

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Sveučilište u Dubrovniku

Institut Ruđer Bošković

Poslijediplomski interdisciplinarni sveučilišni studij Molekularne bioznanosti

Ivan Štefanac

ULOGA SIGNALNOG PUTA HH-GLI U RAKU PROSTATE

Doktorska disertacija

Osijek, 2021.

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: Interdisciplinarno područje znanosti
Znanstvena polja: Temeljne medicinske znanosti i Biologija

ULOGA SIGNALNOG PUTA HH-GLI U RAKU PROSTATE

Ivan Štefanac

Disertacija je izrađena u: Laboratoriju za nasljedni rak Zavoda za molekularnu medicinu Instituta „Ruđer Bošković“ u Zagrebu

Mentor 1: prof. dr. sc. Sonja Levanat, znanstvena savjetnica

Mentor 2: doc. dr. sc. Petar Ozretić, znanstveni suradnik

Kratki sažetak doktorske disertacije:

Rak prostate drugi je po učestalosti tip raka kod muškaraca. Cilj ovog rada bilo je istražiti ulogu signalnog puta Hedgehog-GLI u primarnom raku prostate, u svrhu otkrivanja novih prognostičkih biomarkera te njegove uloge u održavanju rasta stanica raka neovisnog o androgenima. Rezultati na uzorcima tkiva su pokazali da je ekspresija proteina GLI1, GLI2, GLI3 i PTCH1 bila značajano viša u raku prostate. Snižena ekspresija proteina GLI1 te povišena proteina GLI2 i PTCH1 kao i lokalizacija proteina GLI3 u jezgri bili su povezani s kraćim preživljenjem pacijenata srakom prostate. Rezultati na staničnoj liniji LNCaP su pokazali da kratkotrajno lišavanje androgena dovodi do kanonske aktivacije signalnog puta, dok se u stanicama neovisnim o androgenu ligand SHH-N može nekanonski vezati na androgeni receptor (AR) preko molekule kolesterola. Inhibicija te interakcije dovodi do smanjenja regulacije AR, što implicira da SHH-N aktivira AR i održava neovisnost o androgenima. To bi mogla biti nova strategija za liječenje uznapredovanih slučajeva raka prostate.

Broj stranica: 146

Broj slika: 70

Broj tablica: 12

Broj literaturnih navoda: 191

Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: signalni put Hedgehog-GLI, rak prostate, androgeni receptor, prognostički biomarkeri

Datum obrane: 1. srpnja 2021. g.

Stručno povjerenstvo za obranu:

1. doc. dr. sc. Maja Herak Bosnar, znanstvena savjetnica
2. doc. dr. sc. Maja Sabol, znanstvena suradnica
3. prof. dr. sc. Vera Cesar, redovita profesorica
4. Zamjena: doc. dr. sc. Vesna Musani, znanstvena suradnica

Rad je pohranjen u: Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici Zagreb, UI. 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: Interdisciplinary Area of Science
Scientific Fields: Basic Medical Sciences and Biology

THE ROLE OF HH-GLI SIGNALING IN PROSTATE CANCER

Ivan Štefanac

Thesis performed at: Laboratory for Hereditary Cancer, Division of Molecular Medicine, Ruđer Bošković Institute, Zagreb, Croatia

Supervisor:

Menthor 1: Prof. Sonja Levanat, PhD

Menthor 2: Assist. Prof. Petar Ozretić, PhD

Short abstract:

Prostate cancer is the second most common type in men. The aim of this study was to investigate the role of the Hedgehog-GLI signaling pathway in primary prostate cancer, in order to discover new prognostic biomarkers, and its role in maintaining androgen-independent cancer growth. Results on tissues showed that GLI1, GLI2, GLI3 and PTCH1 protein expression was significantly higher in prostate cancer. Decreased GLI1 and increased GLI2 and PTCH1 protein expression, as well as nuclear localization of GLI3, were associated with shorter survival of prostate cancer patients. Results on LNCaP cell line showed that short-term androgen deprivation leads to canonical pathway activation, whereas in androgen-independent cells, SHH-N ligand can bind noncanonically to androgen receptor (AR) via a cholesterol molecule. Inhibition of this interaction leads to decreased AR regulation, what implies that SHH-N activates AR and maintains androgen independence. This could be a new strategy for treating advanced prostate cancers.

Number of pages: 146

Number of figures: 70

Number of tables: 12

Number of references: 191

Original in: Croatian

Key words: Hedgehog-GLI signaling, prostate cancer, androgen receptor, prognostic biomarkers

Date of the thesis defense: July 1, 2021

Reviewers:

1. Assist. Prof. Maja Herak Bosnar, PhD, Senior Scientist
2. Assist. Prof. Maja Sabol, PhD, Research Associate
3. Prof. Vera Cesar, PhD
4. Substitute: Assist. Prof. Vesna Musani, PhD, Research Associate

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“ u Zagrebu pod vodstvom prof. dr. sc. Sonje Levanat i doc. dr. sc. Petra Ozretića u sklopu projekta „Kako ubiti tumorsku stanicu prostate“ financiranog donacijom tvrtke dm – drogerie markt d. o. o.

Zahvale

Veliko hvala mojim mentorima prof. dr. sc. Sonji Levanat i doc. dr. sc. Petru Ozretiću koji su od početka sve ove godine vjerovali u mene i pružali mi pomoć u izradi doktorske disertacije. Hvala im na svim savjetima, kritičkim razmišljanjima, usmjeravanjima i strpljenju.

Ogromno hvala prof. dr. sc. Milanki Mrčeli, dr. med. na izuzetnom trudu i strpljenju oko pronalaska, sortiranja te očitavanja imunohistokemijskih preparata. Također ogromna zahvala na velikoj pomoći i davanju vrijednih savjeta oko kliničkih dijelova (patologije i urologije) tijekom pisanja doktorske disertacije. Veliko hvala i na životnim savjetima, bodrenju i hrabrenju koji su mi uistinu pomogli da dovršim doktorsku disertaciju.

Hvala dr. sc. Diani Trnski na iznimnom trudu i pomoći oko eksperimenata rađenih na stanicama, te na prijateljskim sugestijama i kritikama.

Hvala svim članicama Laboratorija za nasljedni rak, posebno doc. dr. sc. Maji Sabol i doc. dr. sc. Vesni Musani, koje su sudjelovale u provedbi projekta dm-a.

Veliko hvala prof. dr. sc. Veri Cesar, mojoj studijskoj savjetnici koja je nesebično odvojila mnogo vremena savjetujući me i vodeći na pravi put. Hvala na svim savjetima, uputama, kritikama i životnim mudrostima.

Hvala dr. sc. Marijanu Ercegu, dr. med. iz HZJZ-a na trudu oko prikupljanja podataka o smrtnosti pacijenata.

Hvala mojim roditeljima koji su mi najveći životni oslonac, koji su cijelo vrijeme uz mene i pružali mi nesebičnu podršku i pomoć.

Popis kratica

ADT	terapija lišavanja androgena (eng. <i>androgen deprivation therapy</i>)
ANG1	eng. <i>angiopoietin 1</i>
AR	androgeni receptor
ATO	arsenov trioksid
BCC	bazeocelularni karcinom (eng. <i>basal cell carcinoma</i>)
BOC	protein kojeg kodira BOC gen (eng. <i>Brother of CDO</i>)
BSA	albumin iz goveđeg seruma (eng. <i>bovine serum albumin</i>)
cDNA	komplementarna DNA (eng. <i>complementary DNA</i>)
CK1	kazein kinaza 1 (eng. <i>casein kinase 1</i>)
CRPC	karcinom prostate neosjetljiv na anti-hormonsko liječenje (eng. <i>castration resistant prostate cancer</i>)
CT	kompjuterizirana tomografija
CYP17	enzim citokrom P450
DAB	diamnibenzidin
DHH	eng. <i>Desert Hedgehog</i>
DHT	dihidritestosteron
DMSO	dimetilsulfoksid
DRP	digitorektalni pregled
EDTA	etilendiamintetraoctena kiselina (eng. <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>)
EGF	epidermalni faktor rasta (eng. <i>epidermal growth factor</i>)
FBS	fetalni goveđi serum (eng. <i>fetal bovine serum</i>)
FNA	aspiracija tankom iglom (eng. <i>fine needle aspiration</i>)
GANT61	inhibitor transkripcijskih faktora GLI1 i GLI2
GAS1	protein kojeg kodira gen GAS1 (eng. <i>growth-arrest specific 1</i>)
GLI	obitelj gena/proteina cinkovog prsta GLI
GSK3β	kinaza glikogen sintaza 3 beta
HH-GLI	Hedgehog-GLI
HHIP	eng. <i>Hedgehog interacting protein</i>

HRP	peroksidaza iz hrena (eng. horseradish peroxidase)
INH	eng. <i>Indian Hedgehog</i>
mAt	monoklonalno antitijelo
MR	magnetska rezonancija
MTT	3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolij bromid
pAt	poliklonalno antitijelo
PC	fosforilacijski klaster
PCR	lančana reakcija polimerazom (eng. <i>polymerase chain reaction</i>)
PDD	domena za određivanje procesiranja (eng. <i>processing determinant domain</i>)
PDGFR α	receptor trombocitnog faktora rasta (eng. <i>platelet derived growth factor receptor alfa</i>)
PHD	patohistološka dijagnostika
PKA	proteinska kinaza A
PSA	prostata specifični antigen
PTCH1	protein Patched kod ljudi
REP	represorska domena
RND	eng. <i>resistance-nodulation-division</i>
ROC	obilježja primatelja–operatora (eng. <i>receiver operating characteristic</i>)
SDS-PAA	natrijdodecilsulfat-poliakrilamid
SHH-H	aktivni ligand Sonic Hedgehog
SMO	protein <i>Smoothed</i>
SNAIL1	transkripcijski represor SNAIL1 (eng. <i>snail family transcriptional repressor 1</i>)
SOX2	transkripcijski faktor SOX2 (eng. <i>SRY-box transcription factor 2</i>)
SUFU	protein <i>Supressor of Fused</i>
TAD	transaktivirajuća domena (eng. <i>transactivation domain</i>)
TAF	vezno mjesto za protein TAF
TBST	smjesa tris-puferirane otopine i polisorbata 20
TUIP	transuretralna incizija prostate
TURP	transuretralna resekcija prostate
UZV	ultrazvuk
VEGF	vaskularni endotelni faktor rasta (eng. <i>vascular endothelial growth factor</i>)

Sadržaj

1. UVOD.....	1
1.1. Signalni put Hedgehog-GLI (HH-GLI)	1
1.1.1. Signalizacija na staničnoj membrani	2
1.1.2. Citoplazmatska signalna kaskada	6
1.1.3. Signalizacija u jezgri.....	7
1.1.4. Kôd GLI (eng. <i>GLI code</i>)	8
1.1.5. Mehanizmi aktivacije signalnog puta HH-GLI	9
1.1.5.1. Nekanonska signalizacija.....	9
1.1.5.2. Načini aktivacije signalnog puta HH-GLI u tumorima	10
1.1.6. Uloga signalnog puta HH-GLI u embrionalnom razvoju.....	13
1.1.7. Uloga signalnog puta HH-GLI u odraslom organizmu	14
1.1.8. Uloga signalnog puta HH-GLI u karcinogenezi	15
1.1.9. Spojevi koji modificiraju aktivnost signalnog puta HH-GLI	18
1.2. Prostata.....	20
1.2.1. Embrionalni razvoj prostate i uloga signalnog puta HH-GLI	20
1.2.2. Fiziološka funkcija prostate i uloga PSA	24
1.2.3. Benigna hiperplazija prostate	25
1.2.4. Upalni procesi prostate	26
1.2.5. Karcinom prostate.....	28
1.2.5.1. Epidemiologija.....	28
1.2.5.2. Čimbenici rizika	29
1.2.5.3. Klinička slika i dijagnostika	29
1.2.5.4. Patohistološka analiza.....	31
1.2.5.5. TNM klasifikacija	32
1.2.5.6. Gleasonov bodovni sustav	33
1.2.5.7. Klinički tijek bolesti.....	35
1.2.5.8. Terapija i prognoza.....	37
1.3. Androgeni receptor (AR).....	38

1.3.1.	Uloga AR u raku prostate	39
2.	CILJ ISTRAŽIVANJA.....	41
3.	MATERIJALI I METODE	42
3.1.	Imunohistokemijsko bojanje tkivnih preparata	42
3.1.1.	Uzorci tkiva prostate	42
3.1.2.	Imunohistokemija	43
3.1.3.	Kvantifikacija i lokalizacija proteinske ekspresije.....	45
3.2.	Rad sa staničnim kulturama	45
3.2.1.	Odmrzavanje stanica.....	46
3.2.2.	Presadivanje i održavanje stanica u kulturi	46
3.2.3.	Zamrzavanje stanica.....	47
3.2.4.	Tretmani stanica u kulturi	48
3.2.4.1.	Imitacija uvjeta bez androgena za stanice ovisne o androgenima	48
3.2.4.2.	Tretmani stanica kemijskim agensima	48
3.3.	Test MTT	49
3.4.	Izdvajanje RNA iz stanica.....	51
3.4.1.	Mjerenje koncentracije RNA	51
3.5.	Reverzna transkripcija.....	52
3.6.	Kvantitativni PCR u stvarnom vremenu	53
3.7.	Izdvajanje proteina iz stanica	55
3.7.1.	Mjerenje koncentracije proteina	55
3.8.	Analiza Western blot.....	56
3.9.	Analiza fizičke interakcije dvaju proteina – ko-imunoprecipitacija	59
3.10.	Statistička analiza podataka	61
4.	REZULTATI	62
4.1.	Ekspresija i lokalizacija proteina GLI1 u uzorcima tkiva prostate	62
4.2.	Ekspresija i lokalizacija proteina GLI2 u uzorcima tkiva prostate	69
4.3.	Ekspresija i lokalizacija proteina GLI3 u uzorcima tkiva prostate	76
4.4.	Ekspresija proteina PTCH1 u uzorcima tkiva prostate	82
4.5.	Zbirni prikaz rezultata određivanja ekspresije i lokalizacije istraživanih proteina.....	87

4.6.	Korelacija između ekspresija istraživanih proteina i kliničko-patoloških karakteristika pacijenata.....	88
4.7.	Utjecaj kliničko-patoloških osobina te ekspresije i lokalizacije istraživanih proteina na preživljenje pacijenata s rakom prostate.....	90
4.8.	Karakterizacija staničnih linija raka prostate	98
4.8.1.	Genska ekspresija ključnih komponenti signalnog puta HH-GLI te ciljnih gena signalnog puta AR	100
4.8.2.	Ekspresija proteina signalnog puta HH-GLI.....	101
4.9.	Inhibicija signalnog puta HH-GLI specifičnim inhibitorima	104
4.9.1.	Utjecaj inhibicije signalnog puta HH-GLI na proliferaciju stanica	104
4.9.1.1.	Inhibicija ciklopaminom	104
4.9.1.2.	Inhibicija spojem GANT61.....	105
4.9.2.	Utjecaj inhibitora signalnog puta HH-GLI na njegovu aktivnost te aktivnost signalnog puta AR	107
4.10.	Interakcija signalnih puteva HH-GLI i AR.....	108
5.	RASPRAVA.....	110
5.1.	Aktivnost signalnog puta HH-GLI u raku prostate.....	110
5.2.	Prognostički značaj signalnog puta HH-GLI kod pacijenata oboljelih od raka prostate.....	113
5.3.	Interakcija signalnog puta HH-GLI i AR u raku prostate i njen terapijski potencijal	115
6.	ZAKLJUČCI	119
7.	LITERATURA	120
8.	SAŽETAK	141
9.	SUMMARY.....	143
10.	ŽIVOTOPIS.....	145

1. UVOD

1.1. Signalni put Hedgehog-GLI (HH-GLI)

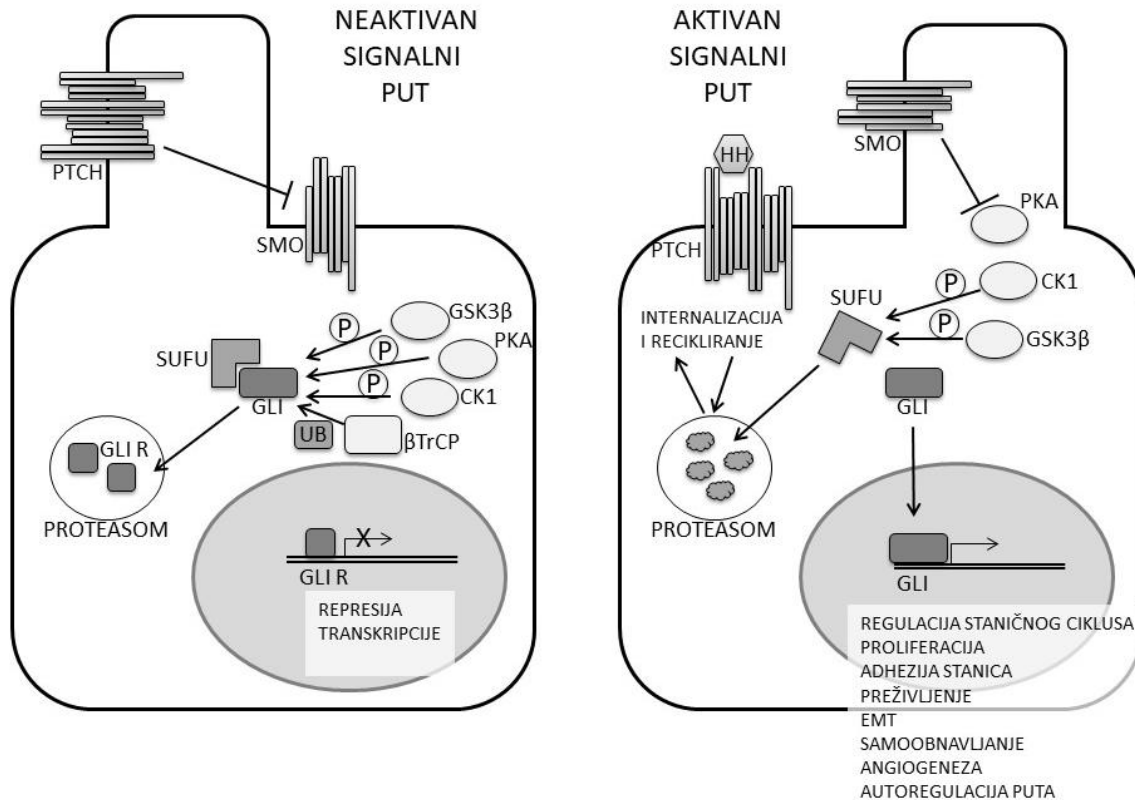
Signalni put Hedgehog-GLI (HH-GLI) je veoma očuvan put prijenosa signala od stanične membrane do jezgre. Otkriven je tijekom genetičkih analiza segmentalnog razvoja u vinskoj mušici (*Drosophila melanogaster*) tijekom 80-ih godina prošlog stoljeća (Nüsslein-Volhard i Wieschaus 1980). Ovaj signalni put ključan je za pravilan embrionalni razvoj te u odraslom organizmu za održavanje matičnih stanica i tkivne homeostaze (Bhardwaj i sur. 2001, Merchant i Matsui 2010). Aberantna aktivacija ovog signalnog puta u odraslom organizmu povezana je s razvojem raznih tipova tumora (Tukachinsky i sur. 2010).

Iako je ovaj signalni put evolucijski konzerviran, jedinstvena karakteristika kod kralješnjaka je primarna cilija, organel potreban za pravilan prijenos signala (Huangfu i Anderson 2005). Primarna cilija je dugačak, nepokretan organel koji se nalazi na apikalnoj površini gotovo svih stanica. Signalne molekule lokalizirane u ciliji, poput transmembranskih receptora koji omogućavaju odgovore na izvanstanične podražaje te regulatorni proteini lokalizirani u bazalnom tjelešcu, tranzicijskoj zoni i distalnim regijama cilije koji kontroliraju korake signalne kaskade, neophodni su za normalnu staničnu signalizaciju tijekom razvoja i u homeostazi (Wheway i sur. 2018).

Kod sisavaca komponente signalnog puta HH-GLI čine tri liganda Hedgehog (HH): Desert, Indian i Sonic Hedgehog (DHH, IHH i SHH), dva transmembranska receptora Patched 1 (PTCH1) i Patched 2 (PTCH2), transmembranski protein sličan receptorima povezanim s G-proteinima Smoothened (SMO) te tri transkripcijska faktora, GLI1, GLI2 i GLI3, koji su regulirani proteinom Suppressor of Fused (SUFU) (**Slika 1**).

Vežanjem liganda HH za PTCH1 dokida se inhibicija koreceptora SMO te dolazi do aktivacije signalne kaskade što rezultira aktivacijom transkripcijskih faktora GLI. GLI1 funkcionira isključivo kao aktivator transkripcije, dok GLI2 i GLI3 mogu biti transkripcijski aktivatori ili represori, ovisno o staničnom kontekstu (Sasaki i sur. 1999). GLI2 i GLI3 su primarni

medijatori signalnog puta, dok GLI1, koji je i jedan od ciljnih gena signalnog puta, djeluje kao pozitivna povratna sprega koja pojačava aktivnost proteina GLI (Hui i Angers 2011) (**Slika 1**).

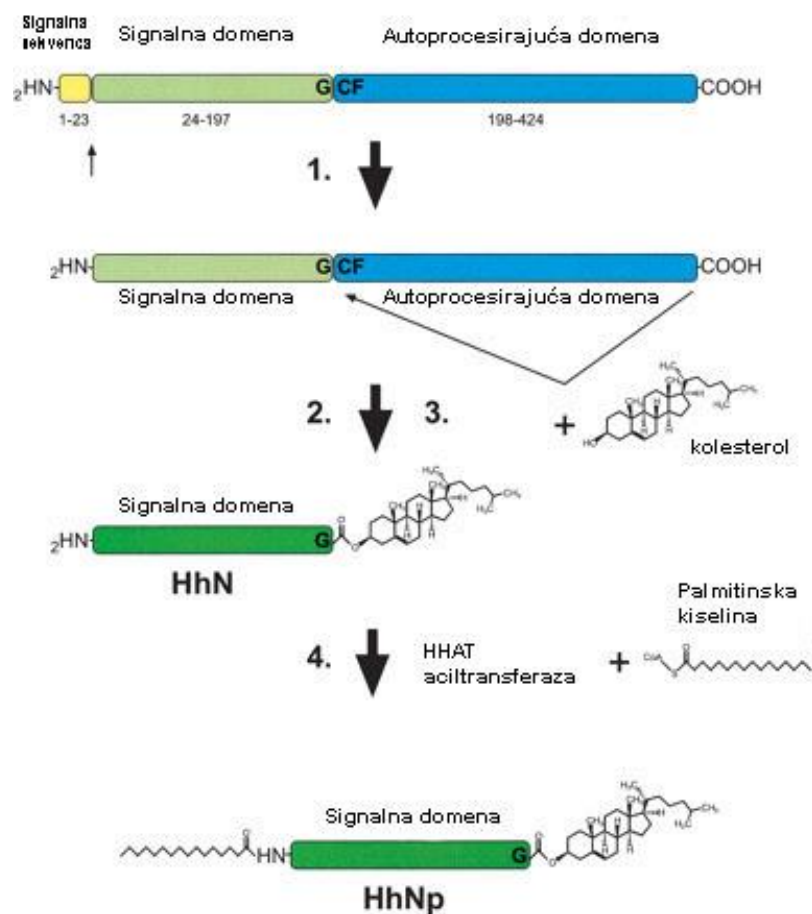


Slika 1. Signalni put Hedgehog-Gli. Slika je preuzeta i prilagođena iz Levanat i sur. 2017.

1.1.1. Signalizacija na staničnoj membrani

Proteini HH su morfogeni i kao takvi kontroliraju brojne procese tijekom embrionalnog razvoja. Smatra se da svi proteini HH eksprimirani kod sisavaca imaju slične fiziološke funkcije, a razlike u njihovim ulogama tijekom razvoja proizlaze iz različitog obrasca ekspresije. SHH je, međutim, najšire eksprimiran u odnosu na ostale HH ligande. Nakon translacije protein HH prolazi kroz nekoliko stupnjeva procesiranja koji rezultiraju aktivnim ligandom. Nakon uklanjanja signalne sekvence, dolazi do autokatalitičkog cijepanja i dodavanja dvije lipidne modifikacije. Na novonastali C-kraj autoprocetirajuća domena katalizira vezanje kolesterola, dok aciltransferaza HHAT veže palmitinsku kiselinu na N-kraj

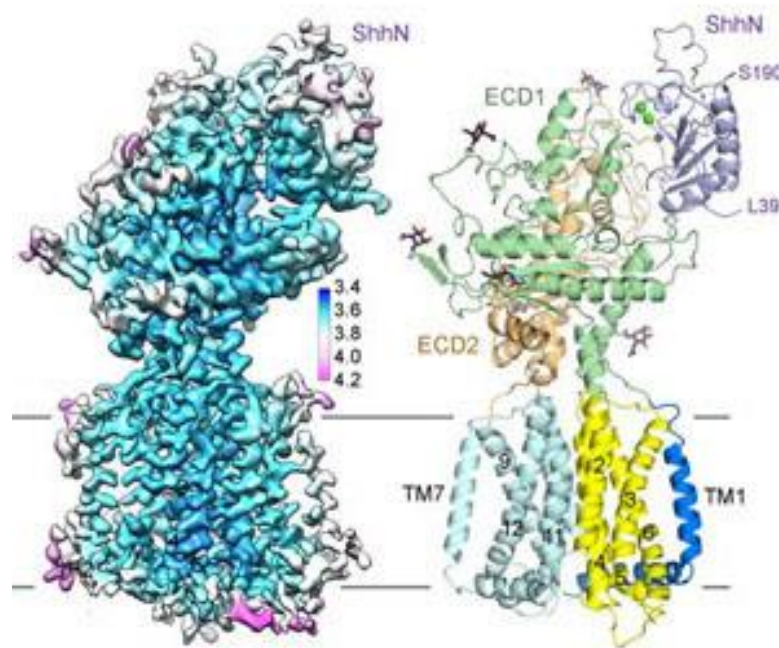
(Slika 2). Kolesterol omogućuje vezanje SHH za membranu te na taj način može djelovati na većim udaljenostima. Iako uloga kolesterola u transportu proteina HH nije u potpunosti razjašnjena, uloga palmitata je utvrđena. Pokazano je da je palmitoilacija ključna za aktivnost proteina HH te je bitna za stvaranje multimernih kompleksa proteina HH za signalizaciju na veće udaljenosti kod sisavaca (Varjosalo i Taipale 2008). Zreli signalni peptid često se označava SHH-N ili HhNp.



Slika 2. Shematski prikaz posttranslacijskog procesiranja i sazrijevanja proteina HH. Protein pune duljine sadrži signalnu i autoprocisirajuću domenu. Autoprocisirajuća domena inicira cijepanje i vezanje kolesterola na novonastali C-kraj. Zatim, aciltransferaza HHAT katalizira vezanje palmitinske kiseline na N-kraj, čime nastaje zreli signalni peptid HhNp (SHH-N). Slika je preuzeta i prilagođena iz Varjosalo i Taipale 2008.

Važnu ulogu u vezanju liganda HH na receptor PTCH1 imaju koreceptoru CDO (*CAM-related/Downregulated by Oncogenes*), BOC (*Brother Of CDO*) te GAS1 (*Growth-Arrest*

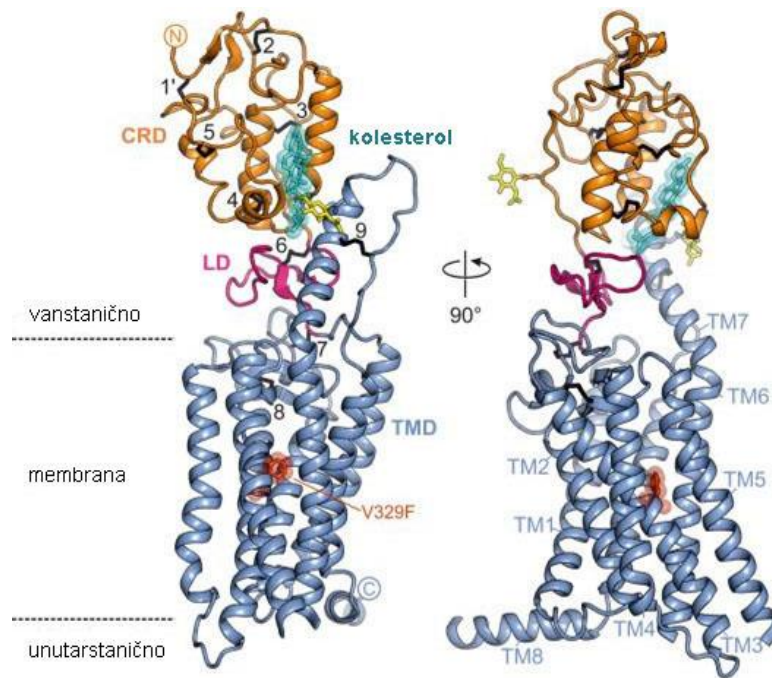
Specific 1). Ta tri proteina vezanjem za PTCH1 stvaraju multimolekularni kompleks te potiču prijenos signala. Još jedan protein lokaliziran na staničnoj membrani, HHIP (*HedgeHog Interacting Protein*) regulira vezanje liganda HH za PTCH1 (Chuang i McMahon 1999). HHIP djeluje kao negativni regulator signalnog puta tako da na sebe veže HH i onemogućava njegov pristup receptoru PTCH1 te time i aktivaciju signalnog puta. Time utječe i na stanice koje proizvode HH te na okolne stanice (Kwong i sur. 2014) (**Slika 3**).



Slika 3. Kristalna struktura receptora PTCH1 u kompleksu s ligandom SHH-N. TM – transmembranska domena, ECD – vanstanična domena. Slika je preuzeta iz Gong i sur. 2018.

U inaktivnom stanju, PTCH1, konstitutivni inhibitor signalnog puta HH-GLI, lociran je na membrani primarne cilije. Do inhibicije signalnog puta dolazi zbog toga što PTCH1 sprječava cilijarnu lokalizaciju proteina SMO, što je neophodan korak za aktivaciju signalnog puta u stanicama sisavaca (Rohatgi i sur. 2007). Posljednjih godina intenzivno se istražuje točan mehanizam kojim PTCH1 regulira SMO te kako SMO prenosi signal u citoplazmu. Iako je bilo brojnih otkrića, ovi mehanizmi i dalje nisu potpuno razjašnjeni. Smatra se da bi PTCH1, s obzirom da pokazuje homologiju s obitelji bakterijskih membranskih transportera RND (*resistance-nodulation-division*), mogao funkcionirati kao transporter neke endogene male

molekule koja regulira SMO (Sharpe i sur. 2015). Kolesterol je predložen kao mogući endogeni regulator proteina SMO (**Slika 4**) (Byrne i sur. 2016, Huang i sur. 2016, Huang i sur. 2018, Byrne i sur. 2018) i pokazano je da je kolesterol nužan i dovoljan za aktivaciju SMO (Myers i sur. 2017, Luchetti i sur. 2016). Pretpostavlja se da bi PTCH1 mogao djelovati na način da onemogućava pristup proteina SMO kolesterolu (Byrne i sur. 2018).



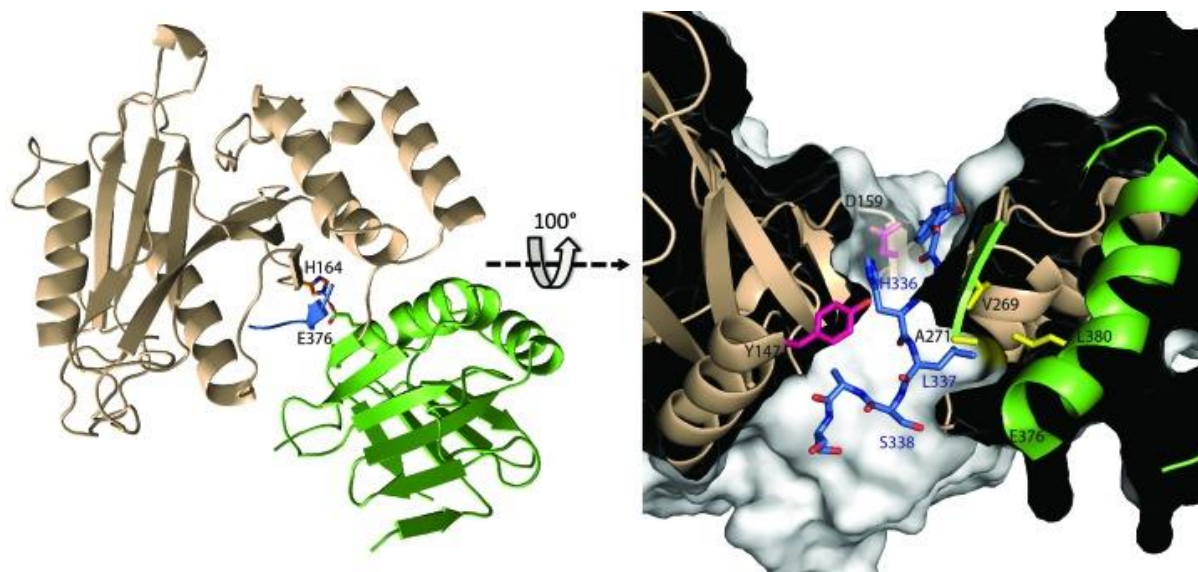
Slika 4. Kristalna struktura proteina SMO. CRD – domena bogata cisteinom, LD – povezna domena, TMD – transmembranska domena. Slika je preuzeta i prilagođena iz Byrne i sur. 2016.

Nakon aktivacije signalnog puta HH-Gli dolazi do fosforilacije C-terminalnog repa proteina SMO od strane Kasein kinaze 1 α (CK1 α) i GPCR kinaze 2 (GRK2). Time se pokreće translokacija proteina SMO u ciliju i inicira konformacijska promjena koja vodi do dimerizacije aktiviranog C-terminalnog repa (Chen i Jiang 2013, Chen i sur. 2011b).

1.1.2. Citoplazmatska signalna kaskada

SUFU je važan negativni regulator signalnog puta HH-GLI, koji direktno veže transkripcijske faktore GLI u inaktivnom stanju, čime sprječava njihovu translokaciju u jezgru i aktivaciju signalnog puta (**Slika 5**) (Musgrove i Sutherland 2009). U inaktivnom stanju SUFU veže proteine GLI2 i GLI3 u citoplazmi te se stvara kompleks koji maskira njihove lokalizacijske signale za jezgru, čime se sprječava njihova translokacija. Zadržavanjem proteina GLI u citoplazmi, SUFU pospješuje njihovu fosforilaciju od strane tri kinaze: protein kinaze A (PKA), kasein kinaze 1 (CK1) te kinaze glikogen sintaze 3 β (GSK3 β). Nakon toga slijedi ubikvitinacija GLI2 i GLI3 putem E3 ubikvitin ligaze SCF β TrCP, što proteine GLI obilježava za proteasomalnu degradaciju/procesiranje. U proteasomu se GLI2 i GLI3 cijepaju, čime nastaju transkripcijski represori GLI2R i GLI3R, koji inhibiraju ekspresiju ciljnih gena kompeticijom s proteinima pune duljine ili regrutiranjem korepresora (Sabol i sur. 2018).

Prilikom aktivacije signalnog puta, kompleks SUFU-GLI2/3 translocira se na vrh cilije, gdje započinje disocijacija kompleksa. GLI2 i GLI3 ostaju nepocijepani i kao takvi djeluju kao transkripcijski aktivatori nakon translokacije u jezgru, a SUFU se degradira. Jedna od ključnih funkcija proteina SUFU je i održavanje zalihe aktivatorskih oblika GLI2 i GLI3 na taj način da sprječava njihovu razgradnju te su tako u trenutku aktivacije signala odmah dostupni i mogu reagirati na signal (Wang i sur. 2010, Huang i sur. 2018). Osim u citoplazmi, SUFU regulira proteine GLI i u jezgri, gdje regrutira specifične korepresore transkripcije, čime utištava aktivnost proteina GLI (Cheng i Bishop 2002, Paces-Fessy i sur. 2004, Lin 2014).



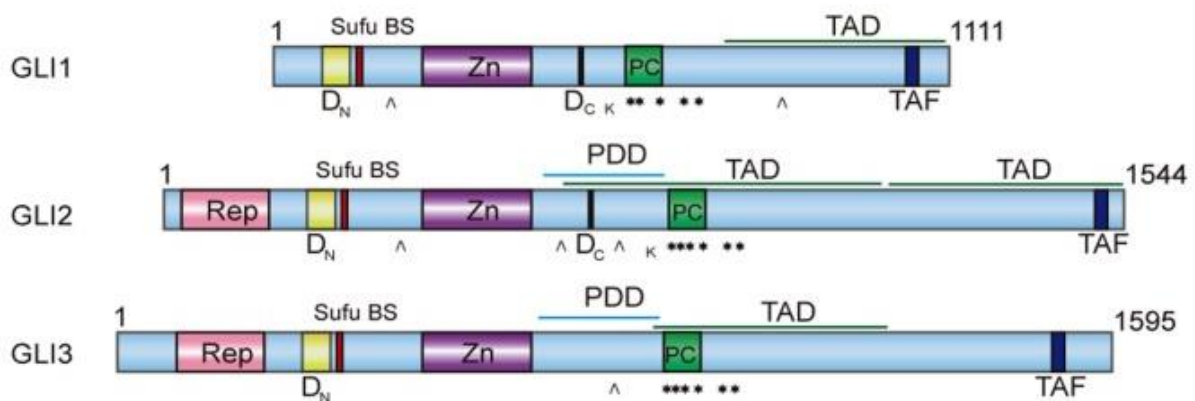
Slika 5. Strukturalna osnova vezanja proteina SUFU i GLI. A) GLI3 peptid (plavo) je uhvaćen između N- (bež) i C- (zeleno) terminalne domene. B) GLI3 peptid (plavo) veže se u kanalu s His336 and Lys337 i ulazi u duboke džepove. Slika je preuzeta i prilagođena iz Cherry i sur. 2013.

1.1.3. Signalizacija u jezgri

Proteini GLI su članovi obitelji transkripcijskih faktora Kruppel. Imaju pet konzerviranih DNA-vezujućih domena s motivom cinkovih prstiju kojima se vežu za konsenzus sekvencu GACCACCCA u promotoru ciljnih gena (Kinzler i Vogelstein 1990). Proteini GLI mogu prepoznati i određene varijante veznog mjesta sa slabijim afinitetom, što može rezultirati snažnom transaktivacijom (Winklmayr i sur. 2010). Signalni put HH-GLI regulacijom ekspresije ciljnih gena regulira razne stanične odgovore kao što su proliferacija i diferencijacija (*Cyclin D1/2*, *Cyclin E*, *E2F1*, *N-Myc*, *FOXM1*, *PDGFR α*), preživljenje (*BCL2*), regeneracija (*SOX2*, *NANOG*, *BMI1*), angiogeneza (*VEGF*, *CYR61*, *ANG1/2*), epitelno-mezenhimalna tranzicija (*SNAIL1*, *ZEB1*, *ZEB2*, *TWIST2*, *MMP9*), invazija (*Osteopontin*) te autoregulaciju samog signalnog puta (*GLI1*, *PTCH1*, *HHIP1*). Regulacija ekspresije gena *GLI1* dovodi do amplifikacije signala nakon njegove aktivacije, dok *PTCH1* i *HHIP1* kao negativni regulatori signalnog puta, predstavljaju negativnu povratnu spregu kojom se kontrolira jačina samog signalnog puta (Katoh i Katoh 2009, Pandolfi i sur. 2015, Sabol i sur. 2018).

1.1.4. Kôd GLI (eng. *GLI code*)

Proteini GLI posjeduju i aktivatorsku i represorsku sposobnost. GLI2 i GLI3 imaju represorsku domenu na amino-terminalnom kraju (N-kraju) i aktivatorsku domenu na karboksiterminalnom kraju (C-kraju). GLI1 ne posjeduje N-terminalnu represorsku domenu i djeluje isključivo kao transkripcijski aktivator (**Slika 6**). Kombinacija sva tri proteina GLI te njihovih aktivatorskih i represorskih oblika naziva se kôd GLI kod (Ruiz i Altaba i sur. 2007, Stecca i Ruiz i Altaba 2010, Aberger i Ruiz i Altaba 2014). U nedostatku HH signala, kôd GLI usmjeren je prema represiranom ishodu (GLI-R) i dovodi do utišavanja signalnog puta. U takvom stanju GLI2 i GLI3 se procesiraju u transkripcijske represore, a *GLI1* se ne prepisuje. Kanonska aktivacija signalnog puta ligandom HH blokira cijepanje proteina GLI i potiče aktivaciju ciljnih gena aktivatorskim oblicima proteina GLI (GLI-A). Iako se u početku smatralo da je regulacija kôda GLI isključivo ovisna o kanonskoj signalizaciji, u posljednje vrijeme sve je jasnije da i signali nevezani za signalni put HH-GLI mogu doprinijeti regulaciji kôda GLI, čime dovode do nekanonske aktivacije signalnog puta HH-GLI (Aberger i Ruiz i Altaba 2014). Ta novija otkrića doprinose razumijevanju načina na koje je kod GLI poremećen u karcinomima.



Slika 6. Shematski prikaz proteina GLI. Prikazane su domene i motivi ključni za funkciju proteina: Zn - motiv cinkovog prsta, DNA vezujuća domena; TAD – transaktivirajuća domena; TAF – vezno mjesto za protein TAF (protein vezan uz TBP); Rep – represorska domena; Sufu BS – vezno mjesto za protein SuFu; * mjesto fosforilacije PKA; PC – fosforilacijski klaster; PDD – domena za određivanje

procesiranja; DN, DC – N- i C-terminalni degroni, sljedovi aminokiselina koji određuju početno mjesto degradacije. Slika je preuzeta i prilagođena iz Huang i sur. 2018.

1.1.5. Mehanizmi aktivacije signalnog puta HH-GLI

1.1.5.1. Nekanonska signalizacija

Postoji nekoliko mehanizama nekanonskog djelovanja signalnog puta HH-GLI. Jedan mehanizam uključuje djelovanje proteina PTCH1 neovisno o nizvodnim komponentama, dok kod drugog mehanizma protein SMO djeluje neovisno o transkripcijskim faktorima GLI (Robbins i sur. 2012). Studije su pokazale da PTCH1 u odsutnosti liganda potiče apoptozu nekanonskom signalizacijom, aktivacijom kaspaze 9. Ligand SHH djeluje kao faktor preživljenja te blokira proapoptotsku funkciju PTCH1 (Mille i sur. 2009). Također, Chang i sur. pokazali su da u staničnoj liniji koja ne eksprimira koreceptor SMO, vezanje liganda za PTCH1 može aktivirati ERK1/2 neovisno o kanonskoj kaskadi te je ta aktivacija neosjetljiva na inhibiciju koreceptora SMO (Chang i sur. 2010). Tumorski supresor PTCH1 regulira i stanični ciklus u kontrolnoj točki G2/M tako da veže ciklin B1 te time sprječava njegovu translokaciju u jezgru (Barnes i sur. 2001). Vezanjem SHH dolazi do konformacijske promjene PTCH1 što dovodi do otpuštanja ciklina B1, njegove translokacije u jezgru te dovršavanja mitoze (Jiang i sur. 2009). Istraživanja su pokazala da postoji i nekanonska signalizacija preko koreceptora SMO, koja je neovisna o nizvodnim transkripcijskim faktorima GLI, međutim, još je nedovoljno istražena i potrebna su detaljnija ispitivanja kako bi se rasvijetlio točan mehanizam i njegova funkcija (Polizio i sur. 2011, Niyaz i sur. 2019). Vrlo zanimljiva interakcija i potencijalni nekanonski mehanizam aktivacije estrogenog receptora putem liganda SHH opisani su u stanicama raka dojke te predstavljaju potencijalni mehanizam aktivacije estrogenog receptora u uvjetima bez estrogena (Sabol i sur. 2014).

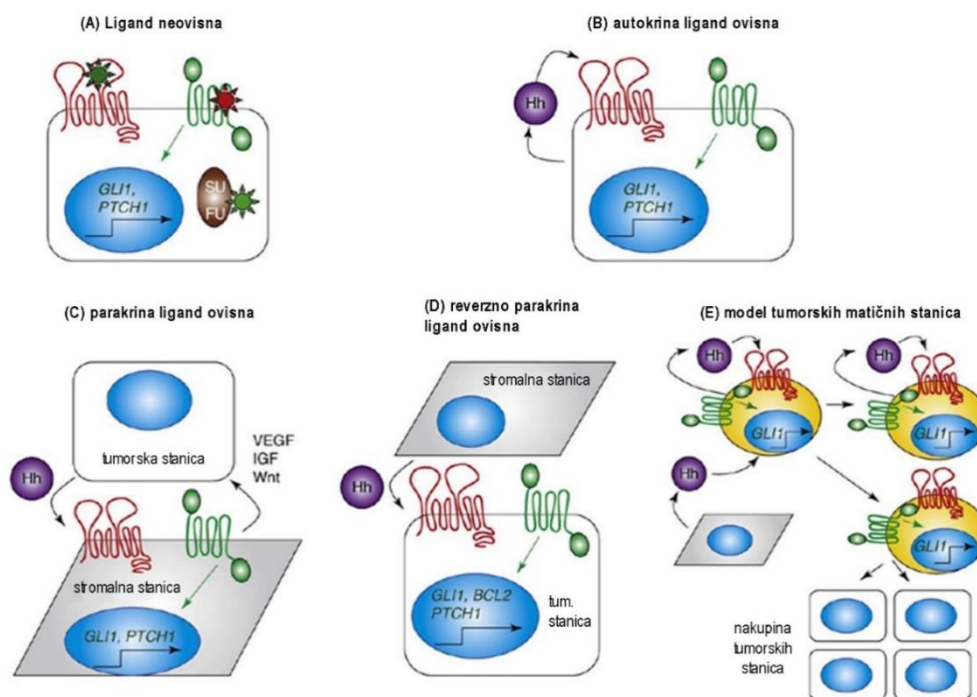
1.1.5.2. Načini aktivacije signalnog puta HH-GLI u tumorima

Poznato je nekoliko načina aktivacije ovog signalnog puta u različitim tipovima tumora. Tako je primjerice kod meduloblastoma i bazocelularnih karcinoma, način aktivacije okarakteriziran kao neovisan o ligandu jer glavni mehanizam aktivacije ovdje predstavljaju mutacije u određenim komponentama signalnog puta, najčešće *PTCH1* i *SMO* (**Slika 7A**).

S druge strane, kod velikog broja tumora, način aktivacije ovisan je o ligandu. Kod takvih tumora dolazi do prekomjerne ekspresije liganda HH. Ukoliko ligand djeluje na samu tumorsku stanicu i unutar nje aktivira signalnu kaskadu, radi se o autokrinoj aktivaciji (**Slika 7B**). Ukoliko, pak, ligand aktivira signalnu kaskadu u okolnim, stromalnim stanicama, govorimo o parakrinoj aktivaciji (**Slika 7C**). Tumori kod kojih je prisutna autokrini signalizacija ovisna o ligandu su 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). Ovi tumori ekspimiraju i nizvodne komponente signalnog puta te je njihov rast *in vitro* moguće inhibirati pomoću inhibitora signalnog puta HH-GLI. Međutim, u nekim slučajevima, iako je nakon tretmana ciklopaminom inhibiran rast stanica, nije došlo do utišavanja signalnog puta pa se smatra kako ciklopamin ima i nespecifične efekte (Scales i de Sauvage, 2009).

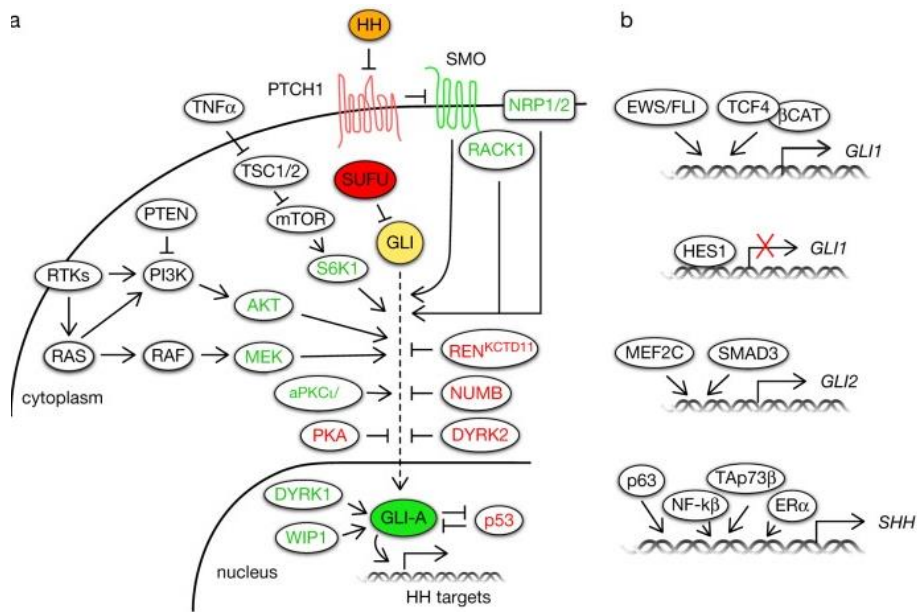
Tumori kod kojih je prisutna parakrina signalizacija ovisna o ligandu su oni kod kojih se ligand proizvodi u tumorskim stanicama, a signal primaju stanice strome u kojima se aktivira signalni put te se proizvode i luče faktori koji održavaju rast tumorskih stanica. Na mišjim modelima tumora prostate (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. U uzorcima humanih tumora prostate i gušterače zabilježeno je da tumorski epitel ekspimirira HH, a *GLI1* se ekspimirira u okolnim stanicama strome (Bailey i sur. 2008, Fan i sur. 2004, Tian i sur. 2009). Uz to, postoji i reverzno-parakrini model tumora (**Slika 7D**), kod kojeg se ligand proizvodi u stanicama strome, a signalni put se aktivira u tumorskim stanicama. Ovakav model opisan je kod limfoma B stanica, multiplog mijeloma i leukemije (Scales i de Sauvage, 2009).

Postoji i najnoviji model, u kojem je signalni put HH-GLI (autokrini ili parakrini) ključan samo za održavanje tumorskih matičnih stanica (**Slika 7**). To je skupina multipotentnih stanica koje imaju sposobnost regeneracije, dakle mogu obnoviti sve stanice tumora. One su rezistentne na kemoterapiju i zračenje i smatra se da su upravo one odgovorne za ponovno pojavljivanje tumora nakon navedenih tretmana. Zbog toga, od ključne je važnosti ispitivati svojstva tih stanica, kako bi se buduće terapije usmjerile na njihovo uništenje. Neka istraživanja su pokazala aktivnost signalnog puta HH-GLI upravo u tumorskim matičnim stanicama glioma (Clement i sur. 2007), gušterače (Li i sur. 2007) i dojke (Liu i sur. 2006) te da njegova inhibicija uništava ovu populaciju stanica. To ukazuje na činjenicu da bi inhibicija ovog signalnog puta mogla biti učinkovita u kombinaciji s klasičnom terapijom. No, s obzirom da su tumorske matične stanice vrlo slične somatskim matičnim stanicama treba detaljno ispitati moguće učinke na samoobnavljajuća tkiva (Scales i de Sauvage, 2009).



Slika 7. Shematski prikaz mehanizama aktivacije signalnog puta HH-GLI u tumorima. Slika je preuzeta i prilagođena iz Scales i de Sauvage 2009.

Osim kanonske aktivacije signalnog puta HH-GLI, postoje i drugi, nekanonski mehanizmi aktivacije putem interakcija s drugim signalnim putevima (**Slika 8**). Kroz više istraživanja je pokazano da drugi signalni putevi koji reguliraju onkogene mogu aktivirati i signalni put HH-GLI neovisno o ligandu. Primjerice, 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). U tumorskim stanicama gušterače SMO nije potreban za aktivaciju signalnog puta HH-GLI, već KRAS i TGF β aktiviraju GLI ovisnu transkripciju. 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). Signalni put TGF β regulira transkripcijske faktore GLI neovisno o koreceptoru SMO u humanim fibroblastima i keratinocitima, kao i u stanicama raka gušterače i dojke. TGF β potiče ekspresiju *GLI2* te na taj način potiče ekspresiju *GLI1* (Dennler i sur. 2007). Takva nekanonska aktivacija transkripcijskih faktora putem TGF β povezana je s epitelno-mezehimalnom tranzicijom te invazijom kod brojnih tumora, primjerice kod melanoma (Alexaki 2010). Zanimljiva je i interakcija između signalnih puteva HH-GLI i WNT. 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 raka debelog crijeva, naime, samo pacijenti s metastazama imaju primarne tumore koje karakterizira utišani signalni put WNT te pojačana aktivnost signalnog puta HH-GLI (Varnat i sur. 2010). Pokazana je i 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 nekontrolirane aktivnosti GLI1, što uzrokuje pojačanu proliferaciju tumorskih stanica i pojačanu regeneraciju tumorskih matičnih stanica (Stecca i Ruiz i Altaba, 2009). Do nekanonske aktivacije signalnog puta HH-GLI može doći i putem interakcije s androgenim receptorom. Pokazano je da transkripcijski aktivan androgeni receptor pojačava transkripcijsku aktivnost proteina GLI u stanicama raka prostate na taj način da vezanjem za GLI3 sprječava njegovo procesiranje u transkripcijski represor te stabilizira formu transkripcijskog aktivatora (Li 2018).



Slika 8. Interakcije signalnog puta HH-Gli s drugim signalnim putevima. **(A)** Shematski prikaz glavnih komponenti signalnog puta HH-Gli (puni krugovi) te njihovih pozitivnih (zeleno) i negativnih (crveno) regulatora. **(B)** Direktni transkripcijski regulatori *GLI1*, *GLI2* i *SHH*. Slika je preuzeta i prilagođena iz Pandolfi i Stecca 2015.

Ukratko, i kanonska signalizacija i velik broj signalnih puteva neovisnih o SMO mogu djelovati na aktivnost transkripcijskih faktora GLI. Stoga bi pristup liječenju tumora u kojima je prisutna nekanonska aktivacija GLI trebao biti prilagođen i usmjeren na inhibiciju GLI, a ne SMO. U tumorima su često istovremeno prisutne i kanonska i nekanonska aktivacija signalnog puta HH-Gli te je u nekim tumorima istovremeno prisutno nekoliko različitih nekanonskih mehanizama. Iz tih razloga, kombinirane terapije će vjerojatno biti mnogo učinkovitije u suzbijanju rasta i progresije tumora ovisnih o transkripcijskim faktorima GLI (Pietrobono i sur. 2019).

1.1.6. Uloga signalnog puta HH-Gli u embrionalnom razvoju

Signalni put HH-Gli igra ključnu ulogu tijekom embrionalnog razvoja kako beskralješnjaka tako i kralješnjaka, osobito tijekom morfogeneze. Proteini HH su morfogeni koji potiču različite odgovore ovisne o dozi. Mogu regulirati proliferaciju stanica i kontrolirati oblik

organa u razvoju. Ovaj signalni put uključen je u razvoj gotovo svih organa tijekom razvoja embrija kralješnjaka (na primjer kost i hrskavica, udovi, neuroni, mali mozak, oko, crijeva, spolni organi, srce, pluća, gušterača, mišići, lateralna simetrija) (Ingham 2001). Zbog toga ne iznenađuje da poremećaji u signalnom putu HH-GLI dovode do razvoja mnogih kongenitalnih malformacija i sindroma (Sabol i sur. 2018).

Za vrijeme embrionalnog razvoja ligand signalnog puta SHH, prisutan je u notokordu, neuralnoj cijevi te pupoljcima ekstremiteta. Aktivni oblik proteina SHH-N djeluje kao difuzna molekula te je odgovorna za morfogenezu okolnih stanica. Protein SHH odgovoran je za simetriju lijeve i desne strane tijela, pravilan razvoj udova, neuralne cijevi, malog mozga, probavnog sustava i kože. DHH je uključen u pravilan razvoj testisa, dok je IHH bitan za morfogenezu kosti (Jia i Jiang 2006). Pokazano je da mutacije u genu *SHH* dovode do holoprosencefalije te ciklopije (Cordero i sur. 2004, Roessler i sur. 1997), dok mutacije u genu *PTCH1* uzrokuju nastanak Gorlinovog sindroma. Ovaj sindrom, osim određenih razvojnih poremećaja, karakterizira i podložnost određenim tumorima, kao što su meduloblastom i bazeocelularni karcinom (BCC) (Hooper i Scott 2005, Unden i sur. 1996). Također, mutacije u obitelji gena *GLI*, a posebno *GLI3*, mogu rezultirati sindromom Pallister-Hall te Greigovom cefalopolisindaktilijom, koje karakteriziraju polidaktilija te poremećaji u razvoju traheja, bubrega i makrocefalija (Ogden i sur. 2004, Villavicencio 2000).

1.1.7. Uloga signalnog puta HH-GLI u odraslom organizmu

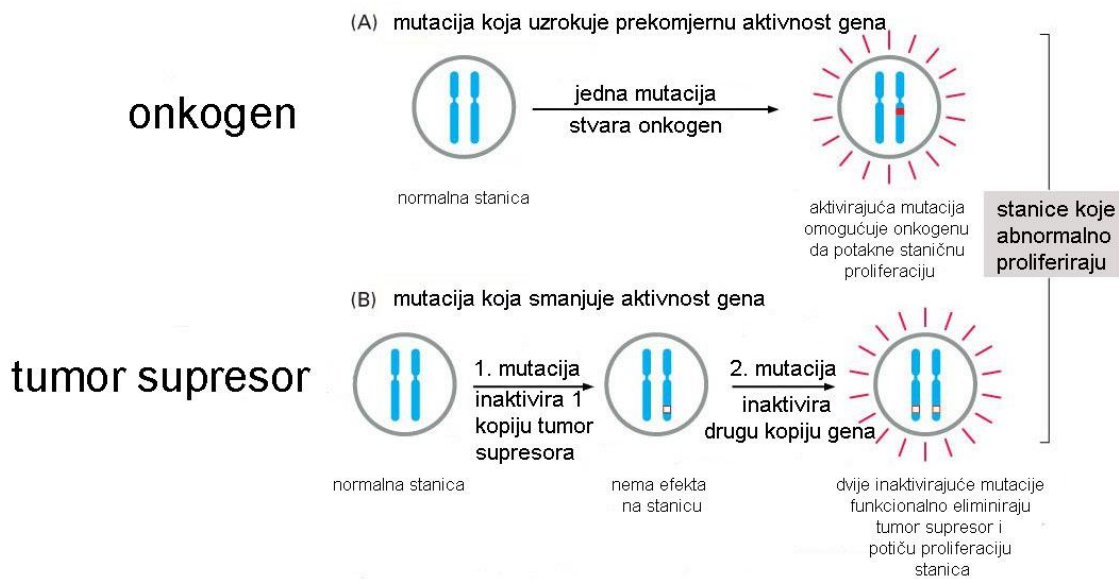
Signalni put HH-GLI je u odraslom organizmu uglavnom inaktivan, iako je mogućnost aktivacije zadržana u matičnim i progenitorskim stanicama. To znači da je njegova funkcija ključna u održavanju homeostaze organa u odraslom organizmu i njihove obnove nakon oštećenja. Količina proteina GLI1 u mirujućim somatskim matičnim stanicama je mala, a aktivacija signalnog puta odgovorna je za njihovu aktivaciju, regeneraciju i stvaranje stanica kćeri (Ruiz i Altaba i sur. 2007). Brojna ispitivanja povezala su signalni put HH-GLI s nizom somatskih matičnih stanica, primjerice neuralnim matičnim stanicama (Faigle i Song 2013); matičnim stanicama jetre, gdje je ključan za obnavljanje nakon akutne ozljede (Omenetti i sur. 2011); matičnim stanicama dojke te je pokazano da ima ulogu u povećanju mliječnih žlijezda tijekom trudnoće (Hui i sur. 2013); epidermalnim matičnim stanicama gdje ima

ključnu ulogu u kontroli rasta folikula dlake (Zhou i sur. 2006); stromalnim matičnim stanicama prostate, gdje je ključan za repopulaciju i regeneraciju tih stanica nakon involucije izazvane kastracijom (Peng i sur. 2013) te spolnim matičnim stanicama (Li i sur. 2017).

1.1.8. Uloga signalnog puta HH-Gli u karcinogenezi

Karcinom je heterogena bolest uzrokovana promjenama u genomu i epigenomu. Pod utjecajem okolišnih faktora i životnog stila dolazi do promjena koje uključuju mutacije, rearanžmane genoma, kao i epigenetske promjene uključujući promijenjenu metilaciju DNA ili promijenjenu modifikaciju histona. Nakupljanje takvih promjena u genima koji kontroliraju ključne regulatorne procese u stanici u konačnici dovodi do nekontrolirane proliferacije stanica. Takve promijenjene, tumorske stanice, postaju neosjetljive na signale koje reguliraju rast normalnih stanica, dijele se nekontrolirano, prodiru u zdravo tkivo i organe te se, u konačnici, šire kroz cijeli organizam.

Geni koji kontroliraju ključne stanične procese mogu se svrstati u proto onkogene i tumorske supresore (**Slika 9**). Proto onkogeni u zdravim stanicama reguliraju prolaz kroz stanični ciklus, diferencijaciju i inhibiraju staničnu smrt. Kada je takav gen u tumoru promijenjen, naziva se onkogenom, a njegova funkcija više nije točno regulirana, što rezultira proliferacijom i izbjegavanjem stanične smrti. S druge strane, tumorski supresori su geni koji u zdravim stanicama sprječavaju diobu stanice i potiču staničnu smrt. Promjene u ovim genima dovode do njihove inaktivacije, čime se gubi njihova funkcija (Cooper 2000).



Slika 9. Shematski prikaz mehanizama nastanka onkogeni i tumorskog supresora. Slika je preuzeta i prilagođena iz Alberts i sur. Molecular biology of the cell, 4th ed.

Komponente signalnog puta HH-Gli također su proto onkogeni i tumorski supresori. Funkcija gena *PTCH1* kao tumorskog supresora ustanovljena je kada je otkriveno da njegova mutacija uzrokuje Gorlinov sindrom, kojeg između ostalog karakterizira i sklonost određenim vrstama tumora, kao što su meduloblastomi, bazeocelularni karcinomi i rabdomiosarkomi. Tada je i nastanak sporadičnih oblika ovih tumora povezan s poremećenom funkcijom signalnog puta HH-Gli (Hahn i sur. 1996, Levanat i sur. 1996). Nakon toga, ustanovljeno je da osim inaktivirajućih mutacija u genu *PTCH1*, nastanak bazocelularnih karcinoma mogu uzrokovati i aktivirajuće mutacije u genu *SMO*. Transgeni miševi koji eksprimiraju mutirani *SMO* razvijaju kožne promjene slične BCC-ima te je time pokazano da *SMO* ima onkogenu funkciju (Xie i sur. 1998). Protein *SUFU* također je identificiran kao tumorski supresor kada je pokazano da inaktivirajuće mutacije u ovom genu uzrokuju nastanak meduloblastoma (Taylor i sur. 2002). Međutim, daljnja istraživanja pokazala su da takve genetske promjene u genu *SUFU* i nisu tako česte u humanim meduloblastomima (Koch i sur. 2004). Ipak, s obzirom da je nedostatak gena *SUFU* letalan za miševe i oni pokazuju karakteristike slične miševima kojima nedostaje gen *PTCH1* te da *SUFU* +/- miševi razvijaju fenotip kože sličan onom kod Gorlinovog sindroma potvrđeno je da je *SUFU* negativni regulator signalnog puta i tumorski supresor (Svärd i sur. 2006).

Transkripcijski faktor *GLI1* otkriven je u malignom gliomu gdje je i do 50 puta amplificiran te je odmah svrstan u onkogene, što implicira i njegovo ime Glioma-associated oncogene homolog 1 (Kinzler i sur. 1987). Za razliku od drugih komponenata ovog signalnog puta, u genu *GLI1* nisu zabilježene mutacije. Amplifikacija ovog gena zapravo i nije česta pojava u tumorima, međutim danas je poznato da onkogeno djelovanje *GLI1* može biti rezultat modulacije njegove funkcije signalima koji nisu vezani za signalni put HH-GLI. Gubitak nekih tumorskih supresora i prekomjerna aktivacija onkogeni u tumorima nekanonski dovodi do deregulacije omjera aktivatorskih i represorskih oblika proteina GLI, čime se ravnoteža pomiče k aktivatorskim oblicima (Aberger i Ruiz i Altaba 2014).

Ključ razumijevanja procesa nastanka tumora te njegovog održavanja leži u identifikaciji ciljnih gena i bioloških procesa koje ovaj signalni put kontrolira, a važni su za karcinogenezu (Slika 10).

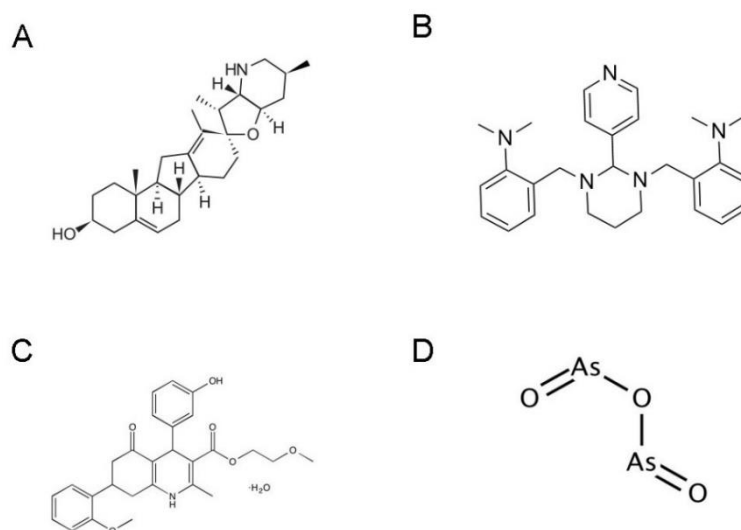


Slika 10. Shematski prikaz utjecaja signalnog puta HH-GLI na stanične procese uključene u karcinogenezu. Slika je preuzeta iz Hanna i Shevde 2016.

1.1.9. Spojevi koji modificiraju aktivnost signalnog puta HH-GLI

Inhibitori signalnog puta HH-GLI skupina su terapeutika koji djeluju na komponente koje reguliraju aktivnost puta. Aktualne strategije inhibicije signalnog puta HH-GLI uključuju inhibitore liganda HH, inhibitore koreceptora SMO te inhibitore transkripcijskih faktora GLI (Slika 11).

Ovce koje su se hranile biljkom *Veratrum californicum* rađale su mrtvu janjad s ciklopijom, a naknadno je otkriveno da je aktivna supstanca s takvim teratogenim učinkom steroidni alkaloid ciklopamin, koji inhibira signalni put HH-GLI vezujući se direktno na koreceptor SMO i mijenjajući njegovu strukturu (Binns i sur. 1963, Chen i sur. 2002). Ciklopamin je i dalje najčešće korištena molekula za inhibiciju signalnog puta na razini proteina SMO *in vitro*, međutim razvijaju se i druge male molekule koje inhibiraju ovaj protein. Najpoznatiji su, vismodegib, sonidegib i saridegib koji su u postupcima kliničkih ispitivanja za neke oblike tumora. Za sada najbolje rezultate pokazuju kod bazocelularnih karcinoma i meduloblastoma, dok kod metastatskog raka gušterače, raka prostate neovisnog o androgenu, metastatskog raka debelog crijeva i želuca te hematoloških maligniteta nisu pokazali klinički efekt sami ili u kombinaciji sa standardnom kemoterapijom (Xie i sur. 2019).

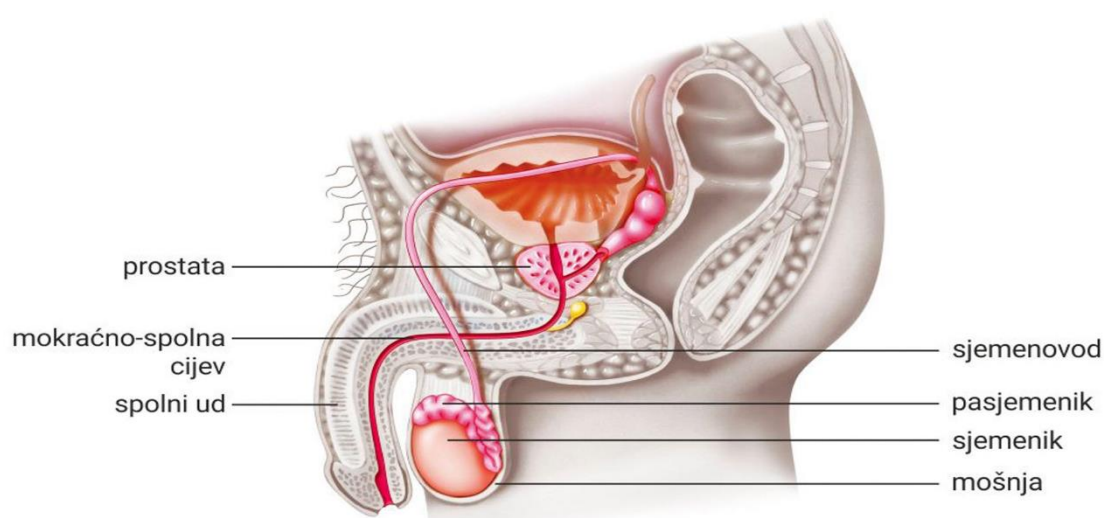


Slika 11. Prikaz kemijskih struktura inhibitora signalnog puta HH-GLI. (A) Ciklopamin. (B) GANT61. (C) HPI1. (D) Arsenov trioksid.

Zbog neosjetljivosti mnogih tumora na inhibiciju proteina SMO, što zbog razvoja rezistentnosti, što zbog nekanonske aktivacije signalnog puta, javila se potreba za inhibicijom na nizvodnim razinama. Aktivnost proteina GLI regulirana je na nekoliko razina, uključujući fosforilaciju, acetilaciju i degradaciju, te svi ti koraci, kao i partneri s kojima proteini GLI stupaju u interakciju, predstavljaju potencijalne mete. Molekula GANT61 identificirana je kao specifični inhibitor proteina GLI1 i GLI2. Ona sprječava vezanje ovih proteina za DNA te time inhibira transkripciju ciljnih gena (Agyeman i sur. 2014). Pokazano je da smanjuje proliferaciju i inducira apoptozu u raznim tipovima tumorskih stanica (Lauth i sur. 2007, Mazumdar i sur. 2011, Yan i sur. 2011, Fu 2013, Wickström i sur. 2013, Desch i sur. 2010). Arsenov trioksid (As_2O_3 , ATO), lijek odobren od strane FDA za liječenje akutne promijelotične leukemije, također je antagonist proteina GLI. Veže se direktno za GLI1 te inhibira njegovu transkripcijsku aktivnost što smanjuje rast tumora *in vitro* i *in vivo*. Učinkovitost ATO treba se detaljnije ispitati zbog drugih, nespecifičnih molekularnih meta i potencijalne toksičnosti (Kim i sur. 2010, Beauchamp i sur. 2011, Levanat i sur. 2017). Inhibitori signalnog puta HH-GLI pod nazivom HPI 1-4 također djeluju nizvodno i to tako da moduliraju procesiranje, aktivaciju i lokalizaciju proteina GLI (Hyman i sur. 2009). Treba naglasiti da niti jedan od inhibitora proteina GLI nisu dobri kandidati za klinička ispitivanja (Pietrobono i sur. 2019). Proteini koji reguliraju aktivnost proteina GLI također su potencijalne mete kad se radi o inhibiciji signalnog puta HH-GLI. Jedan takav protein je i GSK3 β , čija se aktivnost može regulirati litijevim kloridom. Pokazano je da pacijenti tretirani s litijem pokazuju manji rizik za razvoj tumora od opće populacije (Jope 2003, Cohen i sur. 1998). Inhibicija GSK3 β litijem u stanicama raka prostate, gdje pokazuje aberantnu aktivaciju i onkogeno djelovanje, dovodi do inhibicije signalnog puta HH-GLI te smanjene proliferacije i sposobnosti stanica za stvaranje kolonija (Trnski i sur. 2015).

1.2. Prostata

Muški spolni sustav se sastoji od penisa ili muškog spolnog uda, testisa ili sjemenika, epididimisa ili pasjemenika, *ductus deferensa* ili sjemenovoda, glandule *vesiculose* ili sjemenskih mjehurića, prostate i *glandule bulbourethralis* ili bulbouretralne žlijezde (Krpmotić-Nemanjić 1982). Prostata ili predstojna žlijezda je neparan muški organ, koji se nalazi ispod mokraćnog mjehura, ispred rektuma i iza simfize (**Slika 12**). Zbog neobičnog izgleda koji podsjeća na kesten, mnogi autori ju nazivaju i kestenjača.



Slika 12. Anatomski smještaj prostate. Na prerezu kroz ljudsko tijelo vidi se pozicija prostate koja je ispod mokraćnog mjehura, ispred rektuma, a iza simfize. Izvor: <https://edutorij.e-skole.hr/share/proxy/alfresco-noauth/edutorij/api/proxy-guest/3b8a4b4e-84b0-4580-aa6f-e38efe028ed9/biologija-8/m02/j02/index.html>

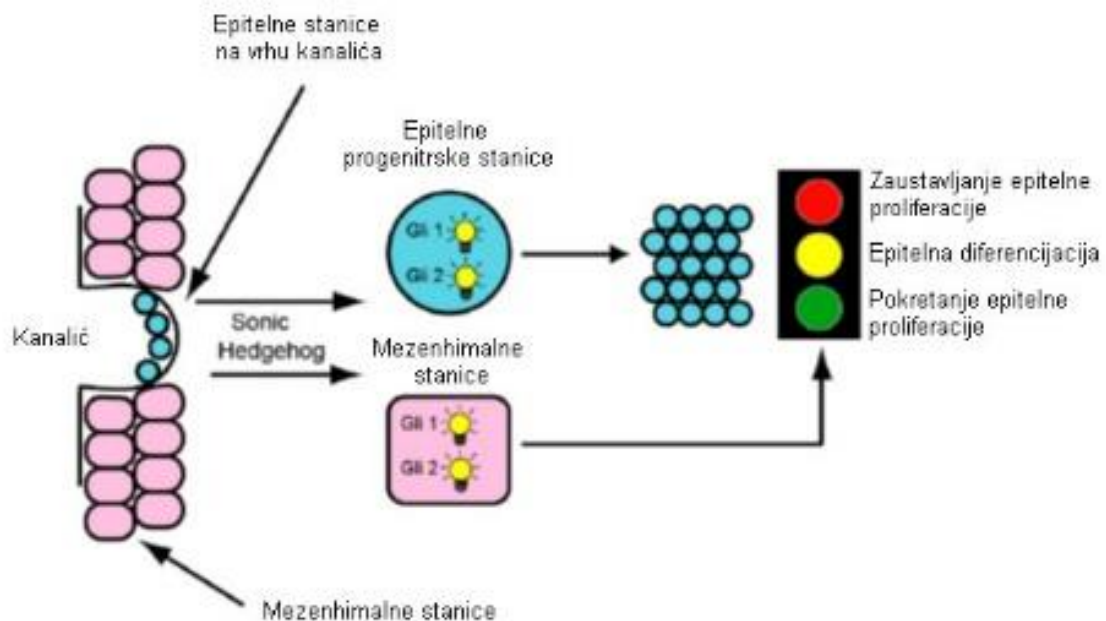
1.2.1. Embrionalni razvoj prostate i uloga signalnog puta HH-Gli

Prostata nastaje tijekom embrionalnog razvoja iz zajedničkog mokraćnog i spolnog sustava koji se formiraju iz intermedijarnog mezoderma (Duančić 1985). Mokraćni sustav se počinje razvijati u 5. tjednu, kada se intermedijarni mezoderm odvaja od somita i oblikuje nefrotome. Između 4. i 7. tjedna razvija se urorektalna pregrada koja će podijeliti kloaku na anorektalni kanal i primitivni urogenitalni sinus. U tijeku razvoja urogenitalnog sinusa

razlikujemo mokraćni mjehur koji se nastavlja u zdjelični dio i osnovu za prostatički i membranski dio mokraćne cijevi te falički dio urogenitalnog sustava. Koncem 3. mjeseca epitel endodermalnog podrijetla počinje bujati i urastati u mezenhim iz čijih epitelnih izdanaka nastaje prostata (Junqueira i sur. 2005). Postnatalno dolazi do grananja endodermalnih kanalića i razvija se zrela prostata (Bushman 2016).

Tijekom razvoja prostate proteini SHH i IHH ekspimiraju se u epitelu urogenitalnog sinusa te potiču ekspresiju ciljnih gena signalnog puta HH-GLI u okolnom mezenhimu. SHH je najjače ekspimirani HH ligand tijekom razvoja prostate, a ekspresija se povećava sa stvaranjem kanalića i nivo se održava do početka grananja kanalića, kada ekspresija SHH počinje padati na nisku, ali detektabilnu razinu u odraslom organizmu (Bushman 2016).

Uloga signalnog puta u embrionalnom razvoju prostate uglavnom je proučavana na mišjem modelu (**Slika 13**). Pokazano je da su SHH i IHH ekspimirani u epitelu urogenitalnog sinusa odakle induciraju aktivaciju ciljnih gena u susjednim mezenhimalnim stanicama. SHH je najjače ekspimirani ligand tijekom razvoja prostate. Visoka razina ekspresije održava se do početka grananja kanalića, kada počinje padati. Ekspresija SHH je lokalizirana u epitelu na distalnom kraju tijekom elongacije i grananja kanalića. U tom periodu GLI1 i PTCH1 ekspimirani su u mezenhimu koji ga okružuje. Pokazano je da IHH može nadomjestiti funkciju SHH u embriju koji ne ekspimirira SHH. Točnu ulogu signalnog puta HH-GLI u morfogenezi prostate potrebno je detaljnije ispitati.

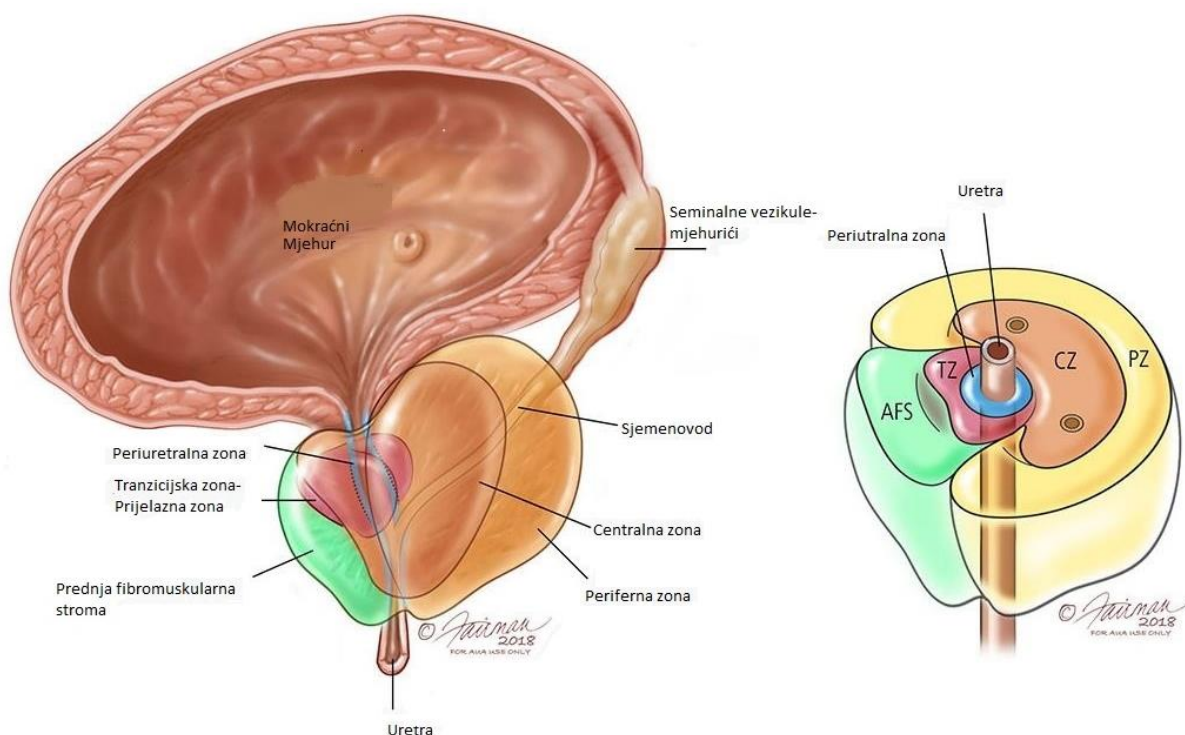


Slika 13. Tijekom razvoja prostate, aktivnost signalnog puta HH-Gli je i autokrini i parakrini. Autokrini signalizacija potiče proliferaciju progenitornih stanica neovisnih o androgenu prilikom stvaranja kanalića. Parakrini signalizacija odgovorna je za izazivanje kompleksnog transkripcijskog odgovora, ovisnog o fazi razvoja, koji dovodi do niza učinaka na proliferaciju i diferencijaciju epitela. U prenatalnoj prostati, ovaj signalni put potiče proliferaciju epitela i rast kanalića. Progenitorne stanice neovisne o androgenu koje se razvijaju pod utjecajem autokrinog prijenosa signala, mogu preživjeti kastraciju i omogućuju regeneraciju prostate u odgovoru na nadomjestak testosteronom. Slika je preuzeta i prilagođena iz Bushman 2016.

Razvoj i održavanje prostate ovisni su o androgenu. Kastracija u odraslih rezultira apoptozom u epitelu i involucijom žlijezda. Do regeneracije dolazi nakon administracije egzogenog testosterona i uključuje proliferaciju stanica, grananje i potpunu rekonstrukciju arhitekture prostate te diferencijaciju. Pokazano je da kastracija uzrokuje ekspanziju sporociklirajućih progenitorskih stanica, koje su neovisne o androgenu. Pronađeno je da su i SHH i Gli pojačano eksprimirani nakon kastracije. Ti nalazi ukazuju na ulogu signalnog puta HH-Gli u ekspanziji progenitorskih stanica i regeneraciji prostate (Bushman 2016).

1.2.2. Anatomija i histologija prostate

Prostata se anatomski može podijeliti i na četiri strane: prednja facies anterior, stražnja facies posterior i dvije lateralne facies inferolaterales (**Slika 14**).



Slika 14. Anatomija prostate. Iznad prostate je prikaz mokraćni mjehur, a jasno se vide periuretralna zona, tranzicijska zona, prednja strana prostate, odnosno centralna i periferna zona. Izvor: [https://www.urologyhealth.org/urology-a-z/p/prostatitis-\(infection-of-the-prostate\)](https://www.urologyhealth.org/urology-a-z/p/prostatitis-(infection-of-the-prostate))

Prostata je izvana obavijena vezivnom ovojnicom - *capsula prostatica*. Građena je od 30 do 50 razgranatih tubuloalveolarnih žlijezda čiji se odvodni kanali otvaraju u mokraćnu cijev (Junqueira i sur. 2005). Žljezdani je dio okružen obilnom fibromuskularnom stromom (Young i sur. 2013). Prednja strana prostate je orijentirana prema simfizi, a stražnja strana je orijentirana prema rektumu. Stražnja površina se može palpirati kroz rektum (digitorektalni pregled, DRP) (Vidović 2008). Baza prostate je okrenuta prema mokraćnom mjehuru, vrh prostate se nalazi na urogenitalnoj dijafragmi (Krpmotić-Nemanjić 1982). Prostatu možemo

podijeliti na i dva režnja, *lobus prostatae dexter* i *lobus prostatae sinister*. *Lobus medius prostatae* je dio prostate između ejakulatornih vodova i mokraćne cijevi (Cotran 2005).

Žljezdani sekret se izlijeva kanalčićima ductuli prostatici u *sinus prostaticus partis prostaticae urethrae masculinae*, a krvna opskrba ide preko donje vezikalne arterije, koja se grana na arteriju prostatiku. Vene se dreniraju u vezikalni venski pleksus koji je povezan s venom dorsalis penisa (Krmpotić-Nemanjić 1982). Venski pleksus je u komunikaciji s hemoroidnim venama i zbog toga nastaju metastaze na jetri kod raka prostate (Vidović 2008). Zbog komunikacije s presakralnim pleksusom vena, omogućen je mehanizam širenja raka prostate u koštani sustav (Vidović 2008).

Histološki prostata ima tri zone: središnja zona čini 25% žlijezde, a periferna zona koja je i glavno mjesto nastanka raka je oko 70% volumena žlijezde. Prijelazna zona je mjesto većine benignih hiperplazija prostate (Gray 2015). Prostata je obavijena fibroelastičnom čahuricom bogatom mišićnim stanicama (Young i sur. 2013). Tubuloalveolarne žlijezde prostate čine kubični ili višeslojni cilindrični epitel. Uz fibrozne stanice također je obogaćena glatkomišićnim stanicama, koje omogućuju kontrakciju žlijezde u cijelosti (Junqueira i sur. 2005). Što je muškarac stariji, na preparatima se može zamijeti sve više prostatičnih kamenaca, corpora amylacea. To su sitna tjelešca glikoproteinske strukture veličine od 0,2 do 2 mm no njihova funkcija i uloga nisu točno utvrđeni (Junqueira i sur. 2005).

1.2.2. Fiziološka funkcija prostate i uloga PSA

Funkcija prostate je stvaranje i izlučivanje sjemene tekućine, odnosno sperme. U sekretu prostate nalazimo kemijske elemente cink, magnezij, kalcij, citrate, poliamine, kolesterol, fosfolipide i proteine (Hall 2015). Prostata proizvodi i secernira u sjemenu tekućinu i krvotok protein veličine 30kDa, tzv. *prostata specifični antigen* ili PSA (Ganong 2019). Epidermalni faktor rasta (EGF) smanjuje, a androgeni pojačavaju izlučivanje PSA. Gen PSA (hKLK3) smješten je na kromosomu 19 (Frick i Aulitzky 1991).

PSA je biomarker koji se široko koristi u dijagnosticiranju i praćenju bolesnika koji su oboljeli od raka prostate. PSA se dobiva iz serumske krvi, vrlo je jednostavna i jeftina metoda. Vrlo precizna u dijagnostici tumora, praćenju tumorskog rasta kao i praćenju recidiva bolesti. PSA

se hidrolizira i na taj način sprječava inhibiciju inhibitora motiliteta sperme semenogelina i njegovih supstrata koji se nalaze u plazmi (Frick i Aulitzky 1991).

PSA je u cirkulaciji u 70 do 90% u vezanom obliku s kompleksima inhibitora proteinaza te se naziva kompleksni PSA. Svega 10 do 30% PSA je u slobodnom obliku i predstavlja inaktivni oblik enzima. Promjene u prostatičnom parenhimu dovode do promjene u vrijednostima PSA u serumu i do promjene omjera slobodnog i vezanog PSA. Kod pacijenata s rakom prostate nalazimo povišene vrijednosti slobodnog i ukupnog PSA (Partin i sur. 1997).

Budući da je digitorektalni pregled (DRP) subjektivna metoda nužna je kombinacija s određivanjem PSA. PSA može biti prediktor nastanka ili progresije tumora (Ganong 2019). Agencija za hranu i lijekove (eng. *Food and Drug Administration*, FDA) 1986. godine dala je preporuke za korištenje PSA metode u dijagnostici uroloških bolesti, a od 1994. godine sukladno preporukama FDA-a urološki pregled se kombinira s DRP-om.

Viša vrijednost PSA povećava vjerojatnost postojanja raka. Treba naglasiti da svaka viša vrijednost ne označava ujedno i karcinom (Frick i Aulitzky 1991). Povišene vrijednosti PSA se nalaze u oko 75% bolesnika, dok je kod ostalih ta vrijednost u granicama normale. Razlog tome je što dio bolesnika ima anaplastične i slabo diferencirane tumore koji ne uzrokuju povišenje ovog biljega (Damjanov i sur. 2011). PSA može biti povišen i kod masaže prostate, kateterizacije, endoskopskog zahvata, spolnog odnosa. Uredna vrijednost PSA je od 0 do 4 ng/ml (Guyton 2019). Više vrijednosti PSA možemo naći i kod prostatitisa i benigne hiperplazije prostate. Budući da se volumen prostate povećava s godinama, tkivo prostate postaje propusnije i na takav način PSA lakše odlazi u sistemske cirkulaciju pa se onda očekuje i porast razine serumske PSA s godinama. Zbog toga se danas sve više koriste korigirane vrijednosti PSA s obzirom na dob (Ikerowo i sur. 2016, Putra i sur. 2016).

1.2.3. Benigna hiperplazija prostate

Benigna hiperplazija prostate je jedan od najčešćih zdravstvenih problema starije muške populacije. Smatra se da oko 50% muškaraca u dobi od 50 godina i čak 95% muškaraca starijih od 70 godina imaju neki oblik hiperplazije prostate (Vidović 2008). Benigna hiperplazija prostate posljedica je hiperplazije stanica prostate koja tada uzrokuje suženje ili čak potpunu opstrukciju prostatičkog dijela uretre. Smatra se da je uzrok povećanja žlijezde

u starijoj dobi promjena razine spolnih hormona. Učestalost se povećava s dobi, a neki od rizičnih faktora su obiteljska predispozicija, kronične bolesti poput dijabetesa, ali i pretjerana tjelesna masa (Vidović 2008).

Vodeći simptomi hiperplazije prostate su: otežano i isprekidano, ponekad i bolno mokrenje, nokturija (noćno mokrenje) te pojačani nagon na mokrenje. Pacijenti često navode da nakon mokrenja prevladava osjećaj nepotpunog pražnjenja, čime se povećava učestalost ponovnih odlazaka u toalet (Vidović 2008). Rjeđi simptomi su prisutnost krvi u urinu te učestale mokraćne infekcije. Najčešće zabilježene komplikacije su povećana učestalost urinarnih infekcija, razvoj mokraćnih kamenaca, gubitak kontroliranja mlaza mokrenja, a u najtežim slučajevima hidronefroza bubrega. U literaturi je zabilježeno da se u 5-10% pacijenta javila urinarna retencija, odnosno potpuna opstrukcija mokraćne cijevi koja uzrokuje bol i nemogućnost mokrenja praćene velikim i napetim mjehurom.

Hitno urološko zbrinjavanje pacijenata uključuje kateterizaciju, koja može biti privremena ili trajna te lijekovi, čiji odabir ovisi o ukupnom kliničkom statusu pacijenta (antibiotici, analgetici, spazmolitici, alfa-blokatori). U slučaju neuspješne kateterizacije nužno je učiniti cistostomiju kako bi se spriječilo oštećenje mokraćnog mjehura. Trajno zbrinjavanje pacijenta može se postići lijekovima ili minimalno invazivnim ili invazivnim kirurškim zahvatom. Lijekovi predstavljaju prvu liniju liječenja, a podrazumijevaju alfa-blokatore ili inhibitore 5-alfa reduktaza (Vidović 2008). Navedeni lijekovi mogu se koristiti kao monoterapija ili u kombinaciji, ovisno o slučaju. Minimalno invazivni zahvati obuhvaćaju transuretralnu resekciju prostate (TURP), transuretralnu inciziju prostate (TUIP) i lasersku terapiju. Invazivniji zahvati podrazumijevaju otvoreni kirurški pristup, prilikom kojeg se uklanja višak žljezdanog tkiva, a u nekim slučajevima i potpuna prostatektomija. U novije vrijeme dostupna je, također, i embolizacija, kojom se izaziva odumiranje dijela prostate koji uzrokuje opstrukciju (Vidović 2008).

1.2.4. Upalni procesi prostate

Prostatitisi ili upale prostate, označuju skupinu bolesti različite etiologije karakteriziranih bolnim mokrenjem ili nemogućnošću mokrenja, te bolnosti u području međice. Prostatitisi mogu biti uzrokovani bakterijskom infekcijom ili neinfektivnim čimbenicima upale koji sa

spazmom urogenitalne dijafragme stvaraju ove simptome (Vidović 2008). Prema nalazu parametara iz mokraće (čimbenici upale i infekcije) prostatitise možemo podijeliti u četiri kategorije prilikom dva uzorkovanja. Uzorak se uzima prije i nakon masaže prostate (Nickel i sur. 2001).

Akutni bakterijski prostatitis (kategorija I) karakteriziran je simptomima akutne upale urinarnog trakta, prisustvom leukocita u urinu, koji mogu, ali i ne moraju biti prisutni prije masaže prostate, a svakako su prisutni nakon masaže prostate (Vidović 2008). Bakterije mogu, ali ne moraju biti prisutne prije masaže, međutim, svakako su prisutne nakon masaže prostate. Kronični bakterijski prostatitis (kategorija II) uzrokovan je recidivima upale mokraćnog trakta istim bakterijskim uzročnikom. Kod kroničnog bakterijskog prostatitisa prije masaže mogu i ne moraju biti prisutni leukociti, ali nakon masaže nalaz je pozitivan. Bakterije prije masaže prostate u kroničnog bakterijskog prostatitisa mogu, ali i ne moraju biti prisutne, ali nakon masaže nalaz bakterija u urinu je pozitivan.

Kronični prostatitis, odnosno sindrom kroničnog bola u zdjelici treća je kategorija prostatitisa. Simptomi ove bolesti su bol u zdjelici, seksualna disfunkcija i smetnje te otežano, bolno mokrenje (Nickel i sur. 2001). U kategoriju IIIa spada upalni kronični prostatitis s negativnim nalazom leukocita u urinu prije masaže i pozitivnim nakon masaže prostate. Bakterijski nalaz je negativan prije masaže, a pozitivan nakon masaže prostate. U kategoriju IIIb ubrajamo i neupalni kronični prostatitis, koji se manifestira kao prostatodinija, odnosno javlja se bol u genitalijama i donjem dijelu leđa, ponekad zimica i tresavica, često i bolno mokrenje (Nickel i sur. 2001). U ovim slučajevima u urinu ne nalazimo leukocite ni prije ni nakon masaže prostate. Bakterije nisu prisutne u urinu ni prije ni nakon masaže prostate (Nickel i sur. 2001). Asimptomatski upalni prostatitis (kategorija IV) otkriva se slučajno prilikom pregleda urologa. Prije masaže u urinu nema prisutnih leukocita, međutim, pojavljuju se nakon masaže (Nickel i sur. 2001).

1.2.5. Karcinom prostate

1.2.5.1. Epidemiologija

Karcinom ili rak prostate je po učestalosti drugi karcinom od svih karcinoma u muškaraca, a na petom je mjestu kao uzrok smrti (Pranth 2019). U svijetu je 2018. godine zabilježeno 1.276.106 novih slučajeva raka prostate (Pranth 2019). Incidencija raka prostate raste s dobi pa je najveća stopa oboljenja u muškaraca preko 65 godina (Pranth 2019). U 2018. g. je svijetu preminulo 358.989 muškaraca (Ferlay i sur. 2018). Svjetska predviđanja govore o negativnom trendu porasta raka prostate oko 1,05%, te predviđaju do 2040. g. oko 2.293.818 novooboljelih pacijenata (Ferlay i sur. 2018). Sjeverna Amerika, Australija i Europa statistički prednjače u broju novo oboljelih, dok je najmanja stopa novoboljelih u Africi. (Ferlay i sur. 2018). Veći broj novoboljelih pacijenata u Americi i u Europi u odnosu na Afriku može se objasniti slijedećim faktorima: utjecaj genetike, socijalnog okruženja, okolišnih čimbenika ali i uspješnijim metodama probira raka prostate (Pranth 2019).

Promatrajući statističke podatke 1 od 350 muškaraca u dobi nižoj od 50 godina će oboljeti od raka prostate, a 1 od 52 muškarca u dobi od 50 do 59 godina, dok će muškarci stariji od 65 g. imati mogućnost oboljenja čak 60% U Europi je karcinom prostate kod muškaraca na prvom mjestu po broju svih novootkrivenih karcinoma (Perdana i sur. 2016). U 2018. g. od ukupnog broja svih novootkrivenih karcinoma u muškaraca 24% su činili tumori prostate. Iste godine u Europi je otkriveno 450.000 novih slučajeva raka prostate. U Americi su brojke nešto niže i pacijenti oboljeli od tumora prostate su na drugom mjestu po učestalosti od svih karcinoma, odmah iza karcinoma pluća. Iz statističkih podataka u Americi je 2018. g. otkriveno 164.690 novih slučajeva i čine oko 9,5% svih novo otkrivenih tumora (Ferlay i sur. 2018). U Hrvatskoj je petogodišnja prevalencija oboljenja od raka prostate 426,70/100.000 stanovnika (Reljić i sur. 2018). Prema podacima Hrvatskog zavoda za statistiku iz 2014. g. u Hrvatskoj je zabilježeno 1.708 novooboljelih od raka prostate, što je stopa incidencije od 82,7/100.000 stanovnika (Reljić i sur. 2018) (**Tablica 1**).

Tablica 1. Incidencija raka prostate u Hrvatskoj u odnosu na ostale tipove raka. Prikazan je ukupni postotak svih karcinoma. Karcinom prostate zauzima drugo mjesto kod karcinoma muškaraca i iznosi 14% u odnosu na ukupni broj svih novotkrivenih karcinoma u 2014. g. Prikazana je stopa incidencije koja iznosi 82,7 te ukupni broj novoboljelih od karcinoma prostate 2014 g. koji iznosi 1.708 pacijenata. Izvor: <https://www.hzjz.hr/periodicne-publikacije/incidencija-raka-u-hrvatskoj-2014/>

MUŠKI - Primarno sjelo	BROJ NOVIH SLUČAJEVA	POSTOTAK %	STOPA INCIDENCIJE	STANDARDIZIRANE STOPE (SVJETSKO PUČANSTVO)*	KUMULATIVNE STOPE (0 - 74 godine)
<i>MALES - Primary site</i>	<i>NUMBER OF NEW CASES</i>	<i>PERCENT %</i>	<i>CRUDE INCIDENCE RATE</i>	<i>STANDARDISED INCIDENCE RATE (WORLD)*</i>	<i>CUMULATIVE RATE (0 - 74 years)</i>
SVA SIJELA - ALL SITES	11389	100	551.2	309.76	34.2
TRACHEA, BRONCHUS ET PULMO (PRIM.)	2128	19	103.0	56.0	7.1
PROSTATA	1708	15	82.7	42.6	5.5
INTESTINUM CRASSUM EXCL. RECTUM	1101	10	53.3	27.9	3.4
RECTUM, RECTOSIGMA ET ANUS	783	7	37.9	20.3	2.6
VESICA URINARIA	757	7	36.6	19.1	2.1
REN ET ORGANA URIN. ALTERA	525	5	25.4	15.5	1.8
VENTRICULUS	503	4	24.3	12.5	1.4
PANCREAS	308	3	14.9	8.1	1.0
MELANOMA	305	3	14.8	8.8	1.0
LARYNX	291	3	14.1	8.1	1.1
OSTALO - Other	2980	26			

1.2.5.2. Čimbenici rizika

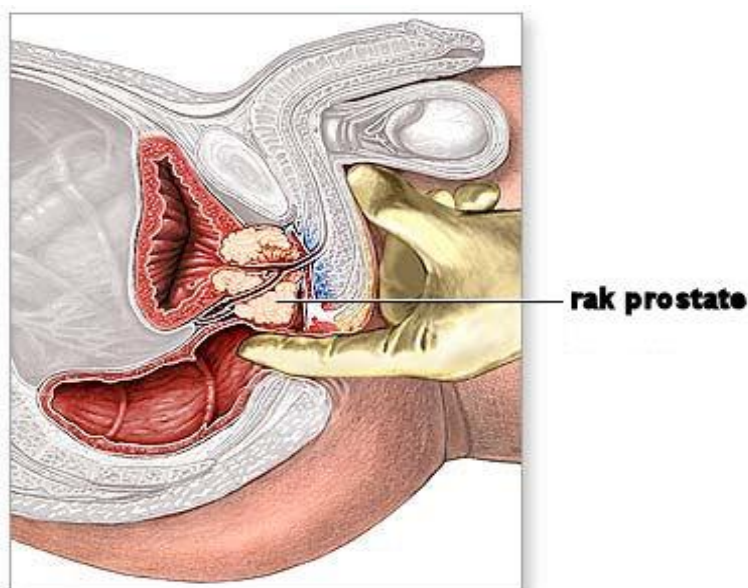
Uzroci raka prostate još nisu utvrđeni, međutim pretpostavlja se da na nastanak raka i njegovu progresiju utječu: genetska predispozicija, dob, pozitivna anamneza u obitelji, hormon testosteron, okolišni čimbenici, pušenje cigareta, unos toksina (pesticidi) i metala (izloženost kadmiju) (Gronberg 2003). Razvoju raka pogoduju smanjena tjelesna aktivnost povezana s debljinom, povišene vrijednosti kolesterola, neliječeni dijabetes, unos velike količine alkohola, te drugi čimbenici (Boyle i Zaridze 1993).

1.2.5.3. Klinička slika i dijagnostika

Rak prostate je histološki u 95% slučajeva adenokarcinom. Karcinomi prostate po položaju mogu biti unilokularni ili multifokalni, a 70% svih karcinoma prostate je smješteno u

perifernoj zoni prostate. U dijagnostici raka prostate koristimo se markerom PSA, digitorektalnim pregledom (DRP) i patohistološkom dijagnostikom (PHD) uzetog uzorka prostate. PHD je konačna potvrda dijagnoze raka prostate. U razvoju bolesti i metastatskoj progresiji koristimo se dodatnom dijagnostičkom tehnikom koja uključuje transrektalni ultrazvuk (UZV), kompjuteriziranom tomografijom (CT) magnetskom rezonancijom (MR), radiografijom (RTG-om) i scintigrafijom.

Otkriće PSA i njegova primjena kao metode probira u redovitim laboratorijskim kontrolama omogućila je ranu dijagnostiku i bolje praćenje oboljelih te samim time veću šansu za preživljenje. Kod velikog broja pacijenata karcinom prostate je u ranoj fazi najčešće bez simptoma uz povišeni PSA. Pacijent zbog visokih vrijednosti PSA učini pregled urologa koji obavi i DRP kojim se osjeti uvećana i tvrda prostata (**Slika 15**). To je razlog kada urolog preporuči pacijentu učiniti biopsiju dijela prostate, a PHD analizom tkiva prostate se u konačnici verificira karcinom prostate.



Slika 15. Prikaz digitorektalnog pregleda prostate. Liječnik pregledom može osjetiti veličinu, tvrdoću odnosno bolnost prostate. Slika preuzeta od: <https://www.kancer.rs/dijagnoza-kancera-prostate/>

Česti simptomi u oboljelih od raka prostate su problemi s mokrenjem zbog opstrukcije mokraćnog mjehura, a javljaju se u kasnijoj fazi bolesti jer većina raka prostate nastaje na

perifernoj zoni. Prisutnost krvi u urinu (hematurija), bolovi u području trbuha ili prepona, povišena temperatura upućuju na progresiju bolesti, odnosno pojavu metastaza (Mahedevia i sur. 1983).

Kod oko 15% pacijenata utvrđena je pozitivna obiteljska anamneza u jednog ili dva srodnika (otac, djed ili otac i stric, brat), što ukazuje na vjerovatnu genetsku predispoziciju oboolijevanja u određenom broju muškaraca (Lesko i sur. 1996). Posljednih dvadesetak godina DRP gubi na značaju zbog ekspanzije određivanja PSA kao primarne molekularne metode probira, iako DRP ostaje kao dodatna pretraga kojom se može ustanoviti veličina, tvrdoća ili bolnost prostate. Transrektalnim ultrazvukom može se ustanoviti hipoehogena lezija u perifernoj zoni prostate. Osjetljivost metode nije pouzdana, budući da se i hipoehogene lezije u rasponu od 15 do 75% nalaze i u pacijenata s hiperplazijom prostate (Spajic i sur. 2007). Kompjuterizirana tomografija je primarno usredotočena na stupanj proširenosti tumora, odnosno postojanje i lokalizaciju metastaza (Akin i Hricak 2007). Magnetska rezonanca služi za anatomske prikaz prostate, te je odlična metoda detekcije i određivanja lokalnog stadija bolesti i praćenju bolesnika. (Mazaheri i sur. 2009). Scintigrafija se koristi u procjeni stadija i proširenosti bolesti, te pojave udaljenih metastaza (Akin i Hricak 2007).

Kroz kliničku praksu se ustanovilo da je PSA najbolji pokazatelj u dijagnostici i praćenju bolesti. Normalna vrijednost PSA u krvi gotovo sigurno isključuje dijagnozu raka prostate, a veće vrijednosti PSA koreliraju s većom vjerovatnošću pojave karcinoma prostate.

1.2.5.4. Patohistološka analiza

Materijal za analizu prostatičnog tkiva uzima se iglenom biopsijom (*core* biopsijom), transuretralnom resekcijom ili aspiracijom tankom iglom (eng. *fine needle aspiration*, FNA). Kada se radi biopsija tankom iglom standardno se uzima šest uzoraka svakog režnja prostate (tri iz lijevog i tri iz desnog) budući da se iz jednog uzorka dobije vrlo malo materijala. (Bostwick i sur. 1993).

Prilikom transuretralne resekcije karcinomi prostate se dijagnosticiraju u 10% pacijenata, kod tumora prijelazne zone. Adenokarcinom prostate se u 75% slučajeva nađe u perifernoj zoni, u prijelaznoj zoni je u oko 15 do 20%, a u 10% slučajeva umora je u centralnoj zoni.

Prisutnost tumora na više mjesta u prostati (multifokalnost) zabilježena je u 50 do 85% pacijenata. (Renshaw 1998, Varma i sur. 2002). Najčešće se tumor ne može vidjeti golim okom, osim u slučaju kada je on veći od 0,5 cm i vidljiv je prilikom radikalne prostatektomije. (Varma i sur. 2002).

Mikroskopski se dijagnoza tumora postavlja kombinacijom arhitekturnih i citoloških kriterija. Arhitekturni kriteriji obuhvaćaju infiltrativni rast i odsutnost bazalnih stanica. Citološki kriteriji označavaju prisutnost makronukleola u jezgri tumorskih stanica (Varma i sur. 2002). Mikroskopski se promatra izgled, veličina i udaljenost između acinusa. Odsutnost bazalnog sloja stanica je bitna karakteristika neoplastičnih žlijezda prostate, odnosno raka prostate (Varma i sur. 2002). U histološkom uzorku karcinom je prisutan s vrlo malim brojem žlijezdi, stoga postoje dodatni kriteriji za prepoznavanje (marginacija nukleola, periglandularne pukotine, intraluminalni kristalodi) (Kruslin i sur. 2011). Za određivanje stupnja diferenciranosti tj. gradusa tumora upotrebljava se Gleasonov zbroj, prema kojemu prognoza raka prostate je kompatibilna sa zbrojem stupnja diferenciranosti dviju najzastupljenijih komponenti tumora (Gleason i Mellinger 1974).

1.2.5.5. TNM klasifikacija

Raku prostate se utvrđuje stupanj kako bi mu se odredila proširenost na genitourinarni trakt. TNM klasifikacija se označava slovima T – veličina primarnog tumora, N – stupanj zahvaćenosti regionalnih limfnih čvorova, M – prisutnost udaljenih metastaza, s različitim podklasama koje su detaljnije opisane u **Tablici 2**.

Podjela na temelju tipa tumorske građe i sličnosti s normalnim tkivom žlijezde pomaže u definiranju agresivnosti tumora. Uzima se u obzir histološka heterogenost tvorbe.

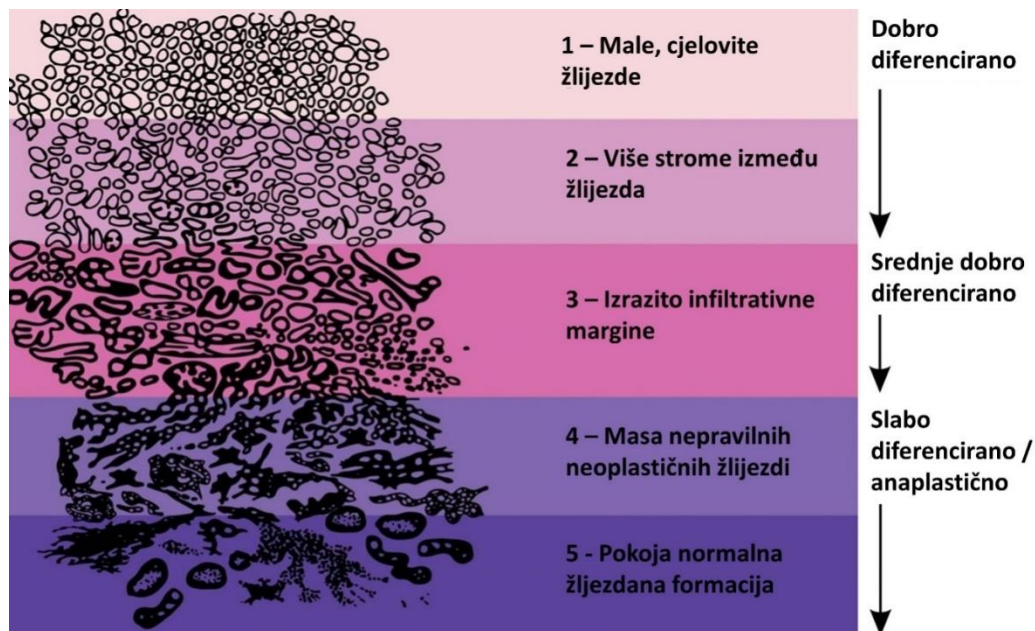
Tablica 2. TNM klasifikacija raka prostate prema smjernicama American Joint Committee on Cancer (Američkog društvo za karcinome). T – tumor, N – limfni čvor, M – metastaze. Izvor: <https://cancerstaging.org/Pages/default.aspx>

Tx	Tumor nije moguće dokazati
T0	Nema dokaza za primarni tumor
Tis	Karcinom in situ
T1	Tumor je nađen slučajno ili nakon biopsije zbog povišenog PSA
T2	Tumor ograničen na prostatu
T2a	Tumor je ograničen na polovici ili manjoj površini prostate
T2b	Tumor je proširen na više od polovice prostate, zahvaća samo jedan lobus
T2c	Tumor je proširen na oba lobusa prostate
T3a	Tumor se proširio izvan prostate (probio kapsulu)
T3b	Tumor se proširio i na seminalne vezikule-mjehuriće
T4	Tumor se proširio izvan prostate u druge lokacije (zid zdjelice, mokraćni mjehur)
Nx	Regionalni limfni čvorovi nisu procijenjeni
N0	Nema limfogenih metastaza
N1	Prisutne su metastaze u regionalnim limfnim čvorovima
Mx	Udaljene metastaze nisu procijenjene
M0	Nema udaljenih metastaza
M1	Prisutne udaljene metastaze
M1a	Tumor je proširen u udaljene limfne čvorove
M1b	Tumor je proširen u kosti
M1c	Tumor je proširen u udaljene organe

1.2.5.6. Gleasonov bodovni sustav

Gleasonov skôr ili Gleasonov uzorak (eng. *pattern*) je mjera agresivnosti pojedinog tumora prostate. Taj podatak se doznaje nakon biopsije tkiva prostate kada patolog analizira i boduje strukturu (diferenciranost) stanica i tkiva žlijezda (**Slika 16**). Najzastupljenija

histološka slika i slijedeći oblik po učestalosti dobivaju 1–5 bodova i zbrajaju se. Zbroj 2–4 = dobro diferenciran, zbroj 5–7 = umjereno diferenciran, zbroj 8–10 = nediferenciran. Gleasonov zbroj se dalje klasificira u pet grupa gradusa: grupa gradusa 1 (GGI) – Gleasonov zbroj ≤ 6 ; grupa gradusa 2 (GGII) – Gleasonov zbroj $3+4=7$; grupa gradusa 3 (GGIII) – Gleasonov zbroj $4+3=7$; grupa gradusa 4 (GGIV) – Gleasonov zbroj $4+4$; $3+5$, $5+3$, te grupa gradusa 5 (GGV) – Gleasonov zbroj 9-10. Za definiranje i klasificiranje tumora prostate u grupe gradusa (Gleasonov zbroj) koristi se WHO Classification of tumors of the urinary system and male genital organs (Moch i sur. 2016). Što je Gleasonov zbroj niži to je tumor manje agresivan, a prognoza bolja.



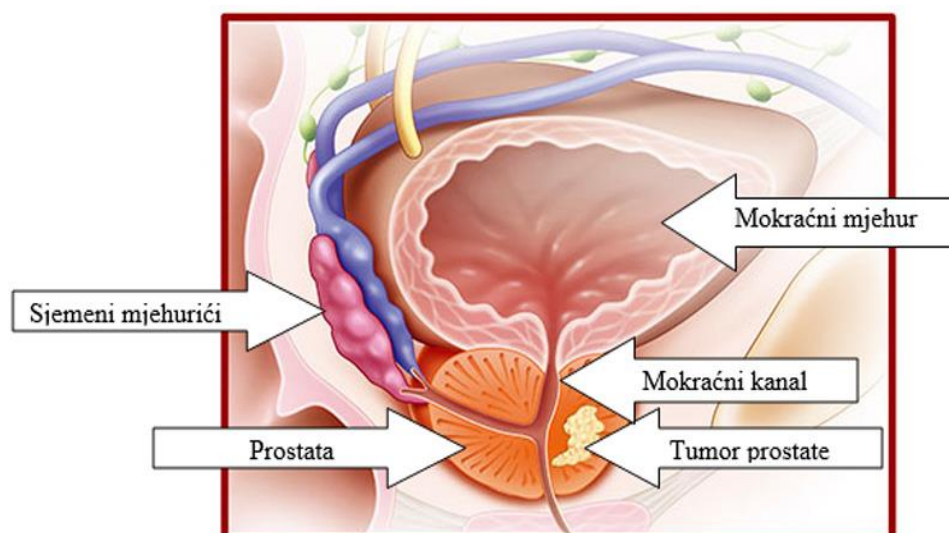
Slika 16. Gleasonov uzorak. Na slici su prikazane promjene kroz koje prolaze stanice prostate. Promjene su prikazane kroz pet stupnjeva. Pod brojem 1 prikazane su male cjelovite jezgre (normalne), a pod brojem 2 početne promjene u smislu pojavljivanja više strome između žlijezdi. Pod brojem 3 su prisutne izrazito infiltrativne margine, gdje okomita strelica pokazuje promjene usmjerene u strukturi stanice koje vode prema slaboj diferencijaciji, odnosno anaplastičnosti stanice. Kod broja 4 prikazana je masa nepravilnih neoplastičnih jezgri. Pod brojem 5 su gotovo sve stanice anaplastične, (rijetko) prisutna normalna jezgrina formacija, dok je većina stanica slabo diferencirana, odnosno pokazuju anaplastičnost. Izvor: <https://training.seer.cancer.gov/prostate/abstract-code-stage/morphology.html>

Kod lokaliziranih tumora Gleasonov zbroj pomaže u predviđanju probijanja kapsule, invazije seminalnih vezikula i rasapa u limfne čvorove. Gleasonov zbroj, klinički stadij i PSA zajedno, predviđaju patološki stupanj i prognozu bolje nego svaki od njih zasebno.

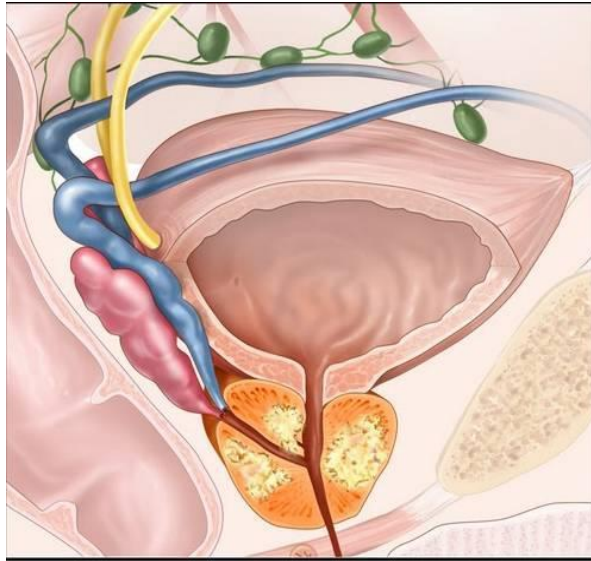
1.2.5.7. Klinički tijek bolesti

Rak prostate najčešće napreduje polako i bez jasnih simptoma sve dok se ne proširi. Prilikom progresije raka javljaju se hematurija i simptomi opstrukcije mokraćnog mjehura: naprezanje, otežano mokrenje, slab ili isprekidan mlaz mokraće, osjećaj nepotpunog pražnjenja, terminalno kapanje.

Nakon otkrivanja raka prostate određuje se stupanj proširenosti tumora. Preživljenje je veće ukoliko se radi samo o lokaliziranom tumoru (**Slika 17**), bez metastatskog širenja u okolne strukture i tkiva u organizmu (**Slika 18**). Rak prostate se širi perineuralno, zahvaća sjemene mjehuriće, u daljnjoj progresiji može zahvatiti vrat mokraćnog mjehura, sfinkter, rektum, zdjelicu (**Slika 19**) (Montironi i sur. 2001). Karcinom prostate se najprije širi u područne limfne čvorove (unutarnje ilijačne), a potom u udaljene limfne čvorove i hematogeno u druge organe (**Slika 20**). 90% raka prostate pronalazimo kao metastaze u kostima. Najčešća mjesta metastaza osim kostiju su pluća, jetra, pleura (Lopez-Beltran i sur. 2005).



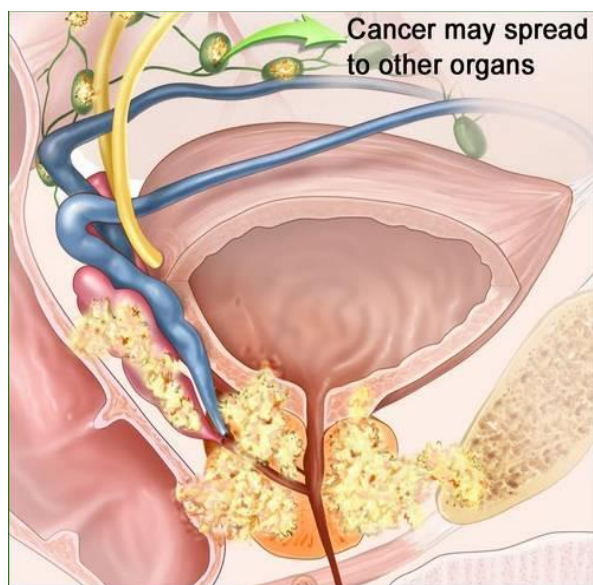
Slika 17. Stadij T1 tumora prostate. Početni stadij tumora prostate. Izvor: http://www.drentrogrlic.com/images/staridoc/prostata/dijagnostika/stadiji_%20raka_%20prostate.pdf



Slika 18. Stadij T2 tumora prostate. Tumor je veće veličine, ali još uvijek unutar kapsule. Izvor: http://www.drentrogrlic.com/images/staridoc/prostata/dijagnostika/stadiji_%20raka_%20prostate.pdf



Slika 19. Stadij T3 tumora prostate. Tumor je probio kapsulu i počeo se širiti iznad ishodišnog mjesta, odnosno samog tkiva prostate. Izvor: http://www.drentrogrlic.com/images/staridoc/prostata/dijagnostika/stadiji_%20raka_%20prostate.pdf



Slika 20. Stadije T4 tumora prostate. Tumor širi na sjemene mjehuriće, mokraćni mjehur ili debelo crijevo. Izvor: http://www.drentrogrlic.com/images/staridoc/prostata/dijagnostika/stadiji_%20raka_%20prostate.pdf

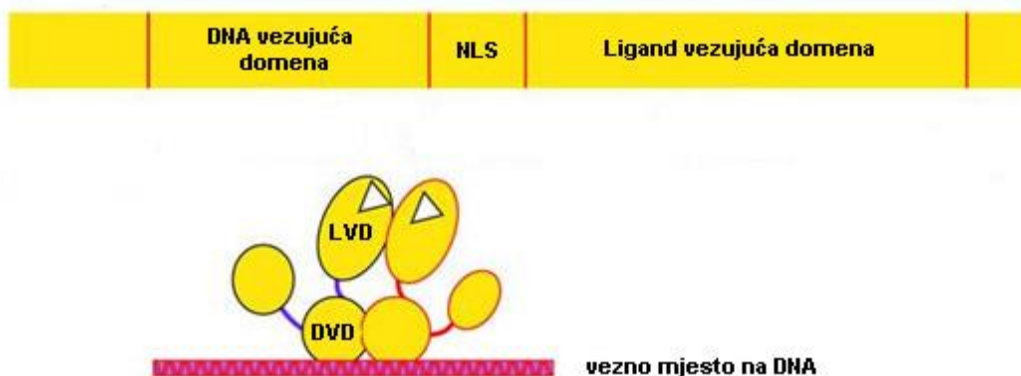
1.2.5.8. Terapija i prognoza

Terapija se određuje u ovisnosti o stadiju bolesti. U lokaliziranom obliku, ovisno o općem stanju i drugim čimbenicima liječnik se može odlučiti na aktivan nadzor, deprivaciju androgena, radioterapiju ili kirurški zahvat (radikalnu prostatektomiju), uz naravno mogućnost kombinacije više modaliteta liječenja. Kod lokalno ograničenih tumora prostate najučinkovitija je radikalna prostatektomija. Međutim, veliki broj tumora prostate ne napreduje dalje od stadija T1 pa se zbog toga za ovaj stadij najčešće bira samo aktivno praćenje. Kod tumora T2 radikalna prostatektomija je metoda izbora, a i sličan je odgovor i kod primjene radioterapije. Kod tumora T3 zračenje uz androgenu deprivacijsku terapiju je metoda izbora (Johansson i sur. 2011, Crook i sur. 2009). Desetogodišnje preživljenje pacijenata u stadiju T1 i T2 je 80% i 95%, a ako su zahvaćeni limfni čvorovi 10-godišnje preživljenje je oko 40% (Lopez-Beltran i sur. 2005). Proširena bolest najčešće ima lošu prognozu te se terapija najviše orijentira na palijativnu skrb ili pokušaj usporavanja progresije. Desetogodišnje preživljenje kod bolesnika s udaljenim metastazama je oko 10% (Crook i sur. 2009).

1.3. Androgeni receptor (AR)

Androgeni receptor pripada skupini nuklearnih receptora steroidnih hormona, zajedno s estrogenim receptorom, glukokortikoidnim receptorom, progesteronskim receptorom te mineralokortikoidnim receptorom. AR djeluje kao transkripcijski faktor ovisan o ligandu. Vezanje liganda (dihidrotestosteron i testosteron) za AR pokreće muški spolni razvoj i diferencijaciju. Hipofiza luči luteinizirajući hormon, koji potiče sintezu androgena u Leydigovim stanicama testisa. Testosteron u krvi cirkulira uglavnom u vezanom obliku, dok samo slobodni testosteron ulazi u stanice prostate. U stanicama se testosteron konvertira u 5α -dihidrotestosteron, koji s visokim afinitetom veže i aktivira androgeni receptor. U jezgri dimeri AR potiču transkripciju ciljnih gena, kao što je specifični antigen prostate (PSA) i dovode do staničnih odgovora kao što su preživljenje i rast (Tan i sur. 2015).

Androgeni receptor sastoji se od tri glavne funkcionalne domene: aminoterminalna nestrukturirana transaktivacijska domena, centralna domena koja se veže na DNA i karboksiterminalna domena na koju se veže ligand (**Slika 21**). Između domena koje vežu DNA i ligand, nalazi se fleksibilna regija u kojoj se nalazi signal za lokalizaciju u jezgri. U neaktivnom stanju, androgeni receptor vezan je za „*heat-shock*“-protein i nalazi se u citoplazmi. Nakon vezanja androgena, androgeni receptor mijenja konformaciju, translocira se u jezgru i potiče transkripciju ciljnih gena (Feng i sur. 2019).



Slika 21. Shematski prikaz strukture androgenog receptora. Prikazane su primarna struktura te struktura dimera vezanog za DNA. LVD – domena koja veže ligand, DVD – domena koja se veže na DNA, NLS – signal za lokalizaciju u jezgri. Slika je preuzeta i prilagođena iz Rustinejad i sur. 2013.

1.3.1. Uloga AR u raku prostate

Aktivnost androgenog receptora usko je povezana s rakom prostate. Stanice raka prostate ovise o aktivnosti androgenog receptora kako bi mogle preživjeti i rasti. Kod raka prostate proliferacija je izraženija od stanične smrti, a taj omjer reguliran je androgenima i androgenim receptorom. Prije 80 godina Charles Huggins pokazao je da deprivacija androgena uzrokuje regresiju raka prostate (Huggins i Hodges, 1941). Razine PSA, ciljnog gena i biljega aktivnosti androgenog receptora, često su povišene u serumu pacijenata. Iako su brojni signalni putevi povezani s inicijacijom raka prostate, signalni put AR i dalje je glavni regulator raka prostate (Tan i sur. 2015). Zbog toga je supresija androgena, kirurškom ili kemijskom kastracijom, i dalje glavni način liječenja uznapredovanih stadija. Pacijenti koji primaju terapiju supresije androgena pokazuju povlačenje bolesti, međutim neizbježan je razvoj rezistencije. Rezistencijom nastaje bolest otporna na kastraciju (eng. *castration-resistant prostate cancer*, CRPC). Kod ovog oblika bolesti pacijenti više ne odgovaraju na hormonsku terapiju te se uglavnom liječe kemoterapijom (Tan i sur. 2015). Nekoliko je mehanizama koji omogućuju razvoj bolesti rezistentne na hormonsku terapiju.

Jedan od mehanizama su mutacije androgenog receptora. Pronađene su u 15-30% pacijenata s CRPC te se najčešće nalaze unutar domene koja veže ligand te domene koja se veže na DNA. Te točkaste mutacije aktiviraju AR na način da se izgubi njegova specifičnost za ligand. Primjerice mutacija T878A, koja je prisutna i u staničnoj liniji LNCaP, je takva mutacija te takav enzim, osim androgena, mogu aktivirati i progesteron, estrogen te neki agonisti androgena koji se koriste u terapijske svrhe. Kod 30–50% pacijenata dolazi do amplifikacije androgenog receptora i njegove prekomjerne ekspresije. Time se omogućuje osjetljivost AR i na najmanje količine androgena koje zaostaju nakon hormonske terapije, a time i preživljenje u takvim uvjetima te stvaranje rezistencije. Jedan od mehanizama je i promjena u biosintezi androgena, što znači da stanice raka prostate mogu koristiti androgene koji se sintetiziraju u nadbubrežnoj žlijezdi i konvertirati ih u testosteron i dihidrotestosteron. To im omogućuje prekomjerna ekspresija enzima koji su odgovorni za konverziju. Od ostalih mehanizama poznati su još i prekomjerna ekspresija kofaktora androgenog receptora, koji potiču njegovu transkripcijsku aktivnost i funkciju te ekspresija varijanti androgenog receptora koje nastaju alternativnim izrezivanjem (Fujita i Nonomura 2019). Danas se

ubrzano razvijaju terapije kojima bi se zaobišli opisani mehanizmi nastanka rezistencije, od kojih su neke već u fazama kliničkih ispitivanja. Primjerice Darolutamide, nesteroidni antiandrogen, koji inhibira vezanje androgena za AR i djelotvoran je i kod prekomjerno ekspimiranog AR i kod mutiranog AR. Trenutno je ovaj lijek u 3. fazi kliničkih ispitivanja. Galeterone je inhibitor enzima CYP17 i antagonist AR koji pospješuje njegovu degradaciju. Učinkovit je kod AR divljeg tipa, njegovih varijanti i mutiranih oblika. Osim ovih lijekova koji djeluju na domena koja veže ligand, razvijen je i lijek EPI-506 koji direktno smanjuje transkripcijsku aktivnost AR te se također nalazi u fazama I/II kliničkih ispitivanja (Fujita i Nonomura 2019).

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Osnovna hipoteza ovog istraživanja je da signalni put HH-GLI ima važnu ulogu u karcinomu prostate te da transkripcijski faktori GLI1, GLI2 i GLI3 pritom imaju bitnu, ali ne nužno i preklapajuću ulogu.

Cilj ove doktorske disertacije je ispitati aktivnost signalnog puta HH-GLI u tumorima prostate.

Specifični ciljevi istraživanja su:

1. Povezati ekspresiju proteina GLI1, GLI2 i GLI3 te proteina PTCH1 u tkivnim uzorcima raka prostate s aktivnosti puta, progresijom tumora te kliničkim karakteristikama pacijenata
2. Ispitati aktivnost i mogućnost inhibicije puta HH-GLI na modelu staničnih linija raka prostate
3. Ispitati specifične uloge transkripcijskih faktora GLI1-3 u stanicama raka prostate ovisnim o androgenu te njihovu ulogu u androgen-neovisnom rastu
4. Ispitati interakciju signalnog puta HH-GLI i signalnog puta AR

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Imunohistokemijsko bojanje tkivnih preparata

3.1.1. Uzorci tkiva prostate

Tkivni rezovi uzoraka prostate dobiveni su iz Kliničkog zavoda za patologiju i sudsku medicinu Kliničkog bolničkog centra Osijek. Tkivni rezovi debljine 4 µm narezani su iz uzoraka fiksiranih u formalinu i uklopljenih u parafin (parafinske kocke), prikupljenih od 2012. do 2016. g.

Uzorci su raspoređeni u sljedeće skupine:

- zdrava prostata (kontrolna skupina 1, K1)
- prostata s prisutnom upalom (kontrolna skupina 2, K2)
- karcinom prostate (KP) – podijeljeni u 5 skupina (grupa gradusa, GGI-V) prema Gleasonovom zbroju (vidi **poglavlje 1.2.6.6.**)

U svakoj skupini je bilo minimalno 30 uzoraka. Ukupno je analizirano 224 uzoraka, od čega 65 kontrolnih uzoraka i 159 uzoraka raka prostate. Radi lakše interpretacije rezultata oba tipa kontrolnih uzoraka, uzorci zdrave prostate i prostate s prisutnom upalom grupirano je zajedno. Medijan i raspon dobi pacijenata od kojih je uzeto kontrolno tkivo bio je 66 godina (od 49 do 88), a kod pacijenata s rakom prostate 60 godina (od 44 do 87). Medijan i raspon inicijalne vrijednosti PSA (nalaz prilikom prvog pregleda urologa), bio je 7,5 ng/ml (0,6-29) kod kontrolnih pacijenata te 15 ng/ml (0,02-994) kod pacijenata s rakom prostate. Medijan i raspon finalne vrijednosti PSA (nalaz prilikom posljednje kontrole kod urologa), bio je 7 ng/ml (0,8-33,8) kod kontrolnih pacijenata i 0,225 ng/ml (0-374) kod pacijenata s rakom prostate. **Tablica 3** prikazuje kliničko-patološke osobine pacijenata čiji uzorci tkiva prostate su korišteni u ovom istraživanju, grupirani prema skupinama.

Ovo istraživanje je odobreno od strane Etičkog povjerenstva Kliničkog bolničkog centra Osijek (odobrenje broj: R2: 9958-4/2017.).

Tablica 3. Kliničko-patološke osobine pacijenata čiji arhivski uzorci tkiva su korišteni za imunohistokemijsko određivanje ekspresije proteina. PSA = prostata specifični antigen, GG = grupa gradusa.

	broj uzoraka	dob (godina)	PSA inicijalni (ng/ml)	PSA finalni (ng/ml)	PSA finalni (≥ 4 ng/ml)
	n (%)	medijan (raspon)	medijan (raspon)	medijan (raspon)	n (%)
Kontrolni uzorci					
zdrava prostata	34 (15,2)	66 (49-76)	7,5 (4,1-24,3)	7 (0,8-26,9)	25 (92,6)
prostata s upalom	31 (13,8)	67 (53-81)	7,6 (0,6-29)	7,9 (0,8-33,8)	17 (70,8)
Uzorci raka prostate					
GGI	30 (13,4)	66 (55-78)	7,585 (1,9-35,6)	0 (0-15)	1 (4,3)
GGII	37 (16,5)	67 (44-83)	11,5 (4,21-104,4)	0,1 (0-51)	2 (6,1)
GGIII	30 (13,4)	71,5 (55-82)	15,2 (0,02-156)	0,6 (0-100)	6 (24,0)
GGIV	32 (14,3)	69,5 (58-84)	58,9 (0,8-500)	0,575 (0-139)	6 (25,0)
GGV	30 (13,4)	70,5 (56-87)	73 (0,14-944)	8,5 (0-374)	11 (52,4)

3.1.2. Imunohistokemija

Imunohistokemija je metoda koja se bazira na detekciji proteina od interesa u tkivnim prerezima specifičnim antitijelom, a signal se detektira pomoću sekundarnog antitijela obilježenog biotinom na koji se veže streptavidin konjugiran peroksidazom iz hrena (eng.

horseradish peroxidase, HRP), koja u reakciji sa supstratom 3,3' diaminobenzidinom (DAB) stvara signal na mjestu vezanja antitijela.

Prvi korak pri izvođenju imunohistokemije je deparafinizacija rezova, što se postiže tretmanom rezova alifatskom otopinom na bazi ugljikovodika koja predstavlja zamjenu za ksilen, BioClear New (Biognost, Hrvatska), 3x3 min. Nakon toga slijedi rehidracija rezova, što se postiže inkubacijom rezova u razrjeđenjima etanola od manjeg prema većem, točnije u apsolutnom etanolu 2x3 min, u 95% etanolu 2x1 min, u 70% etanolu 2x1 min te na kraju u destiliranoj vodi 1 min. Sljedeći korak je renaturacija proteina, s obzirom da se prilikom fiksacije tkiva u formalinu može promijeniti biokemija proteina te „zamaskirati“ epitop zbog čega on ne može biti prepoznat od strane primarnog antitijela. To se postiže inkubacijom rezova u otopini za razotkrivanje epitopa (10 mM natrijev citrat, 0,05% Tween 20, pH 6.0) zagrijanoj do vrenja u trajanju 20 min u zatvorenoj posudi. Nakon toga posuda se otvara i rezovi se hlade još 20 min. Slijedi ispiranje u puferu TBST (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,05% (v/v) Tween 20, pH 7.5) 1x1 min. Nakon toga potrebno je blokirati endogenu peroksidazu, što se čini inkubacijom u otopini metanola i vodikovog peroksida (90% MeOH, 10% H₂O₂), 10 min. Slijedi ispiranje u TBST-u 3x1 min. Nakon ispiranja stakalca se posuše filter papirom, a rezovi zaokruže PAP-PEN olovkom (Dako, SAD) koja ostavlja hidrofobni trag na predmetnom stakalcu i omogućava da otopine ostaju unutar označenih granica, odnosno na preparatu. Na rezove se zatim nakapa otopina Protein Block (Dako, SAD) i stakalca se stavljaju u vlažnu komoru 20 min. Protein Block sprječava nastanak nespecifičnog signala. Nakon blokiranja, otopina se pokupi filter papirom pazeći da se ne ošteti preparat, ali se ne ispiru. Stavlja se primarno antitijelo razrijeđeno u 2% BSA/TBST i inkubira preko noći u vlažnoj komori na +4°C. U ovom radu korištena su sljedeća antitijela:

- GLI1 (Abnova, SAD; MAB16740; razrjeđenje 1:200)
- GLI2 (Aviva Biosystems, SAD; ARP31885_T100; 1:100)
- GLI3 (ProteinTech, SAD; 19949-1-AP; 1:100)
- PTCH1 (ProteinTech, SAD; 17520-1-AP; 1:100)

Sljedećeg dana, rezovi se ispiru u TBST-u 3 x 1 min i dalje se koristi kit za imunohistokemiju DakoCytomation LSAB2 System-HRP (Dako, SAD). Koraci uključuju inkubaciju s mješavinom sekundarnih antitijela anti-miš i anti-zec, obilježenih biotinom, inkubaciju sa streptavidinom

konjugiranim s enzimom HRP te inkubaciju sa supstratom DAB Substrate Chromogen, koji daje signal nakon reakcije s enzimom HRP. Nespecifično bojanje ispiru se destiliranom vodom, a nakon toga slijedi kontrastno bojanje preparata hematoksilinom (BioGnost, Hrvatska) 30 s. Slijedi ispiranje u vodovodnoj vodi te nakon toga dehidracija u padajućim razrjeđenjima etanola, od većeg prema manjem (70%, 95%, apsolutni alkohol), svaki 2x1 min te nakon toga 3x3 min u BioClear otopini (BioGnost, Hrvatska). Na kraju slijedi uklapanje preparata u mediju za uklapanje BioMount New (BioGnost, Hrvatska). Nakon sušenja preparata u digestoru, spremni su za analizu.

3.1.3. Kvantifikacija i lokalizacija proteinske ekspresije

Obojani preparati su pregledani na svjetlosnom mikroskopu od strane iskusnog patologa koji je kvantificirao razinu ekspresije te unutarstaničnu lokalizaciju proteina GLI1, GLI2, GLI3 i PTCH1 u stanicama tumora/epitela žlijezda kontrolnog tkiva te okolne strome. Patolog je odredio jačinu obojanosti dodjeljujući razinama jačine 0 do 3 „križeva“ (0 – negativno, „+“ – slabo obojenje, „++“ – srednje jako obojenje, „+++“ – jako obojenje) te postotak obojanih stanica (0-100%) za svaku razinu jačine obojanosti. Razina proteinske ekspresije je, zatim, izražena pomoću tzv. histoskôra, zbrajanjem umnožaka pojedinih razina jačine obojanosti s postotkom obojanih stanica, pri čemu je maksimalni mogući histoskôr 300 (John i sur. 2009):

$$\text{histoskôr} = [1 \times (\% \text{ „+“ stanica}) + 2 \times (\% \text{ „++“ stanica}) + 3 \times (\% \text{ „+++“ stanica})]$$

Za proteine GLI1, GLI2 i GLI3 osim razine ekspresije bilo je potrebno odrediti i njihovu lokalizaciju. Lokalizacija obojenja spomenutih proteina klasificirana je kao citoplazmatsko obojenje (c), nuklearno obojenje (n) te citoplazmatsko i nuklearno, odnosno difuzno obojenje (d). Porast nuklearnog, odnosno difuznog obojenja ukazuje na aktivne forme transkripcijskih faktora GLI.

3.2. Rad sa staničnim kulturama

Stanična linija raka prostate ovisnog o androgenima, LNCaP (ATCC CRL-1740) dobivena je na dar od dr. sc. Maje Herak Bosnar s Instituta Ruđer Bošković. Stanična linija LNCaP se uzgaja u

mediju RPMI 1640 kompletiranom s 10% FBS (fetalni teleći serum) te dodatkom antibiotika penicilin/streptomycin (50 I.U./ml) i L-glutamina (2 mM).

Rad sa staničnim kulturama odvija se u sterilnim uvjetima. 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% FBS, 45% kompletirani medij, 10% DMSO) u krio-ampulama u tekućem dušiku. Odmrzavanje stanica treba izvršiti što brže, zbog toksičnosti krioprotektanta DMSO. U sterilnu staklenu epruvetu se stavi 5 ml medija u kojem stanice rastu. 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 prelije u staklenu epruvetu s medijem te centrifugira na 1.200 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 kompletiranog medija i prenese u Petrijevu zdjelicu promjera 10 cm (Sarstedt, Njemačka). Petrijeva zdjelica 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 tekuća hranjiva podloga (medij) se mijenja svaka dva do tri dana. Za promjenu medija pipetom se skupi sav medij iz Petrijeve zdjelice i odbaci. 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 isperu s 5 ml fosfatnog pufera (PBS bez Ca i Mg) (1,7 mM KH₂PO₄, 136 mM NaCl, 1 mM Na₂HPO₄, KH₂PO₄, pH 7,2), čime se uklanja zaostali 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, dok se stanice ne

odvoje od podloge (tripsinizacija). Kada se stanice odvoje, na njih se doda 5 ml kompletiranog medija i dobro resuspendira propuhivanjem kroz pipetu. Jedan mililitar otopine se nasadi u čistu Petrijevu zdjelicu te dopuni do 10 ml medijem. Kada se stanice nasađuju u pločice sa 6 ili više bunarčića, trebaju se prethodno izbrojati, kako bi se odgovarajući broj stanica nasadio u svaki bunarčić. Kako 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. Broj izbrojanih živih stanica uvrštava se u formulu $[(\text{ukupan broj stranica u 4 kvadranta Neubaurove komorice}/0,4) \times \text{razrjeđenje (5)} \times 10^3]$ pomoću koje se izračunava broj stanica po mililitru te se dalje može izračunati volumen potreban za odgovarajući broj stanica po bunarčiću. Dobiveni volumen prenese se u novu sterilnu epruvetu te se nadopuni s odgovarajućim volumenom medija potrebnim za nasađivanje u bunarčiće.

3.2.3. Zamrzavanje stanica

Za dugotrajno pohranjivanje stanice je najbolje zamrznuti. Stanice se zamrzavaju kada su optimalne gustoće (80-90% konfluentne). Postupak zamrzavanja počinje tripsiniziranjem stanica. Zatim se resuspendiraju u 5 ml medija i prenese u sterilnu staklenu epruvetu te ostave na ledu pola sata do sat da se polako ohlade. Nakon toga stanice se centrifugiraju na $1.200 \times g$ 5 min u centrifugi ohlađenoj na $+4^{\circ}\text{C}$. Odmah nakon centrifugiranja sa stanica se odlije supernatant, a talog se resuspendira u 1 ml hladnog medija za zamrzavanje (45% FBS, 45% medij, 10% DMSO) i odmah prebaci u krio-ampulu. Takva ampula se odmah pohranjuje u zamrzivač na -80°C gdje treba stajati barem 1-2 dana (a može i do nekoliko mjeseci). Za dulje skladištenje ampule se pohranjuju u tekući dušik.

3.2.4. Tretmani stanica u kulturi

3.2.4.1. Imitacija uvjeta bez androgena za stanice ovisne o androgenima

Kako bi se stanice raka prostate ovisne o androgenu, LNCaP, izložile uvjetima bez androgena, kakvi su prisutni u organizmu nakon anti-hormonske terapije, stanice se uzgajaju u mediju RPMI 1640 kompletiranom s 10% FBS iz kojeg su prethodno uklonjeni androgeni. Uklanjanje androgena iz seruma postiže se tretmanom seruma kuglicama ugljena obloženih dekstranom, koje na sebe vežu steroidne molekule, u koje spadaju i androgeni (Tu i sur. 2018). Naknadnim centrifugiranjem se kuglice izdvoje iz seruma te se on još sterilizira filtracijom. U ovom radu, stanice su uzgajane u mediju bez androgena u trajanju od 5 dana, nakon čega su se izvodili funkcionalni testovi ili izdvojili proteini i RNA. Kako bismo bili sigurni da su opaženi efekti nastali zbog nedostatka androgena, koristili smo i kontrolne stanice kojima je u medij bez androgena egzogeno dodan androgen dihidrotestosteron (DHT).

3.2.4.2. Tretmani stanica kemijskim agensima

U pločice sa 6 bunarčića nasađeno je po 5×10^5 stanica u 2 ml medija. Nakon 24 sata, što je stanicama dovoljno da se uhvate za podlogu, promijenjen je medij te su dodani odgovarajući kemijski agensi. Za inhibiciju signalnog puta HH-Gli korišteni su: specifičan inhibitor proteina SMO, ciklopamin ($M_r=411,63$, Toronto Research Chemicals, konačna koncentracija $10 \mu\text{M}$) te specifičan inhibitor transkripcijskih faktora Gli, GANT61 ($M_r=429,6$, SelleckChem, konačna koncentracija $20 \mu\text{M}$) u trajanju 48 sati.

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

Tablica 4. Shema razrjeđivanja kemijskih spojeva u mediju za MTT test.

	koncentracija početne otopine	volumen spoja	volumen medija	koncentracija radne otopine	volumen nanesen u bunarčiću	konačna koncentracija u bunarčiću
ciklopamin	2,5 mM	3 μ l	1497 μ l	5 μ M	100 μ l	2,5 μ M
	2,5 mM	6 μ l	1494 μ l	10 μ M	100 μ l	5 μ M
	2,5 mM	12 μ l	1488 μ l	20 μ M	100 μ l	10 μ M
	2,5 mM	18 μ l	1482 μ l	30 μ M	100 μ l	15 μ M
	2,5 mM	30 μ l	1470 μ l	50 μ M	100 μ l	25 μ M
GANT61	5 mM	3 μ l	1497 μ l	10 μ M	100 μ l	5 μ M
	5 mM	6 μ l	1494 μ l	20 μ M	100 μ l	10 μ M
	5 mM	9 μ l	1491 μ l	30 μ M	100 μ l	15 μ M
	5 mM	12 μ l	1488 μ l	40 μ M	100 μ l	20 μ M
	5 mM	18 μ l	1482 μ l	60 μ M	100 μ l	30 μ M

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 μ l MTT otopine koncentracije 1 mg/ml, pločica se zamota u aluminijsku foliju kako bi se zaštitila od svjetla i inkubira 4 sata u inkubatoru na 37°C i pri 5% CO₂. Osim na stanice, čisti MTT se dodaje u 4 dodatna bunarčića kako bi se izmjerila osnovna obojenost MTT otopine za normalizaciju. Nakon inkubacije 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 živih stanica, dok bunarčići s mrtvim stanicama uglavnom ostaju obojani žuto. Obojenost otopine (apsorbancija) mjeri se na spektrofotometru Labsystems Multiskan MS pri valnoj duljini od 570 nm. Isto očitavanje napravi se i u pločicama koje su tretirane kemijskim spojevima, 24, 48 i 72h nakon tretmana. Sve vrijednosti se unesu

u program Excel te se izračuna postotak preživljenja stanica pri svakoj koncentraciji kemijskog agensa u odnosu na netretirane stanice.

3.4. Izdvajanje RNA iz stanica

Svi koraci izdvajanja RNA iz stanica rade se na ledu, kako bi se očuvao njen integritet. Također, svi koraci centrifugiranja se rade u centrifugi ohlađenoj na +4°C. Stanice u pločicama se stave 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 1.200 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 (Thermo Fisher). Talog stanica iz jednog bunarčića pločice sa 6 bunarčića se resuspendira u 500 µl TRIzola te se inkubira na sobnoj temperaturi 5 minuta. Nakon toga doda se 100 µl kloroforma, sadržaj mikroeprevete se dobro promiješa mućkanjem i inkubira na sobnoj temperaturi 10 minuta. Zatim slijedi centrifugiranje na +4°C, 15 minuta na 16.000 x g. Centrifugiranjem se razdvoje vodena faza, interfaza i organska faza. U gornjoj, vodenoj fazi se nalazi RNA te se ta faza prebaci u čistu mikroeprevetu. Za precipitaciju RNA doda se 250 µl izopropanola, dobro se promućka i ostavi na sobnoj temperaturi 10 minuta. Nakon inkubacije, centrifugira se 30 minuta na 16.000 x g na +4°C. 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 30-50 µl sterilne vode i pohranjuje u frižideru na -80°C.

3.4.1. Mjerenje koncentracije RNA

Koncentracija RNA mjeri se na spektrofotometru IMPLEN NanoPhotometer N60/N50 (Implen, Njemačka). 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 otopljen te se zatim prelazi na mjerenje koncentracije RNA, također na taj način da se 1µl uzorka nanese na uređaj. Na ekranu uređaja prikazuje se koncentracija RNA te omjeri A260/A280 te

A260/A230. Omjer A260/A280 govori o čistoći RNA. 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 A260/A230 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 TRIzol koji apsorbira pri 230 nm.

3.5. Reverzna transkripcija

Pošto je RNA vrlo osjetljiva molekula, prije analize ekspresije gena potrebno ju je prevesti u cDNA, koja je znatno stabilnija. To je napravljeno pomoću kita za reverznu transkripciju High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher, SAD), koji sadrži enzim reverznu transkriptazu, koja transkribira RNA u sebi komplementarnu cDNA.

Za reakciju reverzne transkripcije koristi se 1 µg RNA. U ukupni volumen od 50 µl ulazi 17 µl reakcijske smjese (10X pufer (10% v/v), 100 mM dNTP (5% v/v), 10× nasumičnih heksamera, 50 U inhibitora RNaze te 125 U reverzne transkriptaze), 1 µg RNA te se nadopunjuje vodom do konačnog volumena (**Tablica 5**).

Tablica 5. Sastav reakcijske smjese za reverznu transkripciju.

komponenta	početna koncentracija	konačna koncentracija	volumen (reakcija od 50 µl)
10X pufer	10 X	1 X	5 µl
25X dNTP	100 mM	4 mM	2 µl
10X nasumični heksameri	10X	1X	5 µl
inhibitor RNaze	20 U/µl	50 U	2,5 µl
reverzna transkriptaza	50 U/µl	125 U	2,5 µl

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

25°C 10:00 min

37°C 120:00 min

85°C 5:00 min

4°C ∞

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

3.6. Kvantitativni PCR u stvarnom vremenu

Kvantitativna lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu omogućuje nam praćenje novonastalih molekula DNA sa svakim ciklusom reakcije. Tijekom reakcije PCR 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 fluorescencija poraste iznad praga detekcije naziva se Ct-vrijednost. Što neke DNA u uzorku ima više, ranije će se umnožiti dovoljno da prijeđe prag detekcije, odnosno Ct-vrijednost će biti niža, dok će uzorak s manje DNA imati višu Ct-vrijednost.

Eventualne razlike u početnoj koncentraciji uzorka ispravlja se pomoću tzv. referentnog gena (eng. *housekeeping gene*), koji služi kao kontrola jer je u svim tkivima u bilo kojem trenutku jednako eksprimiran. Sve Ct-vrijednosti 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 real-time PCR se radi u pločicama s 96 bunarčića (Bio-Rad, SAD) u aparatu CFX96 (BioRad, SAD).

Za detekciju bazalne ekspresije gena koji kodiraju za komponente signalnog puta HH-GLI, analizirano je 5 gena: *SHH*, *PTCH1*, *GLI1*, *GLI2* i *GLI3*, za analizu aktivnosti signalnog puta AR analizirana su 2 gena: *PSA* i *KLK2*, a kao referentni gen korišten je *RPLPO*. Reakcijska smjesa se radi za svaki gen posebno. U smjesu se dodaje SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix 2X (50% v/v, Bio-Rad), početnica F (0,3 mM), početnica R (0,3 mM) te voda do ukupnog volumena 9 μ l po uzorku. Real-time 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 6**.

Tablica 6. Nukleotidni sljedovi početnica korišteni za kvantitativni real-time PCR. Oznaka F označava „forward“, odnosno 5'→3' smjeru sekvence gena, dok su R „reverse“, odnosno u 3'→5' smjeru.

naziv početnice	nukleotidni slijed	referenca
<i>RPLPO F</i>	GGCACCATTGAAATCCTGAGTGATGTG	(Eichberger i sur. 2006)
<i>RPLPO R</i>	TTGCGGACACCCTCCAGGAAGC	
<i>SHH F</i>	GAAAGCAGAGAACTCGGTGG	(Kallassy i sur. 1997)
<i>SHH R</i>	GGTAAGTGAGGAAGTCGCTG	
<i>PTCH1 F</i>	TCCTCGTGTGCGCTGTCTTCCTTC	(Regl i sur. 2002)
<i>PTCH1 R</i>	CGTCAGAAAGGCCAAAGCAACGTGA	
<i>GLI1 F</i>	GCCGTGTAAGCTCCAGTGAACACA	(Regl i sur. 2002)
<i>GLI1 R</i>	TCCCACCTTGAGAGGCCCATAGCAAG	
<i>GLI2 F</i>	GCCATCAAGACCGAGAGCTC	(Tojo i sur. 2003)
<i>GLI2 R</i>	CGGCCCATGAGCAGGAATCC	
<i>GLI3 F</i>	CACTACCTCAAAGCGGGAAG	(Sacedón i sur. 2003)
<i>GLI3 R</i>	TGTTGGACTGTGTGCCATTT	
<i>PSA F</i>	AGTGCGAGAAGCATTCCCAAC	(Li i sur. 2018)
<i>PSA R</i>	CCAGCAAGATCACGCTTTTGTT	
<i>KLK2 F</i>	GCTGCCATTGCCTAAAGAAG	(Li i sur. 2018)
<i>KLK2 R</i>	TGGGAAGCTGTGGCTGACA	

3.7. Izdvajanje proteina iz stanica

Proteini se iz stanica izdvajaju koristeći pufer za lizu, koji se sastoji od pufera RIPA (25 mM Tris-HCl, 1% Na-deoksiholat, 1% Nonidet P-40, 150 mM NaCl, 0,1% SDS) i inhibitora proteaza (Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail Tablets, Roche), uz sonikaciju. 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 1.200 x g 5 min u centrifugi ohlađenoj na +4°C. Supernatant se odlije, a talog stanica se resuspendira u 50-100 µl pufera za lizu i stavi u posudu s ledom te sonicira dva puta po 15 sekundi pomoću sonikatora Labsonic M (Sartorius). Uzorak se nakon toga centrifugira pri 16.000 x g 20 minuta u centrifugi ohlađenoj na +4°C. Nakon centrifugiranja supernatant se sakupi i prebaci u čistu mikroeprevetu. On sadrži izdvojene proteine. Proteini se pohranjuju u frižider na -80°C.

3.7.1. Mjerenje koncentracije proteina

Koncentracija proteina određuje se kolorimetrijski pomoću komercijalnog kita Pierce BCA Protein Assay (Thermo Fisher). Ova metoda se temelji na biuretskoj reakciji u kojoj proteini u alkalnom mediju reduciraju ione bakra. Redukcijom Cu^{2+} nastaje Cu^+ koji se detektira kolorimetrijski, pošto prilikom vezanja bicinkoninske kiseline (eng. *bicinchoninic acid*, BCA) za bazične i aromatske aminokiseline u proteinima dolazi do nastanka svijetloplavog do ljubičastog topljivog kompleksa. Ljubičasti produkt koji se formira pokazuje snažnu apsorbciju pri 562 nm, koja je gotovo linearna s rastućim koncentracijama proteina. Usporedbom vrijednosti apsorbcije uzorka sa standardnom krivuljom poznatih koncentracija jednostavno se može odrediti koncentracija proteina. Prvo se napravi niz serijskih razrjeđenja poznatog standarda proteina, 2 mg/ml BSA (goveđi albumin iz seruma) redom: 0 mg/ml, 0,025 mg/ml, 0,125 mg/ml, 0,25 mg/ml, 0,5 mg/ml, 0,75 mg/ml, 1 mg/ml, 1,5 mg/ml i 2 mg/ml. Također se pripreme razrjeđenja proteina koji se mjere (5,5 µl proteina + 49,5 µl vode). Zatim se napravi radna otopina za bojanje tako da se BCA Reagent A i BCA Reagent B pomiješaju u omjeru 50:1. Radna otopina se nanese u pločicu s 96 bunarčića, za svaki uzorak koji se mjeri po dva bunarčića i po dva bunarčića za svaki u nizu

serijskih razrjeđenja, po 200 µl po bunarčiću. Iz svakog razrjeđenja standarda i uzoraka uzima se po 25 µl i nanosi u 200 µl radne otopine. Pločica se tada stavi na tresilicu da se otopine dobro pomiješaju, 30 s, a zatim se inkubira 30 min na 37°C u vodenoj kupelji. Očitavanje apsorbancije pri 570 nm se vrši na čitaču za pločice Labsystems Multiskan MS. Dobivene vrijednosti se unesu u računalo, prema vrijednostima standarda nacrtana standardna krivulja na temelju koje određujemo koncentraciju proteina u uzorcima.

3.8. Analiza Western blot

Metodom Western blot detektiraju se proteini u određenom uzorku pomoću specifičnih antitijela što nam daje informaciju o tome je li protein i u kojoj mjeri eksprimiran.

Prvi korak kod analize Western blot razdvajanje je 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 između stakla. Gel za razdvajanje se napuni do otprilike $\frac{3}{4}$ stakala, jer treba ostaviti dovoljno mjesta za gel za sabijanje. Gel se nadsvođa 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 češljik pomoću kojeg se formiraju jažice, pazeci da ne ostanu mjehurići zraka. Gel za sabijanje također polimerizira oko pola sata.

U čistu mikroeprevetu odpipetira se 50 µg proteina i na to doda jedna četvrtina konačnog volumena 4X pufera za nanošenje uzoraka (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 zagrije

se 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 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) i redom uzorci. Elektroforeza se odvija pri konstantnom naponu, prvo pri 90 V 15 min da uzorci jednoliku uđu u gel, te zatim otprilike 1,5 h pri 100-120 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. Za prijenos se slaže tzv. sendvič u plastičnom nosaču koji se sastoji od: spužvice, dva komada filter papira, 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 (+). Kada je „sendvič“ složen, nosač se postavi u sustav za prijenos na membranu 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, 1 h. Međutim za proteine većih molekularnih masa prijenos se odvija pri 100 V do 80 minuta.

Nakon što prijenos završi, membrana se ispiru u 3 x 5 min u TBST puferu (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 TBST puferu pola sata pri sobnoj temperaturi na tresilici. Primarna antitijela razrjeđuju se u 5% mlijeku u TBST puferu kako je navedeno u **Tablici 7**. Kao kontrola količine nanesenih proteina koristi se β -aktin. Nakon blokiranja, trakice membrane se upakiraju u plastičnu foliju s otopinom primarnih antitijela, paketići se zavare kako tekućina ne bi iscurila, te se inkubiraju preko noći na +4°C na njihalici kako bi se antitijela cijelo vrijeme miješala.

Tablica 7. Antitijela korištena za analizu Western blot. Sekundarna antitijela su konjugirana s peroksidazom (HRP). pAt = poliklonalno antitijelo, mAt = monoklonalno antitijelo.

primarno antitijelo	razrjeđenje	sekundarno antitijelo	razrjeđenje
β -AKTIN mišje pAt (ProteinTech, SAD; 60008-1-Ig)	1:4.000	protu-mišji IgG-HRP (BD Pharmingen, SAD; 554002)	1:8.000
GLI2 mišje mAt (Santa Cruz, SAD; sc-271786)	1:200		
SHH mišje mAt (Santa Cruz, SAD; sc-365112)	1:100		
GLI1 zečje pAt (Cell Signaling, SAD; #3538)	1:200	protu-zečji IgG-HRP (BD Pharmingen, SAD; 554021)	1:6.000
GLI3 zečje pAt (Genetex, SAD; GTX104362)	1:1.000		
PTCH1 zečje pAt (ABclonal, SAD; A0826)	1:1.000		
AR zečje pAt (Cell Signaling, SAD; #5153)	1:1.000		

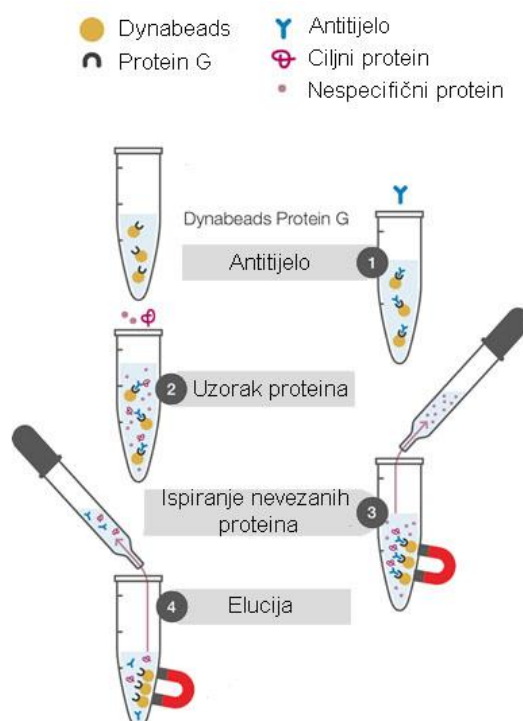
Sljedeći dan membrane se ispiru 3 x 5 min u TBST puferu. Zatim se napravi otopina sekundarnih antitijela odgovarajućih razrjeđenja u 5% otopini mlijeka u TBST-u (**Tablica 7**). Membrane se inkubiraju u otopini sekundarnih antitijela sat vremena na sobnoj temperaturi na njihovoj strani. Nakon inkubacije membrane se ispiru u TBST puferu 3 x 5 minuta.

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

3.9. Analiza fizičke interakcije dvaju proteina – ko-imunoprecipitacija

Ko-imunoprecipitacija je metoda koja omogućava analizu fizičke interakcije među proteinima od interesa pomoću specifičnih antitijela vezanih za magnetne kuglice. Za takvu analizu proteini se izoliraju iz većeg broja stanica u blagim uvjetima kako se ne bi narušile proteinske interakcije. Postupak izdvajanja proteina te mjerenje koncentracije opisano je u **poglavljima 3.7. i 3.7.1.**, a jedina razlika je da se za izolaciju proteina koristi pufer TENN (50 mM Tris, pH=7,4, 5 mM EDTA, 150 mM NaCl, 0,5% NP-40). Za reakciju ko-imunoprecipitacije odvoji se 1 mg proteina (za svaki uzorak ista količina) te se za svaki uzorak odvoji još 50 µg proteina za Western blot ukupnih proteina stavljenih u reakciju ko-imunoprecipitacije, koji se pripremaju kako je opisano u **poglavlju 3.8.**

Za ko-imunoprecipitaciju koriste se magnetne kuglice Dynabeads obložene proteinom G (Thermo Fisher Scientific), koji omogućava vezanje antitijela preko Fc domene, te magnet DynaMag (Thermo Fisher Scientific). Shema postupka prikazana je na **Slici 23.**



Slika 23. Shematski prikaz postupka ko-imunoprecipitacije. Izvor: www.thermofisher.com.

Ukratko, po uzorku se koristi 50 μ l otopine magnetnih kuglica koje se prebace u mikroepruvetu. Mikroepruveta se postavi na magnetni stalak, koji na sebe privuče magnetne kuglice zbog čega se one prilipe uz stijenku mikroepruvete te to dozvoljava uklanjanje supernatanta. Magnetne kuglice se nakon toga isperu u 200 μ l Wash & Bind pufera (0,1 M natrij fosfat, 0,01% (v/v) Tween20, pH 9) te se nakon toga inkubiraju uz rotaciju s otopinom antitijela odgovarajuće koncentracije u Wash & Bind puferu, 20 minuta pri sobnoj temperaturi. Za ko-imunoprecipitaciju proteina SHH korišteno je 5 μ g SHH antitijela (mišje monoklonalno, Santa Cruz Biotechnology, E-1) po uzorku. Nakon inkubacije s antitijelom, mikroepruveta se stavi na magnet i supernatant se odstrani. Magnetne kuglice, za koje je sada vezano antitijelo, se ispiru 3 puta u 200 μ l TBST pufera (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 uz rotaciju u hladnoj komori na +4°C, preko noći. Tijekom tog vremena, za specifično antitijelo vezao se ciljni protein, koji za sebe veže proteine interaktore. Sljedeći dan kompleks se ispiru 3 puta u 200 μ l TBST pufera. Prije elucije, kompleks se resuspendira u 100 μ l TBST pufera i prenese u čistu mikroepruvetu, kako se ne bi eluirali i proteini nespecifično vezani za stijenku mikroepruvete. Kada se kompleks prebaci u čistu mikroepruvetu, supernatant se odstrani, dodaje se 20 μ l 1X LB pufera (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 10 minuta, što omogućava eluciju ko-imunoprecipitiranog kompleksa proteina i njihovu denaturaciju kako bi se dobivene komponente kompleksa mogle analizirati Western blotom. Za svaki set uzoraka analizira se i negativna kontrola, što su magnetne kuglice bez vezanih antitijela. Daljnji protokol isti je kao i za standardne uzorke te nam ova kontrola daje uvid u eventualno nespecifično vezanje proteina na magnetne kuglice. 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.

3.10. Statistička analiza podataka

Normalnost distribucije kontinuiranih varijabli ispitana je pomoću D'Agostino-Pearsonovog testa. S obzirom na normalnost distribucije, razlike kod kontinuiranih varijabli testirane su pomoću neparametrijskog Mann-Whitneyevog (između dvije grupe) i Kruskal-Wallisovog testa (između više od dvije grupe) ili parametrijskog t-testa (između dvije grupe) i jednosmjerne analize varijance (ANOVA) (između više od dvije grupe). Korelacija između varijabli određena je računanjem Spearmanovog koeficijenta korelacije rangova (ρ), zajedno za kontrolno i tkivo raka prostate. Za tumačenje jačine korelacije prema iznosu statistički značajnog koeficijenta korelacije ρ korištena je skala prema Schoberu i sur. (2018): 0,00-0,10 – neznatna korelacija, 0,10-0,39 – slaba korelacija, 0,40-0,69 – umjerena korelacija, 0,70-0,89 – jaka korelacija i 0,90-1,00 – vrlo jaka korelacija. Dob i vrijednosti proteinskih ekspresija su dihotomizirane u dvije kategorije („niska“ i „visoka“) prema graničnoj vrijednosti koja je dobivena analizom krivulje ROC (eng. *receiver operating characteristic*). Razlike u kategoričkim varijablama testirane su pomoću hi-kvadrat testa. Krivulje preživljenja analizirane su pomoću Kaplan-Meierove metode i uspoređene pomoću log-rang testa. Dvosmjerne P-vrijednosti manje od 0,05 smatrane su statistički značajne. Statistička analiza provedena je pomoću programa MedCalc for Windows v19,8 (MedCalc Software, Ostend, Belgija).

4. REZULTATI

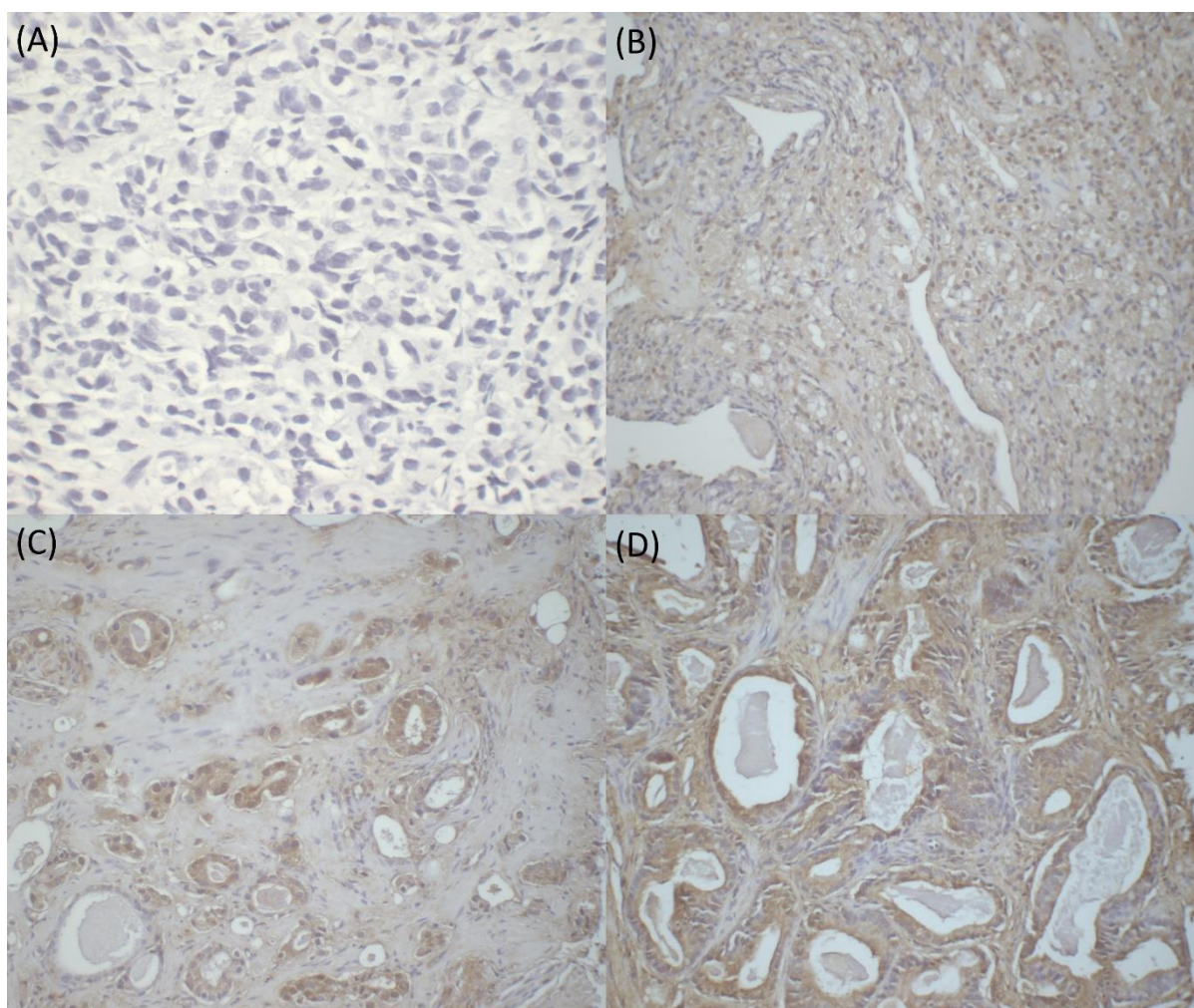
4.1. Ekspresija i lokalizacija proteina GLI1 u uzorcima tkiva prostate

Ekspresija i lokalizacija proteina GLI1 određena je imunohistokemijskim bojanjem tkiva prostate. Razina ekspresije je određena posebno u stanicama epitela žlijezda kontrolnog tkiva, odnosno stanica tumora te okolne strome i izražena je pomoću histoskôra. **Tablica 8** pokazuje zbirne rezultate određivanja ekspresija i lokalizacije proteina GLI1. **Slika 24** prikazuje fotografije oglednih primjera preparata s različitom jačinom ekspresije proteina GLI1.

Tablica 8. Ekspresija i lokalizacija proteina GLI1 u uzorcima tkiva prostate. c = citoplazma, d = citoplazma i jezgra (difuzno), GG = grupa gradusa.

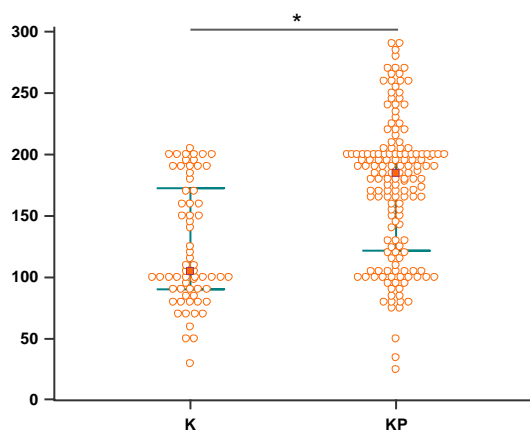
	broj uzoraka	ekspresija u stanicama medijan (raspon)	lokalizacija u stanicama		ekspresija u stromi medijan (raspon)	lokalizacija u stromi	
			n (%)			n (%)	
			c	d		c	d
Kontrolni uzorci							
zdrava prostata	34	100 (30-200)	0 (0,0)	34 (100,0)	100 (20-160)	8 (23,5)	26 (76,5)
prostata s upalom	31	120 (70-205)	4 (12,9)	27 (87,1)	120 (14-180)	0 (0,0)	31 (100,0)
Uzorci raka prostate							
GGI	28	165 (80-270)	1 (3,6)	27 (96,4)	105 (20-210)	7 (25,0)	21 (75,0)
GGII	36	197.5 (90-285)	1 (2,8)	35 (97,2)	105 (30-180)	6	30

						(16,7)	(83,3)
GGIII	30	199 (80-290)	1 (3,3)	29 (96,7)	105 (50-200)	7 (23,3)	23 (76,7)
GGIV	32	180 (50-245)	0 (0,0)	32 (100,0)	100 (25-175)	4 (12,5)	28 (87,5)
GGV	30	162.5 (25-265)	0 (0,0)	30 (100,0)	92.5 (2-150)	9 (30,0)	21 (70,0)



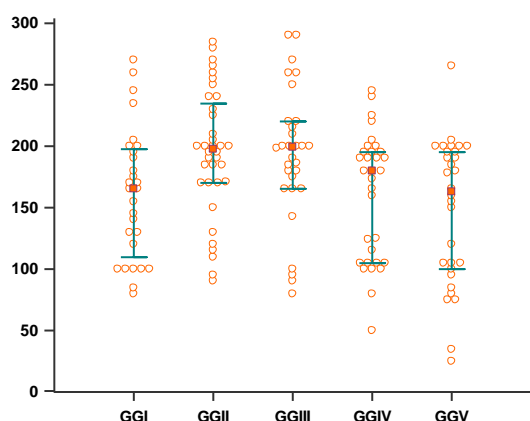
Slika 24. Primjeri preparata s različitom jačinom ekspresije proteina GLI1. **(A)** Negativna (povećanje 400X). **(B)** Slaba (+) (200X). **(C)** Srednje jaka (++) (200X). **(D)** Jaka (+++) (200X).

Medijan i raspon ekspresije proteina GLI1 (vrijednost histoskôra) u stanicama kontrolnog tkiva prostate bio je 105 (30-205), a u stanicama raka prostate 185 (25-290). Statistička analiza je pokazala da je ekspresija proteina GLI1 značajno jača u stanicama raka ($P < 0,0001$) (Slika 25).



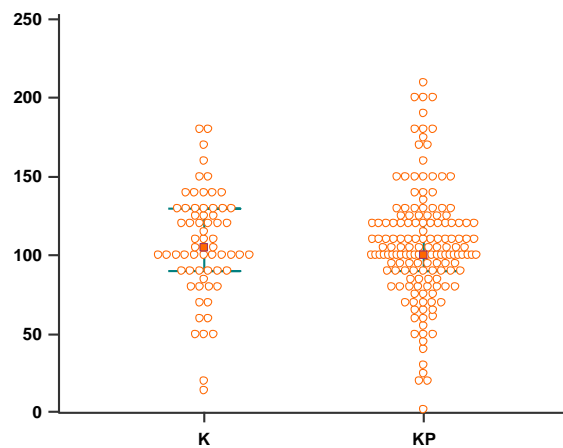
Slika 25. Usporedba razine ekspresije proteina GLI1 između epitelnih stanica kontrolnog tkiva (K) i stanica raka prostate (KP). Ekspresija proteina GLI1 značajno je jača u stanicama raka. Označeni su medijan i interkvartilni raspon. * označava statistički značajnu razliku $P < 0,05$.

Usporedba ekspresije proteina GLI1 u stanicama tkiva raka prostate između pojedinih grupa gradusa pokazala je da postoji statistički značajna razlika ($P = 0,002$), pri čemu izgleda da su više grupe gradusa povezane s nižom razinom ekspresije proteina GLI1 (Slika 26).



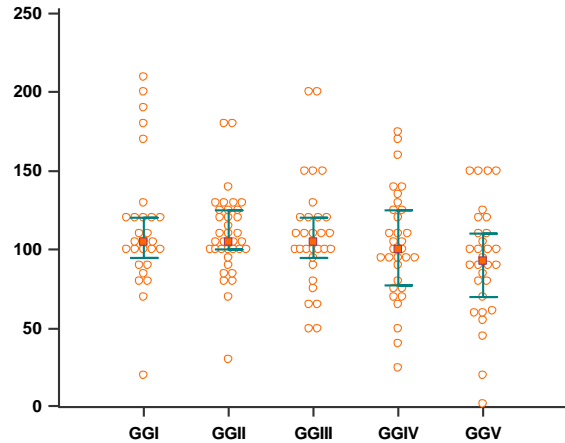
Slika 26. Usporedba razine ekspresije proteina GLI1 u stanicama tkiva raka prostate različitih grupa gradusa (GG). Između skupina utvrđena je statistički značajna razlika ($P < 0,05$) pri čemu se čini da su više grupe gradusa povezane s nižom razinom ekspresije proteina GLI1. Označeni su medijan i interkvartilni raspon.

Medijan i raspon ekspresije proteina GLI1 u stromi tkiva kontrolnih uzoraka bili su 105 (14-180), a u stromi tkiva raka prostate 100 (2-210). Statistička analiza je pokazala da nema razlike u ekspresija proteina GLI1 u stromi između kontrolnih uzoraka prostate i uzoraka raka ($P = 0,491$) (**Slika 27**).



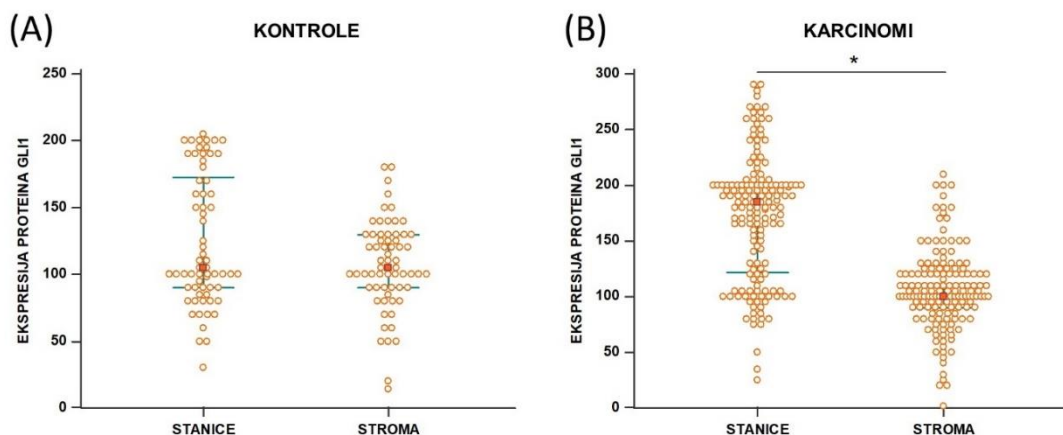
Slika 27. Usporedba razine ekspresije proteina GLI1 između strome kontrolnog tkiva (K) i strome raka prostate (KP). Između skupina nije utvrđena statistički značajna razlika. Označeni su medijan i interkvartilni raspon.

Sukladno tome, nije bilo razlike ni u ekspresiji proteina GLI1 u stromi između pojedinih grupa gradusa ($P = 0,149$) (**Slika 28**).



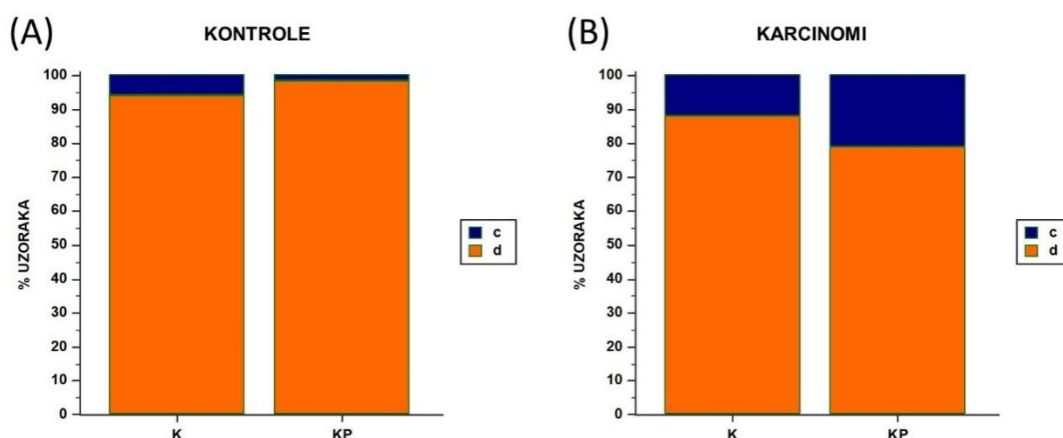
Slika 28. Usporedba razine ekspresije proteina GLI1 u stromi tkiva raka prostate različitih grupa gradusa (GG). Između skupina nije utvrđena statistički značajna razlika. Označeni su medijan i interkvartilni raspon.

Usporedba razine ekspresije proteina GLI1 u stanicama žlijezda i strome kontrolnih uzoraka prostate pokazala je da nema značajne razlike ($P = 0,161$) (**Slika 29A**). Suprotno od toga, ekspresija proteina GLI1 bila je značajno viša u stanicama raka prostate u usporedni sa stromom ($P < 0.0001$) (**Slika 29B**).



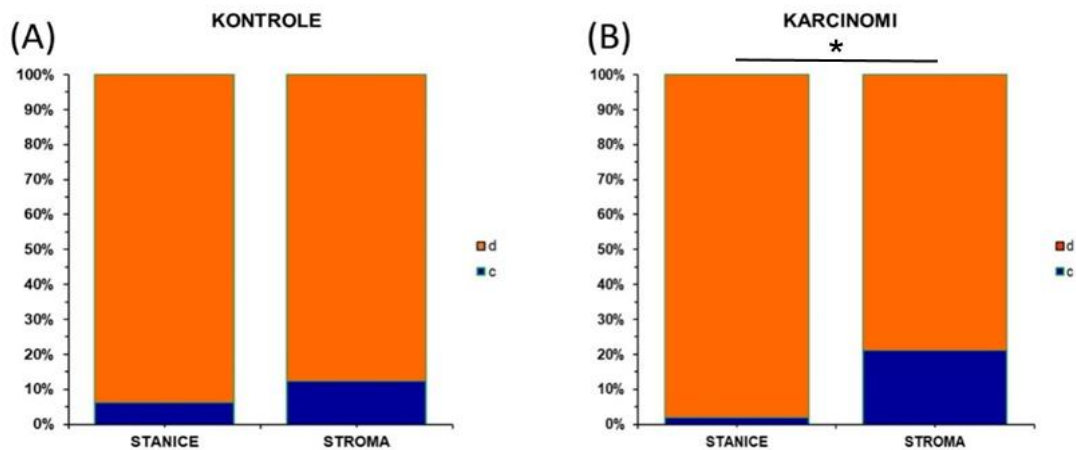
Slika 29. Usporedba razina ekspresije proteina GLI1 u tkivu prostate. **(A)** Između stanica žlijezda i strome u kontrolnim uzorcima nije utvrđena statistički značajna razlika. **(B)** Između stanica raka prostate i okolne strome je utvrđena statistički značajna razlika. Označeni su medijan i interkvartilni raspon. * označava statistički značajnu razliku $P < 0,05$.

I u stanicama kontrolnih uzoraka i u stanicama raka prostate distribucija unutarstanične lokalizacije proteina GLI1 bila je jednaka, odnosno primarno difuzna (nuklearna i citoplazmatska) ($P = 0,103$) (**Slika 30A**). Iako je u stromi uzoraka raka prostate primijećen povećani broj uzoraka sa samo citoplazmatskim obojenjem, tj. lokalizacijom proteina GLI1, nije bilo statistički značajne razlike u usporedbi sa stromom kontrolnog tkiva ($P = 0,124$) (**Slika 30B**).



Slika 30. Usporedba distribucije unutarstanične lokalizacije proteina GLI1. **(A)** Između stranica kontrolnog tkiva prostate (K) i stanica raka prostate (KP). **(B)** Između strome kontrolnog tkiva prostate (K) i strome raka prostate (KP). Između skupina nije utvrđena statistički značajna razlika. c = citoplazma, d = citoplazma i jezgra.

Usporedba distribucije unutarstanične lokalizacije proteina GLI1 između stanica i strome kontrolnog tkiva pokazala je da nema statistički značajne razlike ($P = 0,232$) (**Slika 31A**). S druge strane, usporedba distribucije lokalizacije proteina GLI1 između stanica i strome raka prostate pokazala je da veći broj uzoraka ima u stromi samo citoplazmatsko obojenje ($P < 0,0001$) (**Slika 31B**).



Slika 31. Usporedba distribucije unutarstanične lokalizacije proteina GLI1. **(A)** Između stanica kontrolnog tkiva prostate i strome kontrolnog tkiva nije utvrđena statistički značajna razlika. **(B)** Između stanica raka prostate i strome raka prostate utvrđena je statistički značajna razlika. * označava statistički značajnu razliku $P < 0,05$. c = citoplazma, d = citoplazma i jezgra.

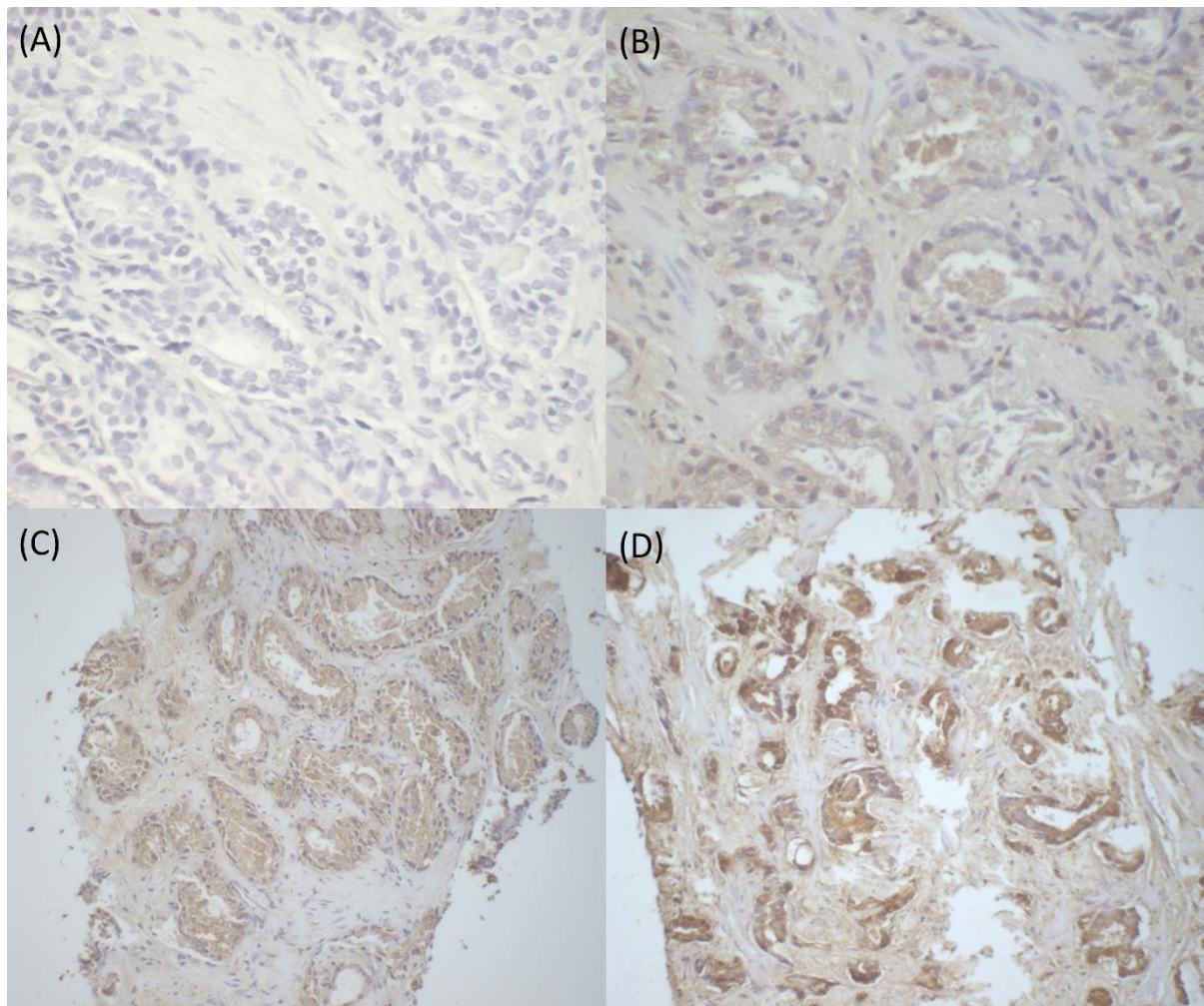
4.2. Ekspresija i lokalizacija proteina GLI2 u uzorcima tkiva prostate

Ekspresija i lokalizacija proteina GLI2 određena je imunohistokemijskim bojanjem tkiva prostate. Razina ekspresije je određena posebno u stanicama epitela žlijezda kontrolnog tkiva, odnosno stanica tumora te okolne strome i izražena je pomoću histoskôra. **Tablica 9** pokazuje zbirne rezultate određivanja ekspresija i lokalizacije proteina GLI2. **Slika 32** prikazuje fotografije oglednih primjera preparata s različitom jačinom ekspresije proteina GLI1.

Tablica 9. Ekspresija i lokalizacija proteina GLI2 u uzorcima tkiva prostate. c = citoplazma, d = citoplazma i jezgra (difuzno), GG = grupa gradusa.

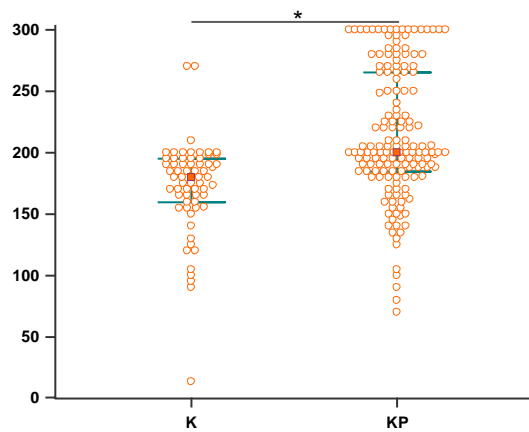
	broj uzoraka	ekspresija u stanicama	lokalizacija u stanicama		ekspresija u stromi	lokalizacija u stromi		
			n (%)			medijan (raspon)	n (%)	
			c	d			c	d
Kontrolni uzorci								
zdrava prostata	34	180 (14-200)	0 (0,0)	34 (100,0)	35 (5-200)	13 (38,2)	21 (61,8)	
prostata s upalom	31	175 (90-270)	2 (6,5)	29 (93,5)	50 (25-120)	4 (12,9)	27 (87,1)	
Uzorci raka prostate								
GGI	29	195 (70-300)	0 (0,0)	29 (100,0)	50 (0-140)	9 (32,1)	19 (67,9)	
GGII	36	200 (90-300)	0 (0,0)	36 (100,0)	55 (20-300)	8 (22,2)	28 (77,8)	
GGIII	30	220 (165-300)	0 (0,0)	30 (100,0)	95 (20-168)	8 (26,7)	22 (73,3)	
GGIV	32	210 (105-300)	0	32	85 (20-165)	4	28	

			(0,0,0)	(100,0)		(12,5)	(87,5)
GGV	30	205 (80-300)	1 (3,3)	29 (96,7)	57,5 (10-200)	7 (23,3)	23 (76,7)



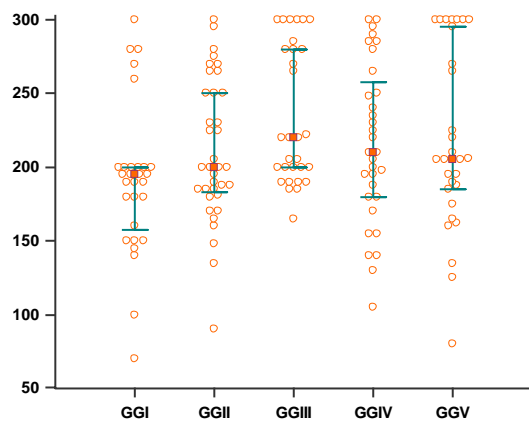
Slika 32. Primjeri preparata s različitim jačinom ekspresije proteina GLI2. (A) Negativna (povećanje 400X). (B) Slaba (+) (200X). (C) Srednje jaka (++) (200X). (D) Jaka (+++) (200X).

Medijan i raspon ekspresije proteina GLI2 (vrijednost histoskôra) u stanicama kontrolnog tkiva prostate bio je 180 (14-270), a u stanicama raka prostate 200 (70-300). Statistička analiza je pokazala da je ekspresija proteina GLI2 značajno jača u stanicama raka ($P < 0,0001$) (Slika 33).



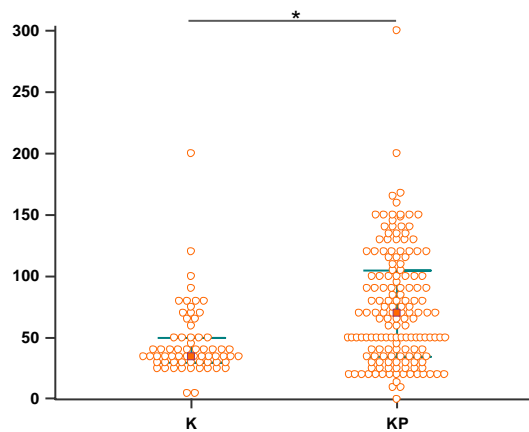
Slika 33. Usporedba razine ekspresije proteina GLI2 između epitelnih stanica kontrolnog tkiva (K) i stanica raka prostate (KP). Ekspresija proteina GLI2 značajno je jača u stanicama raka. Označeni su medijan i interkvartilni raspon. * označava statistički značajnu razliku $P < 0,05$.

Usporedba ekspresije proteina GLI2 u stanicama raka prostate između pojedinih grupa gradusa pokazala je da postoji statistički značajna razlika ($P = 0,022$), pri čemu je najviša ekspresija bila u uzorcima grupe gradusa III (**Slika 34**).



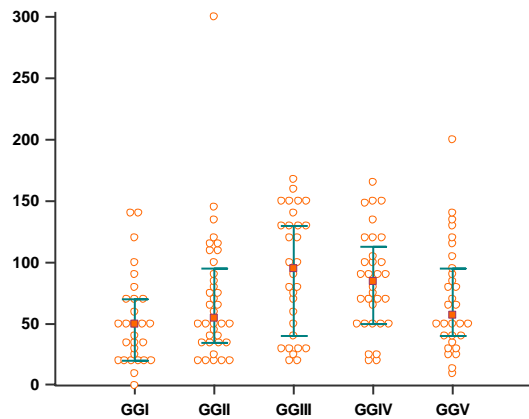
Slika 34. Usporedba razine ekspresije proteina GLI2 u stanicama tkiva raka prostate različitih grupa gradusa (GG). Između skupina utvrđena je statistički značajna razlika ($P < 0,05$) pri čemu je ekspresija proteina GLI2 najjača u uzorcima GGIII. Označeni su medijan i interkvartilni raspon.

Medijan i raspon ekspresije proteina GLI2 u stromi tkiva kontrolnih uzoraka bili su 35 (5-200), a u stromi tkiva raka prostate 70 (0-300). Statistička analiza je pokazala da je ekspresija proteina GLI2 u stromi uzoraka raka viša nego u stromi kontrolnih uzoraka ($P < 0,0001$) (**Slika 35**).



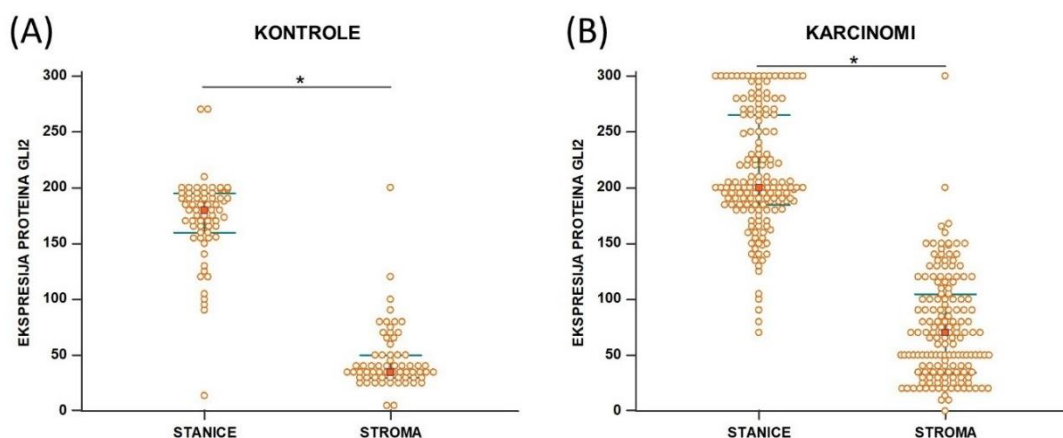
Slika 35. Usporedba razine ekspresije proteina GLI2 između strome kontrolnog tkiva (K) i strome raka prostate (KP). Ekspresija proteina GLI2 značajno je jača u tumorskoj stromi. Označeni su medijan i interkvartilni raspon. * označava statistički značajnu razliku $P < 0,05$.

Usporedba ekspresije proteina GLI2 u stromi raka prostate između pojedinih grupa gradusa pokazala je da postoji statistički značajna razlika ($P = 0,004$), pri čemu je najviša ekspresija opet bila u uzorcima grupe gradusa III (**Slika 36**).



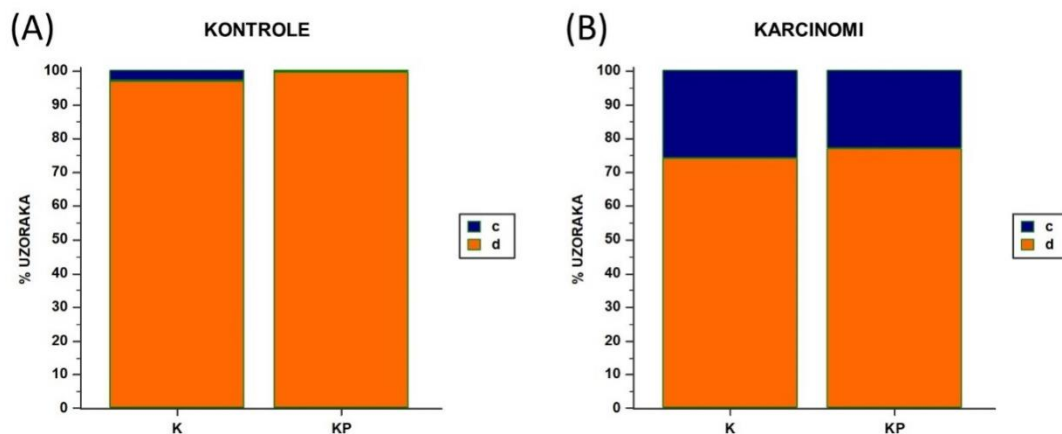
Slika 36. Usporedba razine ekspresije proteina GLI2 u stromi tkiva raka prostate različitih grupa gradusa (GG). Između skupina utvrđena je statistički značajna razlika ($P < 0,05$) pri čemu je ekspresija proteina GLI2 najviša u uzorcima grupe gradusa (GG) III. Označeni su medijan i interkvartilni raspon.

Usporedba razine ekspresije proteina GLI2 u stanicama žlijezda i strome kontrolnih uzoraka prostate pokazala je da je ekspresija bila znatno povišena u stanicama ($P < 0,0001$) (**Slika 37A**). Isto je primijećeno i u stanicama raka prostate u usporedni s njihovom stromom ($P < 0,0001$) (**Slika 37B**).



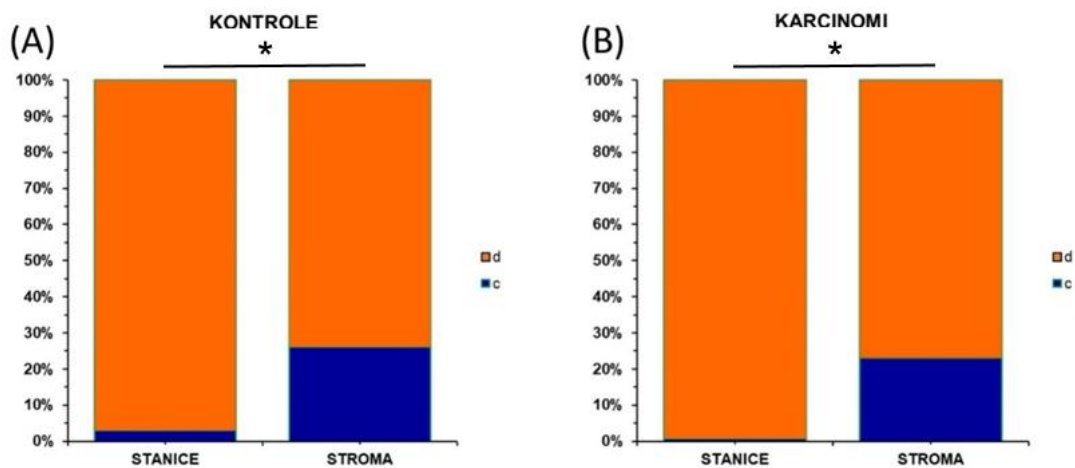
Slika 37. Usporedba razina ekspresije proteina GLI2. **(A)** Između stanica žlijezda i strome u kontrolnim uzorcima tkiva. **(B)** Između stanica raka prostate i okolne strome. Između skupina utvrđena je statistički značajna razlika. Označeni su medijan i interkvartilni raspon. * označava statistički značajnu razliku $P < 0,05$.

I u stanicama kontrolnih uzoraka i u stanicama raka prostate distribucija unutarstanične lokalizacije proteina GLI2 bila je jednaka, odnosno primarno difuzna (nuklearna i citoplazmatska) ($P = 0,153$) (**Slika 38A**). Iako je generalno primijećen povećani broj uzoraka sa samo citoplazmatskim obojenjem, tj. lokalizacijom proteina GLI2, nije bilo statistički značajne razlike između strome kontrolnog tkiva i strome raka prostate ($P = 0,626$) (**Slika 38B**).



Slika 38. Usporedba distribucije unutarstanične lokalizacije proteina GLI2. **(A)** Između stranica kontrolnog tkiva prostate (K) i stanica raka prostate (KP). **(B)** Između strome kontrolnog tkiva prostate (K) i strome raka prostate (KP). Između skupina nije utvrđena statistički značajna razlika. c = citoplazma, d = citoplazma i jezgra.

Usporedba distribucije unutarstanične lokalizacije proteina GLI2 između stanica i strome kontrolnog tkiva pokazala je da u stromi kontrolnog tkiva ima značajno više uzoraka samo s citoplazmatskim bojanjem ($P = 0,0002$) (**Slika 39A**). Isto je primijećeno i kod uzoraka raka prostate ($P < 0,0001$) (**Slika 39B**).



Slika 39. Usporedba distribucije unutarstanične lokalizacije proteina GLI2. **(A)** Između stranica kontrolnog tkiva prostate i strome kontrolnog tkiva. **(B)** Između stanica raka prostate i strome raka prostate. Između skupina utvrđena je statistički značajna razlika. * označava statistički značajnu razliku $P < 0,05$. c = citoplazma, d = citoplazma i jezgra.

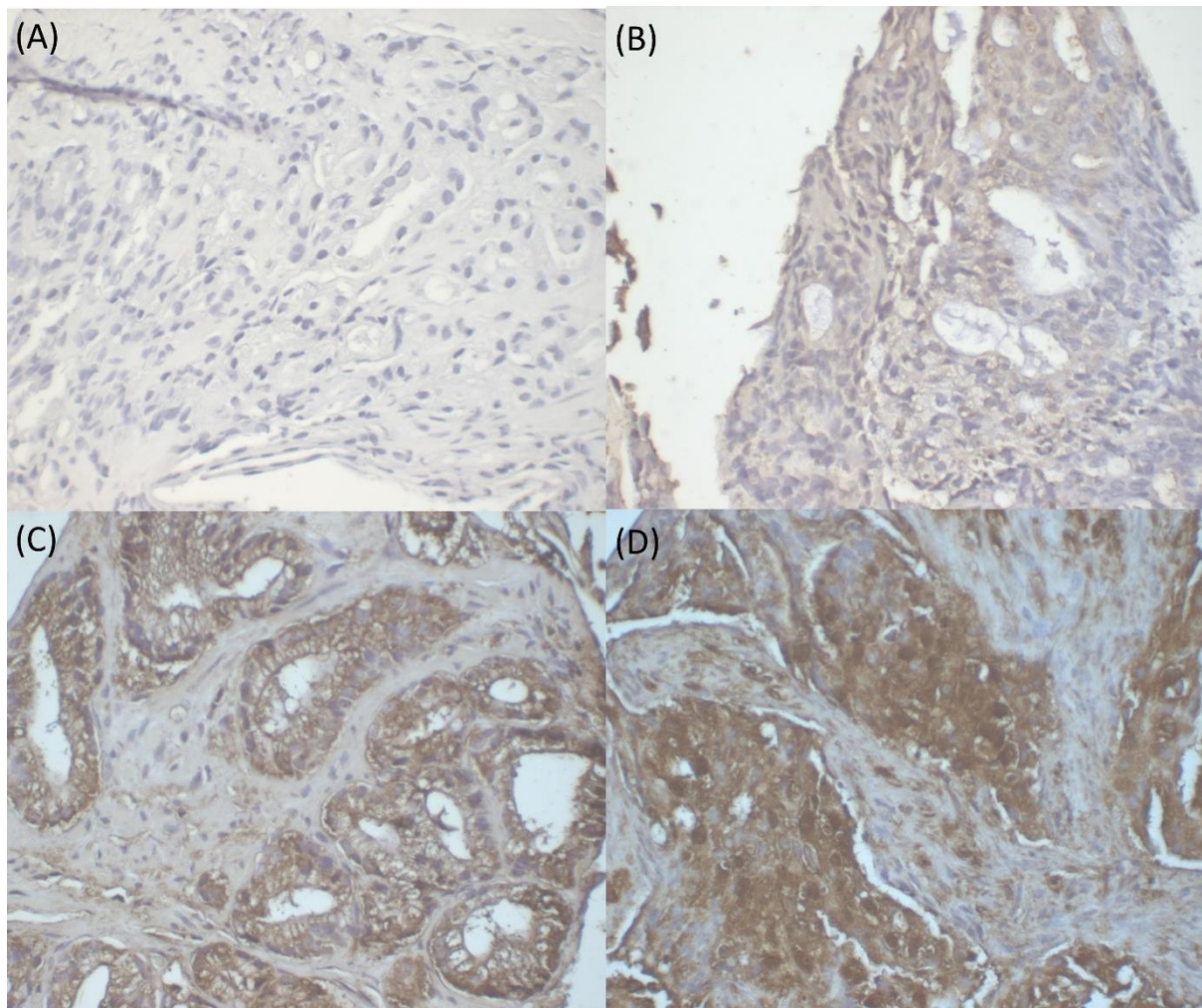
4.3. Ekspresija i lokalizacija proteina GLI3 u uzorcima tkiva prostate

Ekspresija i lokalizacija proteina GLI3 određena je imunohistokemijskim bojanjem tkiva prostate. Razina ekspresije je određena posebno u stanicama epitela žlijezda kontrolnog tkiva, odnosno stanica tumora te okolne strome i izražena je pomoću histoskôra. **Tablica 10** pokazuje zbirne rezultate određivanja ekspresija i lokalizacije proteina GLI3. **Slika 40** prikazuje fotografije oglednih primjera preparata s različitom jačinom ekspresije proteina GLI3.

Tablica 10. Ekspresija i lokalizacija proteina GLI3 u uzorcima tkiva prostate. c = citoplazma, d = citoplazma i jezgra (difuzno), GG = grupa gradusa.

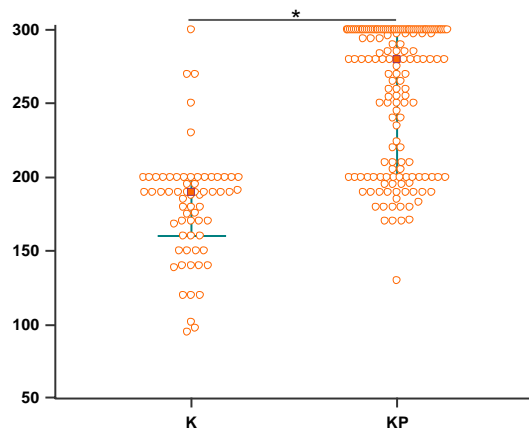
	broj uzoraka	ekspresija u stanicama medijan (raspon)	lokalizacija u stanicama		ekspresija u stromi medijan (raspon)	lokalizacija u stromi	
			n (%)			n (%)	
			c	d		c	d
Kontrolni uzorci							
zdrava prostata	34	190 (120-270)	0 (0,0)	34 (100,0)	100 (20-150)	3 (8,8)	31 (91,2)
prostata s upalom	31	188 (95-300)	0 (0,0)	31 (100,0)	120 (50-200)	1 (3,2)	30 (96,8)
Uzorcii raka prostate							
GGI	29	294 (180-300)	0 (0,0)	29 (100,0)	100 (50-200)	30 (100,0)	0 (0,0)
GGII	36	280 (180-300)	0 (0,0)	36 (100,0)	100 (50-190)	18 (50,0)	18 (50,0)
GGIII	30	300 (180-300)	3 (10,0)	27 (90,0)	90 (40-200)	12 (40,0)	18 (60,0)

GGIV	32	280 (130-300)	1 (3,1)	31 (96,9)	100 (50-200)	7 (21,9)	25 (78,1)
GGV	30	210 (170-300)	2 (6,7)	28 (93,3)	120 (80-200)	4 (13,3)	26 (86,7)



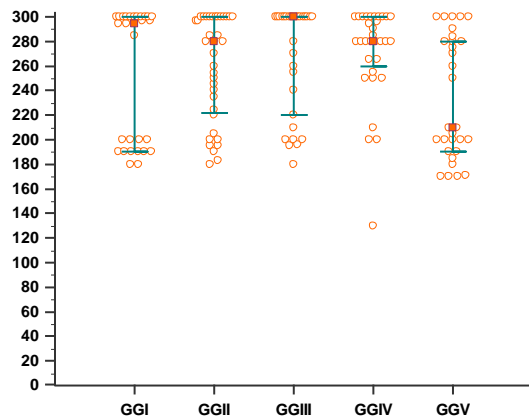
Slika 40. Primjeri preparata s različitom jačinom ekspresije proteina GLI3. **(A)** Negativna (povećanje 400X). **(B)** Slaba (+) (400X). **(C)** Srednje jaka (++) (400X). **(D)** Jaka (+++) (400X).

Medijan i raspon ekspresije proteina GLI3 (vrijednost histoskôra) u stanicama kontrolnog tkiva prostate bio je 190 (95-300), a u stanicama raka prostate 280 (130-300). Statistička analiza je pokazala da je ekspresija proteina GLI3 značajno jača u stanicama raka ($P < 0,0001$) (**Slika 41**).



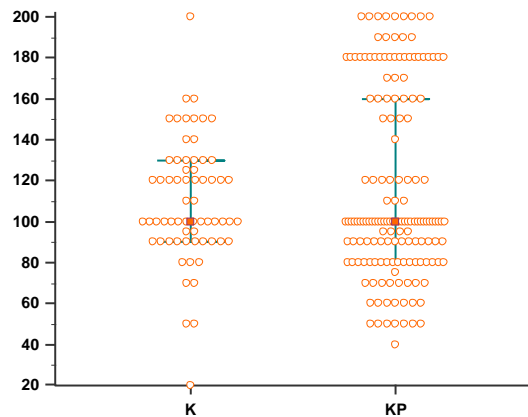
Slika 41. Usporedba razine ekspresije proteina GLI3 između epitelnih stanica kontrolnog tkiva (K) i stanica raka prostate (KP). Ekspresija proteina GLI3 značajno je jača u stanicama raka. Označeni su medijan i interkvartilni raspon. * označava statistički značajnu razliku $P < 0,05$.

Usporedba ekspresije proteina GLI3 u stanicama raka prostate između pojedinih grupa gradusa pokazala je da postoji statistički značajna razlika ($P = 0,020$), pri čemu jedino uzorci grupe gradusa V imaju značajno sniženu ekspresiju proteina GLI3 (**Slika 42**).



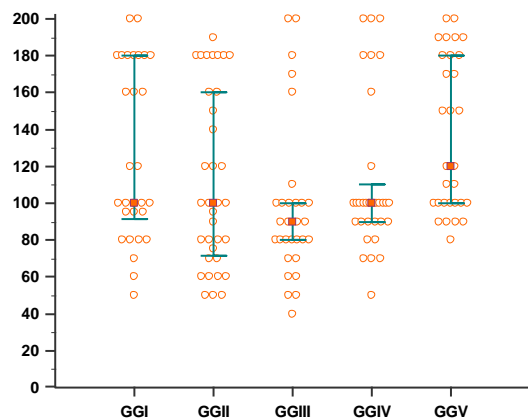
Slika 42. Usporedba razine ekspresije proteina GLI3 u stanicama tkiva raka prostate različitih grupa gradusa (GG). Između skupina utvrđena je statistički značajna razlika ($P < 0,05$) pri čemu jedino uzorci GG V imaju značajno sniženu ekspresiju. Označeni su medijan i interkvartilni raspon.

Medijan i raspon ekspresije proteina GLI3 u stromi tkiva kontrolnih uzoraka bili su 100 (20-200), a u stromi tkiva raka prostate 100 (40-200). Statistička analiza je pokazala da nema razlike u ekspresiji proteina GLI3 između strome kontrolnih uzoraka i strome raka prostate ($P = 0,835$) (**Slika 43**).



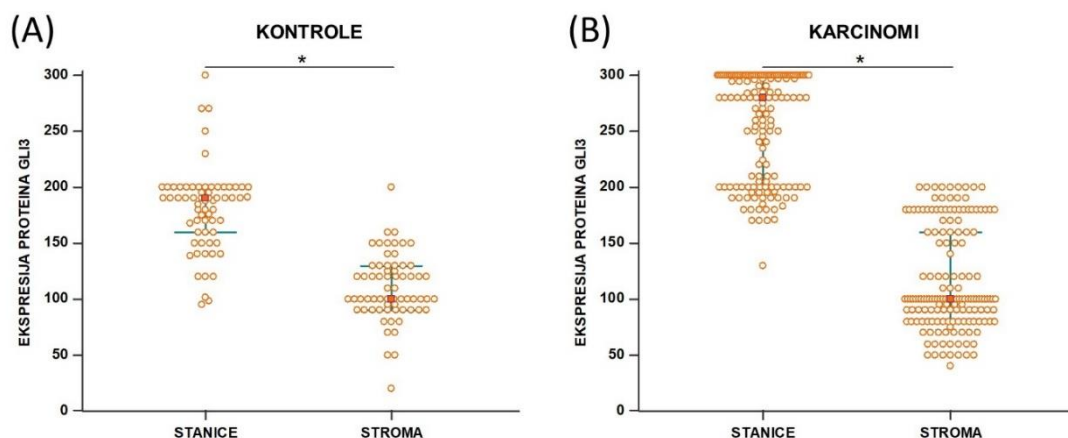
Slika 43. Usporedba razine ekspresije proteina GLI3 između strome kontrolnog tkiva (K) i strome raka prostate (KP). Između skupina nije utvrđena statistički značajna razlika. Označeni su medijan i interkvartilni raspon.

Međutim, usporedba ekspresije proteina GLI3 u stromi raka prostate između pojedinih grupa gradusa pokazala je da postoji statistički značajna razlika ($P = 0,004$), pri čemu je najniža ekspresija bila u uzorcima grupe gradusa III, a najviša u uzorcima grupe gradusa V (**Slika 44**).



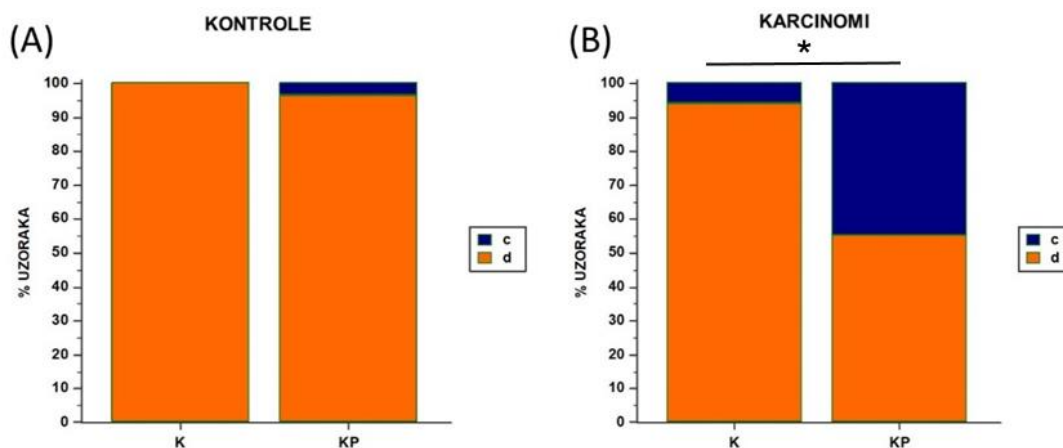
Slika 44. Usporedba razine ekspresije proteina GLI3 u stromi tkiva raka prostate različitih grupa gradusa (GG). Između skupina utvrđena je statistički značajna razlika ($P < 0,05$) pri čemu je ekspresija proteina GLI3 najniža u uzorcima GGIII, a najviša u uzorcima GGV. Označeni su medijan i interkvartilni raspon.

Usporedba razine ekspresije proteina GLI3 u stanicama žlijezda i strome kontrolnih uzoraka prostate pokazala je da je ekspresija bila znatno pojačana u stanicama ($P < 0,0001$) (**Slika 45A**). Isto je primijećeno i u stanicama raka prostate u usporedni s njihovom stromom ($P < 0,0001$) (**Slika 45B**).



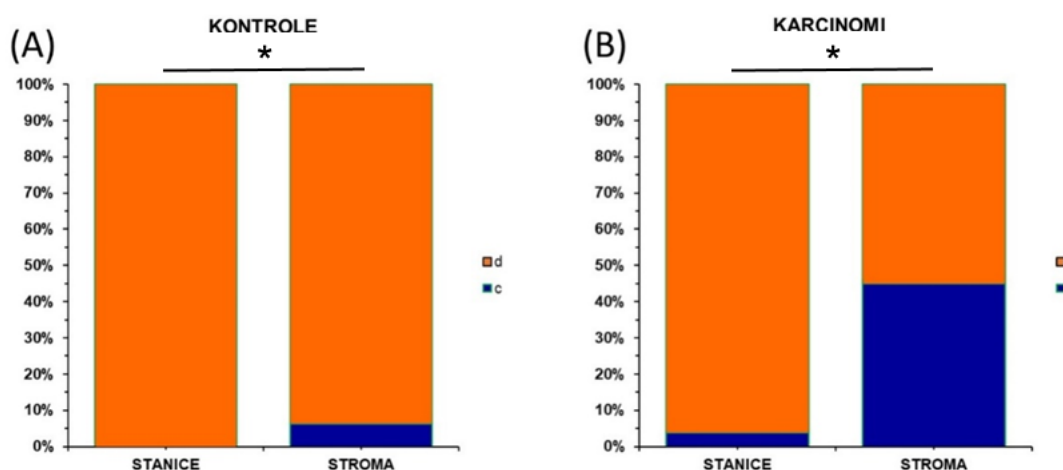
Slika 45. Usporedba razina ekspresije proteina GLI3. **(A)** Između stanica žlijezda i strome u kontrolnim uzorcima tkiva. **(B)** Između stanica raka prostate i okolne strome. Između skupina utvrđena je statistički značajna razlika. Označeni su medijan i interkvartilni raspon. * označava statistički značajnu razliku $P < 0,05$.

I u stanicama kontrolnih uzoraka i u stanicama raka prostate distribucija unutarstanične lokalizacije proteina GLI3 bila je jednaka, odnosno primarno difuzna (nuklearna i citoplazmatska) ($P = 0,111$) (**Slika 46A**). S druge strane, kod statistički znatno većeg broja uzoraka raka prostate protein GLI3 je u stromi bio lokaliziran samo u citoplazmi ($P < 0,0001$) (**Slika 46B**).



Slika 46. Usporedba distribucije unutarstanične lokalizacije proteina GLI3. **(A)** Između stranica kontrolnog tkiva prostate (K) i stanica raka prostate (KP) nije utvrđena statistički značajna razlika. **(B)** Između strome kontrolnog tkiva prostate (K) i strome raka prostate (KP) utvrđena je statistički značajna razlika. * označava statistički značajnu razliku $P < 0,05$. c = citoplazma, d = citoplazma i jezgra.

Usporedba distribucije unutarstanične lokalizacije proteina GLI3 između stanica i strome kontrolnih uzoraka pokazala je da značajno veći broj kontrolnih uzoraka u stromi ima samo citoplazmatsko obojenje ($P = 0,042$) (**Slika 47A**). Isto tako, i znatno veći broj uzoraka raka prostate ima u stromi samo citoplazmatsko obojenje ($P < 0,0001$) (**Slika 47B**).



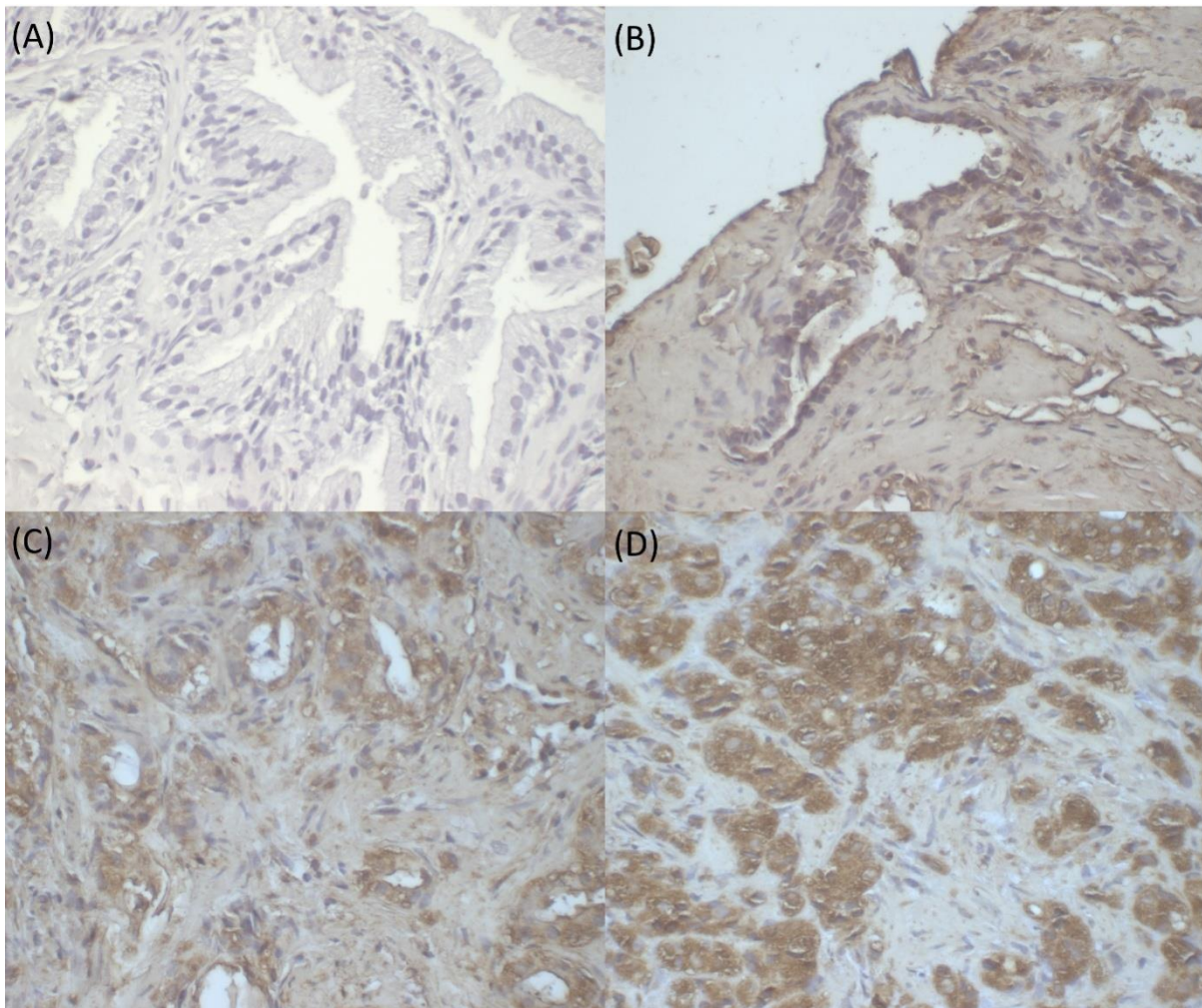
Slika 47. Usporedba distribucije unutarstanične lokalizacije proteina GLI3. **(A)** Između stranica kontrolnog tkiva prostate i strome kontrolnog tkiva. **(B)** Između stanica raka prostate i strome raka prostate. Između skupina utvrđena je statistički značajna razlika. * označava statistički značajnu razliku $P < 0,05$. c = citoplazma, d = citoplazma i jezgra.

4.4. Ekspresija proteina PTCH1 u uzorcima tkiva prostate

Ekspresija proteina PTCH1 određena je imunohistokemijskim bojanjem tkiva prostate. Razina ekspresije je određena posebno u stanicama epitela žlijezda kontrolnog tkiva, odnosno stanica tumora te okolne strome i izražena je pomoću histoskôra. **Tablica 11** pokazuje zbirne rezultate određivanja ekspresije proteina PTCH1. **Slika 48** prikazuje fotografije ogleđnih primjera preparata s različitom jačinom ekspresije proteina PTCH1.

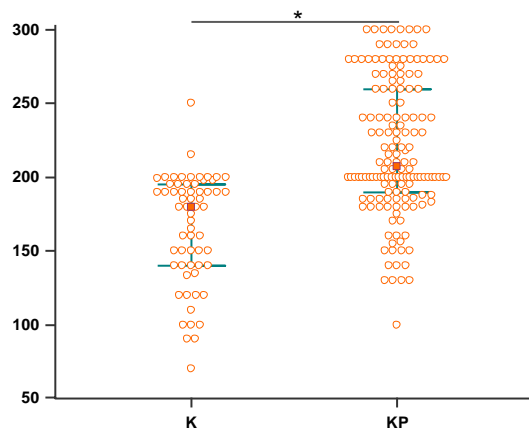
Tablica 11. Ekspresija proteina PTCH1 u uzorcima tkiva prostate. GG = grupa gradusa.

	broj uzoraka	ekspresija u stanicama	ekspresija u stromi
	n	medijan (raspon)	medijan (raspon)
Kontrolni uzorci			
zdrava prostata	31	190 (120-250)	105 (100-180)
prostata s upalom	31	140 (70-200)	110 (50-200)
Uzorci raka prostate			
GGI	29	200 (130-280)	100 (100-150)
GGII	36	230 (100-290)	110 (90-150)
GGIII	28	220 (150-300)	110 (95-200)
GGIV	32	200 (150-300)	145 (100-170)
GGV	29	200 (130-300)	150 (100-200)



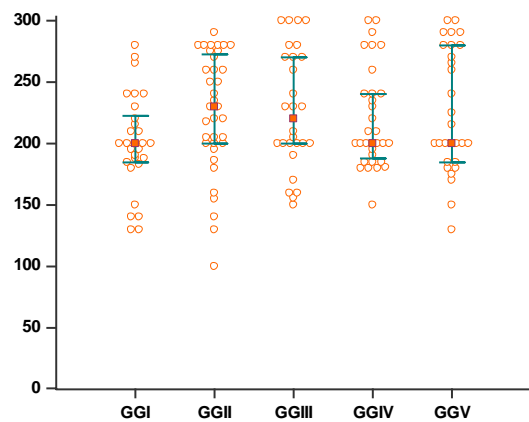
Slika 48. Primjeri preparata s različitim jačinom ekspresije proteina PTCH1. **(A)** Negativna (povećanje 400X). **(B)** Slaba (+) (400X). **(C)** Srednje jaka (++) (400X). **(D)** Jaka (+++) (400X).

Medijan i raspon ekspresije proteina PTCH1 (vrijednost histoskôra) u stanicama kontrolnog tkiva prostate bio je 180 (70-250), a u stanicama raka prostate 207.5 (100-300). Statistička analiza je pokazala da je ekspresija proteina PTCH1 značajno jača u stanicama raka ($P < 0,0001$) (**Slika 49**).



Slika 49. Usporedba razine ekspresije proteina PTCH1 između epitelnih stanica kontrolnog tkiva (K) i stanica raka prostate (KP). Ekspresija proteina PTCH1 značajno je jača u stanicama raka. Označeni su medijan i interkvartilni raspon. * označava statistički značajnu razliku $P < 0,05$.

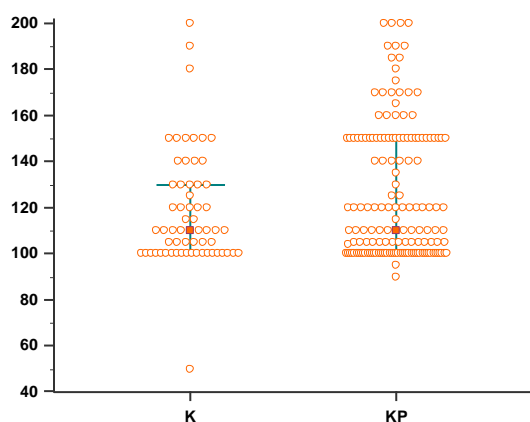
Usporedba ekspresije proteina PTCH1 u stanicama raka prostate između pojedinih grupa gradusa pokazala je da nema statistički značajne razlika ($P = 0,146$) (**Slika 50**).



Slika 50. Usporedba razine ekspresije proteina PTCH1 u stanicama tkiva raka prostate različitih grupa gradusa (GG). Između skupina nije utvrđena statistički značajna razlika. Označeni su medijan i interkvartilni raspon.

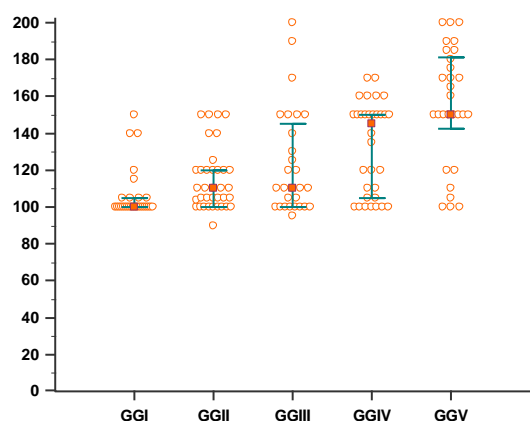
Medijan i raspon ekspresije proteina PTCH1 u stromi tkiva kontrolnih uzoraka bili su 110 (50-200), a u stromi tkiva raka prostate 110 (90-200). Statistička analiza je pokazala da nema

razlike u ekspresiji proteina PTCH1 između strome kontrolnih uzoraka i strome raka prostate ($P = 0,174$) (Slika 51).



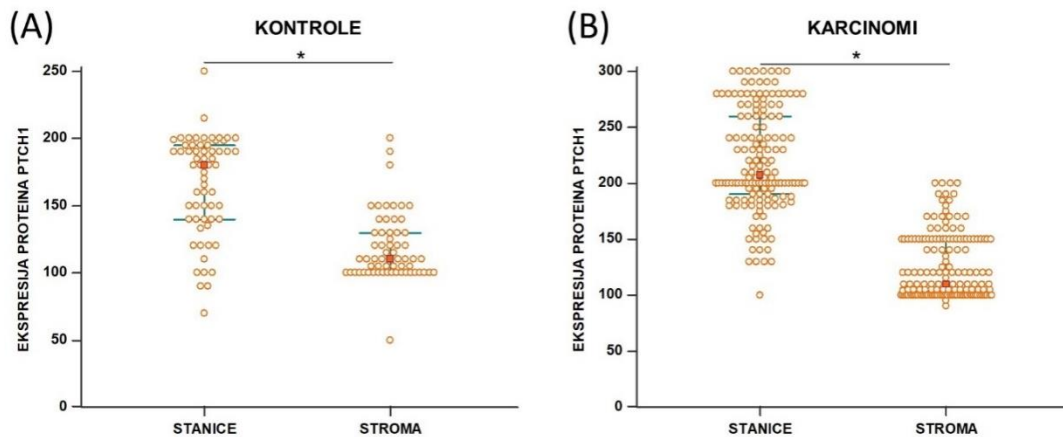
Slika 51. Usporedba razine ekspresije proteina PTCH1 između strome kontrolnog tkiva (K) i strome raka prostate (KP). Između skupina nije utvrđena statistički značajna razlika. Označeni su medijan i interkvartilni raspon.

Međutim, usporedba ekspresije proteina PTCH1 u stromi raka prostate između pojedinih grupa gradusa pokazala je da postoji statistički značajna razlika ($P < 0,000001$), pri čemu ekspresija postepeno raste u višim grupama gradusa (Slika 52).



Slika 52. Usporedba razine ekspresije proteina PTCH1 u stromi tkiva raka prostate različitih grupa gradusa (GG). Između skupina utvrđena je statistički značajna razlika ($P < 0,05$) pri čemu ekspresija postepeno raste u višim GG. Označeni su medijan i interkvartilni raspon.

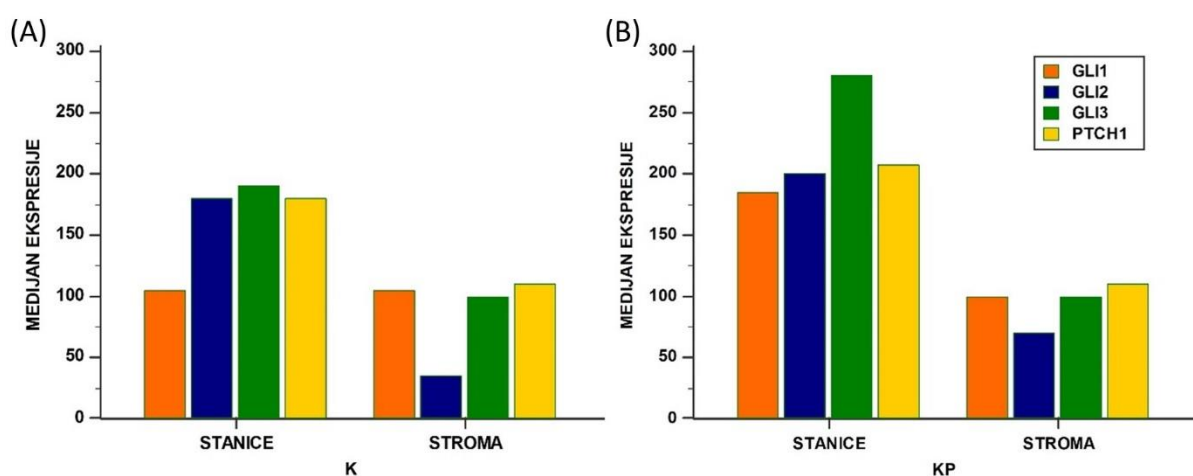
Usporedba razine ekspresije proteina PTCH1 u stanicama žlijezda i strome kontrolnih uzoraka prostate pokazala je da je ekspresija bila znano povišena u stanicama ($P < 0,0001$) (Slika 53A). Isto je primijećeno i u stanicama raka prostate u usporedni s njihovom stromom ($P < 0,0001$) (Slika 53B).



Slika 53. Usporedba razine ekspresije proteina PTCH1. (A) Između stanica žlijezda i strome u kontrolnim uzorcima tkiva. (B) Između stanica raka prostate i okolne strome. Između skupina utvrđena je statistički značajna razlika. Označeni su medijan i interkvartilni raspon. * označava statistički značajnu razliku $P < 0,05$.

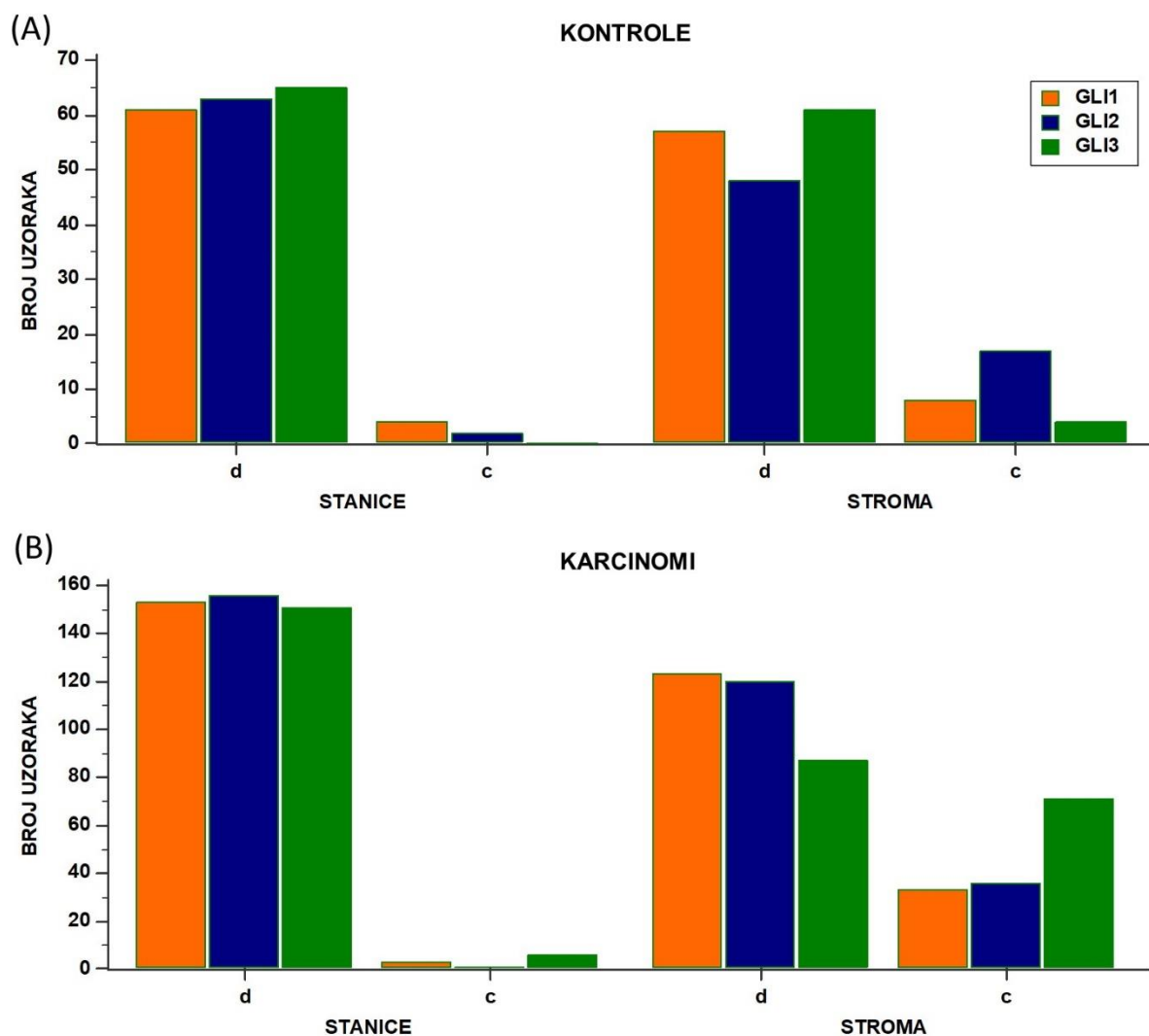
4.5. Zbirni prikaz rezultata određivanja ekspresije i lokalizacije istraživanih proteina

Usporedba medijana ekspresije svih istraživanih proteina pokazala je da je u stanicama i kontrolnih uzoraka i raka prostate najjače bio eksprimiran protein GLI3, a najslabije GLI1 (Slika 54A). Upravo je ekspresija ta dva proteina bila najviše povećana u uzorcima raka prostate u usporedu s kontrolnim uzorcima. U stanicama strome jedino je ekspresija proteina GLI2 bila znatno pojačana u uzorcima raka prostate (Slika 54B).



Slika 54. Globalna usporedba medijana ekspresija istraživanih proteina u stanicama i stromi. (A) U kontrolnom tkivu (K). (B) U tkivu raka prostate (KP).

Zbirni prilaz distribucije lokalizacije proteina GLI1, GLI2 i GLI3 pokazuje da najveći broj analiziranih uzoraka, i kontrolnih i raka prostate, u stanicama pokazuje gotovo isključivo difuzno obojenje (Slika 55A). Što se tiče strome, puno veći broj oba tipa uzoraka pokazuje samo citopazmatsko obojenje, s tim da je u kontrolnim uzorcima najveći pad broja uzoraka s difuznim obojenjem primijećen za protein GLI2, dok je u stromi uzoraka raka prostate najveći pad broja uzoraka s difuznim bojenjem primijećen za protein GLI3 (Slika 55B).



Slika 55. Globalna usporedba distribucije proteinske ekspresije istraživanih proteina u stanicama i stromi. **(A)** U kontrolnom tkivu. **(B)** U tkivu raka prostate. d – difuzno, c – citoplazmatsko.

4.6. Korelacija između ekspresija istraživanih proteina i kliničko-patoloških karakteristika pacijenata

Korelacija između ekspresija svih istraživanih proteina i kliničko-patoloških karakteristika pacijenata čiji uzorci tkiva prostate su korišteni, kao što su dob prilikom postavljanja dijagnoze, inicijalna vrijednost PSA, finalna vrijednost PSA te pripadnost određenoj grupi uzoraka (K1, K2 ili GGI-V), određena je računanjem Spearmanovog koeficijenta korelacije rangova (ρ). Rezultati analize korelacija prikazani su na **Slici 56**.

GLI1 (stroma)	GLI2 (stanice)	GLI2 (stroma)	GLI3 (stanice)	GLI3 (stroma)	PTCH1 (stanice)	PTCH1 (stroma)	dob	PSA inicijalni	PSA finalni*	grupa uzorka		
0.46	0.56	0.27	0.50	0.04	0.44	0.08	0.07	0.10	-0.02	0.24	p	GLI1 (stanice)
<0.0001	<0.0001	0.0001	<0.0001	0.578	<0.0001	0.251	0.302	0.194	0.835	0.0003	p	
	0.15	0.25	0.10	0.28	0.07	0.13	-0.05	-0.15	0.02	-0.11	p	GLI1 (stroma)
	0.028	0.0002	0.140	<0.0001	0.293	0.057	0.449	0.047	0.787	0.100	p	
		0.47	0.58	0.05	0.54	0.19	0.20	0.23	0.13	0.39	p	GLI2 (stanice)
		<0.0001	<0.0001	0.460	<0.0001	0.005	0.003	0.002	0.146	<0.0001	p	
			0.28	0.15	0.21	0.32	0.21	0.18	0.10	0.35	p	GLI2 (stroma)
			<0.0001	0.031	0.002	<0.0001	0.002	0.012	0.248	<0.0001	p	
				0.11	0.64	0.07	0.19	0.27	-0.14	0.44	p	GLI3 (stanice)
				0.114	<0.0001	0.315	0.004	0.0002	0.132	<0.0001	p	
					0.01	0.27	0.04	0.04	0.14	0.06	p	GLI3 (stroma)
					0.879	0.0001	0.561	0.595	0.128	0.418	p	
						0.22	0.18	0.28	0.02	0.41	p	PTCH1 (stanice)
						0.001	0.008	0.0002	0.840	<0.0001	p	
							0.20	0.23	0.30	0.36	p	PTCH1 (stroma)
							0.004	0.002	0.001	<0.0001	p	
								0.30	0.30	0.22	p	dob
								<0.0001	0.001	0.001	p	
								0.10	0.52		p	PSA inicijalni
								0.207	<0.0001		p	
									0.47		p	PSA finalni*
									<0.0001		p	

	pozitivna	negativna
0,00-0,10 – neznatna korelacija		
0,10-0,39 – slaba korelacija		
0,40-0,69 – umjerena korelacija		
0,70-0,89 – jaka korelacija		
0,90-1,00 – vrlo jaka korelacija		

Slika 56. Rezultati analize korelacija između ekspresija istraživanih proteina i kliničko patoloških karakteristika pacijenata. Statistički značajni ($P < 0,05$) Spearmanovi koeficijenti korelacije (p) su obojani prema legendi. * - korelacija je računata samo za uzorke raka prostate, s obzirom da kontrolni pacijenti nisu prolazili terapijske postupke koji bi doveli do snižavanja vrijednosti PSA.

Analiza korelacija je pokazala da je između ekspresije istraživanih proteina i kliničko-patoloških karakteristika pacijenata prisutna uglavnom slaba pozitivna korelacija ($p \leq 0,39$), što generalno ukazuje na to da povećanjem stupnja malignosti tkiva prostate blago raste i ekspresija istraživanih proteina članova signalnog puta HH-Gli. Shodno tome, najznačajnija, odnosno najjača korelacija bila je između grupe uzorka i ekspresije proteina GLI3 te PTCH1 u stanicama. Također se pokazalo da postoji umjerena međusobna korelacija između ekspresija svih istraživanih proteina u stanicama, dok je korelacija između ekspresija u stromi bila slabija. Korelacija između ekspresije istraživanih proteina u stanicama i stromi

bila je umjerena za proteine GLI1 i GLI2 te slaba za protein PTCH1, dok za protein GLI3 nema korelacije između ekspresije u stanicama i stromi. Što se tiče kliničko-patoloških karakteristika pacijenata, bilo je za očekivati da će korelacija između grupe gradusa i inicijalne te finalne vrijednosti PSA biti pozitivna, što je logično te vidljivo i u **Tablici 3**. Bila je prisutna i slaba korelacija između inicijalne vrijednosti PSA i ekspresije proteina GLI2 i PTCH1, i u stanicama i u stromi. S druge strane, jedina slaba, ali statistički značajna negativna korelacija bila je između inicijalne vrijednosti PSA i razine ekspresije proteina GLI1 u stromi.

4.7. Utjecaj kliničko-patoloških osobina te ekspresije i lokalizacije istraživanih proteina na preživljenje pacijenata s rakom prostate

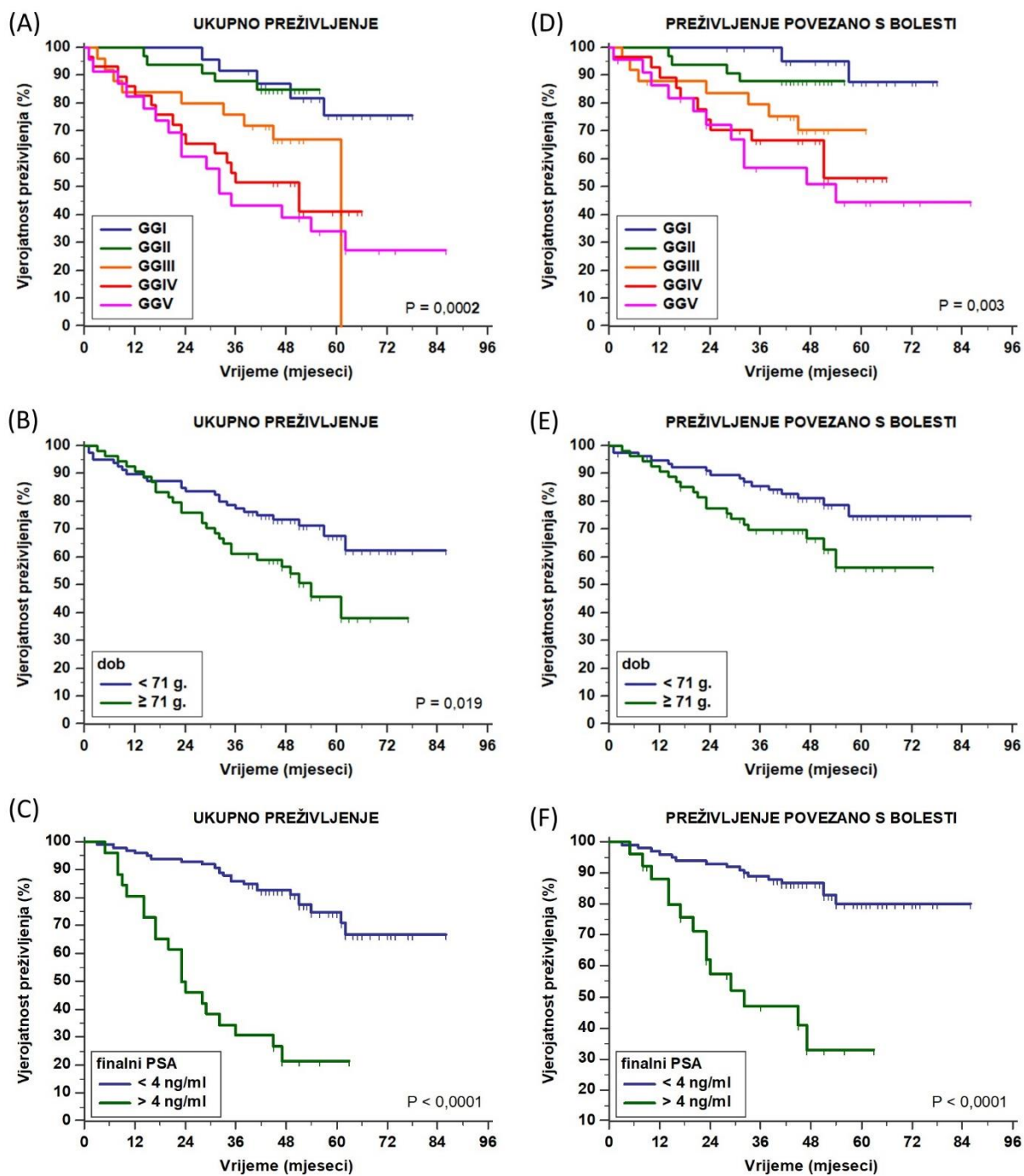
Podaci o preživljenju pacijenata s rakom prostate prikupljeni su iz Registra za rak i Registra uzroka smrti Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo (HZJZ). Podaci su dobiveni za 134 pacijenata. Od njih 134, 51 (58,1%) je preminuo tijekom praćenja, a od tih 51, 35 (68,6%) je preminulo zbog raka prostate (oznaka uzroka smrti C610 prema Desetoj reviziji Međunarodne klasifikacije bolesti i stanja (MKB-10)). Ukupno preživljenje (eng. *overall survival*) izračunato je od datuma postavljanja dijagnoze do datuma smrti od bilo kojeg uzroka, odnosno zadnje provjere, a preživljenje povezano s bolesti (eng. *disease-specific survival*) je izračunato od datuma postavljanja dijagnoze do datuma smrti od raka prostate, odnosno zadnje provjere. Pacijenti su praćeni od travnja 2012. g. do travnja 2020. g. Medijan i raspon trajanja praćenja u mjesecima su bili 46,5 (1 do 86). **Tablica 12** prikazuje zbirne rezultate analize preživljenja.

Tablica 12. Rezultati analize preživljenja prokazuju utjecaj kliničko-patoloških karakteristika te razine ekspresije i lokalizacije istraživanih proteina na ukupno preživljenje pacijenata te preživljenje povezano s karcinom prostate. Statistički značajne P – vrijednosti za log-rank test < 0,05 su označene masnim slovima.

karakteristika	ukupno preživljenje	preživljenje povezano s bolesti
grupa gradusa (GGI-V)	0,0002	0,003
dob (< 71 g., > 71 g.)	0,019	0,041
finalni PSA > 4 ng/ml (da, ne)	< 0,0001	< 0,0001
Terapija (da, ne)		
radikalna prostatektomija	0,005	0,148
radioterapija	0,162	0,403
hormonska terapija	< 0,0001	0,0001
Ekspresija proteina (visoka, niska)		
GLI1 (stanice)	0,812	0,155
GLI1 (stroma)	0,013	0,048
GLI2 (stanice)	0,022	0,022
GLI2 (stroma)	0,456	0,254
GLI3 (stanice)	0,072	0,184
GLI3 (stroma)	0,099	0,264
PTCH1 (stanice)	0,060	0,152
PTCH1 (stroma)	0,018	0,013
Lokalizacija proteina (citoplazmatska, difuzna)		
GLI1 (stanice)	0,213	0,313
GLI1 (stroma)	0,749	0,845

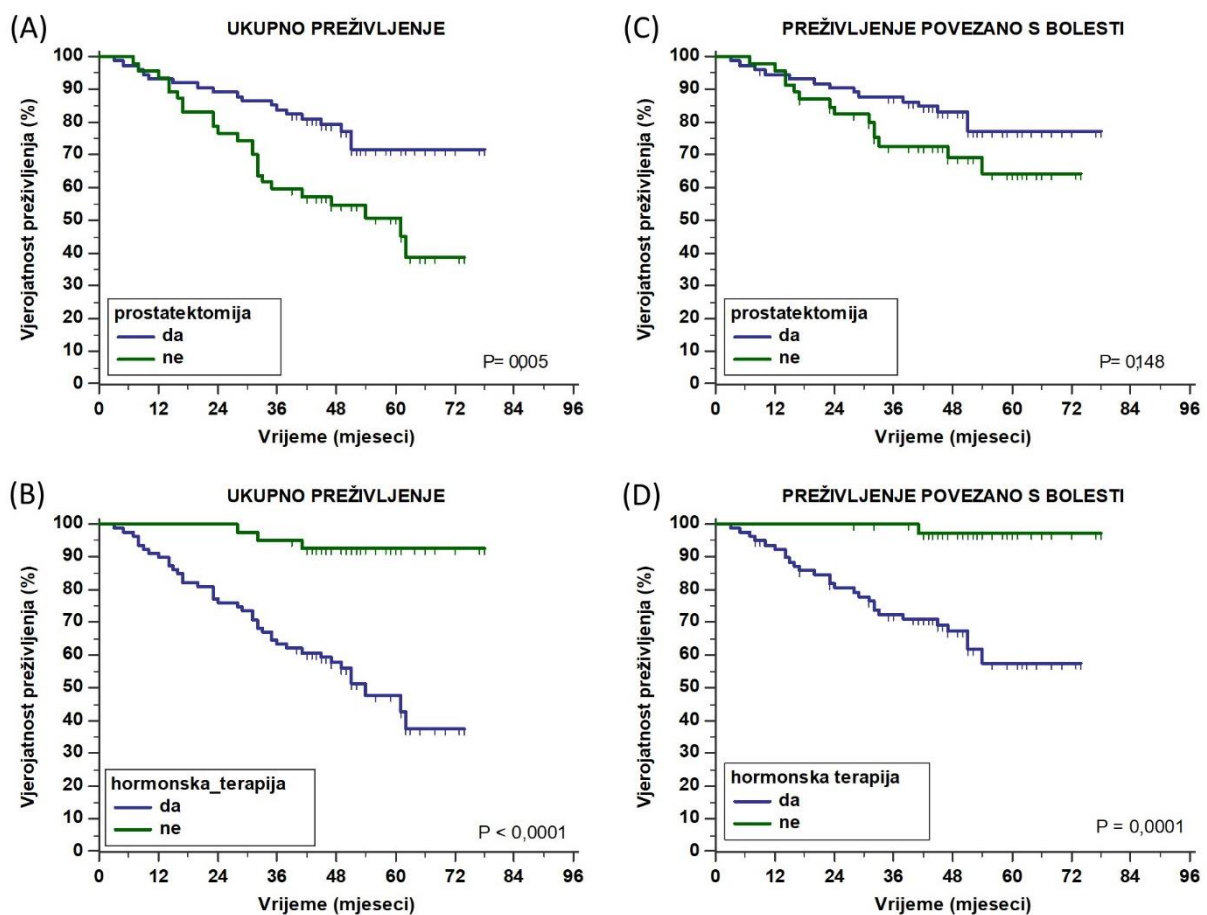
GLI2 (stanice)	0,340	0,174
GLI2 (stroma)	0,308	0,308
GLI3 (stanice)	0,250	0,941
GLI3 (stroma)	0,026	0,026

Što se tiče kliničko-patoloških karakteristika, analiza preživljenja je očekivano pokazala da pripadnost višoj grupi gradusa (GG), starija dob pacijenta te finalna vrijednost PSA > 4 ng/ml imaju negativni utjecaj na ukupno preživljenje pacijenata s rakom prostate (**Slika 57A-C**). Taj se utjecaj direktno može povezati sa samim oboljenjem jer te karakteristike imaju isti negativni učinak i na preživljenje povezano s bolesti (**Slika 57D-F**).



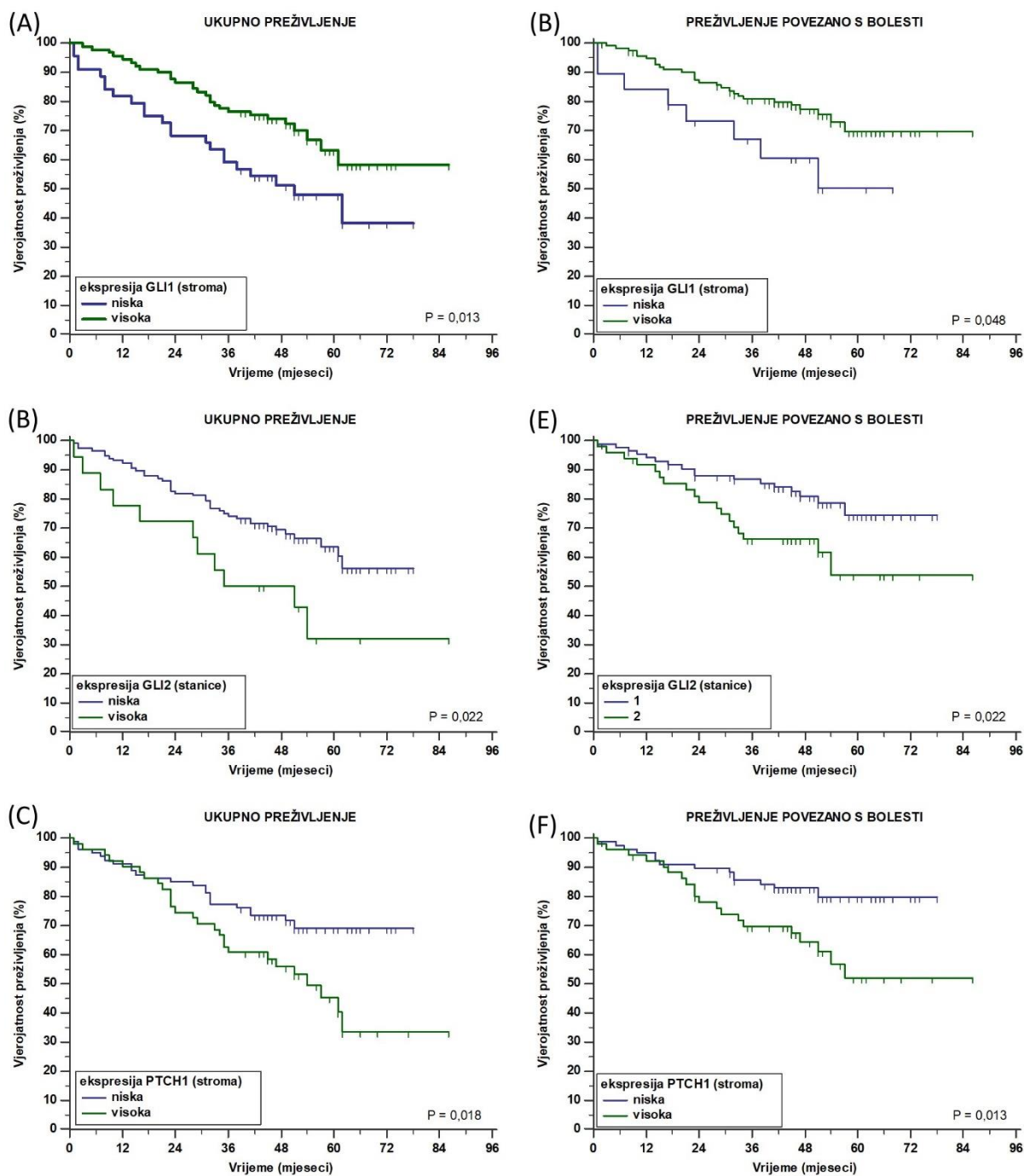
Slika 57. Kliničko-patološke karakteristike sa statistički značajnim utjecajem na preživljenje pacijenata s rakom prostate. Karakteristike koji imaju utjecaj na ukupno preživljenje: **(A)** Pripadnost grupi gradusa (GG). **(B)** Dob iznad 71 g. **(C)** Finalna vrijednost PSA > 4 ng/ml. Karakteristike koje imaju utjecaj na preživljenje povezano s bolesti: **(D)** Pripadnost grupi gradusa (GG). **(E)** Dob iznad 71 g. **(F)** Finalna vrijednost PSA > 4 ng/ml.

Analiza preživljenja je pokazala da od tri najčešća terapijska postupka koji su pacijenti prošli nakon postavljanja dijagnoze jedino radikalna prostatektomija i hormonska terapija imaju statistički značajan učinak na ukupno preživljenje oboljelih od raka prostate. I dok je radikalna prostatektomija imala pozitivan učinak na produljenje ukupnog preživljenja (**Slika 58A**), primanje hormonske terapije bilo je, kontraintuitivno, povezano s kraćim ukupnim preživljenjem (**Slika 58B**). Međutim, čini se da je jedino učinak hormonske terapije doista bio povezan s rakom prostate jer jedino taj tip terapije ima, također negativan, utjecaj na preživljenje povezano s bolesti (**Slika 58C-D**).



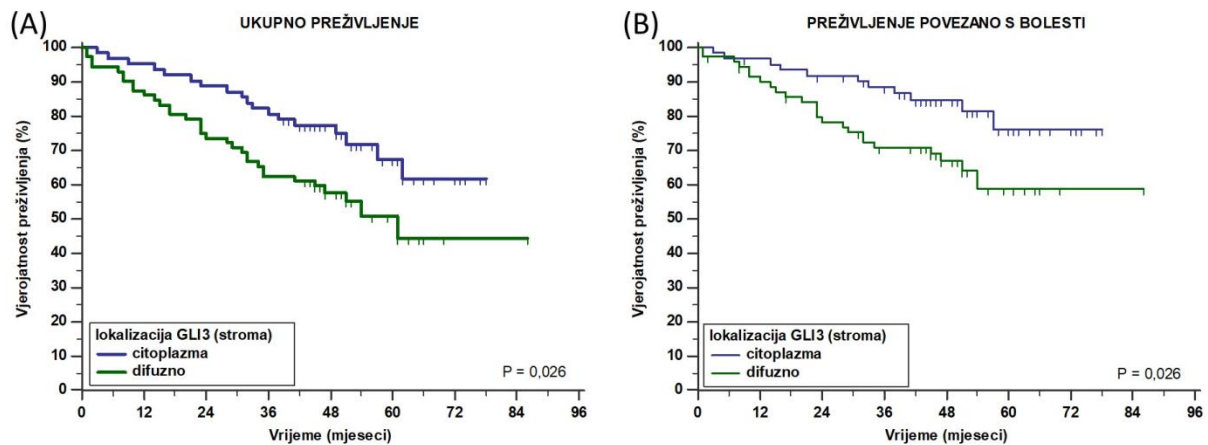
Slika 58. Utjecaj terapijskih postupaka na preživljenje pacijenata s rakom prostate. Utjecaj na ukupno preživljenje: **(A)** Radikalna prostatektomija. **(B)** Hormonska terapija. Utjecaj na preživljenje povezano s bolesti: **(C)** Radikalna prostatektomija. **(D)** Hormonska terapija.

Jedan od glavnih ciljeva ovog istraživanja bilo je otkriti može li se određivanje proteinske ekspresije članova signalnog puta HH-Gli koristiti kao potencijalni prognostički biomarker za predviđanje smrtnosti pacijenata oboljelih od raka prostate. Analiza preživljenja je pokazala da se uglavnom razina ekspresije istraživanih proteina u stromi tkiva raka prostate može povezati s učinkom na preživljenje pacijenata. Tako se pokazalo da bi povišena ekspresija proteina Gli1 u stromi mogla imati protektivni učinak, odnosno biti povezana s višom stopom ukupnog preživljenja (**Slika 59A**). Jedini protein čija je ekspresija u tumorskim stanicama imala učinak na preživljenje bio je Gli2 (**Slika 59B**). Za razliku od proteina Gli1, visoka ekspresija proteina Gli2 imala je negativni učinak na ukupno preživljenje, odnosno bila je povezana s višom stopom smrtnosti pacijenata s rakom prostate. Jednaki negativni učinak imala je i povišena ekspresija proteina Ptch1 u stromi (**Slika 59C**). Čini se da su svi opaženi efekti povezani baš s rakom prostate jer se jednaki učinak ekspresija sva tri navedena proteina opaža i na stopu preživljenja, odnosno smrtnosti povezanog s bolesti (**Slika 59D-F**).



Slika 59. Utjecaj ekspresije istraživanih proteina na preživljenje pacijenata s rakom prostate. Proteini čije ekspresije imaju utjecaj na ukupno preživljenje: **(A)** GLI1 u stromi. **(B)** GLI2 u stanicama. **(C)** PTCH1 u stromi. Proteini čije ekspresije imaju utjecaj na preživljenje povezano s bolesti: **(D)** GLI1 u stromi. **(E)** GLI2 u stanicama. **(F)** PTCH1 u stromi.

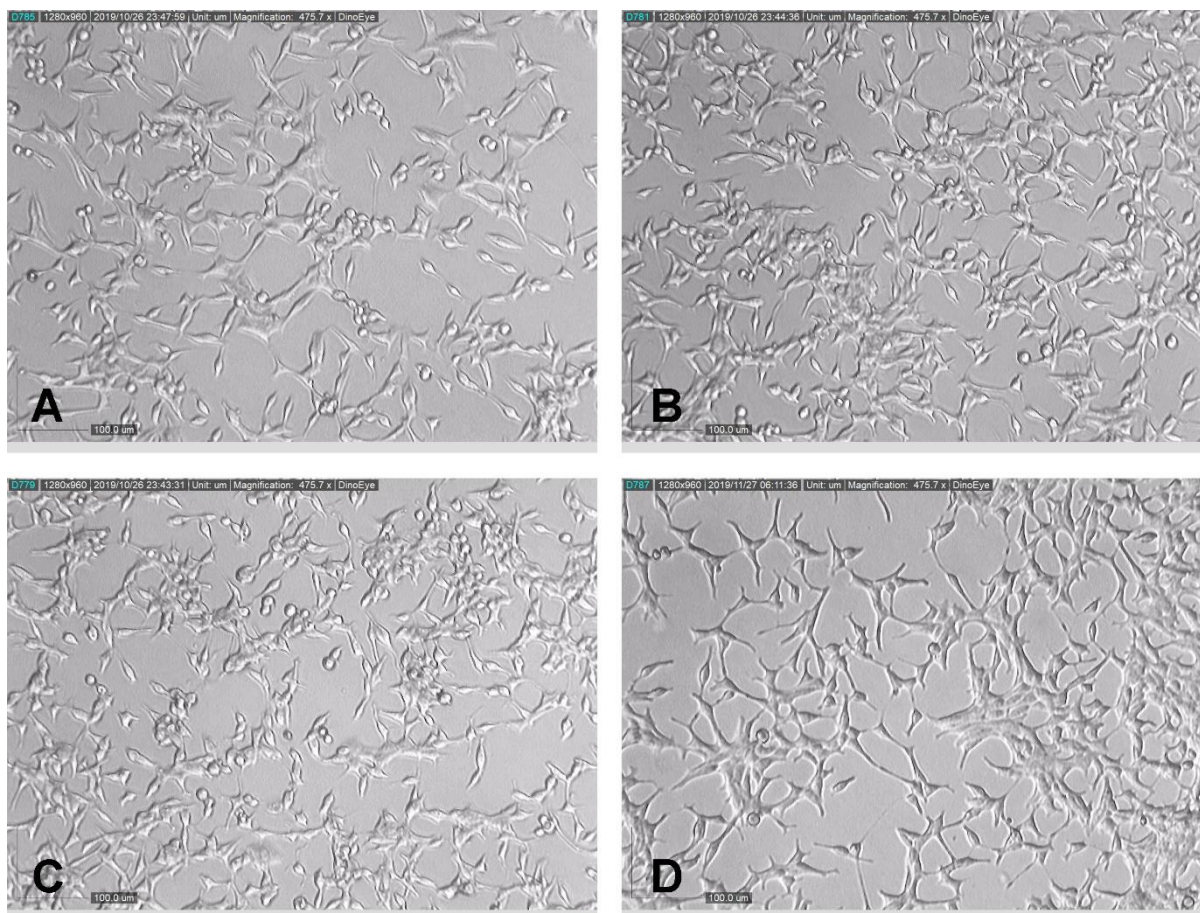
Osim razine ekspresije, pokazalo se da i lokalizacija (ekspresije) proteina ima učinak na preživljenje pacijenata s rakom prostate. Opet se pokazalo da bi procesi u stromi mogli imati značajniji utjecaj od stanica raka. Jedini protein čija je distribucija u lokalizaciji ekspresije u stromi imala učinak na ukupno preživljenje bio je GLI3. Pokazalo se da porast difuzne ekspresije, dakle porast ekspresije u jezgri, u odnosu na samo citoplazmatsku ima negativni učinak, tj. povezan je s kraćim ukupnim preživljenjem pacijenata s rakom prostate (**Slika 60A**). I u ovom slučaju opaženi se efekt može povezati sa samim rakom prostate jer se jednaki, dakle negativni učinak povećanja difuzne, odnosno jezgrene ekspresije u stromi može povezati i sa smanjenom stopom preživljenja povezanog s bolesti (**Slika 60B**).



Slika 60. Utjecaj distribucije lokalizacija istraživanih proteina na preživljenje pacijenata s rakom prostate. Jedini protein čija lokalizacija ima utjecaj na ukupno preživljenje: **(A)** GLI3 u stromi. Jedini protein čija lokalizacija ima utjecaj na preživljenje povezano s bolesti: **(B)** GLI3 u stromi.

4.8. Karakterizacija staničnih linija raka prostate

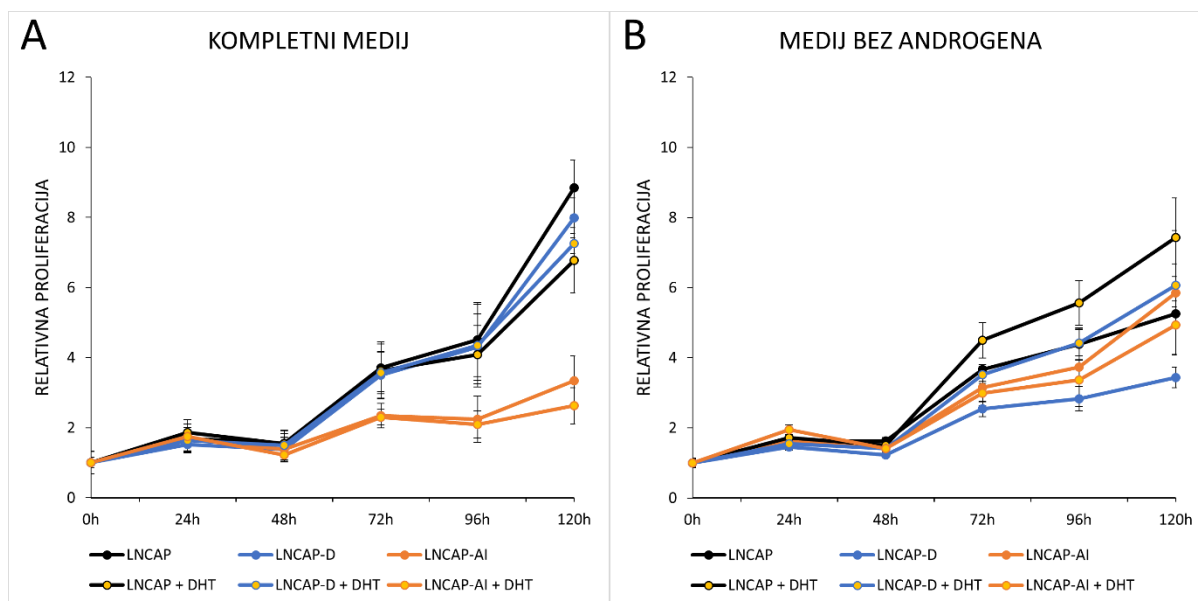
U ovom istraživanju korištena je stanična linija raka prostate ovisna o androgenu LNCaP (**Slika 61A**). Kako bismo što vjernije istražili ulogu signalnog puta HH-Gli u androgen-neovisnom rastu staničnu liniju LNCaP izložili smo uvjetima bez androgena, kratkoročno (5 dana, LNCaP-D, **Slika 61B**) te dugoročno (10 mjeseci, LNCaP-AI, **Slika 61D**) nakon čega su ove stanice postale androgen-neovisne. Same stanice se morfološki mijenjaju uslijed stjecanja sposobnosti androgen-neovisnog rasta, postaju izduženije s izraženijim izdancima (**Slika 61D**). Kako bismo pratili da su učinci kratkoročnog izlaganja stanica uvjetima bez androgena, zaista rezultat nedostatka androgena, kao kontrolu koristili smo stanice u mediju bez androgena s dodatkom sintetskog dihidrotestosterona (LNCaP-D + DHT, **Slika 61C**).



Slika 61. Fotografije stanične linije LNCaP i njenih varijanti nakon uzgoja u različitim uvjetima. (A) Stanice LNCaP divljeg tipa. (B) Stanice LNCaP uzgajane 5 dana u mediju bez androgena (LNCaP-D). (C)

Stanice LNCaP uzgajane 5 dana u mediju bez androgena uz dodatak sintetskog dihidrotestosterona (LNCaP-D + DHT). **(D)** Androgen-neovisne stanice LNCaP, uzgajane >10 mjeseci u mediju bez androgena (LNCaP-AI).

Ako gledamo stanice divljeg tipa, LNCAP, u potpunom mediju stanice uspješno rastu, a dodatak DHT im čak malo smanjuje proliferaciju, ali tek na 120h (**Slika 62A**). Stanice LNCAP-D u potpunom mediju rastu kao da prethodno nisu bile u mediju bez androgena te se ponašaju jednako kao i stanice divljeg tipa. Dodatak DHT u potpunom mediju nema utjecaja niti na stanice LNCAP niti na LNCAP-D, što znači da je signalni put preko androgenog receptora već aktivan i ne može se dodatno stimulirati. Stanice LNCAP-AI u potpunom mediju rastu znatno sporije od LNCAP, a dodatak DHT im ne pomaže kao niti ostalim linijama. U mediju bez androgena stanice LNCAP normalno rastu, ali dodatak DHT ih dodatno stimulira (kompenzira se nedostatak androgena u mediju bez androgena) (**Slika 62B**). Stanice LNCAP-D također rastu, ali slabije jer su prethodno već bile u uvjetima bez androgena 5 dana i sada se već počinje vidjeti efekt nedostatka androgena. Njima dodatak DHT pomaže za oporavak i vraćanje na brzinu rasta divljeg tipa (plava linija sa žutim točkama u odnosu na plavu liniju s plavim točkama). Stanice LNCAP-AI uspješno rastu u mediju bez androgena, ali njihov rast dodatak DHT ne stimulira, što znači da su postale neosjetljive na androgen.



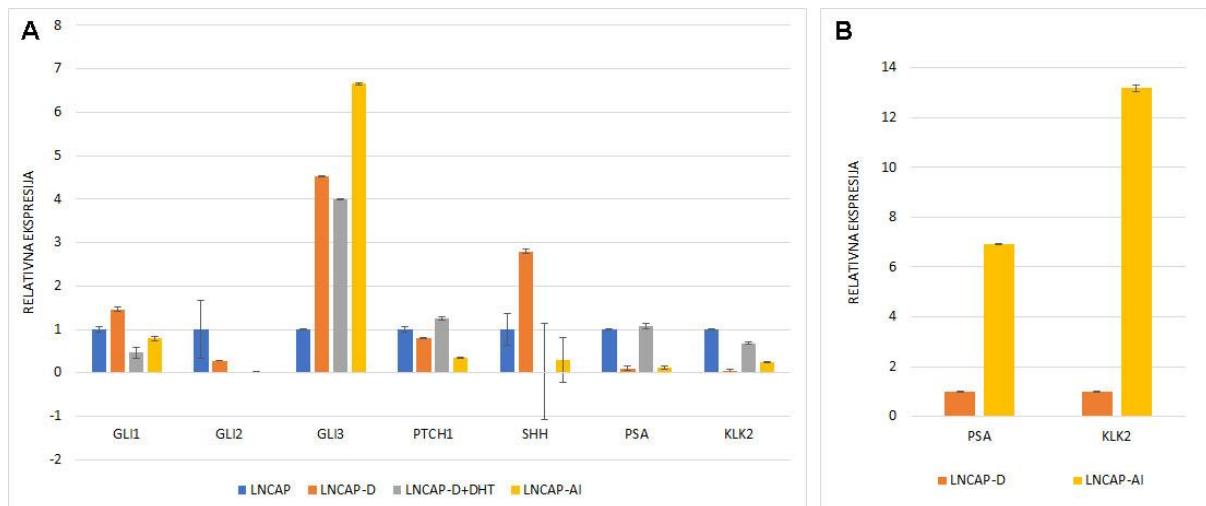
Slika 62. Krivulje rasta stanica LNCaP i njenih varijanti LNCaP-D, LNCaP-D + DHT te LNCaP-AI u tekućoj hranjivoj podlozi s i bez androgena. **(A)** Rast stanica u kompletnom mediju. **(B)** Rast stanica u mediju bez androgena.

4.8.1. Genska ekspresija ključnih komponenti signalnog puta HH-GLI te ciljnih gena signalnog puta AR

U staničnim linijama praćena je ekspresija gena ključnih komponenti signalnog puta HH-GLI: *GLI1*, *GLI2*, *GLI3*, *PTCH1* te *SHH*. S obzirom da su *GLI1* i *PTCH1* direktni ciljni geni signalnog puta, oni predstavljaju markere aktivnosti signalnog puta. Također je praćena i aktivacija signalnog puta AR, preko razine ekspresije ciljnih gena *PSA* i *KLK2*. Može se primijetiti kako je ekspresija komponenti signalnog puta HH-GLI prisutna u stanicama LNCaP te da se ona mijenja ovisno o uvjetima rasta stanica.

Ekspresija gena *GLI1* i *GLI2* je vrlo slaba, dok su *GLI3* i *PTCH1* bolje izraženi. Ekspresija gena *GLI3* raste nakon izlaganja mediju bez androgena, dok se razina *PTCH1* mijenja, odnosno smanjuje, tek nakon stjecanja sposobnosti androgen-neovisnog rasta. Za *SHH* je poznato da je njegova ekspresija smanjena, reprimirana u prisutnosti androgena. To se jasno vidi i u ispitivanim stanicama. Dakle, nakon izlaganja stanica mediju bez androgena raste ekspresija gena *SHH*, dok se ponovnim dodatkom sintetskog androgena razina ekspresije *SHH* smanjuje

(Slika 63A). Ekspresija ciljnih gena AR također se mijenja ovisno o prisutnosti androgena, odnosno u odsustvu androgena ekspresija je smanjena (Slika 63A). Također, treba primijetiti značajno pojačanu ekspresiju ciljnih gena signalnog puta AR u stanicama koje su stekle neovisnost o androgenima u odnosu na stanice kratkoročno izložene mediju bez androgena (Slika 63B), ukazujući na reaktivaciju signalizacije preko AR alternativnim mehanizmima.



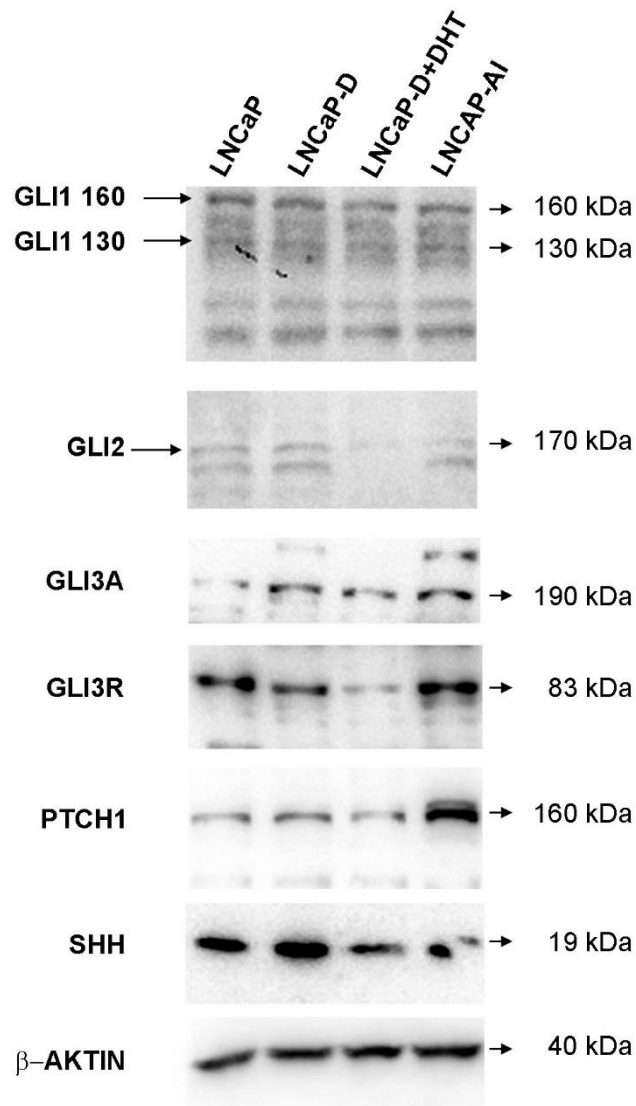
Slika 63. Grafički prikaz razina ekspresije gena. (A) Usporedba razine ekspresije gena signalnog puta HH-Gli i ciljnih gena AR u staničnim linijama LNCaP, LNCaP-D, LNCaP-D + DHT te LNCaP-AI. (B) Usporedba ekspresije ciljnih gena AR u stanicama LNCaP-D te stanicama neovisnim o androgenu LNCaP-AI.

4.8.2. Ekspresija proteina signalnog puta HH-Gli

Stanične linije LNCaP, LNCaP-D, LNCaP-D + DHT i LNCaP-AI analizirane su metodom Western blot na prisutnost proteina signalnog puta HH-Gli. Na proteinskoj razini detektirana je ekspresija ključnih komponenti signalnog puta HH-Gli: GLI1, GLI2, GLI3, PTCH1 te SHH (Slika 64).

Može se primijetiti da je ekspresija transkripcijskih faktora GLI1 i GLI2 vrlo slaba, dok je ekspresija GLI3 jača. Kod proteina GLI1 ekspimirane su dvije izoforme, GLI1 pune duljine od 160 kDa te kraća izoforma od 130 kDa, koja je još slabije ekspimirana. Među staničnim

linijama nisu vidljive razlike u razini ekspresije GLI1. Kod GLI2, iako je slabo eksprimiran, može se primijetiti da se ekspresija smanjuje dodatkom androgena u staničnoj liniji LNCaP-D + DHT. Kod proteina GLI3 može se pratiti ekspresija i aktivatorskog oblika (GLI3A) te represorskog oblika (GLI3R). Ekspresija GLI3A mijenja dinamiku ovisno o staničnoj liniji pa tako ekspresija u odnosu na stanice divljeg tipa (LNCaP) raste u stanicama kratkoročno izloženim uvjetima bez androgena (LNCaP-D), kao i u stanicama neovisnim o androgenu. Dodatak androgena stanicama LNCaP-D ponovno snižava razinu ekspresije GLI3A. Represorski oblik GLI3R najjače je eksprimiran u stanicama divljeg tipa te u stanicama neovisnim o androgenu (LNCaP-AI). U LNCaP-D stanicama dolazi do smanjenog cijepanja proteina GLI3 u odnosu na stanice divljeg tipa, što rezultira jačom ekspresijom GLI3A te smanjenom ekspresijom GLI3R. Dodatak androgena u stanicama LNCaP-D + DHT dovodi do ukupne smanjene ekspresije proteina GLI3 jer je smanjena ekspresije obiju formi. U stanicama LNCaP-AI dolazi do ukupne pojačane ekspresije GLI3, s obzirom na pojačanu ekspresiju obiju izoformi u odnosu na stanice divljeg tipa. Protein PTCH1 također ima različitu dinamiku ekspresije ovisno u uvjetima uzgoja stanica. Na **Slici 64** može se primijetiti kako ekspresija proteina PTCH1 značajno raste u stanicama neovisnim o androgenu LNCaP-AI. Što se tiče proteina SHH, vidi se porast ekspresije u uvjetima uzgoja bez androgena, kod stanica LNCaP-D te smanjenje ekspresije nakon dodatka androgena u stanicama LNCaP-D + DHT, što odgovara poznatoj činjenici da je ekspresija gena *SHH* utišana androgenom.



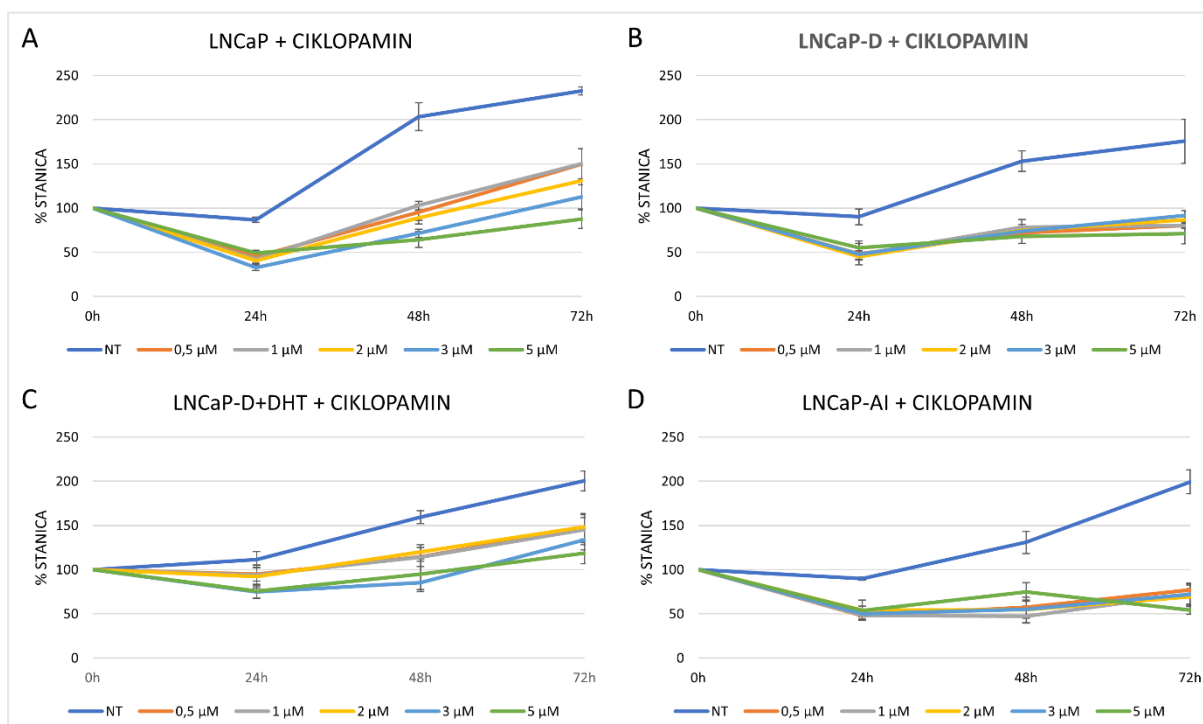
Slika 64. Proteinska ekspresija komponenti signalnog puta HH-Gli u staničnim linijama LNCaP, LNCaP-D, LNCaP-D + DHT te LNCaP-AI. Prikazana je i ekspresija proteina β -aktina koji služi kao kontrola nanošenja.

4.9. Inhibicija signalnog puta HH-Gli specifičnim inhibitorima

4.9.1. Utjecaj inhibicije signalnog puta HH-Gli na proliferaciju stanica

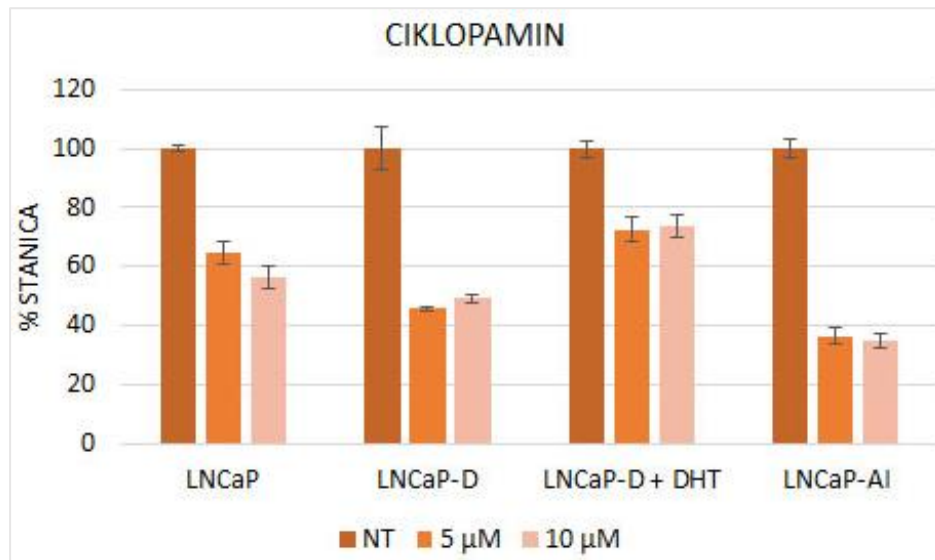
4.9.1.1. Inhibicija ciklopaminom

Za uzvodnu inhibiciju signalnog puta na razini koreceptora SMO koristi se spoj ciklopamin. Sve linije tretirane su nizom koncentracija ciklopamina kroz 72 sata nakon čega je praćena njihova proliferacija testom MTT. Pokazano je da ciklopamin usporava proliferaciju svih staničnih linija i to ovisno o dozi (Slika 65). Najizraženiji učinak je zabilježen kod staničnih linija uzgajanim u mediju bez androgena (LNCaP-D i LNCaP-AI (Slika 65B i D).



Slika 65. Krivulje rasta staničnih linija u prisutnosti ciklopamina. (A) LNCaP. (B) LNCaP-D. (C) LNCaP-D + DHT. (D) LNCaP-AI. Na apscisama je prikazano vrijeme u satima, a na ordinati postotak rasta stanica.

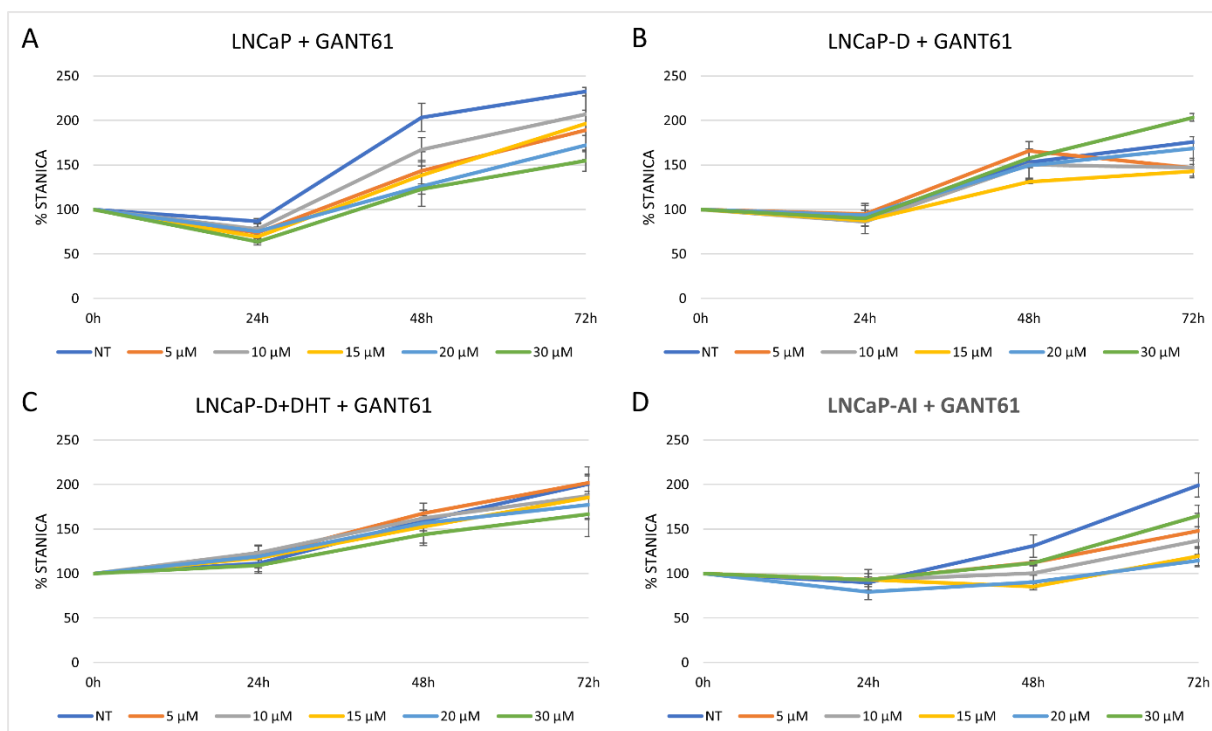
Isti rezultati mogu se prikazati na način da se vidi smanjenje broja stanica kroz vrijeme (**Slika 66**), gdje je također jasno vidljivo da ciklopamin smanjuje proliferaciju stanica. Najučinkovitiji je u stanicama LNCaP-AI u LNCaP-D (**Slika 66**).



Slika 66. Utjecaj rastućih koncentracija ciklopamina na proliferaciju staničnih linija. Na apscisi su prikazane stanične linije dok je na ordinati izražen postotak rasta stanica.

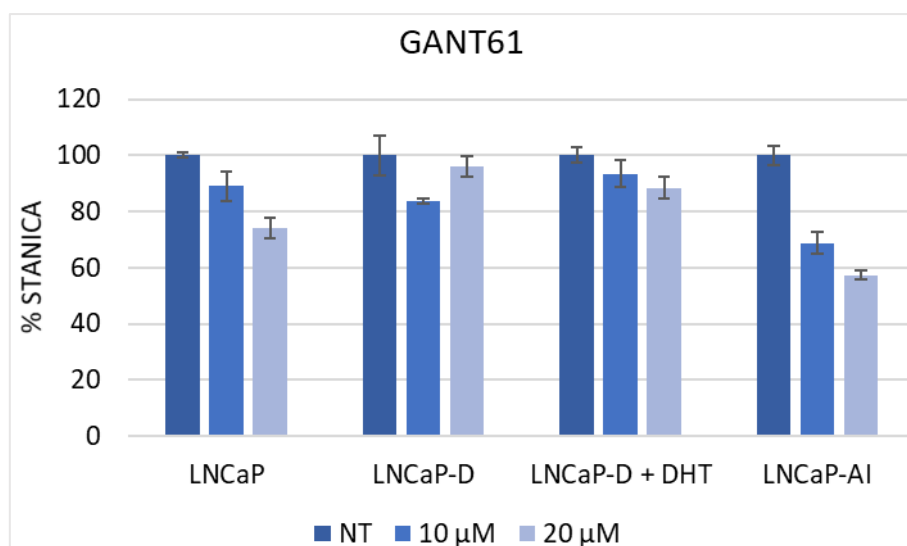
4.9.1.2. Inhibicija spojem GANT61

GANT61 je specifični inhibitor proteina GLI1 i GLI2, koji sprječava njihovo vezanje za DNA te na taj način onemogućuje njihovu funkciju transkripcijskih faktora (Agyeman i sur. 2014). Kao i kod ciklopamina, stanice su tretirane nizom koncentracija spoja GANT61 kroz 72 sata nakon čega je praćena njihova proliferacija testom MTT. Ova analiza pokazala je da GANT61 ima mnogo slabiji učinak na proliferaciju stanica u usporedbi s ciklopaminom (**Slika 67 i 65**).



Slika 67. Krivulje rasta staničnih linija u prisutnosti inhibitora GANT61. **(A)** LNCaP **(B)** LNCaP-D **(C)** LNCaP-D + DHT. **(D)** LNCaP-AI. Na apscisama je prikazano vrijeme u satima, a na ordinati postotak rasta stanica.

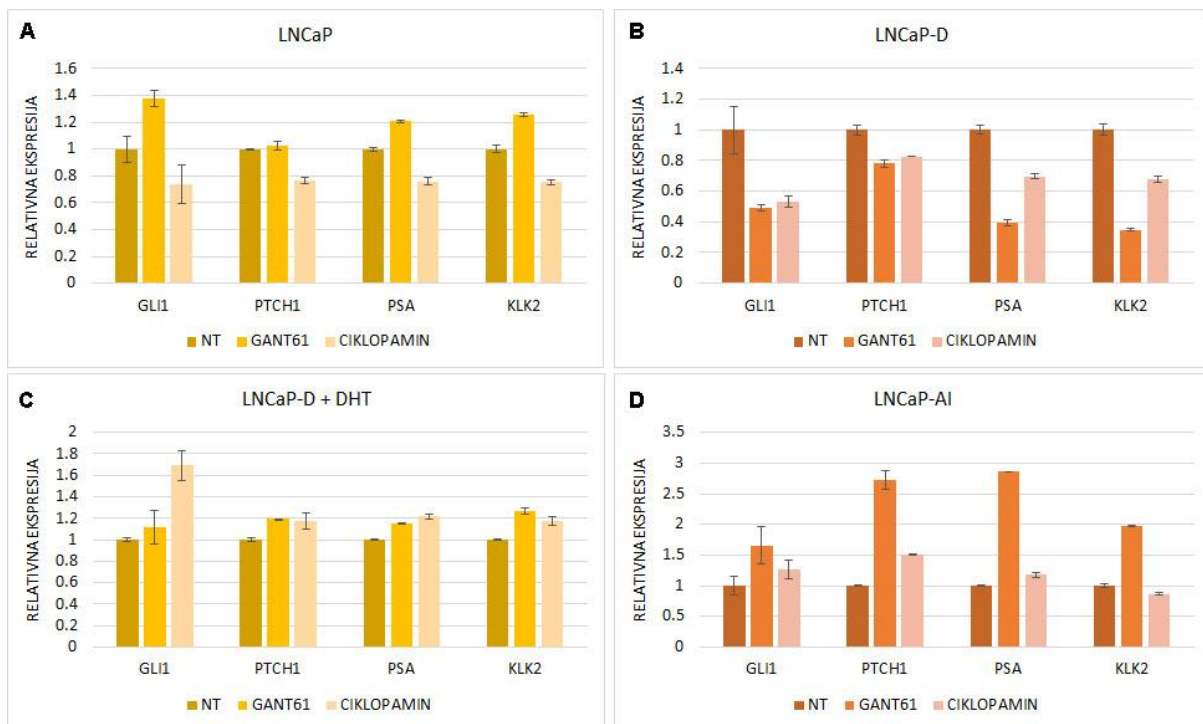
Na **Slici 68** vidljivo je da GANT61 ima minimalan ili nikakav učinak na proliferaciju stanica LNCaP, LNCaP-D i LNCaP-D + DHT, dok nešto izraženiji inhibički učinak ima na proliferaciju LNCaP-AI stanica.



Slika 68. Utjecaj rastućih koncentracija inhibitora GANT61 na proliferaciju staničnih linija. Na apscisi su prikazane stanične linije dok je na ordinati izražen postotak rasta stanica.

4.9.2. Utjecaj inhibitora signalnog puta HH-GLI na njegovu aktivnost te aktivnost signalnog puta AR

Aktivnost signalnog puta HH-GLI praćena je razinom ekspresije njegovih ciljnih gena *GLI1* i *PTCH1*, dok je aktivnost signalnog puta AR praćena razinom ekspresije ciljnih gena *PSA* i *KLK2*. Na **Slici 69** može se vidjeti kako u staničnim linijama LNCaP, LNCaP-D + DHT te LNCaP-AI ni ciklopamin ni GANT61 nemaju inhibitorni učinak na aktivnost signalnog puta HH-GLI. Jedino u staničnoj liniji LNCaP-D nakon oba tretmana dolazi do inhibicije signalnih puteva HH-GLI i AR (**Slika 69B**). S obzirom da inhibitori signalnog puta nemaju inhibitoran učinak na aktivnost puta, osim u staničnoj liniji LNCaP-D, učinci viđeni na proliferaciju stanica u prethodnom poglavlju mogu se pripisati ili nespecifičnim djelovanjima ovih inhibitora ili potencijalnom blokadom nekanonskih ogranaka signalnog puta HH-GLI.

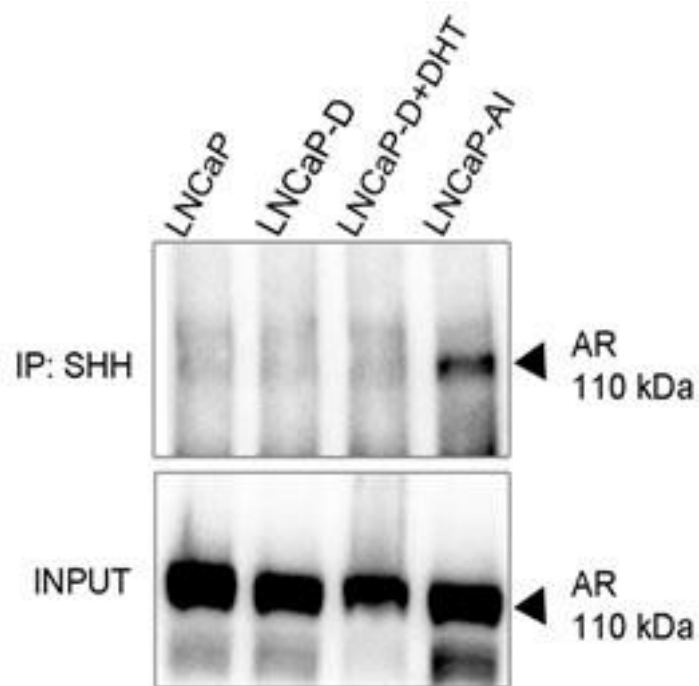


Slika 69. Ekspresija ciljnih gena signalnog puta HH-GLI u staničnim linijama. **(A)** U staničnoj liniji LNCaP inhibitori ciklopamin i GANT61 nemaju inhibitoran učinak na aktivnost signalnih puteva HH-GLI i AR. **(B)** U staničnoj liniji LNCaP-D pod utjecajem ciklopamina i GANT61 dolazi do inhibicije signalnog puta HH-GLI, ali i signalnog puta AR. **(C)** U staničnoj liniji LNCaP-D + DHT inhibitori ciklopamin i GANT61 nemaju inhibitoran učinak na aktivnost signalnih puteva HH-GLI i AR. **(D)** U staničnoj liniji LNCaP-AI inhibitori ciklopamin i GANT61 nemaju inhibitoran učinak na aktivnost signalnih puteva HH-GLI i AR.

4.10. Interakcija signalnih puteva HH-GLI i AR

S obzirom da inhibicija signalnog puta HH-GLI specifičnim inhibitorima na različitim razinama signalne kaskade nije rezultirala inhibicijom aktivnosti signalnog puta u stanicama raka prostate ovisnim o androgen LNCaP niti u stanicama neovisnim o androgen LNCaP-AI postavljeno je pitanje postoji li možda interakcija signalnog puta AR i uzvodnog dijela signalnog puta HH-GLI. Točnije, s obzirom da je aktivni protein SHH modificiran molekulom kolesterola nameće se pitanje može li SHH zamijeniti androgen i aktivirati androgeni receptor, s obzirom da androgen nastaje biosintezom iz kolesterola. Metodom koimunoprecipitacije ispitana je mogućnost fizičkog vezanja proteina SHH i androgenog

receptora. Rezultati su pokazali da dolazi do interakcije ova dva proteina, ali samo u stanicama neovisnim o androgenu LNCaP-AI (**Slika 70**). Aktivacija androgenog receptora putem SHH mogao bi predstavljati novi mehanizam njegove aktivacije te stjecanja neovisnosti o androgenu.



Slika 70. Ko-immunoprecipitacija proteina SHH i AR. Do fizičke interakcije dvaju proteina dolazi u stanicama neovisnim o androgenu LNCaP-AI. Input označava bazalne količine proteina AR u svakoj liniji te se vidi da su one izjednačene u svim staničnim linijama.

5. RASPRAVA

Signalni put Hedgehog-Gli je evolucijski konzerviran put prijenosa signala od stanične membrane do jezgre. Njegova glavna aktivnost je tijekom embrionalnog razvoja pa tako ima važnu ulogu i u razvoju prostate (Bushman 2016). Signalni put HH-Gli je u odraslom organizmu uglavnom neaktivan, iako je mogućnost aktivacije zadržana u matičnim i progenitorskim stanicama. Tako je na primjer povezan sa stromalnim matičnim stanicama prostate, gdje je ključan za repopulaciju i regeneraciju tih stanica nakon involucije izazvane kastracijom (Peng i sur. 2013). Mnoge komponente signalnog puta HH-Gli su također proto onkogeni i tumorski supresori te je aberantna aktivnost tog signalnog puta povezana s razvojem mnogih tipova raka kao što je i rak prostate (Gonnissen i sur. 2013). U ovom radu istražili smo, koristeći kliničke uzorke tkiva, razinu aktivnosti signalnog puta Hedgehog-Gli u svrhu otkrivanja novih prognostičkih biomarkera. Kako je rak prostate usko povezan s aktivnosti androgenog receptora (Tan i sur. 2015), na staničnom nivou smo istražili interakciju signalnog puta HH-Gli s AR te ulogu te interakcije u održavanju rasta stanica raka prostate neovisnog o androgenima, što bi moglo otvoriti put razvoju novih terapija.

Glavni cilj ove doktorske disertacije bio je povezati aktivnost signalnog puta HH-Gli s raznim stadijima tumora prostate uzimajući u obzir interakciju s androgenim receptorom. Naime, istraživanja interakcija signalnog puta Hedgehog-Gli i estrogenog receptora kod tumora dojke pokazala su nove potencijalne terapijske protokole (Sabol i sur. 2014).

5.1. Aktivnost signalnog puta HH-Gli u raku prostate

U ovom opsežnom istraživanju koristili smo kliničke uzorke raka prostate (159 uzoraka) te kontrolne uzorke zdrave prostate i prostate s upalom (65 uzoraka). Uzorke raka prostate podijelili smo u skupine (grupe gradusa) na osnovu Gleasonovog zbroja (**poglavlje 1.2.6.6.**) te je u svakoj skupini bilo minimalno 30 uzoraka. Rezultati prvog dijela istraživanja prikazani su **poglavljima 4.1. do 4.7.** te na **slikama 24 do 60.** Imunohistokemijsko bojanje tkivnih preparata zdrave prostate i prostate s upalom te uzoraka primarnog raka prostate različite grupe gradusa pokazalo je da je signalni put HH-Gli aktivan i u kontrolnim uzorcima i u uzorcima raka prostate. Međutim, sva tri transkripcijska faktora Gli – Gli1, Gli2 i Gli3, koji

su glavni efektori signalnog puta HH-GLI, kao i receptor PTCH1, koji je također često korišteni marker aktivnosti tog signalnog puta, bili su u usporedbi s kontrolnim tkivom statistički značajno snažnije eksprimirani u tkivu raka prostate. Dosad je nekoliko studija pokazalo pojačanu ekspresiju komponenti signalnog puta HH-GLI koje smo i mi istraživali u kliničkim uzorcima raka prostate. Tako su naši rezultati u skladu s rezultatima Tzelepi i suradnika (2011), a jednake rezultate pojačane ekspresije proteina PTCH1 i transkripcijskih faktora GLI u prostatektomiranim uzorcima lokaliziranog raka prostate dobili su i Kim i suradnici (2011). S druge strane, naši rezultati samo se djelomično poklapaju s rezultatima dvije novije studije iste grupe autora. Gonnisen i suradnici su istraživali povezanost signalnog puta HH-GLI s pojavom tzv. biokemijskog recidiva, odnosno serumskog PSA $\geq 0,2$ ng/ml kod prostatektomiranih pacijenata s rakom prostate visokog rizika (Gleasonov zbroj > 7) te su primijetili da je ekspresija samo proteina GLI1 značajno jača u uzorcima raka prostate, dok su GLI2 i PTCH1 bili statistički značajno sniženi u tumorskim uzorcima (Gonnisen i sur. 2018). Čisto suprotno od svih dosadašnjih rezultata pokazala je ranija studija Gonnissen i suradnika (2017). Oni su istraživali prognostički značaj signalnog puta HH-GLI kod pacijenata s rakom prostate srednjeg rizika (Gleasonov zbroj = 7) te pokazali da je ekspresija sva četiri proteina bila jača u uzorcima zdrave prostate (Gonnissen i sur. 2017). Međutim, potencijalni problem u (ne)usporedivosti naših i rezultata te studije je u njihovom načinu dihotomizacije vrijednosti proteinske ekspresije, pri čemu je histoskôr od 1,5 (što bi bilo 150 u našem slučaju) korišten kao granica između „niske“ („slabe“) i „visoke“ („jake“) ekspresije. Ta vrijednost je u načelu previše artificijelna i ne pokazuje stvarnu srednju ili medijalnu razinu ekspresije. Korištenje te granične vrijednosti s našim rezultatima dalo je najlošije rezultate statističke analize (podaci nisu prikazani). Iako dihotomizacija ili binarizacija kontinuiranih varijabli često pomaže u interpretaciji rezultata biomedicinskih istraživanja, ona je sa strane statističke analize problematična jer dovodi do gubitka velike količine informacija iz podataka te se sugerira njeno izbjegavanje (Dawson i Weiss 2012). Neovisno o broju proteina članova signalnog puta HH-GLI čija se pojačana ili snižena ekspresija preklapa s našim rezultatima, autori svih dosad objavljenih studija slažu se u tome da imunohistokemijsko bojanje uzoraka tkiva raka prostate pokazuje pojačanu razinu aktivnost signalnog puta HH-GLI u tom tipu raka (Gonnissen i sur. 2013). Vrlo interesantan literaturni podatak je rezultat studije Fan i suradnika koji pokazuje da nije bilo statistički

značajne razlike u razinama genske (mRNA) ekspresije članova signalnog puta HH-GLI između različitih tipova tkiva prostate (Fan i sur. 2004). To se tumači mogućnošću da je RNA bila izolirana iz mješavine tkiva žljezdanog epitela i okolne strome, što ukazuje na to da je imunohistokemijsko određivanje razine proteinske ekspresije pogodnije za ovaj tip istraživanja (Chen i sur. 2011a).

U našem istraživanju ekspresija sva četiri istraživana proteina bila je u tumorskim stanicama statistički značajno jača nego u okolnoj tumorskoj stromi. Većina autora dosad objavljenih studija slaže se da pojačana razina ekspresije komponenti signalnog puta u stanicama tumora u odnosu na okolnu stromu ukazuje na moguću važnost autokrinog načina prijenosa signala signalnim putem HH-GLI u raku prostate (Karhadkar i sur. 2004, Tzelepi i sur. 2011, Gonnissen i sur. 2017, Gonnissen i sur. 2017), što je u skladu i s našim rezultatima (**Slika 54**). S druge strane, neki autori predlažu parakrini model prijenosa signala u raku prostate (Bailey i sur. 2008, Yauch i sur. 2009), što je prvotno bilo pokazano na mišjem modelu raka prostate (Fan i sur. 2004). Parakrina signalizacija regulira morfogenezu i proliferaciju stanica prostate tijekom njenog embrionalnog razvoja, što dodatno ukazuje na važnost tog načina prijenosa signala u kontekstu prostate (Bushman 2016). Također je poznato da jedan način signalizacije ne isključuje drugi te da više različitih modaliteta prijenosa signala može biti prisutno u istom tipu tumora (Scales i de Sauvage, 2009). S obzirom na to da su u uzorcima raka prostate do sada jedino u genu *SUFU* pronađene mutacije koje dovode do njegove inaktivacije, generalno se smatra da je mehanizam aktivacije signalnog puta HH-GLI u raku prostate ovisan o ligandu (Sheng i sur. 2004, Datta i Datta 2006). Međutim, za bolje razumijevanje samih mehanizama prijenosa signala signalnim putem HH-GLI u raku prostate svakako je bilo potrebno odrediti ekspresiju i lokalizaciju glavnog liganda SHH, što u ovom istraživanju nije učinjeno zbog limitiranog broja dostupnih prereza kliničkih uzoraka tkiva prostate.

U **poglavlju 1.1.2.** opisani su mehanizmi translokacije transkripcijskih faktora GLI iz citoplazme u jezgru, odnosno njihovo procesiranje iz aktivatorske u represorsku formu. Naša korištena antitijela prepoznaju i aktivatorsku (cijeli proteini) i represorsku formu (skraćeni proteini) transkripcijskih faktora GLI pa imunohistokemijskim bojanjem tkivnih preparata nije moguće razlikovati te dvije forme proteina GLI. Zbog toga je za razumijevanje stupnja aktivnosti i načina aktivacije signalnog puta HH-GLI u nekom tipu tumora, uz određivanje

razine ekspresije, bitno odrediti i subcelularnu lokalizaciju članova signalnog puta (Sabol i sur. 2018). Shodno tome, pojačana nuklearna lokalizacija, odnosno pojačano bojanje u jezgri ukazuje na aktivne forme transkripcijskih faktora GLI (Niewiadomski i sur. 2019). U našem istraživanju, u stanicama i kontrolnih uzoraka i uzoraka raka prostate, lokalizacija proteina GLI1, GLI2 i GLI3 bila je primarno difuzna, što uz citoplazmatsku uključuje i nuklearnu lokalizaciju koja ukazuje na to da su u tim dijelovima tkiva prisutne aktivne forme tih transkripcijskih faktora (**Slika 55**). S druge strane, puno veći broj uzoraka čija stroma i inače pokazuje niže razine ekspresija istraživanih proteina, pokazuje samo citoplazmatsko obojenje, dakle veću količinu inaktivnih formi navedenih proteina.

Naša korelacijska analiza je pokazala da je ekspresija gotovo svih istraživanih proteina ili slabo ili umjereno, ali svejedno statistički značajno, povezana s grupom gradusa, odnosno stadijem malignosti raka prostate (**Slika 56**). Ti su rezultati u skladu s generalno prihvaćenim stavom da je pojačana aktivnost signalnog puta HH-GLI pokazatelj uznapredovanog stadija raka prostate (Gonnissen i sur. 2013, Gonnissen i sur. 2018). Korelacijska analiza također je pokazala da je pozitivna korelacija između pojedinih istraživanih članova signalnog puta znatno jača u stanicama nego u stromi, što bi moglo dodatno ukazivati na autokrini model prijenosa signala.

5.2. Prognoistički značaj signalnog puta HH-GLI kod pacijenata oboljelih od raka prostate

Incidencija raka prostate raste s dobi, a prosječna dob oboljelih je 66 godina (Rawla 2019). Prosječna dob naših pacijenata bila je 68,67 godina. Iako se općenito smatra da dob oboljenja nema toliko značajan utjecaj na preživljenje kao kod nekih drugih tipova raka, muškarci koji obole prije 49. ili nakon 80. godine imaju najnižu stopu desetogodišnjeg preživljenja (Siegel i sur. 2020). Naše istraživanje je pokazalo da je dob oboljenja prije 71. godine života pozitivan prognoistički marker, odnosno da ti pacijenti pokazuju veću stopu preživljenja. Rak prostate najčešće napreduje polako i preživljenje je veće ukoliko se radi samo o lokaliziranom tumoru. Veliki broj slučajeva tumora prostate ne napreduje dalje od stadija T1 pa se zbog toga za ovaj stadij bira najčešće samo aktivno praćenje. Desetogodišnje preživljenje pacijenata u stadiju T1 je 80% i 95% (Lopez-Beltran i sur. 2005), dok je

desetogodišnje preživljenje kod bolesnika s udaljenim metastazama samo oko 10% (Crook i sur. 2009). Gleasonova grupa gradusa i inicijalna vrijednost PSA i dalje su jedni od najboljih prognostičkih biomarkera za rak prostate (Buhmeida i sur. 2006). I naše istraživanje je pokazalo da je kraće preživljenje pacijenata s rakom prostate povezano s višom grupom gradusa, što je vidljivo na krivuljama preživljenja na **Slici 57**. Također smo pokazali i da je finalna vrijednost PSA > 4 ng/ml, što potencijalno ukazuje na nedjelotvornost primijenjene terapije, pokazatelj kraćeg preživljenja pacijenata. Kod lokalno ograničenih tumora prostate najučinkovitija je radikalna prostatektomija. To je vidljivo i iz naše analize preživljenja jer pacijenti koji su bili podvrgnuti tom operativnom zahvatu imaju veću vjerojatnost preživljenja (**Slika 58**). Interesantan, iako na prvi pogled dosta kontraintuitivan rezultat našeg istraživanja je da pacijenti koji NISU primali hormonsku terapiju pokazuju vjerojatnost preživljenja iznad 90%! Najlogičnije objašnjenje tog fenomena proizlazi iz činjenice da je u svakoj višoj grupi gradusa sve veći postotak naših pacijenata bio podvrgnut hormonskoj terapiji (podaci nisu prikazani), čime se opet vraćamo na to da je svaka viša Gleasonova grupa gradusa vrlo pouzdani prognostički marker sve kraćeg preživljenja, kao i na to da uznapredovani stadiji raka prostate sve slabije odgovaraju na hormonsku terapiju, odnosno postaju rezistentni (Tan i sur. 2015).

Što se tiče utjecaja razine aktivnosti signalnog puta HH-GLI na ukupno preživljenje pacijenata s rakom prostate ili na preživljenje do povratka bolesti, sve dosadašnje studije su primarno pokazale povezanost razine ekspresije određenih članova signalnog puta s povratkom bolesti, što je definirano vremenom koje protekne do pojave tzv. biokemijskog recidiva. Tako su na primjer Gonnissen i sur. (2017) pokazali da je pojačana ekspresija proteina GLI3 u stanicama tumora prediktor bolje prognoze, dok je studija Gonnissen i sur. (2018) otkrila da je niža ekspresija proteina GLI1 u tumorskim stanicama prediktor kasnijeg povratka bolesti. S obzirom na to da smo mi koristili uzorke tkiva primarnih tumora prostate, naše analize preživljenja su kao krajnju kliničku točku (eng. *endpoint*) koristile smrt od bilo kojeg uzroka (ukupno preživljenje) te smrt uzrokovanu rakom prostate (preživljenje povezanog s bolesti), a ne povratak bolesti. Dodatna prepreka za usporedbu naših rezultata analiza preživljenja s rezultatima objavljenih studija proizlazi iz činjenice da utori koriste različite načine za dihotomizaciju vrijednosti proteinske ekspresije u dvije kategorije, obično „slabe“ i „jake“ ekspresije. U našem slučaju, najbolji rezultati analize preživljenja dobiveni su

određivanjem graničnih vrijednosti za dihotomizaciju pomoću analize krivulje ROC (Hajian-Tilaki 2017). Na taj način analizirani, naši rezultati su pokazali da je razina ekspresije čak tri istraživana proteina, u različitim dijelovima tkiva prostate, povezana s preživljenjem pacijenata: GLI1 i PTCH1 u tumorskoj stromi te GLI2 u stanicama tumora (**Slika 59**). Iako je viša razina ekspresije proteina GLI1 jedan od pokazatelja više razine aktivnosti signalnog puta HH-GLI, u našem se istraživanju pokazalo da je viša razina ekspresije proteina GLI1 u stromi, donekle kontraintuitivno, povezana s boljim preživljenjem pacijenata (**Tablica 12**). Međutim, analizirajući naše rezultate povezanosti ekspresije proteina GLI1 s kliničko-patološkim karakteristikama pacijenata, može se vidjeti da je s jedne strane viša razina ekspresije proteina GLI1 povezana s nižom grupom gradusa (**Slika 26**), dok je s druge strane bila prisutna negativna korelacija između razine ekspresije proteina GLI1 u stromi i inicijalne vrijednosti PSA (**Slika 56**), čija je povišena vrijednost već spomenuti pokazatelj kraćeg preživljenja pacijenata s rakom prostate, za vrijednosti PSA ispod 70 ng/ml (Iwamoto i sur. 2019). Interesantno da, iako je razina ekspresije svih istraživanih proteina bila viša u stanicama raka prostate u odnosu na okolnu stromu, je upravo ekspresija i lokalizacija nekih od istraživanih proteina u stromi bila povezana s preživljenjem pacijenata s rakom prostate. U našem istraživanju pokazali smo da je viša ekspresija proteina PTCH1 u stromi te veća lokalizacija proteina GLI3 u jezgri stanica strome prediktor kraćeg trajanja ukupnog preživljenja te preživljenja povezanog s bolesti pacijenata s rakom prostate. Ti rezultati pak idu u prilog parakrinom mehanizmu prijenosa signala signalnim putem HH-GLI u raku prostate. Zaključno, svi rezultati naših analiza preživljenja dodatno ukazuju na prognostičku vrijednost, a time i klinički potencijal određivanja razina ekspresije članova signalnog puta HH-GLI kod pacijenata oboljelih od primarnog raka prostate (Kim i sur. 2011, Azoulay i sur. 2008).

5.3. Interakcija signalnog puta HH-GLI i AR u raku prostate i njen terapijski potencijal

Uloga signalnog puta HH-GLI u razvoju raka prostate, kao i interakcija signalnih putova HH-GLI i AR intenzivno su istraženi tijekom posljednja dva desetljeća. Rana istraživanja sugerirala su da je autokrina signalizacija puta HH-GLI ključna za održavanje rasta raka

prostate (Karhadkar i sur. 2004, Sanchez i sur. 2004, Stecca i sur. 2005). Međutim, ovaj je model kasnije preispitan jer je postalo očito da aktivacija SMO u modelu miša nije dovela do neoplastične transformacije prostate kao na primjer kože, mozga ili mišićnog tkiva (Mao i sur. 2006). Također, Zhang i suradnici nisu pronašli dokaze o autokrinoj signalizaciji u tri stanične linije raka prostate, LNCaP, PC3 i 22RV1 (Zhang i sur. 2007). Isti autori također su otkrili i da je ciklopamin inhibirao staničnu proliferaciju navedenih staničnih linija raka prostate, ali nije utjecao na kanonsku aktivnost puta HH-GLI (Zhang i sur. 2007). S druge strane, istraživanje na ksenograftima je otkrilo da vjerojatnije parakrina signalizacija podupire rast stanica raka prostate (Shaw i sur. 2009, Zunich i sur. 2009). Kako je ekspresija gena *SHH* inhibirana androgenom, utvrđeno je da produljena izloženost stanica LNCaP uvjetima bez androgena omogućava ograničenu aktivaciju autokrine signalizacije signalnog puta HH-GLI kao odgovor na ligande HH koji se eksprimiraju u tim uvjetima, predlažući ulogu signalnog puta HH-GLI u održavanju rasta raka prostate neovisnog o androgenu (Chen i sur. 2009, Shaw i sur. 2008). Kasnije je pronađena izravna interakcija između signalnih putova HH-GLI i AR, što sugerira potpuno novu, nekanonsku funkciju signalnog puta HH-GLI kod raka prostate. Tako je otkriveno da transkripcijski faktor GLI2 veže AR i to bi mogao biti temelj za potporu signalnog puta HH-GLI aktivnosti AR u uvjetima bez androgena (Chen i sur. 2010). Nedavno je ova skupina autora otkrila i da GLI3 također tvori kompleks s AR na koji je vezan ligand. To sprječava procesiranje GLI3 i stabilizira ga u njegovoj aktivnoj konformaciji što dovodi do pojačane transkripcije ciljnih gena transkripcijskih faktora GLI (Li i sur. 2018). Najnovije istraživanje je pak pokazalo da GLI3 također može tvoriti kompleks i s estrogenim receptora ER α te da tretman estradiolom stabilizira GLI3 i potiče ekspresiju ciljnih gena transkripcijskih faktora GLI, što bi se moglo koristiti kao terapijska meta za liječenje raka dojke kod kojih je povšena razina estrogenog receptora (Massah i sur. 2021).

U ovom je istraživanju detaljnije istražena uloga signalnog puta HH-GLI u rastu stanica raka prostate neovisnom o androgenima (**Slika 61**). Koristili smo staničnu liniju raka prostate ovisnu o androgenu LNCaP koju smo izložili uvjetima bez androgena, kratkoročno pet dana (LNCaP-D) te dugoročno (LNCaP-AI) nakon čega su te stanice postale neovisne o androgenu. Slično prethodnim istraživanjima, pokazali smo da je proliferacija stanica LNCaP inhibirana ciklopaminom, ali je kanonski put prijenosa signala bio samo djelomično prekinut (**poglavlje 4.9.1.1.**). Samo su u stanicama LNCaP-D signalni putovi HH-GLI i AR bili smanjeno aktivni, ali

je egzogeno dodavanje DHT ovaj učinak poništilo, što ukazuje na kanonsku aktivaciju puta u uvjetima bez androgena. Slični rezultati dobiveni su tretmanom sa spojem GANT61, ali učinak na proliferaciju stanica je bio neznan (**poglavlje 4.9.1.2.**). S druge strane, u stanicama LNCaP-AI na signalne putove HH-GLI i AR nisu utjecali ni ciklopamin niti GANT61. Nedostatak kanonske signalizacije puta HH-GLI u tim stanicama i prethodna otkrića potencijalnih interakcija aktivne forme liganda SHH-N i estrogenog receptora ER α (Sabol i sur. 2014), motivirali su ovo istraživanje s ciljem dobivanja odgovora na pitanje može li SHH-N nekanonski vezati i aktivirati AR u stanicama raka prostate. Ovo istraživanje je pokazalo da SHH-N doista veže AR, ali samo u stanicama LNCaP-AI koje su neovisne o androgenu (**Slika 70**). Ova novootkrivena interakcija između SHH-N i AR jedan je od potencijalnih mehanizama održavanja rasta stanica raka prostate neovisnih o androgenu i mogla bi predstavljati novu terapijsku metu. Azoulay i suradnici su pokazali povećanu ekspresiju liganda SHH-N i DHH-N u epitelnom dijelu uzoraka tkiva raka prostate neosjetljivih na anti-hormonalnu terapiju koja je bila povezana s najvećim rizikom od pojave recidiva (Azoulay i sur. 2008). To podupire ulogu liganda SHH kao ključnog igrača u rastu stanica raka prostate neovisnom o androgenima. Slično tome, pokazano je da kastracija uzrokuje ekspanziju sporo-ciklirajućih progenitorskih stanica koje su neovisne o androgenu, uz pojačanu ekspresiju i SHH i GLI nakon kastracije što dodatno ukazuje na ulogu signalnog puta HH-GLI u ekspanziji progenitorskih stanica i regeneraciji prostate u uvjetima bez androgena (Bushman 2016).

S obzirom da je aktivni protein SHH posttranslacijski modificiran molekulom kolesterola koji je prekursor u biosintezi androgena (Eacker i sur. 2008), moguće je da je to ključan dio za interakciju između SHH i AR. Stoga bi moguće sredstvo za dokidanje ove interakcije moglo uključivati snižavanje razine kolesterola. Statini, koji se u klinici naširoko koriste kao lijekovi za snižavanje kolesterola, u ovom bi slučaju mogli imati terapijski učinak za rak prostate. Epidemiološke studije pokazale su smanjeni rizik od uznapredovanog raka prostate kod bolesnika koji su uzimali statine, ali nisu uočeni značajni rezultati na ukupno smanjenje učestalosti raka prostate (Murtola i sur. 2008). Ta studija je u skladu s našim rezultatima koji pokazuju da SHH-N podržava samo rast stanica neovisan o androgenu. Stoga bi se terapija statinima mogla pokazati učinkovitom samo za rak prostate rezistentan na kastraciju (CRPC) koji se oslanja na interakciju SHH-N-AR ili u kombinaciji s terapijom lišavanja androgena (eng. *androgen deprivation therapy*, ADT) za uznapredovani rak prostate, da spriječi

stvaranje interakcija SHH-N–AR i time onemogućiti tumorski rast neovisan o androgenima. Međutim, nedavna studija je pokazala pro-tumorigeni učinak niskih doza statina na rak prostate (Caro-Maldonado i sur. 2017) zbog čega je potrebno provesti detaljnija istraživanja o učincima statina na različite faze razvoja raka prostate.

Na kraju treba ponovo naglasiti važnost signalnog puta HH-GLI u raku prostate. Iako se može činiti da je njegova uloga proturječna, dublji uvidi otkrivaju da njegova uloga možda nije tako izravna kao kod drugih tipova tumora. Ovo naše istraživanja je ukazalo na ključna mjesta interakcije signalnog puta HH-GLI i AR te bi bilo nužno nastaviti s istraživanjima i detaljnije ispitati molekularne mehanizme tih interakcija pomoću naprimjer molekularnog modeliranja. Sve je očiglednije da kanonski put prijenosa signala možda nije vodeći uzrok razvoja raka prostate, već je presudan za preživljavanje stanica raka prostate u uvjetima bez androgena. Također, rezultati ovog istraživanja, kao i drugih, ističu sposobnost određenih komponenata signalnog puta HH-GLI da nekanonski komuniciraju s AR i aktiviraju ga, što predstavlja mehanizme održavanja tumorskog rasta neovisnog o androgenima. Što se tiče interakcije proteina SHH-N–AR koju smo identificirali na staničnom modelu raka prostate, opseg i važnost te interakcije treba dodatno procijeniti na kliničkim uzorcima te ostaje istražiti bi li njegova inhibicija u uznapredovanom raku prostate i CRPC mogla biti relevantna za uspješno liječenje.

6. ZAKLJUČCI

Na temelju rezultata dobivenih u ovom radu mogu se izvesti sljedeći zaključci:

- Ekspresija proteina GLI1, GLI2, GLI3 i PTCH1 statistički je značajno povišena u uzorcima tumorskog tkiva u usporedbi s kontrolnim tkivom, što ukazuje na pojačanu aktivnost signalnog puta HH-GLI u raku prostate.
- Ekspresija sva četiri istraživana proteina statistički je značajno viša u stanicama raka prostate u odnosu na okolnu stromu, a dijelovi tkiva koji pokazuju višu razinu ekspresije imaju veći postotak stanica s jezgrinim bojanjem.
- Korelacija između ekspresija istraživanih proteina je uglavnom umjerena pozitivna, dok je korelacija između ekspresija proteina i kliničko-patoloških karakteristika pacijenata uglavnom slaba pozitivna.
- Snižena ekspresija proteina GLI1 te povišena proteina GLI2 i PTCH1 kao i lokalizacija proteina GLI3 u jezgri povezani su s kraćim preživljenjem pacijenata s rakom prostate.
- Stanice raka prostate LNCaP nakon dugotrajnog (dulje od 10 mjeseci) izlaganja uvjetima bez androgena postaju androgen neovisne (LNCaP-AI).
- U stanicama LNCaP divljeg tipa te njenim varijantama LNCaP-D i LNCaP-AI eksprimirane su komponente signalnog puta HH-GLI. Ekspresija androgen-reprimiranog gena *SHH* i ciljnih gena AR mijenjaju se u ovisnosti o prisutnosti androgena u mediju.
- Stanice LNCaP-AI imaju značajno pojačanu ekspresiju ciljnih gena AR u odnosu na stanice LNCaP-D koje su samo kratkoročno (5 dana) izložene uvjetima bez androgena, što sugerira alternativne oblike aktivacije AR u LNCaP-AI stanicama.
- Korišteni inhibitori signalnog puta HH-GLI smanjuju proliferaciju stanica, međutim, nemaju učinak na njegovu aktivnost osim u stanicama LNCaP-D. To sugerira kanonsku aktivaciju signalnog puta kod kratkotrajnog izlaganja uvjetima bez androgena, dok je kod drugih varijanti stanica LNCaP moguće da se radi o nekanonskoj aktivnosti.
- U stanicama LNCaP-AI dolazi do fizičke interakcije proteina SHH i AR, dok u ostalim varijantama stanične linije LNCaP ta interakcija nije prisutna.
- Interakcija SHH i AR mogla bi predstavljati novi mehanizam aktivacije AR u uvjetima bez androgena koja omogućuje stanicama stjecanje neovisnosti o tom hormonu.

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.

Agyeman, A., Jha, B. K., Mazumdar, T., Houghton, J. A. (2014). Mode and specificity of binding of the small molecule GANT61 to GLI determines inhibition of GLI-DNA binding. *Oncotarget.* 5(12), 4492.

Akin O., Hricak H. (2007). Imaging of prostate cancer. *Radiol Clin North Am.* 45, 207–22.

Alexaki, V.I., Javelaud, D., Van Kempen, L. C. L., Mohammad, K. S., Dennler, S., Luciani, F., Hoek, K. S., Juárez, P., Goydos, J. S., Fournier, P. J., Sibon, C., Bertolotto, C., Verrecchia, F., Saule, S., Delmas, V., Ballotti, R., Larue, L., Saiag, P., Guise, T. A., Mauviel, A. (2010). GLI2-mediated melanoma invasion and metastasis. *Journal of the National Cancer Institute.* 102(15), 1148–1159.

Asim, M., Siddiqui, I. A., Hafeez, B. B., Baniahmad, A., Mukhtar, H. (2008). Src kinase potentiates androgen receptor transactivation function and invasion of androgen-independent prostate cancer C4-2 cells. *Oncogene.* 27(25), 3596–3604.

Azoulay, S., Terry, S., Chimingqi, M., Sirab, N., Faucon, H., Diez de Medina, S. G., Moutereau, S., Maillé, P., Soyeux, P., Abbou, C., Salomon, L., Vacherot, F., de La Taille, A., Loric, S., Allory, Y. (2008). Comparative expression of Hedgehog ligands at different stages of prostate carcinoma progression. *The Journal of Pathology.* 216(4), 460–470.

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.

Barnes, E. A., Kong, M., Ollendorff, V., Donoghue, D. J. (2001). Patched1 interacts with cyclin B1 to regulate cell cycle progression. *The EMBO Journal.* 20(9), 2214–2223.

Beauchamp, E. M., Ringer, L., Bulut, G., Sajwan, K. P., Hall, M. D., Lee, Y. C., Peaceman, D., Özdemirli, M., Rodriguez, O., Macdonald, T. J., Albanese, C., Toretsky, J. A., Üren, A. (2011). Arsenic trioxide inhibits human cancer cell growth and tumor development in mice by blocking Hedgehog/GLI pathway. *The Journal of Clinical Investigation*. 121(1), 148–160.

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., Beachy, P. A. (2003). Widespread requirement for Hedgehog ligand stimulation in growth of digestive tract tumours. *Nature*. 425, 846–851.

Bhardwaj, G., Murdoch, B., Wu, D., Baker, D. P., Williams, K. P., Chadwick, K., Ling, L. E., Karanu, F. N., Bhatia, M. (2001). Sonic hedgehog induces the proliferation of primitive human hematopoietic cells via BMP regulation. *Nature Immunology*. 2(2), 172–180.

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

Bostwick G., Srigley J., Grignon D., Maksen J., Humphrey P., Kwast TH van der, Bose D, Harrison J., Young RH (1993) Atypical adenomatous hyperplasia of the prostate: morphologic criteria for its distinction from well-differentiated carcinoma. *Hum Pathol*. 24, 819–832.

Boyle P., Zaridze D. G. (1993). Risk factors for prostate and testicular cancer. *Eur J Cancer*. 29, 1048–55.

Buhmeida, A., Pyrhönen, S., Laato, M., Collan, Y. (2006). Prognostic factors in prostate cancer. *Diagn Path*. 1, 4.

Bushman, W. (2016). Hedgehog Signaling in Prostate Development, Regeneration and Cancer. *J Dev Biol*. 4(4), 30.

Byrne, E. F. X., Sircar, R., Miller, P. S., Hedger, G., Luchetti, G., Nachtergaele, S., Tully, M. D., Mydock-McGrane, L., Covey, D. F., Rambo, R. P., Sansom, M. S. P., Newstead, S., Rohatgi, R.,

Siebold, C. (2016). Structural basis of Smoothed regulation by its extracellular domains. *Nature*. 535(7613), 517–522.

Byrne, E. F., Luchetti, G., Rohatgi, R., Siebold, C. (2018). Multiple ligand binding sites regulate the Hedgehog signal transducer Smoothed in vertebrates. *Current Opinion in Cell Biology*. 51, 81–88.

Caro-Maldonado, A., Camacho, L., Zabala-Letona, A., Torrano, V., Fernández-Ruiz, S., Zamacola-Bascaran, K., Arreal, L., Valcárcel-Jiménez, L., Martín-Martín, N., Flores, J. M., Cortazar, A. R., Zúñiga-García, P., Arruabarrena-Aristorena, A., Guillaumond, F., Cabrera, D., Falcón-Perez, J. M., Aransay, A. M., Gomez-Muñoz, A., Olivan, M., Carracedo, A. (2017). Low-dose statin treatment increases prostate cancer aggressiveness. *Oncotarget*. 9(2), 1494–1504.

Chang, H., Li, Q., Moraes, R. C., Lewis, M. T., Hamel, P. A. (2010). Activation of Erk by sonic hedgehog independent of canonical hedgehog signalling. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 42(9), 1462–1471.

Chen, J. K., Taipale, J., Cooper, M. K., Beachy, P. A. (2002). Inhibition of Hedgehog signaling by direct binding of cyclopamine to Smoothed. *Genes Dev*. 16, 2743–2748.

Chen, M., Carkner, R., Buttyan, R. (2011a). The hedgehog/Gli signaling paradigm in prostate cancer. *Expert Rev Endocrinol Metab*. 6(3), 453–467.

Chen, M., Feuerstein, M. A., Levina, E., Baghel, P. S., Carkner, R. D., Tanner, M. J., Shtutman, M., Vacherot, F., Terry, S., de la Taille, A., Buttyan, R. (2010). Hedgehog/Gli supports androgen signaling in androgen deprived and androgen independent prostate cancer cells. *Molecular Cancer*. 9(1), 89.

Chen, M., Tanner, M., Levine, A. C., Levina, E., Ohouo, P., Buttyan, R. (2009). Androgenic regulation of hedgehog signaling pathway components in prostate cancer cells. *Cell Cycle*. 8(1), 149–157.

Chen, Y., Jiang, J. (2013). Decoding the phosphorylation code in Hedgehog signal transduction. *Cell Res*. 23, 186–200.

Chen, Y., Sasai, N., Ma, G., Yue, T., Jia, J., Briscoe, J., Jiang, J. (2011b). Sonic Hedgehog Dependent Phosphorylation by CK1 α and GRK2 Is Required for Ciliary Accumulation and Activation of Smoothed. *PLoS Biology*. 9(6), e1001083.

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., Jovine, L., Toftgård, R. (2013). Structural basis of SUFU–GLI interaction in human Hedgehog signalling regulation. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 69, 2563–2579.

Chuang, P. T., McMahon, A. P. (1999). Vertebrate Hedgehog signalling modulated by induction of a Hedgehog-binding protein. *Nature*. 397(6720), 617–620.

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*. Sinauer Associates, Sunderland. 2nd ed.

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.

Cotran, R. S., Kumar, V., Collins T. (2005). *Robbins pathologic basis of disease*. WB Saunders Company, Philadelphia. 7th ed., 1047–1066.

Crook, J., Ludgate, C., Malone, S., Perry, G., Eapen, L., Bowen, J., Robertson, S., Lockwood, G. (2009). Final report of multicenter Canadian Phase III randomized trial of 3 versus 8 months

of neoadjuvant androgen deprivation therapy before conventional-dose radiotherapy for clinically localized prostate cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 73(2), 327–333.

Damjanov, I., Jukić, S., Nola, M. (2011). *Patologija*, Medicinska naklada, Zagreb. 3. izd., 718-721.

Datta, S., Datta, M. W. (2006). Sonic Hedgehog signaling in advanced prostate cancer. *Cell Mol Life Sci.* 63(4), 435–448.

Dawson, N. V., Weiss, R. (2012). Dichotomizing continuous variables in statistical analysis: a practice to avoid. *Med Decis Making.* 32(2), 225–226.

Dennler, S., André, J., Alexaki, I., Li, A., Magnaldo, T., Ten Dijke, P., Wang, X. J., Verrecchia, F., Mauviel, A. (2007). Induction of sonic hedgehog mediators by transforming growth factor-beta: Smad3-dependent activation of Gli2 and Gli1 expression in vitro and in vivo. *Cancer Research.* 67(14), 6981.

Desch, P., Asslaber, D., Kern, D., Schnidar, H., Mangelberger, D., Alinger, B., Stoecher, M., Hofbauer, S. W., Neureiter, D., Tinhofer, I., Aberger, F., Hartmann, T. N., Greil, R. (2010). Inhibition of GLI, but not Smoothed, induces apoptosis in chronic lymphocytic leukemia cells. *Oncogene.* 29, 4885–4895.

Duančić, V. (1985). *Osnove embriologije čovjeka*, Medicinska knjiga, Zagreb. 9. izd., 145.

Durst-Živković, B. (2007). *Praktikum histologije*, Školska knjiga, Zagreb. 50–57.

Eacker, S. M., Agrawal, N., Qian, K., Dichek, H. L., Gong, E. Y., Lee, K., Braun, R. E. (2008). Hormonal regulation of testicular steroid and cholesterol homeostasis. *Mol Endocrinol.* 22(3), 623–635.

Eichberger, T., Sander, V., Schnidar, H., Regl, G., Kasper, M., Schmid, C., Plamberger, S., Kaser, A., Aberger, F., Frischauf, A. M. (2006). Overlapping and distinct transcriptional regulator properties of the GLI1 and GLI2 oncogenes. *Genomics.* 87(5), 616–632.

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., Munoz, A., Lipinski, R., Thrasher, J. B., Bushman, W. (2004). Hedgehog signaling promotes prostate xenograft tumor growth. *Endocrinology*. 145, 3961–3970

Feng, C., Bai, M., Zhang, H., Zeng, A., Zhang, W. (2019). Prioritization and comprehensive analysis of genes associated with melanoma. *Oncology Letters*. 18(1), 127–136.

Ferlay, J., Colombet, M., Soerjomataram, I. (2018). Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. *Int J Cancer*. 10, 100–102.

Frick, J., Aulitzky W. (1991). Physiology of the prostate. *Infection*. 19, 115–118.

Fu, J., Rodova, M., Roy, S. K., Sharma, J., Singh, K. P., Srivastava, R. K., Shankar, S. (2013). GANT-61 inhibits pancreatic cancer stem cell growth in vitro and in NOD/SCID/IL2R gamma null mice xenograft. *Cancer Letters*. 330(1), 22–32.

Fujita, K., Nonomura, N. (2019). Role of Androgen Receptor in Prostate Cancer: A Review. *The World Journal of Men's Health*. 37(3), 288.

Ganong, W. (2019). Review of Medical Physiology, Lange, San Diego., 26th ed., 405–408.

Gleason, D. F, Mellinger, G. T. (1974). Prediction of prognosis for prostatic adenocarcinoma by combined histologic grading and clinical staging. *J Urol*. 111, 58–64.

Gong, X., Qian, H., Cao, P., Zhao, X., Zhou, Q., Lei, J., Yan, N. (2018). Structural basis for the recognition of Sonic Hedgehog by human Patched1. *Science (New York, N.Y.)*. 361(6402).

Gonnissen, A., Isebaert, S., Haustermans, K. (2013). Hedgehog signaling in prostate cancer and its therapeutic implication. *Int J Mol Sci*. 14(7), 13979–14007.

Gonnissen, A., Isebaert, S., Perneel, C., McKee, C. M., Van Utterbeeck, F., Lerut, E., Verrill, C., Bryant, R. J., Joniau, S., Muschel, R. J., Haustermans, K. (2018). Patched 1 Expression Correlates with Biochemical Relapse in High-Risk Prostate Cancer Patients. *Am J Pathol*. 188(3), 795–804.

Gonnissen, A., Isebaert, S., Perneel, C., McKee, C. M., Verrill, C., Bryant, R. J., Van Utterbeeck, F., Lerut, E., Haustermans, K., Muschel, R. J. (2017). Tissue microarray analysis indicates hedgehog signaling as a potential prognostic factor in intermediate-risk prostate cancer. *BMC Cancer*. 17(1), 634.

Gray, H. (2015). *Gray's Anatomy: The Anatomical Basis Of Clinical Practice*. Elsevier, Philadelphia. 41st ed., 1266–1270.

Gronberg, H. (2003). Prostate cancer epidemiology. *Lancet*. 361, 859–64.

Hahn, H., Wicking, C., Zaphiropoulos, P. G., Gailani, M. R., Shanley, S., Chidambaram, A., Vorechovsky, I., Holmberg, E., Uden, A. B., Gillies, S., Negus, K., Smyth, I., Pressman, C., Leffell, D. J., Gerrard, B., Goldstein, A. M., Dean, M., Toftgard, R., Chenevix-Trench, G., Wainwright, B., Bale, A. E. (1996). Mutations of the human homolog of *Drosophila* patched in the nevoid basal cell carcinoma syndrome. *Cell*. 85, 841–851.

Hajian-Tilaki, K. (2018). The choice of methods in determining the optimal cut-off value for quantitative diagnostic test evaluation. *Stat Methods Med Res*. 27(8), 2374–2383.

Hall, J. (2015). *Guyton and Hall Textbook of medical physiology*. Elsevier, Jackson. 13th ed., 996–1009.

Hanna, A., Shevde, L. A. (2016). Hedgehog signaling: Modulation of cancer properties and tumor microenvironment. *Molecular Cancer*. 15(1), 24.

Ho Wei, L., Arastoo, M., Georgiou, I., Manning, D. R., Riobo-Del Galdo, N. A. (2018). Activation of the Gi protein-RHOA axis by non-canonical Hedgehog signaling is independent of primary cilia. *Plos One*. 13(8), 1–11.

Hooper, J.E., Scott, M.P. (2005). Communicating with Hedgehogs. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 6, 306–317.

Hrvatski zavod za javno zdravstvo, Registar za rak Republike Hrvatske. Incidencija raka u Hrvatskoj 2014. Bilten 39, Zagreb, 2015.

Huang, P., Nedelcu, D., Watanabe, M., Jao, C., Kim, Y., Liu, J., Salic, A. (2016). Cellular Cholesterol Directly Activates Smoothed in Hedgehog Signaling. *Cell*. 166(5), 1176–1187.e14.

Huang, P., Zheng, S., Wierbowski, B. M., Kim, Y., Nedelcu, D., Aravena, L., Liu, J., Kruse, A. C., Salic, A. (2018). Structural Basis of Smoothed Activation in Hedgehog Signaling. *Cell*. 174(2), 312–324.e16.

Huangfu, D., Anderson, K. V. (2005). Cilia and Hedgehog responsiveness in the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 102(32), 11325–11330.

Huggins, C., Hodges, C. V. (1941). Studies on Prostatic Cancer. I. The Effect of Castration, of Estrogen and of Androgen Injection on Serum Phosphatases in Metastatic Carcinoma of the Prostate. *Cancer Res*. 1(4), 293–297.

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.

Hyman, J. M., Firestone, A. J., Heine, V. M., Zhao, Y., Ocasio, C. A., Han, K., Sun, M., Rack, P. G., Sinha, S., Wu, J. J., Solow-Cordero, D. E., Jiang, J., Rowitch, D. H., Chen, J. K. (2009). Small-molecule inhibitors reveal multiple strategies for Hedgehog pathway blockade. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 106(33), 14132–14137.

Ikerowo, S., Ajla, M., Abolarinwa, A., Omisano, O.(2016). Age-specific antigen ranges among apparently healthy Nigerian men without clinical evidence of prostate cancer. *Niger J Surg*. 22, 5-8.

Ingham, P. W. (2001). Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles. *Genes Dev*. 15, 3059–3087.

Iwamoto, H., Izumi, K., Kadono, Y., Mizokami, A. (2019). Prognosis of patients with prostate cancer and middle range prostate - specific antigen levels of 20 - 100 ng / mL. *Int Braz J Urol.* 45(1), 61–67.

Jia, J., Jiang, J. (2006). Decoding the Hedgehog signal in animal development. *Cell Mol Life Sci.* 63, 1249–1265.

Jiang, X., Yang, P., Ma, L. (2009). Kinase activity-independent regulation of cyclin pathway by GRK2 is essential for zebrafish early development. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106(25), 10183–10188.

Johansson, A., Rudolfsson, S. H., Kilter, S., Bergh, A. (2011). Targeting castration-induced tumour hypoxia enhances the acute effects of castration therapy in a rat prostate cancer model. *BJU International.* 107, 1818–1824.

John, T., Liu, G., Tsao, M. S. (2009). Overview of molecular testing in non-small-cell lung cancer: mutational analysis, gene copy number, protein expression and other biomarkers of EGFR for the prediction of response to tyrosine kinase inhibitors. *Oncogene.* 28 Suppl 1, S14–S23.

Jope, R. S. (2003). Lithium and GSK-3: one inhibitor, two inhibitory actions, multiple outcomes. *Trends Pharmacol Sci.* 24, 441–443.

Junqueira, L. C., Carnerio, J., Kelley, R. O. (2005). *Osnove histologije. Školska knjiga, Zagreb.* X. izd., 308–402.

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.

Katoh, Y., Katoh, M. (2009). Hedgehog target genes: mechanisms of carcinogenesis induced by aberrant hedgehog signaling activation. *Curr Mol Med.* 9, 873–886.

Kim, J., Lee, J. J., Kim, J., Gardner, D., Beachy, P. A. (2010). Arsenic antagonizes the Hedgehog pathway by preventing ciliary accumulation and reducing stability of the Gli2 transcriptional effector. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 107(30), 13432–13437.

Kim, T. J., Lee, J. Y., Hwang, T. K., Kang, C. S., Choi, Y. J. (2011). Hedgehog signaling protein expression and its association with prognostic parameters in prostate cancer: a retrospective study from the view point of new 2010 anatomic stage/prognostic groups. *Journal Surg Oncol.* 104(5), 472–479.

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., Vogelstein, B. (1990). The GLI gene encodes a nuclear protein which binds specific sequences in the human genome. *Mol Cell Biol.* 10, 634–642.

Koch, A., Waha, A., Hartmann, W., Milde, U., Goodyer, C.G., Sörensen, N., Berthold, F., Dignon-Söntgerath, B., Krätzschar, J., Wiestler, O.D., Pietsch, T. (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.

Krmpotić, J. (1982). *Anatomija čovjeka.* Jumena, Zagreb. 3. izd., 869–871.

Kruslin, B., Tomas, D., Mikuz, G. (2011). Periacinar retraction artifact of the prostate. *Front Biosci.* 3, 226–235.

Kwong, L., Bijlsma, M. F., Roelink, H. (2014). Shh-mediated degradation of Hhip allows cell autonomous and non-cell autonomous Shh signaling. *Nature communications,* 5, 4849.

Lauth, M., Bergström, A., Shimokawa, T., Toftgård, R. (2007). Inhibition of GLI-mediated transcription and tumor cell growth by small-molecule antagonists. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104(20), 8455–8460.

Lesko, S. M., Rosenberg, L., Shapiro, S. (1996). Family history and prostate cancer risk. *Am J Epidemiol.* 144, 1041–1047.

Leung, J. K., Sadar, M. D. (2017). Non-Genomic Actions of the Androgen Receptor in Prostate Cancer. *Frontiers in Endocrinology*. 8, 1–8

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.

Levanat, S., Sabol, M., Musani, V., Ozretic, P., Trnski, D. (2017). Hedgehog Signaling Pathway as Genetic and Epigenetic Target in Ovarian Tumors. *Current Pharmaceutical Design*. 23(1), 73–94.

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 Research*. 67(3), 1030–1037.

Li, N., Truong, S., Nouri, M., Moore, J., Al Nakouzi, N., Lubik, A. A., Buttyan, R. (2018). Non-canonical activation of hedgehog in prostate cancer cells mediated by the interaction of transcriptionally active androgen receptor proteins with Gli3. *Oncogene*. 37(17), 2313–2325.

Lin, C., Yao, E., Wang, K., Nozawa, Y., Shimizu, H., Johnson, J. R., Chen, J.N., Krogan, N. J., Chuang, P.T. (2014). Regulation of Sufu activity by p66 β and Mycbp provides new insight into vertebrate Hedgehog signaling. *Genes & Development*. 28(22), 2547–2563.

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.

Lopez-Beltran, A., Eble, J. N., Bostwick, D. G. (2005). Pleomorphic giant cell carcinoma of the prostate. *Arch Pathol Lab Med*. 129, 683–685.

Luchetti, G., Sircar, R., Kong, J. H., Nachtergaele, S., Sagner, A., Byrne, E. F., Covey, D. F., Siebold, C., Rohatgi, R. (2016). Cholesterol activates the G-protein coupled receptor Smoothed to promote Hedgehog signaling. *ELife*. 5, e20304.

Ma, X., Sheng, T., Zhang, Y., Zhang, X., He, J., Huang, S., Chen, K., Sultz, J., Adegboyega, P. A., Zhang, H., Xie, J. (2006). Hedgehog signaling is activated in subsets of esophageal cancers. *Int J Cancer*. 118, 139–148.

Mahedevia, P. S., Ramaswamy, A., Greenwald, E. (1983). Hypercalcemia in prostatic carcinoma, Report of eight cases. *Arch Intern Med*. 143, 1339–1342.

Mao, J., Ligon, K. L., Rakhlin, E. Y., Thayer, S. P., Bronson, R. T., Rowitch, D., McMahon, A. P. (2006). A Novel Somatic Mouse Model to Survey Tumorigenic Potential Applied to the Hedgehog Pathway. *Cancer Research*. 66(20), 10171–10178.

Massah, S., Foo, J., Li, N., Truong, S., Nouri, M., Xie, L., Prins, G. S., Buttyan, R. (2021). Gli activation by the estrogen receptor in breast cancer cells: Regulation of cancer cell growth by Gli3. *Mol Cell Endocrinol*. 522, 111136.

Mazaheri, Y., Hricak, H., Fine, S. W. (2009). Prostate tumor volume measurement with combined T2-weighted imaging and diffusion-weighted MR: correlation with pathologic tumor volume. *Radiology*. 252, 449–457.

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.

Merchant, A. A., Matsui, W. (2010). Targeting Hedgehog—A Cancer Stem Cell Pathway. *Clinical Cancer Research*. 16(12), 3130.

Mille, F., Thibert, C., Fombonne, J., Rama, N., Guix, C., Hayashi, H., Corset, V., Reed, J. C., Mehlen, P. (2009). The Patched dependence receptor triggers apoptosis through a DRAL–caspase-9 complex. *Nature Cell Biology*. 11(6), 739–746.

Moch, H., Cubilla, A. L., Humphrey, P. A., Reuter, V. E., Ulbricht, T. M. (2016). The 2016 WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs-Part A: Renal, Penile, and Testicular Tumours. *Eur Urol*. 70, 93–105.

Montironi, R., Lopez Beltran, A., Scarpeli, M., Bollito, E. (2001). Assessment of radical prostatectomy specimens and diagnostic reporting of pathological findings. *Pathologica*. 93(3), 226–232.

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., Frost, A. R. (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.

Murtola, T. J., Visakorpi, T., Lahtela, J., Syvälä, H., Tammela, T. L. (2008). Statins and prostate cancer prevention: Where we are now, and future directions. *Nature Clinical Practice Urology*. 5(7), 376–387.

Musgrove, E. A., Sutherland, R. L. (2009). Biological determinants of endocrine resistance in breast cancer. *Nature Reviews. Cancer*. 9(9), 631–643.

Myers, B. R., Neahring, L., Zhang, Y., Roberts, K. J., Beachy, P. A. (2017). Rapid, direct activity assays for Smoothed reveal Hedgehog pathway regulation by membrane cholesterol and extracellular sodium. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 114(52), E11141–E11150.

Nickel, J. C., Downey, J., Hunter, D., Clark, J. (2001). Prevalence of prostatitis-like symptoms in a population based study using the National Institutes of Health chronic prostatitis symptom index, *J. Urology*. 165(3), 842–845.

Niewiadomski, P., Niedziółka, S. M., Markiewicz, Ł., Uśpieński, T., Baran, B., Chojnowska, K. (2019). Gli Proteins: Regulation in Development and Cancer. *Cells*. 8(2), 147.

Niyaz, M., Khan, M. S., Mudassar, S. (2019). Hedgehog Signaling: An Achilles' Heel in Cancer. *Translational Oncology*. 12(10), 1334–1344.

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.

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.

Paces-Fessy, M., Boucher, D., Petit, E., Paute-Briand, S., Blanchet-Tournier, M. F. (2004). The negative regulator of Gli, Suppressor of fused (*Sufu*), interacts with SAP18, Galectin3 and other nuclear proteins. *Biochem J*. 378(Pt 2), 353–362.

Pandolfi, S., Montagnani, V., Lapucci, A., Stecca, B. (2015). HEDGEHOG/GLI-E2F1 axis modulates iASPP expression and function and regulates melanoma cell growth. *Cell Death and Differentiation*, 22(12), 2006–2019.

Partin, A. W., Kattan, M. W., Subong, E. N. (1997). Combination of prostate-specific antigen, clinical stage, and Gleason score to predict pathological stage of localized prostate cancer: A multi-institutional update. *JAMA*. 277, 1445–1451.

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.

Perdana, N. R., Mochtar, C. A., Umbas, R., Hamid, A. R. (2016). The Risk Factors of Prostate Cancer and Its Prevention: A Literature Review. *Acta Med Indones*. 48(3), 228–238.

Pietrobono, S., Gagliardi, S., Stecca, B. (2019). Non-canonical Hedgehog Signaling Pathway in Cancer: Activation of GLI Transcription Factors Beyond Smoothed. *Frontiers in Genetics*. 10, 556.

Polizio, A. H., Chinchilla, P., Chen, X., Manning, D. R., Riobo, N. A. (2011). Sonic Hedgehog activates the GTPases Rac1 and RhoA in a Gli-independent manner through coupling of smoothed to Gi proteins. *Science Signaling*. 4(200), pt7.

- Pranth, R. (2019). Epidemiology of prostate cancer. *World J Oncology*. 10(2), 63–89
- Putra, I., Hamid, A., Mochtar, C., Umbas, R.(2016). Relationship of age, prostate-specific antigen and prostate volume in Indonesian men with benign prostatic hyperplasia. *Prostate Int*. 4, 43-48.
- 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.
- Rawla, P. (2019). Epidemiology of Prostate Cancer. *World J Oncol*. 10(2), 63–89.
- Reljić, A., Čukelj, P., Tomašković, I., Ružić, B., Šekerija, M. (2018). Epidemiology of prostate cancer in Croatia, situation and perspectives of prostate cancer in Croatia. *Acta Clin Croat*. 57, 27–34.
- Renshaw, A. A. (1998). Correlation of gross morphologic features with histologic features in radical prostatectomy specimens. *Am J Clin Pathol*. 110, 38–42.
- 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.
- Rohatgi, R., Milenkovic, L., Scott, M. P. (2007). Patched1 Regulates Hedgehog Signaling at the Primary Cilium. *Science*. 317(5836), 372–376.
- 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.

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.

Sabol, M., Trnski, D., Musani, V., Ozretić, P., Levanat, S. (2018). Role of GLI Transcription Factors in Pathogenesis and Their Potential as New Therapeutic Targets. *International Journal of Molecular Sciences.* 19(9), 2562.

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.

Sadler, T. W. (2009): *Langmanova medicinska embriologija*, Školska knjiga, Zagreb. X. izd.

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(34), 12561–12566.

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.

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.

Schober, P., Boer, C., Schwarte, L. A. (2018). Correlation coefficients: appropriate use and interpretation. *Anesth Analg.* 126(5), 1763–1768.

Sharpe, H. J., Wang, W., Hannoush, R. N., de Sauvage, F. J. (2015). Regulation of the oncoprotein Smoothed by small molecules. *Nat Chem Biol.* 11(4), 246–255.

Shaw, A., Gipp, J., Bushman, W. (2009). The Sonic Hedgehog pathway stimulates prostate tumor growth by paracrine signaling and recapitulates embryonic gene expression in tumor myofibroblasts. *Oncogene*. 28(50), 4480–4490.

Shaw, G., Price, A. M., Ktori, E., Bisson, I., Purkis, P. E., McFaul, S., Oliver, R. T. D., Prowse, D. M. (2008). Hedgehog signalling in androgen independent prostate cancer. *European Urology*. 54(6), 1333–1343.

Sheng, T., Li, C., Zhang, X., Chi, S., He, N., Chen, K., McCormick, F., Gatalica, Z., Xie, J. (2004). Activation of the hedgehog pathway in advanced prostate cancer. *Mol Cancer*. 3, 29.

Siegel, D. A., O'Neil, M. E., Richards, T. B., Dowling, N. F., Weir, H. K. (2020). Prostate Cancer Incidence and Survival, by Stage and Race/Ethnicity - United States, 2001-2017. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 69(41), 1473–1480.

Spajic B., Cupic H., Tomas D. (2007). The incidence of hyperechoic prostate cancer in transrectal ultrasound-guided biopsy specimens. *Urology*. 70, 734–737.

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.

Stecca, B., Mas, C., Ruiz i Altaba, A. (2005). Interference with HH–GLI signaling inhibits prostate cancer. *Trends in Molecular Medicine*. 11(5), 199–203.

Stecca, B., Ruiz i Altaba, A. (2009). A GLI1-p53 inhibitory loop controls neural stem cell and tumour cell numbers. *EMBO J*. 28(6), 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.

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.

Tan, M. E., Li, J., Xu, H. E., Melcher, K., Yong, E. (2015). Androgen receptor: Structure, role in prostate cancer and drug discovery. *Acta Pharmacologica Sinica*. 36(1), 3–23.

Taylor, M. D., Liu, L., Raffel, C., Hui, C. C., Mainprize, T. G., Zhang, X., Agatep, R., Chiappa, S., Gao, L., Lowrance, A., Hao, A., Goldstein, A. M., Stavrou, T., Scherer, S. W., Dura, W. T., Wainwright, B., Squire, J. A., Rutka, J. T., Hogg, D. (2002). Mutations in SUFU predispose to medulloblastoma. *Nat Genet*. 31, 306–310.

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., Antoniu, B., McMahon, M., Warshaw, A. L., Hebrok, M. (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.

Trnski, D., Sabol, M., Gojević, A., Martinić, M., Ozretić, P., Musani, V., Ramić, S., Levanat, S. (2015). GSK3 β and Gli3 play a role in activation of Hedgehog-Gli pathway in human colon cancer—Targeting GSK3 β downregulates the signaling pathway and reduces cell proliferation. *Biochimica Et Biophysica Acta*. 1852(12), 2574–2584.

Tu, C., Fiandalo, M. V., Pop, E., Stocking, J. J., Azabdaftari, G., Li, J., Wei, H., Ma, D., Qu, J., Mohler, J. L., Tang, L., Wu, Y. (2018). Proteomic Analysis of Charcoal-Stripped Fetal Bovine Serum Reveals Changes in the Insulin-like Growth Factor Signaling Pathway. *J Proteome Res*. 17(9), 2963–2977.

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.

Tzelepi, V., Karlou, M., Wen, S., Hoang, A., Logothetis, C., Troncoso, P., Efstathiou, E. (2011). Expression of hedgehog pathway components in prostate carcinoma microenvironment: shifting the balance towards autocrine signalling. *Histopathology*. 58(7), 1037–1047.

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.

Varjosalo, M., Taipale, J. (2008). Hedgehog: Functions and mechanisms. *Genes & Development.* 22(18), 2454–2472.

Varma, M., Lee, M. W., Tamboli, P. (2002). Morphologic criteria for the diagnosis of prostatic adenocarcinoma in needle biopsy specimens. *Arch Pathol Lab Med.* 126, 554–561.

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, 440–45.

Vidović M. (2008). *Urologija - Priručnik za medicinare. Školska knjiga, Zagreb.* 1–12.

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.

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.

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.

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.

Wheway, G., Nazlamova, L., Hancock, J. T. (2018). Signaling through the Primary Cilium. *Frontiers in Cell and Developmental Biology,* 6, 8.

Wickström, M., Dyberg, C., Shimokawa, T., Milosevic, J., Baryawno, N., Fuskevåg, O. M., Larsson, R., Kogner, P., Zaphiropoulos, P. G., Johnsen, J. I. (2013). Targeting the hedgehog signal transduction pathway at the level of GLI inhibits neuroblastoma cell growth in vitro and in vivo. *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer.* 132(7), 1516–1524.

Winklmayr, M., Schmid, C., Laner-Plamberger, S., Kaser, A., Aberger, F., Eichberger, T., Frischauf, A. M. (2010). Non-consensus GLI binding sites in Hedgehog target gene regulation. *BMC Molecular Biology.* 11(1), 2.

Xie, H., Paradise, B. D., Ma, W. W., Fernandez-Zapico, M. E. (2019). Recent Advances in the Clinical Targeting of Hedgehog/GLI Signaling in Cancer. *Cells.* 8(5), 394.

Xie, J., Murone, M., Luoh, S.M., Ryan, A., Gu, Q., Zhang, C., Bonifas, J.M., Lamk, C.W., Hynes, M., Goddard, A., Rosenthal, A., Epstein, E. H., Jr, de Sauvage, F. J. (1998). Activating Smoothed mutations in sporadic basal-cell carcinoma. *Nature.* 391, 90–92.

Yam, P. T., Langlois, S. D., Morin, S., Charron, F. (2009). Sonic Hedgehog Guides Axons through a Noncanonical, Src-Family-Kinase-Dependent Signaling Pathway. *Neuron.* 62(3), 349–362.

Yan, M., Wang, L., Zuo, H., Zhang, Z., Chen, W., Mao, L., Zhang, P. (2011). HH/GLI signalling as a new therapeutic target for patients with oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncology.* 47(6), 504–509.

Yauch, R. L., Gould, S. E., Scales, S. J., Tang, T., Tian, H., Ahn, C. P., Marshall, D., Fu, L., Januario, T., Kallop, D., Nannini-Pepe, M., Kotkow, K., Marsters, J. C., Rubin, L. L., de Sauvage, F. J. (2008). A paracrine requirement for hedgehog signalling in cancer. *Nature.* 455, 406–410.

Young, B., O'Dowd, G., Woodford, P. (2013). *Wheater's functional histology: a text and colour atlas.* Elsevier, Philadelphia, 6th ed., 347–348.

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.

Zhang, J., Lipinski, R., Shaw, A., Gipp, J., Bushman, W. (2007). Lack of Demonstrable Autocrine Hedgehog Signaling in Human Prostate Cancer Cell Lines. *Journal of Urology*. 177(3), 1179–1185.

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.

Zunich, S. M., Douglas, T., Valdovinos, M., Chang, T., Bushman, W., Walterhouse, D., Iannaccone, P., Lamm, M. L. G. (2009). Paracrine sonic hedgehog signalling by prostate cancer cells induces osteoblast differentiation. *Molecular Cancer*. 8(1), 12.

8. SAŽETAK

Rak prostate je drugi po učestalosti tip raka kod muškaraca i usko je povezan s aktivnosti androgenog receptora. Signalni put HH-GLI je evolucijski visoko konzerviran put prijenosa signala od stanične membrane do jezgre, a njegova aktivnost tijekom embrionalnog razvoja ima važnu ulogu i u razvoju prostate. Cilj ovog istraživanja bilo je istražiti ulogu signalnog puta HH-GLI u karcinomu prostate, u svrhu otkrivanja novih potencijalnih prognostičkih biomarkera te njegove uloge u održavanju rasta stanica raka prostate neovisnog o androgenima.

Imunohistokemijskim bojanjem uzoraka tkiva raka prostate i kontrolnih uzoraka zdrave prostate i prostate s upalom određena je ekspresija i lokalizacija proteina GLI1, GLI2, GLI3 i PTCH1. Kao stanični model raka prostate korištena je stanična linija LNCaP u kojoj je određena aktivnost signalnog puta HH-GLI na genskom i proteinskom nivou, dok je uloga tog signalnog puta u androgen-neovisnom rastu istražena izlaganjem stanica LNCaP uvjetima kratkoročne (5 dana, LNCaP-D) i dugoročne (10 mjeseci, LNCaP-AI) deprivacije androgena. Istražen je i utjecaj inhibicije signalnog puta HH-GLI pomoću spojeva cikloplamin i GANT61 na proliferaciju stanica, aktivnost signalnog puta HH-GLI te AR. Na kraju je istražena interakcija signalnih puteva HH-GLI i AR metodom ko-imunoprecipitacije.

Rezultati su pokazali da je ekspresija proteina GLI1, GLI2, GLI3 i PTCH1 bila statistički značajno povišena u uzorcima tumorskog tkiva u usporedbi s kontrolnim tkivom te da je njihova ekspresija bila statistički značajno viša u stanicama raka prostate u odnosu na okolnu stromu. Određivanje lokalizacije proteina (obojenja) je pokazalo da su dijelovi tkiva s višom razinom ekspresije imali veći postotak stanica s jezgrinim bojanjem. Korelacijska analiza je pokazala umjerenu pozitivnu korelaciju između ekspresija istraživanih proteina te slabu pozitivnu korelaciju između ekspresija proteina i kliničko-patoloških karakteristika pacijenata. Analiza preživljenja je pokazala da je snižena ekspresija proteina GLI1 te povišena proteina GLI2 i PTCH1 kao i lokalizacija proteina GLI3 u jezgri povezana s kraćim preživljenjem pacijenata s rakom prostate. Rezultati na stanicama LNCaP pokazali su da stanice raka prostate nakon dugotrajnog izlaganja uvjetima bez androgena postaju androgen neovisne (LNCaP-AI). U stanicama LNCaP divljeg tipa te njenim varijantama LNCaP-

D i LNCaP-AI bile su eksprimirane komponente signalnog puta HH-GLI, ali se ekspresija androgen reprimiranog gena SHH i ciljnih gena AR mijenjaju u ovisnosti o prisutnosti androgena. Stanice LNCaP-AI imale su značajno pojačanu ekspresiju ciljnih gena AR u odnosu na stanice LNCaP-D koje su samo kratkoročno izložene uvjetima bez androgena, što sugerira alternativne oblike aktivacije AR u LNCaP-AI stanicama. Inhibitori signalnog puta HH-GLI smanjili su proliferaciju stanica, ali nisu imali učinak na njegovu aktivnost. Aktivnost puta bila je smanjena samo u varijanti stanica LNCaP-D, što sugerira aktivaciju kanonskog signalnog puta kod kratkotrajog izlaganja uvjetima bez androgena. U stanicama LNCaP-AI došlo je do fizičke interakcije proteina SHH i AR, dok u ostalim varijantama stanica LNCaP ta interakcija nije bila prisutna.

Analiza proteinske ekspresije članova signalnog puta HH-GLI u kliničkim uzorcima raka prostate pokazala je da je taj signalni put aktivan u tom tipu tumora te da određivanje razine ekspresije može imati prognostički značaj za predviđanje stope preživljenja oboljelih od raka prostate. S druge strane, otkrivena interakcija SHH i AR mogla bi predstavljati novi mehanizam aktivacije AR u uvjetima bez androgena koja omogućuje stanicama stjecanje neovisnosti o tom hormonu, što bi se moglo iskoristiti kao terapijska meta za liječenje pacijenata s uznapredovanim rakom prostate.

9. SUMMARY

Prostate cancer is the second most common type of cancer in men and it is closely related to androgen receptor activity. The HH-GLI signaling pathway is an evolutionarily highly conserved signal transduction pathway from the cell membrane to the nucleus, and its activity during embryonic development also plays an important role in prostate development. The aim of this study was to investigate the role of the HH-GLI signaling pathway in prostate cancer, in order to detect new potential prognostic biomarkers and its role in maintaining androgen-independent prostate cancer cell growth.

Immunohistochemical staining of prostate cancer tissue samples and control samples of healthy prostate and prostate with inflammation determined the expression and localization of GLI1, GLI2, GLI3 and PTCH1 proteins. As a cell model of prostate cancer, the LNCaP cell line was used, in which the activity of the HH-GLI signaling pathway at the gene and protein levels were determined, while the role of this signaling pathway in androgen-independent growth was investigated by exposing LNCaP cells to short-term (5 days, LNCaP-D) and long-term (10 months, LNCaP-AI) androgen deprivation. The effects of inhibition of the HH-GLI signaling pathway by the cycloplamin and GANT61 on cell proliferation, HH-GLI signaling pathway activity and AR activity were also investigated. Finally, the interaction between the HH-GLI signaling pathways and AR by was investigated co-immunoprecipitation.

The results showed that GLI1, GLI2, GLI3 and PTCH1 protein expression was statistically significantly increased in tumor tissue compared to control tissue and that their expression was statistically significantly higher in prostate cancer cells compared to the surrounding stroma. Determination of protein (staining) localization showed that parts of the tissue with a higher level of expression had a higher percentage of cells with nuclear staining. Correlation analysis showed a moderate positive correlation between the expressions of the studied proteins and a weak positive correlation between protein expressions and clinicopathological characteristics of patients. Survival analysis showed that decreased GLI1 protein expression and elevated GLI2 and PTCH1 proteins as well as localization of GLI3 proteins in the nucleus were associated with a shorter survival of prostate cancer patients.

Results on LNCaP cells showed that prostate cancer cells become androgen independent (LNCaP-AI) after prolonged exposure to androgen-free conditions. In wild-type LNCaP cells and its variants LNCaP-D and LNCaP-AI, components of the HH-GLI signaling pathway were expressed, but the expression of the androgen-repressed SHH gene and target AR genes varied depending on the presence of androgens. LNCaP-AI cells had significantly enhanced expression of target AR genes relative to LNCaP-D cells that were only exposed to androgen-free conditions in the short term, suggesting alternative forms of AR activation in LNCaP-AI cells. HH-GLI signaling pathway inhibitors reduced cell proliferation but had no effect on its activity. Pathway activity was reduced only in the LNCaP-D cell variant, suggesting activation of the canonical signaling pathway upon short-term exposure to androgen-free conditions. In LNCaP-AI cells, there was a direct interaction of SHH and AR proteins, while in other variants of LNCaP cells this interaction was not present.

Analysis of protein expression of HH-GLI signaling pathway members in clinical prostate cancer samples showed that this signaling pathway is active in this type of tumor and that determining expression levels may have prognostic significance for predicting survival rates in prostate cancer patients. On the other hand, the discovered interaction of SHH and AR could represent a new mechanism of AR activation in androgen-free conditions that allows cells to gain independence from this hormone, which could be used as a therapeutic target for the treatment of advanced prostate cancer patients.

10. ŽIVOTOPIS

Rođen sam 30.04.1986. g. u Osijeku gdje sam završio Osnovnu školu Franje Krežma, potom I. (opću) gimnaziju. 2005. g. upisao sam Medicinski fakultet u Osijeku na kojem sam diplomirao 2011. g. Tijekom studija 2007.g. pokrenuo sam studentski medicinski časopis GMO – „Glasilo medicinara Osijek“ koji je bio jedan od najvećih studentskih pothvata Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera. Iste godine osnovao sam MODUS - "Medicinsku osječku udruhu studenata" koja je zastupala i predstavljala studente, organizirala kongrese i međunarodne skupove, te publicirala studentski list GMO. Za pokretanje časopisa GMO dobio sam 2008.g. nagradu Fakultetskog vijeća za poseban doprinos razvoju fakulteta na svečanoj obljetnici 10. godišnjice osnutka samostalnog Medicinskog fakulteta u Osijeku. 2008. izabran za Predsjednika Studentskog zbora Medicinskog fakulteta Osijek, potom i za Zamjenika Predsjednika Studentskog zbora Sveučilišta čiji sam puni mandat odradio do 2010.g. Tijekom studija obavio sam dvije stručne prakse (Na klinici za internu Medicinu u Palermu, Italija, kao i praksu u bolnici u Besanconu u Francuskoj na Klinici za kirurgiju.) Tijekom studija bio sam demonstrator na kolegiju Farmakologija. 2009. g organizirao sam 1. kardiološki Simpozij u Hotelu Osijek „Srce i Sport“. 2009. g. organizirao sam Međunarodni skup urednika biomedicinskih studentskih časopisa u Novom Vinodolskom. 2011. g. diplomirao sam na Medicinskom fakultetu diplomskim radom na temu „Bouveretov sindrom“. Odmah po završetku fakulteta osnovao sam ALUMNI klub bivših studenata Medicinskog fakulteta Osijek. 2012. g. ustrojio sam LUOS - Liječničku udruhu Osijek s nekolicinom kolega liječnika kojoj je za cilj briga za zdravlje i humanitarno djelovanje na području Osijeka i Slavonije. Pripravnički staž odradio sam u KBC Osijek 2012.-2013. g. Od 2011. godine radim kao predavač, vanjski suradnik u školi za prekvalifikacije gdje predajem predmete iz skupine medicinskih kolegija. Od 2011. radim i kao sportski liječnik u I. Hrvatskoj rukometnoj ligi za potrebe osječkog prvoligaškog kluba RK Osijek. Od 2013. do 2017. g. radim kao liječnik u ambulanti obiteljske medicine u Domu zdravlja Osijek, te u Zatvorskoj ambulanti u Zatvoru u Osijeku. 2014. g upisao sam Poslijediplomski studij Molekularne Bioznanosti-MOBI. 2017. g. započinem internističku specijalizaciju iz pulmologije u sklopu Doma zdravlja Osijek. 2020. g. kao dobrovaljac DZO-a sudjelujem u

pokretanju 1. COVID mobilnog tima u Hrvatskoj. 2020. g. završio sam jednogodišnji specijalistički poslijediplomski studij „Pulmologija“.

Popis radova:

Štefanac I., Mrčela M. (2019): Hedgehog signalni put i njegova uloga u nastanku tumora. Naučna revija 6:80-83.

Štefanac I. (2019): Alergijske bolesti kože i dišnog sustava. Naučna revija 6:76-79.

Štefanac I. (2018): Iznenadne smrti u mladim sportaša. Naučna revija 4:52-62.