaze GSK3 β . Za to je korišten litij-klorid, koji je, kako je opisano u uvodu, specifičan inhibitor ove kinaze (Jope, 2003). Inhibicija GSK3 β značajno je smanjila stopu proliferacije i sposobnost stvaranja kolonija kod obje stanične linije, što je potvrdilo ključnu ulogu GSK3 β u rastu i tumorigeničnom potencijalu ovih stanica (Slika 4.7 i Slika 4.8). Zanimljivo je da je inhibicija GSK3 β imala direktan utjecaj na Hh-Gli signalni put, koji je posljedično bio utišan (Slika 4.9). To je bio direktan dokaz o promjenjenoj funkciji ove kinaze. Njenom inhibicijom u zdravim stanicama došlo bi do aktivacije signalnog puta, pošto u takvim uvjetima GSK3 β ima ulogu negativnog regulatora signalnog puta (Tempe i sur., 2006). Na proteinskoj razini pokazalo se da uzrok utišavanja signalnog puta leži u pojačanom procesiranju Gli3 u represorski oblik (Slika 4.10). Dok su kod netretiranih stanica prisutni i aktivatorski i represorski oblik Gli3, nakon inhibicije GSK3 β udio aktivatorskog oblika se drastično smanjuje, dok udio represorskog oblika raste. Gli3R tada inhibira signalni put te sve druge gene pod njegovom kontrolom te je vjerojatno to uzrok smanjenja proliferacije i tumorigeničnog potencijala stanica. Dakle, inhibicija GSK3 β je pojačala procesiranje Gli3, proces direktno reguliran kinazom GSK3 β . Iz toga se može pretpostaviti da LiCl na neki način modificira funkciju kinaze GSK3 β , usljed čega se vrati određeni dio njene fiziološke funkcije. Poznato je da litij potiče inhibitornu fosforilaciju GSK3 β na Ser9, što smo i potvrdili analizom udjela proteina fosforiliranog na aminokiselini Ser9. Udio proteina fosforiliranog na aminokiselini Ser9 vidljivo se povećao s tretmanom (Slika 4.11). Iz ovih rezultata proizašla je hipoteza da se povećanjem udjela inhibitorne fosforilacije ponovno uspostavlja izgubljena ravnoteža između aktivacijske i inhibitorne fosforilacije GSK3 β , koja je neophodno za pravilno funkcioniranje kinaze. Kao što je iz literature poznato, u stanicama karcinoma debelog crijeva prevladava aktivirajuća fosforilacija GSK3 β na aminokiselini Tyr216, a fosforilacija na aminokiselini Ser9 je drastično smanjena (Shakoori i sur., 2005). Ponovno uspostavljanje dijela funkcije rezultiralo je efikasnijim procesiranjem transkripcijskog faktora Gli3. Međutim, da bi se hipoteza potvrdila, bilo je potrebno stvarno pokazati da se usljed tretmana pospješuje funkcija GSK3 β . S obzirom da je za izvršenje njene konkretne funkcije u signalnom putu Hh-Gli, fosforilaciju Gli3, potrebno stvaranje kompleksa GSK3 β -SuFu-Gli3, trebalo je potvrditi efikasnije stvaranje dotičnog kompleksa nakon tretmana. Imunofluorescencijom se prvo pratila lokalizacija proteina GSK3 β i Gli3, kako bi uvidjeli

eventualne promjene u međusobnoj lokalizaciji nakon tretmana litijem. U netretiranim stanicama, oba proteina se nalaze difuzno u stanici i oko jezgre te pokazuju bazalnu razinu kolokalizacije. Međutim, nakon tretmana litijem, kolokalizacija se pojačava te se proteini koncentriraju u specifične regije u perinuklearnom prostoru (Slika 4.12 i Slika 4.13). Moguće je da te regije predstavljaju bazalna tjelešca, iz kojih nastaje primarna cilija. Pokazano je da je procesiranje Gli3 direktno ovisno o proteinima bazalnog tjelešca, a ne same cilije (Gerdes i sur., 2009). Nakon toga, ko-immunoprecipitacijom dobivena je konačna potvrda, litij pospješuje funkciju GSK3 β , odnosno pospješuje stvaranje kompleksa GSK3 β -SuFu-Gli3 i procesiranje proteina Gli3. Ko-immunoprecipitacija je pokazala da 10 sati nakon tretmana dolazi do pojačanog stvaranja spomenutog kompleksa (Slika 4.14). Pokazana je povećana interakcija između proteina Gli3 i SuFu te proteina GSK3 β i SuFu. Poznato je da u tom kompleksu SuFu služi kao platforma koja veže Gli3 i GSK3 β te na taj način omogućuje fosforilaciju Gli3 (Kise i sur., 2009). Sama interakcija između Gli3 i GSK3 β nije detektirana pa je moguće da je ona prolazna i kratkotrajna te se zbog toga ne može detektirati. Da je SuFu ključan za procesiranje Gli3 potvrđeno je njegovim utišavanjem, koje dovodi do smanjene sposobnosti procesiranja Gli3 i nakupljanja aktivne forme Gli3A (Slika 4.16). Na Slici 5.1 shematski je prikazan pretpostavljeni tijek događaja prilikom stvaranja GSK3 β -SuFu-Gli3 kompleksa prije i nakon tretmana litijem.



Slika 5.1 Shematski prikaz djelovanja GSK3 β na procesiranje Gli3 u prisustvu i odsustvu litija. U stanicama karcinoma debelog crijeva prevladava aktivacijska fosforilacija GSK3 β (Y216). Takav protein ne može fosforilirati Gli3 te on ostaje u nepocijepanom, aktivatorskom obliku, što aktivira signalni put Hh-Gli i sve procese koje on kontrolira. Tretman litijem pospješuje inhibitornu fosforilaciju GSK3 β (S9), što uspostavlja izgubljenу ravnotežu između ta dva fosforilacijska događaja i dijelom vraća normalnu funkciju GSK3 β . Kao rezultat uspješnije je cijepanje Gli3 te njegov represorski oblik u konačnici inhibira signalni put i procese pod njegovom kontrolom, kao što je proliferacija stanica.

U jednom novijem istraživanju pokazano je da LiCl može smanjiti aktivnost Gli1 u modelu karcinoma gušterače, što potvrđuje naš nalaz direktnog utjecaja litija na signalni put Hh-Gli (Peng i sur., 2013).

Također, htjeli smo pokazati ima li razlike u odgovoru nakon različitih načina inaktivacije GSK3 β . Zato je provedeno utišavanje ove kinaze i pokazalo se da ukidanje njene ekspresije dolazi do potpuno suprotnog učinka. Naime, nakon utišavanja došlo je do porasta u ekspresiji Ptch1 proteina i do nakupljanja nepocijepanog aktivatorskog oblika Gli3, odnosno došlo je do stimulacije signalnog puta (Slika 4.15). Ovo opažanje vrlo je bitno u svjetlu razvoja budućih terapija koje bi kao ciljnu molekulu imale GSK3 β . Ovime je pokazano da samo uspostavljanje fosforilacijske ravnoteže na GSK3 β ima povoljne učinke u terapijskom smislu, dok potpuno dokidanje njene ekspresije može imati neželjene učinke.

U ovom radu također je ispitano koji je oblik stanične smrti uzrok smanjenoj proliferaciji stanica nakon tretmana litijem. Tretman litijem uzrokovao je značajan porast u stvaranju kiselih vezikularnih organela, karakterističnih za proces autofagije (Slika 4.17 A i B). Međutim da bi se potvrdilo da je povećan broj kiselih vezikula stvarno rezultat tijeka autofagije, a ne nespecifično bojanje lizosoma ili rezultat poremećenog tijeka autofagije usljed kojeg dolazi do nakupljanja ovih vezikula, potrebno je pratiti specifične markere za tijek autofagije. U ovom radu kao specifični marker pratilo se procesiranje proteina LC3-I u LC3-II (Klionsky i sur., 2012). LC3-II protein nalazi se u autofagosomima i marker je za njihov nastanak. Međutim pravi protok autofagije pokazan je nakon dodatka inhibitora lizosomalnih proteaza, što blokira lizosomalnu razgradnju, karakterističnu za autofagiju. Povećanja količine LC3-II nakon te inhibicije znak je da u istraživanom sustavu dolazi do neometanog protoka autofagije, jer nakon inhibicije lizosomalnih proteaza dolazi do nakupljanja LC3-II koji se inače razgradi u funkcionalnom sistemu (Slika 4.18). Potrebno je, međutim, još ispitati je li aktivacija autofagije posljedica djelovanja samog litija, za kojeg postoje naznake da može inducirati autofagiju preko inhibicije inositol monofosfataze ili je direktni rezultat inhibicije signalnog puta Hh-Gli. Iako do danas ima malo istraživanja koja se bave ulogom signalnog puta Hh-Gli u regulaciji autofagije, dvije novije publikacije daju naznake da bi ovaj signalni put mogao biti uključen u regulaciju autofagije. Jedna skupina autora pokazala je da regulacija ide preko transkripcijskog faktora Gli2, dok druga skupina autora navodi da je Gli1 glavni regulator (Jimenez-Sanchez i sur., 2012; Wang i sur., 2013b). Ovi rezultati upućuju na mogućnost regulacije autofagije preko Gli3, međutim tu mogućnost trebalo bi detaljnije ispitati u nastavku ovog istraživanja.

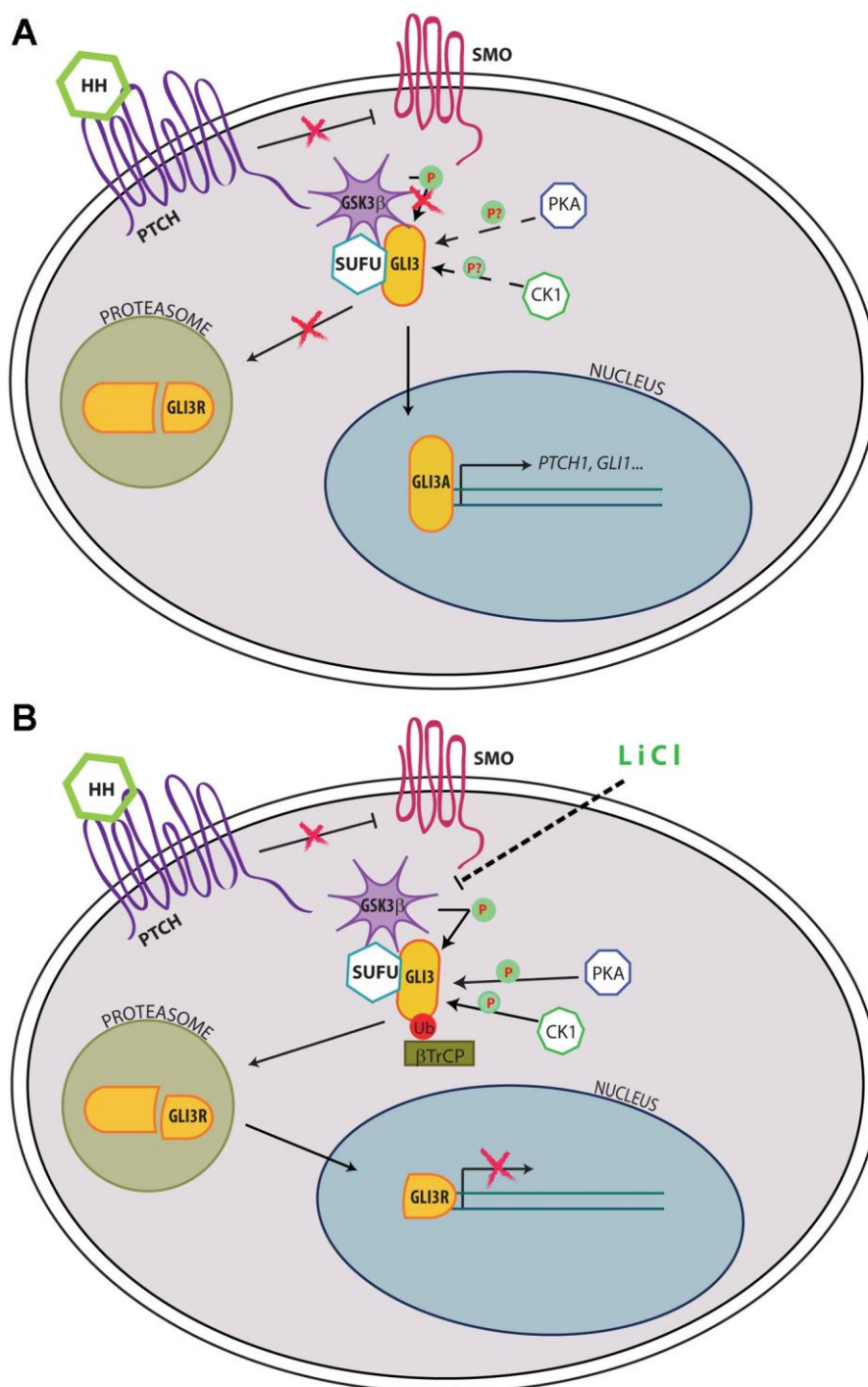
Iako je autofagija evolucijski očuvan proces koji omogućava preživljenje stanica u stresnim uvjetima, danas je poznato da može sudjelovati i u procesu stanične smrti (Eisenberg-Lerner i Kimchi, 2009). U ovom modelu, autofagija je rezultirala staničnom smrti, zbog očitog smanjenja proliferacije stanica i indukcije apoptoze. U staničnoj liniji SW480 je uz autofagiju nedvojbeno pokazana i aktivacija apoptoze (Slika 4.19A), što može značiti da autofagija proizvodi energiju za provođenje apoptoze ili surađuje s apoptozom u izvršenju stanične smrti (Eisenberg-Lerner i sur., 2009). Za represorski oblik Gli3 (Gli3R) je već prije pokazano da

može pokrenuti apoptozu u stanicama karcinoma debelog crijeva (Varnat i sur., 2009). Što se tiče stanične linije SW620, primijećeno je cijepanje proteina PARP pri najvišoj koncentraciji LiCl, međutim nije detektirano cijepanje kaspaze-3 (Slika 4.19B). To ne znači da apoptoze nema u ovim stanicama, ali moguće je da se PARP cijepa pomoću neke druge kaspaze koja ovdje nije testirana (Germain i sur., 1999), ili da se cijepa neovisno o kaspazama (Masdehors i sur., 2000). Aktivaciju apoptoze u staničnoj liniji SW620 potrebno je još dodatno istražiti.

Ovim radom pokazano je da poremećena funkcija kinaze GSK3 β direktno utječe na signalni put Hh-Gli. Dolazi do aktivacije signalnog puta, jer deregulirana kinaza GSK3 β ima smanjenu sposobnost fosforilacije transkripcijskog faktora Gli3, zbog čega se on ne procesira i potiče aktivaciju samog signalnog puta, ali i svih procesa koje on kontrolira, kao što je proliferacija stanica, inhibicija apoptoze, migracija. Ovim radom je također pokazano da je kinaza GSK3 β vrlo zanimljiva meta za razvoj novih terapija, s obzirom da njena inhibicija litijem utišala signalni put Hh-Gli i dovela do smanjene proliferacije stanica te aktivirala apoptozu i autofagiju. S obzirom da je utišavanje kinaze GSK3 β , uzrokovalo potpuno suprotan efekt, aktivaciju signalnog puta Hh-Gli, može se zaključiti da nije svejedno na koji će se način djelovati na kinazu GSK3 β u tumorima u kojima je njena funkcija poremećena. Aktivacija signalnog puta Hh-Gli nakon utišavanja GSK3 β u konačnici može dovesti do neželjenog ishoda. Rezultati dobiveni u ovom radu govore u prilog uspostavljanja izgubljene fosforilacijske ravnoteže GSK3 β , poticanjem inhibitorne fosforilacije GSK3 β na aminokiselini Ser9, čime se ponovno uspostavlja normalna funkcija kinaze. Do nedavno je litij bio jedini poznati element koji potiče fosforilaciju na poziciji Ser9. Iako se litij već koristi u liječenju drugih bolesti, kao što je bipolarni poremećaj (Jope i sur., 2007), problem je što se u uvjetima *in vitro* za testiranje na tumorskim stanicama koristi u koncentracijama koje su više od onih koje su korištene u pacijentima. Međutim, nedavno je objavljen spoj CG0009 koji također inducira fosforilaciju GSK3 β na poziciji Ser9, a koristi se u mnogo manjim koncentracijama od litija. Testiran je na stanicama raka dojke u kojima dovodi do stanične smrti (Kim i sur., 2013) te bi bilo zanimljivo učinkovitost takvih spojeva ispitati i a drugim tumorskim modelima kao i *in vivo*.

S obzirom da je ovim radom pokazano da je signalni put Hh-Gli sudjeluje u izvršavanju onkogene funkcije GSK3 β u stanicama karcinoma debelog crijeva, potencijalno zanimljiva strategija liječenja mogla bi biti i blokiranje ovog signalnog puta. Međutim, s obzirom da aktivacija ide putem GSK3 β , i u radu je pokazano da inhibicija na uzvodnim komponentama (Smo) nema učinka, trebalo bi djelovati na komponente signalnog puta koje se nalaze nizvodno, kao što su transkripcijski faktori Gli. Ovaj rad je također pokazao da je glavni efektor signalnog puta u ovim stanicama Gli3, te time potvrđuje aktivatorski kapacitet ovog proteina, koji se sve više istražuje. Bilo bi zanimljivo vidjeti potencijalne učinke inhibicije transkripcijskog aktivatora Gli3 na ovim stanicama, međutim do danas još nije razvijen inhibitor ovog proteina.

Na temelju dobivenih rezultata u ovom radu predlažem model signalnog puta Hh-Gli u stanicama karcinoma debelog crijeva koji je prikazan na Slici 5.2. U stanicama karcinoma debelog crijeva, deregulirana funkcija protein-kinaze GSK3 β direktno utječe na aktivaciju signalnog puta Hh-Gli. Takva protein-kinaza ima smanjenu sposobnost obilježavanja transkripcijskog faktora Gli3 za procesiranje u transkripcijski represor, zbog čega velik dio tog proteina ostaje u obliku transkripcijskog aktivatora. Gli3 kao transkripcijski aktivator potiče aktivaciju signalnog puta Hh-Gli kao i aktivaciju procesa koje on kontrolira. Litij, kao specifični inhibitor protein-kinaze GSK3 β , potiče fosforilaciju GSK3 β na poziciji Ser9, što se pokazalo kao ključni korak za ispravljanje funkcije ove kinaze. Naime, nakon tretmana litijem dolazi do pojačanog procesiranja proteina Gli3 u transkripcijski represor, što rezultira inhibicijom signalnog puta Hh-Gli, a posljedično i smanjenom proliferacijom te staničnom smrti. Treba naglasiti da u staničnom modelu karcinoma debelog crijeva glavnu efektorsku ulogu u signalnom putu Hh-Gli ima transkripcijski faktor Gli3, dosada najslabije istraženi transkripcijski faktor iz obitelji proteina Gli. Iako je uvriježeno mišljenje da Gli3 uglavnom ima represorsku ulogu u ovom signalnom putu, ovim istraživanjem doprinosi se rastućem interesu za aktivatorske mogućnosti transkripcijskog faktora Gli3.



Slika 5.2 Predloženi model provođenja signala Hh-Gli u stanicama karcinoma debelog crijeva. (A) U stanicama karcinoma debelog crijeva deregulirana kinaza GSK3 β uzrokuje aktivaciju signalnog puta. (B) Inhibicija GSK3 β litijem potiče procesiranje Gli3 u represorski oblik i utišavanje signalnog puta.

6. ZAKLJUČCI

Na temelju rezultata koji su dobiveni u ovom radu mogu se izvesti sljedeći zaključci:

1. Signalni put Hh-Gli aktivan je u staničnim linijama karcinoma debelog crijeva SW480 i SW620: prisutna je genska i proteinska ekspresija svih glavnih komponenti signalnog puta (Shh, Ptch1, Smo, SuFu, GSK3 β , Gli1, Gli2 i Gli3), a put je moguće dodatno stimulirati agonistom.
2. Signalni put Hh-Gli u ovim staničnim linijama aktiviran je zbog deregulirane funkcije GSK3 β : inhibicija signalnog puta uzvodno od GSK3 β je neefikasna, a inhibicija GSK3 β smanjuje aktivnost signalnog puta.
3. Inhibicija GSK3 β litijem dovodi do pojačanog cijepanja transkripcijskog faktora Gli3 na represorski oblik, što smanjuje aktivnost signalnog puta.
4. Inhibicija GSK3 β litijem smanjuje proliferaciju i tumorigenični potencijal stanica.
5. Litij potiče inhibitornu fosforilaciju kinaze GSK3 β , što utječe na njenu funkciju i rezultira pojačanim stvaranjem kompleksa GSK3 β -SuFu-Gli3 te procesiranjem Gli3 na represorski oblik.
6. Dokidanje ekspresije kinaze GSK3 β rezultira dodatnom stimulacijom signalnog puta Hh-Gli.
7. Tretman staničnih linija karcinoma debelog crijeva litijem aktivira autofagiju i apoptozu.

7. LITERATURA

Aberger, F., Ruiz i Altaba, A. (2014). Context-dependent signal integration by the GLI code: The oncogenic load, pathways, modifiers and implications for cancer therapy. *Semin. Cell Dev. Biol.* *33*, 93–104.

Amakye, D., Jagani, Z., Dorsch, M. (2013). Unraveling the therapeutic potential of the Hedgehog pathway in cancer. *Nat. Med.* *19*, 1410–1422.

Bai, C.B., Auerbach, W., Lee, J.S., Stephen, D., Joyner, A.L. (2002). Gli2, but not Gli1, is required for initial Shh signaling and ectopic activation of the Shh pathway. *Dev. Camb. Engl.* *129*, 4753–4761.

Bailey, J.M., Swanson, B.J., Hamada, T., Eggers, J.P., Caffery, T., Ouellette, M.M., Hollingsworth, M.A. (2008). Sonic hedgehog promotes desmoplasia in pancreatic cancer. *Clin. Cancer Res.* *14*, 5995–6004.

Barakat, M.T., Humke, E.W., Scott, M.P. (2010). Learning from Jekyll to control Hyde: Hedgehog signaling in development and cancer. *Trends Mol. Med.* *16*, 337–348.

Berman, D.M., Karhadkar, S.S., Maitra, A., Montes De Oca, R., Gerstenblith, M.R., Briggs, K., Parker, A.R., Shimada, Y., Eshleman, J.R., Watkins, D.N., i sur. (2003). Widespread requirement for Hedgehog ligand stimulation in growth of digestive tract tumours. *Nature* *425*, 846–851.

Bilim, V., Ougolkov, A., Yuuki, K., Naito, S., Kawazoe, H., Muto, A., Oya, M., Billadeau, D., Motoyama, T., Tomita, Y. (2009). Glycogen synthase kinase-3: a new therapeutic target in renal cell carcinoma. *Br. J. Cancer* *101*, 2005–2014.

Binns, W., James, L.F., Shupe, J.L., Everett, G. (1963). A congenital cyclopi-an-type malformation in lambs induced by maternal ingestion of a range plant, *Veratrum californicum*. *Am. J. Vet. Res.* *24*, 1164–1175.

Bogaert, J., Prenen, H. (2014). Molecular genetics of colorectal cancer. *Ann. Gastroenterol.* *27*, 9–14.

Van den Brink, G.R. (2007). Hedgehog signaling in development and homeostasis of the gastrointestinal tract. *Physiol. Rev.* *87*, 1343–1375.

Briscoe, J., Théron, P.P. (2013). The mechanisms of Hedgehog signalling and its roles in development and disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *14*, 418–431.

Buller, N.V.J.A., Rosekrans, S.L., Westerlund, J., van den Brink, G.R. (2012). Hedgehog signaling and maintenance of homeostasis in the intestinal epithelium. *Physiology* *27*, 148–155.

- Burke, R., Nellen, D., Bellotto, M., Hafen, E., Senti, K.A., Dickson, B.J., Basler, K. (1999). Dispatched, a novel sterol-sensing domain protein dedicated to the release of cholesterol-modified Hedgehog from signaling cells. *Cell* **99**, 803–815.
- Cao, Q., Lu, X., Feng, Y.-J. (2006). Glycogen synthase kinase-3 β positively regulates the proliferation of human ovarian cancer cells. *Cell Res.* **16**, 671–677.
- Carney, T.J., Ingham, P.W. (2013). Drugging Hedgehog: signaling the pathway to translation. *BMC Biol.* **11**, 37.
- Carpenter, D., Stone, D.M., Brush, J., Ryan, A., Armanini, M., Frantz, G., Rosenthal, A., De Sauvage, F.J. (1998). Characterization of two Patched receptors for the vertebrate Hedgehog protein family. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 13630–13634.
- Chatel, G., Ganef, C., Boussif, N., Delacroix, L., Briquet, A., Nolens, G., Winkler, R. (2007). Hedgehog signaling pathway is inactive in colorectal cancer cell lines. *Int. J. Cancer* **121**, 2622–2627.
- Chen, Y., Jiang, J. (2013). Decoding the phosphorylation code in Hedgehog signal transduction. *Cell Res.* **23**, 186–200.
- Chen, Y., Struhl, G. (1996). Dual roles for Patched in sequestering and transducing Hedgehog. *Cell* **87**, 553–563.
- Chen, J.K., Taipale, J., Cooper, M.K., Beachy, P.A. (2002a). Inhibition of Hedgehog signaling by direct binding of cyclopamine to Smoothed. *Genes Dev.* **16**, 2743–2748.
- Chen, J.K., Taipale, J., Young, K.E., Maiti, T., Beachy, P.A. (2002b). Small molecule modulation of Smoothed activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 14071–14076.
- Cheng, S.Y., Bishop, J.M. (2002). Suppressor of Fused represses Gli-mediated transcription by recruiting the SAP18-mSin3 corepressor complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 5442–5447.
- Cherry, A.L., Finta, C., Karlström, M., Jin, Q., Schwend, T., Astorga-Wells, J., Zubarev, R.A., Del Campo, M., Criswell, A.R., de Sanctis, D., i sur. (2013). Structural basis of SUFU–GLI interaction in human Hedgehog signalling regulation. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **69**, 2563–2579.
- Clement, V., Sanchez, P., de Tribolet, N., Radovanovic, I., Ruiz i Altaba, A. (2007). HEDGEHOG-GLI1 signaling regulates human glioma growth, cancer stem cell self-renewal, and tumorigenicity. *Curr. Biol. CB* **17**, 165–172.
- Cohen, Y., Chetrit, A., Sirota, P., Modan, B. (1998). Cancer morbidity in psychiatric patients: influence of lithium carbonate treatment. *Med. Oncol.* **15**, 32–36.
- Cooper, G.M. (2000). *The Cell: A molecular approach* (USA: Sinauer Associates).

- Cooper, M.K., Porter, J.A., Young, K.E., Beachy, P.A. (1998). Teratogen-mediated inhibition of target tissue response to Shh signaling. *Science* **280**, 1603–1607.
- Corbit, K.C., Aanstad, P., Singla, V., Norman, A.R., Stainier, D.Y.R., Reiter, J.F. (2005). Vertebrate Smoothed functions at the primary cilium. *Nature* **437**, 1018–1021.
- Cordero, D., Marcucio, R., Hu, D., Gaffield, W., Tapadia, M., Helms, J.A. (2004). Temporal perturbations in Sonic hedgehog signaling elicit the spectrum of holoprosencephaly phenotypes. *J. Clin. Invest.* **114**, 485–494.
- Curis Inc. (2010). Curis announces Genentech’s phase II clinical trial results of GDC-0449 in combination with Avastin(R) and chemotherapy in first-line metastatic colorectal cancer (NASDAQ:CRIS).
- Dai, P., Akimaru, H., Tanaka, Y., Maekawa, T., Nakafuku, M., Ishii, S. (1999). Sonic Hedgehog-induced activation of the *Gli1* promoter is mediated by GLI3. *J. Biol. Chem.* **274**, 8143–8152.
- Dajani, R., Fraser, E., Roe, S.M., Young, N., Good, V., Dale, T.C., Pearl, L.H. (2001). Crystal structure of Glycogen synthase kinase 3 beta: structural basis for phosphate-primed substrate specificity and autoinhibition. *Cell* **105**, 721–732.
- Denef, N., Neubüser, D., Perez, L., Cohen, S.M. (2000). Hedgehog induces opposite changes in turnover and subcellular localization of Patched and Smoothed. *Cell* **102**, 521–531.
- Doble, B., Woodgett, J.R. (2003). GSK-3: tricks of the trade for a multi-tasking kinase. *J. Cell Sci.* **116**, 1175–1186.
- Douard, R., Moutereau, S., Pernet, P., Chimingqi, M., Allory, Y., Manivet, P., Conti, M., Vaubourdolle, M., Cugnenc, P.-H., Loric, S. (2006). Sonic Hedgehog-dependent proliferation in a series of patients with colorectal cancer. *Surgery* **139**, 665–670.
- Dunaeva, M. (2002). Characterization of the physical interaction of Gli proteins with SUFU proteins. *J. Biol. Chem.* **278**, 5116–5122.
- Earnshaw, W.C., Martins, L.M., Kaufmann, S.H. (1999). Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu. Rev. Biochem.* **68**, 383–424.
- Eichberger, T., Regl, G., Ikram, M.S., Neill, G.W., Philpott, M.P., Aberger, F., Frischauf, A.-M. (2004). FOXE1, a new transcriptional target of GLI2 is expressed in human epidermis and basal cell carcinoma. *J. Invest. Dermatol.* **122**, 1180–1187.
- Eisenberg-Lerner, A., Kimchi, A. (2009). The paradox of autophagy and its implication in cancer etiology and therapy. *Apoptosis* **14**, 376–391.
- Eisenberg-Lerner, A., Bialik, S., Simon, H.U., Kimchi, A. (2009). Life and death partners: apoptosis, autophagy and the cross-talk between them. *Cell Death Differ.* **16**, 966–975.

- Erdal, E., Ozturk, N., Cagatay, T., Eksioglu-Demiralp, E., Ozturk, M. (2005). Lithium-mediated downregulation of PKB/Akt and cyclin E with growth inhibition in hepatocellular carcinoma cells. *Int. J. Cancer* *115*, 903–910.
- Faigle, R., Song, H. (2013). Signaling mechanisms regulating adult neural stem cells and neurogenesis. *Biochim. Biophys. Acta* *1830*, 2435–2448.
- Fan, L., Pepicelli, C.V., Dibble, C.C., Catbagan, W., Zarycki, J.L., Laciak, R., Gipp, J., Shaw, A., Lamm, M.L.G., Munoz, A., i sur. (2004). Hedgehog signaling promotes prostate xenograft tumor growth. *Endocrinology* *145*, 3961–3970.
- Fearon, E.R., Vogelstein, B. (1990). A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* *61*, 759–767.
- Frame, S., Cohen, P. (2001). GSK3 takes centre stage more than 20 years after its discovery. *Biochem. J.* *359*, 1–16.
- Frank-Kamenetsky, M., Zhang, X.M., Bottega, S., Guicherit, O., Wichterle, H., Dudek, H., Bumcrot, D., Wang, F.Y., Jones, S., Shulok, J., i sur. (2002). Small-molecule modulators of Hedgehog signaling: identification and characterization of Smoothed agonists and antagonists. *J. Biol.* *1*, 10.
- Gerdes, J.M., Davis, E.E., Katsanis, N. (2009). The vertebrate primary cilium in development, homeostasis, and disease. *Cell* *137*, 32–45.
- Germain, M., Affar, E.B., D'Amours, D., Dixit, V.M., Salvesen, G.S., Poirier, G.G. (1999). Cleavage of automodified poly (ADP-ribose) polymerase during apoptosis Evidence for involvement of caspase-7. *J. Biol. Chem.* *274*, 28379–28384.
- Gojević, A. (2011). Ekspresija izoformi onkogeni Gli u sporadičnim karcinomima debelog crijeva. Doktorski rad. Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet, Biološki odsjek.
- Grimes, C.A., Jope, R.S. (2001). The multifaceted roles of Glycogen synthase kinase 3beta in cellular signaling. *Prog. Neurobiol.* *65*, 391–426.
- Hahn, H., Wicking, C., Zaphiropoulos, P.G., Gailani, M.R., Shanley, S., Chidambaram, A., Vorechovsky, I., Holmberg, E., Unden, A.B., Gillies, S., i sur. (1996). Mutations of the human homolog of *Drosophila patched* in the nevoid basal cell carcinoma syndrome. *Cell* *85*, 841–851.
- Heretsch, P., Tzagkaroulaki, L., Giannis, A. (2010). Cyclopamine and Hedgehog signaling: chemistry, biology, medical perspectives. *Angew. Chem. Int. Ed.* *49*, 3418–3427.
- Hooper, J.E., Scott, M.P. (2005). Communicating with Hedgehogs. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *6*, 306–317.

- Hrvatski Zavod za Javno Zdravstvo (2011). Incidencija raka u Hrvatskoj (Zagreb).
- Hui, C., Angers, S. (2011). Gli Proteins in development and disease. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* *27*, 513–537.
- Hui, M., Cazet, A., Nair, R., Watkins, D.N., O’Toole, S.A., Swarbrick, A. (2013). The Hedgehog signalling pathway in breast development, carcinogenesis and cancer therapy. *Breast Cancer Res.* *15*, 203.
- Humke, E.W., Dorn, K.V., Milenkovic, L., Scott, M.P., Rohatgi, R. (2010). The output of Hedgehog signaling is controlled by the dynamic association between Suppressor of Fused and the Gli proteins. *Genes Dev.* *24*, 670–682.
- Huntzicker, E.G. (2006). Dual degradation signals control Gli protein stability and tumor formation. *Genes Dev.* *20*, 276–281.
- Ingham, P.W. (2001). Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles. *Genes Dev.* *15*, 3059–3087.
- Ingham, P.W., Nakano, Y., Seger, C. (2011). Mechanisms and functions of Hedgehog signalling across the metazoa. *Nat. Rev. Genet.* *12*, 393–406.
- Iwasaki, H., Nakano, K., Shinkai, K., Kunisawa, Y., Hirahashi, M., Oda, Y., Onishi, H., Katano, M. (2013). Hedgehog Gli3 activator signal augments tumorigenicity of colorectal cancer via upregulation of adherence-related genes. *Cancer Sci.* *104*, 328–336.
- Jeong, J., McMahon, A.P. (2002). Cholesterol modification of Hedgehog family proteins. *J. Clin. Invest.* *110*, 591–596.
- Jia, J., Jiang, J. (2006). Decoding the Hedgehog signal in animal development. *Cell. Mol. Life Sci.* *63*, 1249–1265.
- Jimenez-Sanchez, M., Menzies, F.M., Chang, Y.-Y., Simecek, N., Neufeld, T.P., Rubinsztein, D.C. (2012). The Hedgehog signalling pathway regulates autophagy. *Nat. Commun.* *3*, 1200.
- Jögi, A., Abel, F., Sjöberg, R.M., Toftgård, R., Zaphiropoulos, P.G., Pålman, S., Martinsson, T., Axelson, H. (2000). *Patched 2*, located in 1p32-34, is not mutated in high stage neuroblastoma tumors. *Int. J. Oncol.* *16*, 943–949.
- Johnson, R.L., Rothman, A.L., Xie, J., Goodrich, L.V., Bare, J.W., Bonifas, J.M., Quinn, A.G., Myers, R.M., Cox, D.R., Epstein, E.H.J., i sur. (1996). Human homolog of *patched*, a candidate gene for the Basal cell nevus syndrome. *Science* *272*, 1668–1671.
- Johnson, R.L., Milenkovic, L., Scott, M.P. (2000). *In vivo* functions of the Patched protein: requirement of the C terminus for target gene inactivation but not Hedgehog sequestration. *Mol. Cell* *6*, 467–478.

- Jope, R.S. (2003). Lithium and GSK-3: one inhibitor, two inhibitory actions, multiple outcomes. *Trends Pharmacol. Sci.* **24**, 441–443.
- Jope, R.S., Johnson, G.V.. (2004). The glamour and gloom of glycogen synthase kinase-3. *Trends Biochem. Sci.* **29**, 95–102.
- Jope, R.S., Yuskaitis, C.J., Beurel, E. (2007). Glycogen synthase kinase-3 (GSK3): inflammation, diseases, and therapeutics. *Neurochem. Res.* **32**, 577–595.
- Kallassy, M., Toftgaard, R., Ueda, M., Nakazawa, K., Vörechovsky, I., Yamasaki, H., Nakazawa, H. (1997). Patched (*ptch*)-associated preferential expression of Smoothed (*smoh*) in human basal cell carcinoma of the skin. *Cancer Res.* **57**, 4731–4735.
- Kameda, C., Nakamura, M., Tanaka, H., Yamasaki, A., Kubo, M., Tanaka, M., Onishi, H., Katano, M. (2010). Oestrogen receptor- α contributes to the regulation of the hedgehog signalling pathway in ER α -positive gastric cancer. *Br. J. Cancer* **102**, 738–747.
- Kang, H.N., Oh, S.C., Kim, J.S., Yoo, Y.A. (2011). Abrogation of Gli3 expression suppresses the growth of colon cancer cells via activation of p53. *Exp. Cell Res.* **318**, 539–549.
- Karhadkar, S.S., Bova, G.S., Abdallah, N., Dhara, S., Gardner, D., Maitra, A., Isaacs, J.T., Berman, D.M., Beachy, P.A. (2004). Hedgehog signalling in prostate regeneration, neoplasia and metastasis. *Nature* **431**, 707–712.
- Kasper, M., Regl, G., Frischauf, A.M., Aberger, F. (2006). GLI transcription factors: mediators of oncogenic Hedgehog signalling. *Eur. J. Cancer* **42**, 437–445.
- Kasperczyk, H., Baumann, B., Debatin, K.-M., Fulda, S. (2009). Characterization of *sonic hedgehog* as a novel NF-kappaB target gene that promotes NF-kappaB-mediated apoptosis resistance and tumor growth in vivo. *FASEB J.* **23**, 21–33.
- Katoh, Y., Katoh, M. (2009). Hedgehog target genes: mechanisms of carcinogenesis induced by aberrant hedgehog signaling activation. *Curr. Mol. Med.* **9**, 873–886.
- Kim, H.M., Kim, C.-S., Lee, J.-H., Jang, S.J., Hwang, J.J., Ro, S., Choi, J. (2013). CG0009, a novel Glycogen synthase kinase 3 inhibitor, induces cell death through Cyclin D1 depletion in breast cancer cells. *PLoS ONE* **8**, e60383.
- Kinzler, K.W., Vogelstein, B. (1990). The *GLI* gene encodes a nuclear protein which binds specific sequences in the human genome. *Mol. Cell. Biol.* **10**, 634–642.
- Kinzler, K., Bigner, S., Bigner, D., Trent, J., Law, M., O'Brien, S., Wong, A., Vogelstein, B. (1987). Identification of an amplified, highly expressed gene in a human glioma. *Science* **236**, 70–73.
- Kinzler, K.W., Ruppert, J.M., Bigner, S.H., Vogelstein, B. (1988). The *GLI* gene is a member of the Kruppel family of zinc finger proteins. *Nature* **332**, 371–374.

- Kise, Y., Morinaka, A., Teglund, S., Miki, H. (2009). Sufu recruits GSK3beta for efficient processing of Gli3. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 387, 569–574.
- Klionsky, D.J. i sur. (2012). Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. *Autophagy* 8, 445–544.
- Koch, A., Waha, A., Hartmann, W., Milde, U., Goodyer, C.G., Sörensen, N., Berthold, F., Digon-Söntgerath, B., Krätzschar, J., Wiestler, O.D., i sur. (2004). No evidence for mutations or altered expression of the Suppressor of Fused gene (*SUFU*) in primitive neuroectodermal tumours. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 30, 532–539.
- Kogerman, P., Grimm, T., Kogerman, L., Krause, D., Undén, A.B., Sandstedt, B., Toftgård, R., Zaphiropoulos, P.G. (1999). Mammalian suppressor-of-fused modulates nuclear-cytoplasmic shuttling of Gli-1. *Nat. Cell Biol.* 1, 312–319.
- Kunnimalaiyaan, M., Vaccaro, A.M., Ndiaye, M.A., Chen, H. (2007). Inactivation of glycogen synthase kinase-3beta, a downstream target of the raf-1 pathway, is associated with growth suppression in medullary thyroid cancer cells. *Mol. Cancer Ther.* 6, 1151–1158.
- Levanat, S., Gorlin, R.J., Fallet, S., Johnson, D.R., Fantasia, J.E., Bale, A.E. (1996). A two-hit model for developmental defects in Gorlin syndrome. *Nat. Genet.* 12, 85–87.
- Li, C., Heidt, D.G., Dalerba, P., Burant, C.F., Zhang, L., Adsay, V., Wicha, M., Clarke, M.F., Simeone, D.M. (2007). Identification of pancreatic cancer stem cells. *Cancer Res.* 67, 1030–1037.
- Liu, S., Dontu, G., Mantle, I.D., Patel, S., Ahn, N., Jackson, K.W., Suri, P., Wicha, M.S. (2006). Hedgehog signaling and Bmi-1 regulate self-renewal of normal and malignant human mammary stem cells. *Cancer Res.* 66, 6063–6071.
- Low, J.A., de Sauvage, F.J. (2010). Clinical experience with Hedgehog pathway inhibitors. *J. Clin. Oncol.* 28, 5321–5326.
- Luo, J. (2009). Glycogen synthase kinase 3 β (GSK3 β) in tumorigenesis and cancer chemotherapy. *Cancer Lett.* 273, 194–200.
- Ma, X., Sheng, T., Zhang, Y., Zhang, X., He, J., Huang, S., Chen, K., Sultz, J., Adegboyega, P.A., Zhang, H., i sur. (2006). Hedgehog signaling is activated in subsets of esophageal cancers. *Int. J. Cancer* 118, 139–148.
- Di Marcotullio, L., Ferretti, E., Greco, A., De Smaele, E., Po, A., Sico, M.A., Alimandi, M., Giannini, G., Maroder, M., Screpanti, I., i sur. (2006). Numb is a suppressor of Hedgehog signalling and targets Gli1 for Itch-dependent ubiquitination. *Nat. Cell Biol.* 8, 1415–1423.
- , V., Carrillo, G., Torroja, C., Guerrero, I. (2001). The sterol-sensing domain of Patched protein seems to control Smoothened activity through Patched vesicular trafficking. *Curr. Biol.* 11, 601–607.

- Masdehors, P., Glaisner, S., Maciorowski, Z., Magdelenat, H., Delic, J. (2000). Ubiquitin-dependent protein processing controls radiation-induced apoptosis through the N-End rule pathway. *Exp. Cell Res.* *257*, 48–57.
- Mazor, M., Kawano, Y., Zhu, H., Waxman, J., Kypta, R.M. (2004). Inhibition of glycogen synthase kinase-3 represses androgen receptor activity and prostate cancer cell growth. *Oncogene* *23*, 7882–7892.
- Mazumdar, T., DeVecchio, J., Shi, T., Jones, J., Agyeman, A., Houghton, J.A. (2011). Hedgehog signaling drives cellular survival in human colon carcinoma cells. *Cancer Res.* *71*, 1092–1102.
- Meijer, L., Flajolet, M., Greengard, P. (2004). Pharmacological inhibitors of glycogen synthase kinase 3. *Trends Pharmacol. Sci.* *25*, 471–480.
- Merchant, M., Vajdos, F.F., Ultsch, M., Maun, H.R., Wendt, U., Cannon, J., Desmarais, W., Lazarus, R.A., De Vos, A.M., De Sauvage, F.J. (2004). Suppressor of fused regulates Gli activity through a dual binding mechanism. *Mol. Cell. Biol.* *24*, 8627–8641.
- Mizushima, N. (2007). Autophagy: process and function. *Genes Dev.* *21*, 2861–2873.
- Mukherjee, S., Frolova, N., Sadlonova, A., Novak, Z., Steg, A., Page, G.P., Welch, D.R., Lobo-Ruppert, S.M., Ruppert, J.M., Johnson, M.R., et al. (2006). Hedgehog signaling and response to cyclopamine differ in epithelial and stromal cells in benign breast and breast cancer. *Cancer Biol. Ther.* *5*, 674–683.
- Murone, M., Rosenthal, A., de Sauvage, F.J. (1999). Hedgehog signal transduction: from flies to vertebrates. *Exp. Cell Res.* *253*, 25–33.
- Nolan-Stevaux, O., Lau, J., Truitt, M.L., Chu, G.C., Hebrok, M., Fernández-Zapico, M.E., Hanahan, D. (2009). GLI1 is regulated through Smoothed-independent mechanisms in neoplastic pancreatic ducts and mediates PDAC cell survival and transformation. *Genes Dev.* *23*, 24–36.
- Nowicki, M.O., Dmitrieva, N., Stein, A.M., Cutter, J.L., Godlewski, J., Saeki, Y., Nita, M., Berens, M.E., Sander, L.M., Newton, H.B. (2008). Lithium inhibits invasion of glioma cells; possible involvement of glycogen synthase kinase-3. *Neuro-Oncol.* *10*, 690–699.
- Nüsslein-Volhard, C., Wieschaus, E. (1980). Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature* *287*, 795–801.
- Ogden, S.K., Ascano, M., Jr, Stegman, M.A., Robbins, D.J. (2004). Regulation of Hedgehog signaling: a complex story. *Biochem. Pharmacol.* *67*, 805–814.
- Omenetti, A., Choi, S., Michelotti, G., Diehl, A.M. (2011). Hedgehog signaling in the liver. *J. Hepatol.* *54*, 366–373.

- Onishi, H., Katano, M. (2011). Hedgehog signaling pathway as a therapeutic target in various types of cancer. *Cancer Sci.* *102*, 1756–1760.
- Ougolkov, A.V., Fernandez-Zapico, M.E., Savoy, D.N. (2005). Glycogen synthase kinase-3 beta participates in Nuclear Factor kappa B-mediated gene transcription and cell survival in pancreatic cancer cells. *Cancer Res.* *65*, 2076–2081.
- Pan, Y., Bai, C.B., Joyner, A.L., Wang, B. (2006). Sonic hedgehog signaling regulates Gli2 transcriptional activity by suppressing its processing and degradation. *Mol. Cell. Biol.* *26*, 3365–3377.
- Pandey, G.N., Dwivedi, Y., Rizavi, H.S., Teppen, T., Gaszner, G.L., Roberts, R.C., Conley, R.R. (2009). GSK-3beta gene expression in human postmortem brain: regional distribution, effects of age and suicide. *Neurochem. Res.* *34*, 274–285.
- Pathi, S., Pagan-Westphal, S., Baker, D.P., Garber, E.A., Rayhorn, P., Bumcrot, D., Tabin, C.J., Blake Pepinsky, R., Williams, K.P. (2001). Comparative biological responses to human Sonic, Indian, and Desert hedgehog. *Mech. Dev.* *106*, 107–117.
- Pavletich, N.P., Pabo, C.O. (1993). Crystal structure of a five-finger GLI-DNA complex: new perspectives on zinc fingers. *Science* *261*, 1701–1707.
- Peng, Z., Ji, Z., Mei, F., Lu, M., Ou, Y., Cheng, X. (2013). Lithium inhibits tumorigenic potential of PDA cells through targeting Hedgehog-GLI signaling pathway. *PloS One* *8*, e61457.
- Pepinsky, R.B., Zeng, C., Wen, D., Rayhorn, P., Baker, D.P., Williams, K.P., Bixler, S.A., Ambrose, C.M., Garber, E.A., Miatkowski, K., i sur. (1998). Identification of a palmitic acid-modified form of human Sonic hedgehog. *J. Biol. Chem.* *273*, 14037–14045.
- Porter, J.A., Young, K.E., Beachy, P.A. (1996). Cholesterol modification of hedgehog signaling proteins in animal development. *Science* *274*, 255–259.
- Qualtrough, D., Buda, A., Gaffield, W., Williams, A.C., Paraskeva, C. (2004). Hedgehog signalling in colorectal tumour cells: induction of apoptosis with cyclopamine treatment. *Int. J. Cancer* *110*, 831–837.
- Ramalho-Santos, M., Melton, D.A., McMahon, A.P. (2000). Hedgehog signals regulate multiple aspects of gastrointestinal development. *Dev. Camb. Engl.* *127*, 2763–2772.
- Rask, K., Nilsson, A., Brännström, M., Carlsson, P., Hellberg, P., Janson, P.-O., Hedin, L., Sundfeldt, K. (2003). Wnt-signalling pathway in ovarian epithelial tumours: increased expression of β -catenin and GSK3 β . *Br. J. Cancer* *89*, 1298–1304.
- Regl, G., Neill, G.W., Eichberger, T., Kasper, M., Ikram, M.S., Koller, J., Hintner, H., Quinn, A.G., Frischauf, A.-M., Aberger, F. (2002). Human GLI2 and GLI1 are part of a positive feedback mechanism in Basal Cell Carcinoma. *Oncogene* *21*, 5529–5539.

- Reimers, M.S., Zeestraten, E.C.M., Kuppen, P.J.K., Liefers, G.J., van de Velde, C.J.H. (2013). Biomarkers in precision therapy in colorectal cancer. *Gastroenterol. Rep.* *1*, 166–183.
- Reinchisi, G., Parada, M., Lois, P., Oyanadel, C., Shaughnessy, R., Gonzalez, A., Palma, V. (2013). Sonic Hedgehog modulates EGFR dependent proliferation of neural stem cells during late mouse embryogenesis through EGFR transactivation. *Front. Cell. Neurosci.* *7*.
- Riobó, N.A., Lu, K., Ai, X., Haines, G.M., Emerson, C.P. (2006). Phosphoinositide 3-kinase and Akt are essential for Sonic Hedgehog signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *103*, 4505–4510.
- Robbins, D.J., Fei, D.L., Riobo, N.A. (2012). The Hedgehog signal transduction network. *Sci. Signal.* *5*, re6–re6.
- Roessler, E., Belloni, E., Gaudenz, K., Vargas, F., Scherer, S.W., Tsui, L.C., Muenke, M. (1997). Mutations in the C-terminal domain of Sonic Hedgehog cause holoprosencephaly. *Hum. Mol. Genet.* *6*, 1847–1853.
- Ruiz i Altaba, A., Mas, C., Stecca, B. (2007). The Gli code: an information nexus regulating cell fate, stemness and cancer. *Trends Cell Biol.* *17*, 438–447.
- Ruppert, J.M., Kinzler, K.W., Wong, A.J., Bigner, S.H., Kao, F.T., Law, M.L., Seunemann, H.N., O'Brien, S.J., Vogelstein, B. (1988). The GLI-Kruppel family of human genes. *Mol. Cell. Biol.* *8*, 3104–3113.
- Sabol, M., Car, D., Musani, V., Ozretic, P., Oreskovic, S., Weber, I., Levanat, S. (2012). The Hedgehog signaling pathway in ovarian teratoma is stimulated by Sonic Hedgehog which induces internalization of Patched. *Int. J. Oncol.* *41*, 1411–1418.
- Sacedón, R., Varas, A., Hernández-López, C., Gutiérrez-deFrías, C., Crompton, T., Zapata, A.G., Vicente, A. (2003). Expression of Hedgehog proteins in the human thymus. *J. Histochem. Cytochem.* *51*, 1557–1566.
- Sahebjam, S., Siu, L.L., Razak, A.A. (2012). The utility of Hedgehog signaling pathway inhibition for cancer. *The Oncologist* *17*, 1090–1099.
- Sanchez, P., Hernández, A.M., Stecca, B., Kahler, A.J., DeGueme, A.M., Barrett, A., Beyna, M., Datta, M.W., Datta, S., Ruiz i Altaba, A. (2004). Inhibition of prostate cancer proliferation by interference with SONIC HEDGEHOG-GLI1 signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 12561–12566.
- Saqui-Salces, M., Merchant, J.L. (2010). Hedgehog signaling and gastrointestinal cancer. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* *1803*, 786–795.
- Sarkar, S. (2005). Lithium induces autophagy by inhibiting inositol monophosphatase. *J. Cell Biol.* *170*, 1101–1111.

- Sasaki, H., Nishizaki, Y., Hui, C., Nakafuku, M., Kondoh, H. (1999). Regulation of Gli2 and Gli3 activities by an amino-terminal repression domain: implication of Gli2 and Gli3 as primary mediators of Shh signaling. *Development* 126, 3915–3924.
- Sato, K., Tsuchihara, K., Fujii, S., Sugiyama, M., Goya, T., Atomi, Y., Ueno, T., Ochiai, A., Esumi, H. (2007). Autophagy is activated in colorectal cancer cells and contributes to the tolerance to nutrient deprivation. *Cancer Res.* 67, 9677–9684.
- Scales, S.J., de Sauvage, F.J. (2009). Mechanisms of Hedgehog pathway activation in cancer and implications for therapy. *Trends Pharmacol. Sci.* 30, 303–312.
- Shakoori, A., Ougolkov, A., Yu, Z.W., Zhang, B., Modarressi, M.H., Billadeau, D.D., Mai, M., Takahashi, Y., Minamoto, T. (2005). Deregulated GSK3 β activity in colorectal cancer: Its association with tumor cell survival and proliferation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 334, 1365–1373.
- Shakoori, A., Mai, W., Miyashita, K., Yasumoto, K., Takahashi, Y., Ooi, A., Kawakami, K., Minamoto, T. (2007). Inhibition of GSK-3 beta activity attenuates proliferation of human colon cancer cells in rodents. *Cancer Sci.* 98, 1388–1393.
- Shi, Q., Han, Y., Jiang, J. (2014). Suppressor of fused impedes Ci/Gli nuclear import by opposing Trn/Kap β 2 in Hedgehog signaling. *J. Cell Sci.* jcs.142828.
- Sinha, S., Chen, J.K. (2006). Purmorphamine activates the Hedgehog pathway by targeting Smoothed. *Nat. Chem. Biol.* 2, 29–30.
- Smyth, I., Narang, M.A., Evans, T., Heimann, C., Nakamura, Y., Chenevix-Trench, G., Pietsch, T., Wicking, C., Wainwright, B.J. (1999). Isolation and characterization of human Patched 2 (*PTCH2*), a putative tumour suppressor gene in basal cell carcinoma and medulloblastoma on chromosome 1p32. *Hum. Mol. Genet.* 8, 291–297.
- Stecca, B., Ruiz i Altaba, A. (2009). A GLI1-p53 inhibitory loop controls neural stem cell and tumour cell numbers. *EMBO J.* 28, 663–676.
- Stecca, B., Ruiz i Altaba, A. (2010). Context-dependent Regulation of the GLI Code in Cancer by HEDGEHOG and Non-HEDGEHOG Signals. *J. Mol. Cell Biol.* 2, 84–95.
- Stecca, B., Mas, C., Clement, V., Zbinden, M., Correa, R., Piguet, V., Beermann, F., Ruiz I Altaba, A. (2007). Melanomas require HEDGEHOG-GLI signaling regulated by interactions between GLI1 and the RAS-MEK/AKT pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 5895–5900.
- Stone, D.M., Hynes, M., Armanini, M., Swanson, T.A., Gu, Q., Johnson, R.L., Scott, M.P., Pennica, D., Goddard, A., Phillips, H., i sur. (1996). The tumour-suppressor gene *patched* encodes a candidate receptor for Sonic hedgehog. *Nature* 384, 129–134.

- Stone, D.M., Murone, M., Luoh, S., Ye, W., Armanini, M.P., Gurney, A., Phillips, H., Brush, J., Goddard, A., de Sauvage, F.J., i sur. (1999). Characterization of the human suppressor of fused, a negative regulator of the zinc-finger transcription factor Gli. *J. Cell Sci.* *112 (Pt 23)*, 4437–4448.
- Svärd, J., Henricson, K.H., Persson-Lek, M., Rozell, B., Lauth, M., Bergström, A., Ericson, J., Toftgaard, R., Teglund, S. (2006). Genetic elimination of Suppressor of fused reveals an essential repressor function in the mammalian Hedgehog signaling pathway. *Dev. Cell* *10*, 187–197.
- Taipale, J., Cooper, M.K., Maiti, T., Beachy, P.A. (2002). Patched acts catalytically to suppress the activity of Smoothed. *Nature* *418*, 892–897.
- Takenaka, K., Kise, Y., Miki, H. (2007). GSK3 [beta] positively regulates Hedgehog signaling through Sufu in mammalian cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *353*, 501–508.
- Tanida, I., Minematsu-Ikeguchi, N., Ueno, T., Kominami, E. (2005). Lysosomal turnover, but not a cellular level, of endogenous LC3 is a marker of autophagy. *Autophagy* *1*, 84–91.
- Taylor, M.D., Liu, L., Raffel, C., Hui, C., Mainprize, T.G., Zhang, X., Agatep, R., Chiappa, S., Gao, L., Lowrance, A., i sur. (2002). Mutations in *SUFU* predispose to medulloblastoma. *Nat. Genet.* *31*, 306–310.
- Tempe, D., Casas, M., Karaz, S., Blanchet-Tournier, M.-F., Concordet, J.-P. (2006). Multisite Protein kinase A and Glycogen synthase kinase 3 beta phosphorylation leads to Gli3 ubiquitination by SCF bTrCP. *Mol. Cell. Biol.* *26*, 4316–4326.
- Thayer, S.P., di Magliano, M.P., Heiser, P.W., Nielsen, C.M., Roberts, D.J., Lauwers, G.Y., Qi, Y.P., Gysin, S., Fernández-del Castillo, C., Yajnik, V., i sur. (2003). Hedgehog is an early and late mediator of pancreatic cancer tumorigenesis. *Nature* *425*, 851–856.
- Tian, H., Callahan, C.A., DuPree, K.J., Darbonne, W.C., Ahn, C.P., Scales, S.J., De Sauvage, F.J. (2009). Hedgehog signaling is restricted to the stromal compartment during pancreatic carcinogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 4254–4259.
- Tojo, M., Kiyosawa, H., Iwatsuki, K., Nakamura, K., Kaneko, F. (2003). Expression of the *GLI2* oncogene and its isoforms in human basal cell carcinoma. *Br. J. Dermatol.* *148*, 892–897.
- Tostar, U., Malm, C.J., Meis-Kindblom, J.M., Kindblom, L.-G., Toftgård, R., Undén, A.B. (2006). Deregulation of the hedgehog signalling pathway: a possible role for the *PTCH* and *SUFU* genes in human rhabdomyoma and rhabdomyosarcoma development. *J. Pathol.* *208*, 17–25.
- Tukachinsky, H., Lopez, L.V., Salic, A. (2010). A mechanism for vertebrate Hedgehog signaling: recruitment to cilia and dissociation of SuFu–Gli protein complexes. *J. Cell Biol.* *191*, 415–428.

- Uden, A.B., Holmberg, E., Lundh-Rozell, B., Stähle-Bäckdahl, M., Zaphiropoulos, P.G., Toftgård, R., Vorechovsky, I. (1996). Mutations in the human homologue of *Drosophila* patched (*PTCH*) in basal cell carcinomas and the Gorlin syndrome: different *in vivo* mechanisms of *PTCH* inactivation. *Cancer Res.* 56, 4562–4565.
- Varnat, F., Duquet, A., Malerba, M., Zbinden, M., Mas, C., Gervaz, P., Ruiz i Altaba, A. (2009). Human colon cancer epithelial cells harbour active HEDGEHOG-GLI signalling that is essential for tumour growth, recurrence, metastasis and stem cell survival and expansion. *EMBO Mol. Med.* 1, 338–351.
- Varnat, F., Siegl-Cachedenier, I., Malerba, M., Gervaz, P., Ruiz i Altaba, A. (2010). Loss of WNT-TCF addiction and enhancement of HH-GLI1 signalling define the metastatic transition of human colon carcinomas. *EMBO Mol. Med.* 2, 440–457.
- Villavicencio, E.H., Walterhouse, D.O., Iannaccone, P.M. (2000). The Sonic Hedgehog–Patched–Gli pathway in human development and disease. *Am. J. Hum. Genet.* 67, 1047–1054.
- Walther, A., Johnstone, E., Swanton, C., Midgley, R., Tomlinson, I., Kerr, D. (2009). Genetic prognostic and predictive markers in colorectal cancer. *Nat. Rev. Cancer* 9, 489–499.
- Wang, C., Pan, Y., Wang, B. (2010). Suppressor of fused and Spop regulate the stability, processing and function of Gli2 and Gli3 full-length activators but not their repressors. *Development* 137, 2001–2009.
- Wang, C., Wu, H., Katritch, V., Han, G.W., Huang, X.-P., Liu, W., Siu, F.Y., Roth, B.L., Cherezov, V., Stevens, R.C. (2013a). Structure of the human smoothed receptor bound to an antitumour agent. *Nature* 497, 338–343.
- Wang, Y., McMahon, A., Allen, B. (2007). Shifting paradigms in Hedgehog signaling. *Curr. Opin. Cell Biol.* 19, 159–165.
- Wang, Y., Han, C., Lu, L., Magliato, S., Wu, T. (2013b). Hedgehog signaling pathway regulates autophagy in human hepatocellular carcinoma cells: *Hepatology*. *Hepatology* 58, 995–1010.
- Watkins, D.N., Berman, D.M., Burkholder, S.G., Wang, B., Beachy, P.A., Baylin, S.B. (2003). Hedgehog signalling within airway epithelial progenitors and in small-cell lung cancer. *Nature* 422, 313–317.
- Xie, J., Murone, M., Luoh, S.M., Ryan, A., Gu, Q., Zhang, C., Bonifas, J.M., Lamk, C.W., Hynes, M., Goddard, A., i sur. (1998). Activating *Smoothed* mutations in sporadic basal-cell carcinoma. *Nature* 391, 90–92.
- Yauch, R.L., Gould, S.E., Scales, S.J., Tang, T., Tian, H., Ahn, C.P., Marshall, D., Fu, L., Januario, T., Kallop, D., i sur. (2008). A paracrine requirement for hedgehog signalling in cancer. *Nature* 455, 406–410.

Yoon, J.W. (2001). Gene expression profiling leads to identification of GLI1-binding elements in target genes and a role for multiple downstream pathways in GLI1-induced cell transformation. *J. Biol. Chem.* *277*, 5548–5555.

Yu, F.-Y., Hong, Y.-Y., Qu, J.-F., Chen, F., Li, T.-J. (2014). The large intracellular loop of Ptch1 mediates the non-canonical Hedgehog pathway through cyclinB1 in Nevoid basal cell carcinoma syndrome. *Int. J. Mol. Med.* *34*, 507–512.

Yuan, Z., Goetz, J.A., Singh, S., Ogden, S.K., Petty, W.J., Black, C.C., Memoli, V.A., Dmitrovsky, E., Robbins, D.J. (2006). Frequent requirement of hedgehog signaling in non-small cell lung carcinoma. *Oncogene* *26*, 1046–1055.

Yue, S., Chen, Y., Cheng, S.Y. (2009). Hedgehog signaling promotes the degradation of tumor suppressor Sufu through the ubiquitin-proteasome pathway. *Oncogene* *28*, 492–499.

Zhao, Y., Tong, C., Jiang, J. (2007). Hedgehog regulates smoothed activity by inducing a conformational switch. *Nature* *450*, 252–258.

Zhou, J., Jia, L., Liu, W., Miao, C., Liu, S., Cao, Y., Duan, E. (2006). Role of sonic hedgehog in maintaining a pool of proliferating stem cells in the human fetal epidermis. *Hum. Reprod.* *21*, 1698–1704.

Zhu, H., Lo, H.W. (2010). The human Glioma-associated oncogene homolog 1 (GLI1) family of transcription factors in gene regulation and diseases. *Curr. Genomics* *11*, 238–245.

8. SAŽETAK

Hedgehog-Gli (Hh-Gli) put prijenosa signala važan je za pravilan embrionalni razvoj. U odraslom organizmu aktivnost je prisutna samo u matičnim stanicama uključenim u regeneraciju tkiva. Do njegove aberantne aktivacije dolazi u stanicama velikog broja tumora. Ovaj doktorski rad ispitao je mehanizam aktivacije signalnog puta Hh-Gli u stanicama karcinoma debelog crijeva čovjeka. Dosadašnja istraživanja su pokazala da Kinaza glikogen sintaze 3β (GSK3 β) u karcinomu debelog crijeva ima onkogenu, umjesto uobičajene tumorsupresorske funkcije. Međutim, nije pokazan mehanizam izvršenja njene onkogene funkcije. Kinaza GSK3 β ima važnu ulogu u regulaciji signalnog puta Hh-Gli te je ključna za proces vezan uz aktivaciju/inhibiciju transkripcijskih faktora Gli. U ovom radu pokazano je da je signalni put aktivan u dvije stanične linije karcinoma debelog crijeva, te da je okidač aktivacije poremećena funkcija kinaze GSK3 β . Inhibicija GSK3 β litijem dovela je do smanjene aktivnosti signalnog puta Hh-Gli. Mehanizam inhibicije uključuje poboljšano stvaranje kompleksa GSK3 β -SuFu-Gli3 i procesiranje Gli3 u transkripcijski represor, što utišava djelovanje signalnog puta. Inhibicija litijem uzrokovala je smanjenu proliferaciju i tumrgenični potencijal stanica karcinoma debelog crijeva, kao i aktivaciju apoptoze i autofagije. Spojevi koji imaju isti način djelovanja na GSK3 β kao i litij imaju potencijal u razvoju budućih terapija za tumore u kojima je funkcija GSK3 β poremećena. Međutim, pristupi kojima bi se ukinula ekspresija GSK3 β mogli bi imati neželjene posljedice, s obzirom da je ovdje pokazano da utišavanje GSK3 β dovodi do aktivacije signalnog puta Hh-Gli.

9. SUMMARY

The Hedgehog-Gli (Hh-Gli) signaling pathway has an essential role during embryonic development. In the adult organism it is mostly inactivated, except in stem cells which are vital for tissue regeneration. It has been shown that this pathway becomes aberrantly activated in various tumor types. The aim of this thesis was to investigate the role of Hh-Gli signaling in colon cancer. To date it has been shown that GSK3 β has a pro-tumorigenic role in colon cancer cells, rather than its usual tumor suppressor role. The mechanism through which its oncogenic role is manifested has not been discovered yet. GSK3 β plays an important role in Hh-Gli signaling regulation, where it is crucial for the activation/inhibition of the Gli transcription factors. The data presented in this thesis show, that the Hh-Gli signaling pathway is active in two colon carcinoma cell lines, and that this activation is the result of deregulated GSK3 β function. Inhibition of GSK3 β with lithium leads to downregulation of Hh-Gli signaling. The mechanism of downregulation involves enhanced GSK3 β -SuFu-Gli3 complex formation. This leads to enhanced Gli3 processing into repressor form, which, in turn, downregulates the pathway. On a cellular level, the consequences of Hh-Gli signaling inhibition with lithium manifest themselves as reduced proliferation and tumorigenicity. Also, cell death through apoptosis and autophagy is initiated. Compounds with properties similar to lithium could have potential in future drug design for tumors that harbour deregulated GSK3 β . In contrast, it was shown here, that GSK3 β silencing leads to additional Hh-Gli pathway stimulation and therefore, approaches that would involve abolishing GSK3 β expression, could have unwanted effects.

10. POPIS KRATICA

APS	amonij persulfat
ATO	arsen trioksid
ATP	adenozin trifosfat
BCC	bazeocelularni karcinom (engl. <i>Basal Cell Carcinoma</i>), karcinom bazalnih stanica
BSA	albumin iz goveđeg seruma (engl. <i>Bovine Serum Albumin</i>)
cDNA	komplementarna DNA (engl. <i>complementary DNA</i>)
Ci	<i>Cubitus interruptus</i> , homolog proteina Gli kod vinske mušice
CK1	Kasein kinaza 1
Cos-2	protein Costal-2, član signalnog puta Hh-Gli kod visnke mušice
DAB	diaminobenzidin
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
Dhh	protein Desert Hedgehog
Disp	protein Dispatched (od engl. otpremljen, poslan)
DMEM	Dulbeccov minimalni esencijalni medij (engl. <i>Dulbecco's Minimal Essential Medium</i>)
DMSO	dimetil-sulfoksid
DNA	deoksiribonukleinska kiselina (engl. <i>Deoxyribonucleid acid</i>)
dNTP	deoksinukleotid-trifosfati
DTT	ditiotreitol
EDTA	etilendiamintetraoctena kiselina (engl. <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>)
EGF	epidermalni faktor rasta (engl. <i>Epidermal Growth Factor</i>)

EGFR	receptor epidermalnog faktora rasta (engl. <i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>)
FBS	fetalni goveđi serum (engl. <i>Fetal Bovine Serum</i>)
FC	promjena ekspresije (engl. <i>Fold change</i>)
FITC	Fluorescein
GANT	antagonist proteina Gli (engl. <i>Gli antagonist</i>)
Gli	protein Gli (engl. <i>Glioma associated oncogene</i>)
Gli3FL	nepocijepani protein Gli3, aktivator (engl. <i>Gli3 full length</i>)
Gli3R	pocijepani oblik proteina Gli3, represor (engl. <i>Gli3 repressor</i>)
GPCR	receptor vezan uz G protein (engl. <i>G Protein-Coupled Receptor</i>)
GSK3 β	Kinaza glikogen sintaze 3 β
Hh	protein Hedgehog (od engl. jež)
Hhat	Hedgehog aciltransferaza
Hh-Gli	Hedgehog-Gli
Hh-N	aktivni oblik proteina Hh, N-terminalni
HNPCC	nasljedni nepolipozni karcinom debelog crijeva (engl. <i>Hereditary non-polyposis colorectal cancer</i>)
HRP	peroksidaza iz hrena (engl. <i>Horseradish peroxidase</i>)
IFT	kompleks intraflagelarnih transportnih proteina
IgG	imunoglobulin
Ihh	protein Indian Hedgehog
Itch	E3 ubikvitin ligaza itchy
Kap β 2	protein Karioferin β 2 iz obitelji importina (engl. <i>Karyopherin β2</i>)
Kif27	protein iz obitelji kinezina 27 (engl. <i>Kinesin family member 27</i>)
Kif7	protein iz obitelji kinezina 7 (engl. <i>Kinesin family member 7</i>)

LB	pufer za nanošenje uzoraka na PAA gel (engl. <i>Loading buffer</i>)
LOH	gubitak heterozigotnosti (engl. <i>Loss of heterozygosity</i>)
MAP-LC3	laki lanac 3 proteina vezanog s mikrotubulima (engl. <i>Microtubule-associated protein 1 light chain 3</i>)
MEM	minimalni esencijalni medij (engl. <i>Minimal essential medium</i>)
MTT	(3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolij bromid)
NBCCS	sindrom nevoidnih bazeocelularnih karcinoma (engl. <i>Nevoid Basal Cell Carcinoma Syndrome</i>)
Numb	protein Numb
PAA	poliakrilamid
PARP	polimeraza poli ADP riboze (engl. <i>Poly ADP ribose polymerase</i>)
PBS	fosfatni pufer (engl. <i>Phosphate Buffer Saline</i>)
PCR	lančana reakcija polimerazom (engl. <i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PDGFR α	receptor trombocitnog faktora rasta alfa (eng. Platelet-Derived Growth Factor Receptor Alfa)
PKA	Protein kinaza A
Ptc	protein Patched kod vinske mušice (od engl. zakrpan)
Ptch	protein Patched kod ljudi
RNA	ribonukleinska kiselina (engl. <i>Ribonucleic acid</i>)
<i>RPLP0</i>	gen za veliki ribosomalni protein P0 (engl. <i>ribosomal protein, large, P0</i>)
SAG	agonist proteina Smo (engl. <i>Smoothened agonist</i>)
SDS	natrijev dodecil sulfat (engl. <i>sodium dodecyl-sulphate</i>)
Shh	protein Sonic Hedgehog
Smo	protein Smoothened (od engl. zaglađen)
SSD	domena osjetljiva na sterole (engl. <i>Sterol-Sensing Domain</i>)
SuFu	protein Suppressor of Fused (od engl. spojen)

TGF β	transformirajući faktor rasta beta (engl. <i>Transforming Growth Factor Beta</i>)
TR	Teksas crveno (engl. <i>Texas red</i>)
VEGF	vaskularni endotelijalni faktor rasta (engl. <i>Vascular endothelial growth factor</i>)
β TrCP	protein koji sadrži ponavljanje beta transducina (engl. <i>Beta-transducin repeat containing protein</i>)

11. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 24. siječnja 1985. u Rijeci (djevojačko prezime Car). U Crikvenici sam završila osnovnu i srednju školu. Govorim engleski, nizozemski i njemački jezik, a tijekom srednjoškolskog obrazovanja položila sam Cambridge First Certificate in English ispit pri British Councilu. Studij molekularne biologije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu u Zagrebu upisala sam 2003. godine. Tijekom studija, pod vodstvom prof. Željke Vidaković-Cifrek s Botaničkog zavoda Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu, izradila sam studentski rad, za kojeg sam u školskoj godini 2005./2006. dobila Rektorovu nagradu. Diplomirala sam 2008. godine, a diplomski rad izradila sam pod vodstvom dr.sc. Sonje Levanat u Laboratoriju za nasljedni rak Zavoda za molekularnu medicinu Instituta Ruđer Bošković.

Od 2009. godine zaposlena sam kao znanstveni novak u Laboratoriju za nasljedni rak Zavoda za molekularnu medicinu na Institutu Ruđer Bošković. Poslijediplomski interdisciplinarni sveučilišni studij Molekularne bioznanosti Sveučilišta J. J. Strossmayer u Osijeku, Sveučilišta u Dubrovniku i Instituta Ruđer Bošković upisala sam 2010. godine. Za vrijeme svog zaposlenja sudjelovala sam u izvođenju četiri projekta pod vodstvom dr.sc. Sonje Levanat: projekt Ministarstva znanosti, obrazovanja i sporta RH „Prijenos signala u tumorima: Hh-Gli put, interakcije i potencijalne terapije“ koji je trajao od 2007. – 2013., „Terry Fox Run“ donacija „Genetičko testiranje na nasljednu sklonost karcinomu dojke i jajnika“ 2009. – 2011., „Terry Fox Run“ donacija „Uloga survivina kao prediktivnog i prognostičkog markera u raku dojke“ 2012. – 2014. te „Terry Fox Run“ donacija „MicroRNA profiling of ovarian cancer“ 2014. – danas. Također sudjelujem i u znanstvenom projektu Hrvatske zaklade za znanost pod vodstvom dr.sc. Nede Slade „New protein networks for novel therapeutic avenues in human melanoma“ 2014. – danas.

Član sam Hrvatskog društva za biokemiju i molekularnu biologiju (HDBMB), Hrvatskog društva za istraživanje raka (HDIR) te Europskog društva za istraživanje raka (EACR). Asistent sam u nastavi na dva kolegija pod vodstvom dr.sc. Sonje Levanat: „Metode istraživanja u

molekularnoj onkologiji“ na poslijediplomskom studiju Medicinskog fakulteta u Zagrebu, te „Metode rekombinantne DNA“ na Specijalističkom studiju sanitarnog inženjerstva Veleučilišta u Zagrebu. Sudjelovala sam na Otvorenim danima Instituta Ruđer Bošković 2010. godine kao vodič, a 2011. godine sudjelovala sam u organizaciji dvodnevnog edukacijskog simpozija „Znanstveni susreti 3. vrste“ na Institutu Ruđer Bošković. Također sam bila član organizacijskog odbora Prve, Druge i Treće konferencije Hrvatskog društva za istraživanje raka „From Bench to Clinic“ 2010., 2012. i 2014. godine.

Tijekom zaposlenja na Institutu Ruđer Bošković aktivno sam sudjelovala na 7 međunarodnih konferencija s poster prezentacijama te na ljetnoj školi „1st HEALING Summer School on Hedgehog-Gli Signalling“ održanoj na Kreti 2011. godine. Za sudjelovanje na navedenoj ljetnoj školi i pridruženoj konferenciji dobila sam stipendiju „Travel Fellowship Award“ Europskog društva za istraživanje raka. Za sudjelovanje na konferenciji „EACR-22 – from Basic Research to Personalised Cancer Treatment“, održanoj u Barceloni 2012. godine također sam dobila stipendiju Europskog društva za istraživanje raka. Ostali skupovi na kojima sudjelovala su: The 2nd EMBO Conference Series on Cellular Signaling & Molecular Medicine, 2010., Cavtat, 10. kongres Hrvatskog društva za biokemiju i molekularnu biologiju „Tajni život biomolekula“, 2010., Opatija, FEBS3+ Meeting „From molecules to life and back“, 2012., Opatija, HDIR-2 „From Bench to Clinic“, 2012., Zagreb te HDIR-3 „From Bench to Clinic“, 2014., Zagreb.

Autor sam 12 znanstvenih radova, od toga 8 citiranih u bazi Current Contents.

Znanstveni radovi:

1. Ozretić P, Bisio A, Musani V, Trnski D, Sabol M, Levanat S, Inga A. Regulation of human *PTCH1b* expression by different 5' untranslated region cis-regulatory elements. *RNA Biology*. 2015. [in press]
2. *Sabol M, *Trnski D, Uzarevic Z, Ozretic P, Musani V, Rafaj M, Cindric M, Levanat S (2014) Combination of cyclopamine and tamoxifen promotes survival and migration of MCF-7 breast cancer cells - interaction of Hedgehog-Gli and Estrogen receptor signaling pathways. *PLoS One*. 9(12):e114510. (*autori dijele prvo autorstvo)

3. Maurac I, Sabol M, Car D, Čačev T, Levanat S (2013) In reply. *International Journal Of Gynecological Pathology*. 32(2):177-177.
4. Musani V, Sabol M, Car D, Ozretić P, Kalafatić D, Maurac I, Orešković S, Levanat S (2013) *PTCH1* gene polymorphisms in ovarian tumors: Potential protective role of c.3944T allele. *Gene*. 517(1):55-59.
5. Leović D, Sabol M, Ozretić P, Musani V, Car D, Marjanović K, Zubčić V, Sabol I, Sikora M, Grce M, Glavaš-Obrovac Lj, Levanat S (2012) Hh-Gli signaling pathway activity in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Head and neck*. 34(1):104-112.
6. Levanat S, Musani V, Levačić Cvok M, Sušac I, Sabol M, Ozretić P, Car D, Eljuga D, Eljuga Lj, Eljuga D (2012) Three novel *BRCA1/BRCA2* mutations in breast/ovarian cancer families in Croatia. *Gene*. 498(2): 169-176.
7. Maurac I, Sabol M, Musani V, Car D, Ozretić P, Kalafatić D, Orešković S, Babić D, Levanat S (2012) A low grade ovarian carcinoma case with coincident LOH of *PTCH1* and *BRCA1*, and a mutation in *BRCA1*. *International Journal Of Gynecological Pathology*. 31(3): 264-271.
8. Musani V, Sabol M, Car D, Ozretić P, Orešković S, Leović D, Levanat S (2012) LOH of *PTCH1* region in BCC and ovarian carcinoma: microsatellite vs. HRM analysis. *Frontiers in Bioscience-Landmark*. E4(3):1049-1057.
9. Sabol M, Car D, Musani V, Ozretić P, Orešković S, Weber I, Levanat S (2012) The Hedgehog signaling pathway in ovarian teratoma is stimulated by Sonic Hedgehog which induces internalization of Patched. *International Journal Of Oncology*. 41(4):1411-1418.
10. Tkalec M, Car D, Gospočić J, Križaić I, Duž K, Vidaković-Cifrek Ž (2012) Response of *Kalanchoe daigremontiana* to wounding and infection with *Agrobacterium tumefaciens*. *Periodicum Biologorum*. 114(1):83-90.

11. Car D, Sabol M, Musani V, Ozretić P, Levanat S (2010) Epigenetic regulation of the Hedgehog-Gli signaling pathway in cancer. *Periodicum Biologorum*. 112(4):419-423.
12. Ozretić P, Levačić Cvok M, Musani V, Sabol M, Car D, Levanat S (2010) *In silico* analysis of potential structural and functional significance of human breast cancer gene *BRCA2* sequence variants found in 5' untranslated region. *Periodicum Biologorum*. 112(4):469-474.