

# Uloga glikogen-sintaza-kinaze 3 beta u razvoju karcinoma jajnika

---

**Glibo, Mislav**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2020**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:105:975931>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2022-06-24**



*Repository / Repozitorij:*

[Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Mislav Glibo**

**Uloga glikogen-sintaza-kinaze  $3\beta$  u razvoju  
karcinoma jajnika**

**DIPLOMSKI RAD**



**Zagreb, 2020.**

Ovaj diplomski rad izrađen je na Klinici za ginekologiju i porodništvo Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i Kliničke bolnice Sveti Duh pod vodstvom doc. dr. sc. Alana Šermana i predan je na ocjenu u akademskoj godini 2019./2020.

Mentor rada: doc. dr. sc. Alan Šerman

## **SKRAĆENICE KORIŠTENE U RADU**

**AMPK** – kinaza aktivirana adenozin-monofosfatom

**APC** – engl. *adenomatous polyposis coli*

**ATP** – adenozin-trifosfat

**BIO** – (2Z,3E)-6-bromoindirubin-3'-oksim

**BRAF** – engl. *B rapidly accelerated fibrosarcoma*

**BRCA1** – engl. *breast cancer 1*

**BRCA2** – engl. *breast cancer 2*

**CA-125** – karcinomski antigen 125

**cAMP** – ciklički adenozin-monofosfat

**CDK** – kinaza ovisna o ciklinima

**CK1** – kazein-kinaza 1

**CREB** – engl. *cAMP-response protein binding element*

**CT** – kompjutorizirana tomografija

**DNA** – deoksiribonukleinska kiselina

**DNA-PK** – deoksiribonukleinska kiselina-proteinska kinaza

**EMT** – epitelno-mezenhimalna tranzicija

**ERBB2** – engl. *erythroblastic oncogene B*

**ERK** – kinaza regulirana izvanstaničnim signalima

**FIGO** – Međunarodna federacija ginekologa i opstetričara

**FSH** – folikul-stimulacijski hormon

**GLI** – gen za protein Gli

**Gli** – engl. protein *Glioblastoma*

**GLIA** – aktivatorska forma proteina Gli

**GLIR** – represorska forma proteina Gli

**GSK3** – glikogen-sintaza-kinaza 3

**GSK3 $\alpha$**  – glikogen-sintaza-kinaza 3 $\alpha$

**GSK3B** – gen za glikogen-sintaza-kinazu 3 $\beta$

**GSK3 $\beta$**  – glikogen-sintaza-kinaza 3 $\beta$

**GSK3 $\beta$ -S9A** – konstitutivno aktivna glikogen-sintaza-kinaza 3 $\beta$

**HGSC** – serozni adenokarcinom jajnika visokog gradusa

**HH** – signalni put *Hedgehog*

**Hif** – faktor induciran hipoksijom

**IGF2** – gen za čimbenik rasta sličan inzulinu 2

**IKK** – I $\kappa$ B kinaza

**ILK** – kinaza povezana s integrinima

**I $\kappa$ B** – inhibitor kappa B

**JUN** – gen za protoonkogen c-jun

**kDa** – kilodalton

**KRAS** – engl. *Kirsten rat sarcoma*

**LGSC** – serozni adenokarcinom jajnika niskog gradusa

**LiCl** – litijev klorid

**LRP** – protein povezan s lipoproteinskim receptorom

**MAP2K** – protein-kinaza-kinaza aktivirana mitogenom

**MDR-1** – engl. *multidrug resistance-1*

**MMP** – matriksna metaloproteinaza

**MR** – magnetna rezonancija

**mRNA** – glasnička ribonukleinska kiselina

**mTOR** – engl. *molecular target of rapamycin*

**mTORC1** – engl. *molecular target of rapamycin complex 1*

**mTORC2** – engl. *molecular target of rapamycin complex 2*

**MYC** – gen za protoonkogen c-myc

**NFκB** – nuklearni faktor kappa B

**NICD** – intracelularna domena receptora Notch

**NK** – prirodnoubilačke stanice

**OS** – sveukupno preživljenje

**PFS** – preživljenje bez progresije bolesti

**PGC-1 $\alpha$**  – engl. *peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 $\alpha$*

**pGSK3 $\beta$ -S9** – glikogen-sintaza-kinaza 3 $\beta$  fosforilirana na serinu 9

**pGSK3 $\beta$ -Y216** – glikogen-sintaza-kinaza 3 $\beta$  fosforilirana na tirozinu 216

**PIP2** – fosfatidil-inozitol-difosfat

**PIP3** – fosfatidil-inozitol-trifosfat

**PKA** – protein-kinaza A

**PP1** – protein-fosfataza 1

**PTCH** – engl. *patched*

**PYK2** – proteinska tirozin-kinaza 2

**S** – serin

**SAD** – Sjedinjene Američke Države

**SMO** – engl. *smoothened*

**SuFu** – engl. *suppressor of fused*

**Tcf/Lef** – engl. *T-cell factor / lymphoid enhancer-binding factor*

**TGF- $\beta$**  – faktor transformacije i rasta  $\beta$

**TP53** – engl. *tumour protein 53*

**VEGF** – čimbenik rasta vaskularnog endotela

**WHO** – Svjetska zdravstvena organizacija

**Y** – tirozin

## SADRŽAJ

<b>1. SAŽETAK</b>	
<b>2. ABSTRACT</b>	
<b>3. KARCINOM JAJNIKA.....</b>	<b>1</b>
<b>4. ENZIM GLIKOGEN-SINTAZA-KINAZA 3<math>\beta</math> .....</b>	<b>5</b>
<b>4.1. Struktura i funkcija .....</b>	<b>5</b>
<b>4.2. Aktivacija i inaktivacija.....</b>	<b>5</b>
<b>4.3. GSK3<math>\beta</math> kao dio staničnih signalnih putova .....</b>	<b>6</b>
4.3.1. Signalni put G-proteini/cAMP/protein-kinaza A (PKA).....	6
4.3.2. Signalni put PIP3/Akt/mTOR.....	7
4.3.3. Signalni put Wnt.....	7
4.3.4. Signalni put Hedgehog.....	9
4.3.5. Signalni put NF $\kappa$ B .....	10
4.3.6. Signalni put Notch.....	11
4.3.7. Signalni put TGF- $\beta$ i epitelno-mezenhimalna tranzicija.....	11
4.3.8. Signalni put p53 .....	12
<b>4.4. Uloga GSK3<math>\beta</math> u apoptozi .....</b>	<b>12</b>
<b>4.5. Uloga GSK3<math>\beta</math> u autofagiji.....</b>	<b>13</b>
<b>4.6. GSK3<math>\beta</math> i stanični ciklus .....</b>	<b>14</b>
<b>4.7. Uloga GSK3<math>\beta</math> u epitelno-mezenhimalnoj tranziciji i invazivnosti tumora</b>	<b>14</b>
<b>4.8. GSK3<math>\beta</math> i rak .....</b>	<b>14</b>
<b>5. ULOGA GSK3<math>\beta</math> U KARCINOMU JAJNIKA.....</b>	<b>17</b>
<b>5.1. GSK3<math>\beta</math> kao čimbenik u razvoju karcinoma jajnika.....</b>	<b>17</b>
<b>5.2. Uloga GSK3<math>\beta</math> u EMT, neoangiogenezi i invazivnosti karcinoma jajnika .</b>	<b>22</b>
<b>5.3. GSK3<math>\beta</math> kao čimbenik rezistencije na terapiju.....</b>	<b>24</b>
5.3.1. Vinkristin .....	24
5.3.2. Paklitaksel.....	24
5.3.3. Cisplatina .....	25
<b>5.4. Ekspresija GSK3<math>\beta</math> kao prognostički čimbenik.....</b>	<b>26</b>
<b>5.5. GSK3<math>\beta</math> kao meta terapije.....</b>	<b>26</b>
5.5.1. Aktivacija GSK3 $\beta$ kao terapijska strategija.....	26
5.5.2. Inhibicija GSK3 $\beta$ kao terapijska strategija.....	27



<b>6.</b>	<b>RASPRAVA I ZAKLJUČAK .....</b>	<b>31</b>
<b>7.</b>	<b>LITERATURA.....</b>	<b>36</b>
<b>8.</b>	<b>ZAHVALE .....</b>	<b>59</b>
<b>9.</b>	<b>ŽIVOTOPIS.....</b>	<b>60</b>

## 1. SAŽETAK

### Uloga glikogen-sintaza-kinaze 3 $\beta$ u razvoju karcinoma jajnika

Mislav Glibo

**Ključne riječi:** glikogen-sintaza-kinaza 3 $\beta$ , karcinom jajnika

Enzim glikogen-sintaza-kinaza 3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ ) uključen je u regulaciju staničnog metabolizma, staničnog ciklusa, apoptoze i brojnih signalnih putova, a u različitim tumorima i različitim okolnostima djeluje kao promotor ili supresor tumorskog rasta, invazivnosti i metastaziranja. Cilj je ovog rada pregledom literature utvrditi ulogu GSK3 $\beta$  u razvoju, prognozi i terapiji karcinoma jajnika, najletalnijeg među ginekološkim karcinomima od kojeg godišnje u Hrvatskoj oboli oko 400 žena. Funkcija GSK3 $\beta$  ovisi o fosforilacijskom statusu enzima. Za aktivnost enzima nužna je fosforilacija na tirozinu 216, koju može provesti sama GSK3 $\beta$  tijekom procesa vlastite translacije ili neke druge kinaze. Protein-kinaza A i protein-kinaza B (Akt) fosforiliraju GSK3 $\beta$  na serinu 9 i, onemogućujući time vezanje supstrata, inhibiraju aktivnost GSK3 $\beta$ . Istraživanja koja su se temeljila na proučavanju ekspresije GSK3 $\beta$  u karcinomima jajnika otkrila su povećanu ekspresiju, dok istraživanja koja su proučavala kinazu Akt zaključuju da je uslijed povećane aktivnosti Akt u stanicama karcinoma jajnika snižena aktivnost GSK3 $\beta$ . Čini se da GSK3 $\beta$  suprimira proces epitelno-mezenhimalne tranzicije, koji je preduvjet za invazivnost i metastaziranje, dok su za prognostičku ulogu GSK3 $\beta$  u istraživanjima oprečni rezultati. U posljednje se vrijeme ispituje i mogućnost ciljanja GSK3 $\beta$  kao terapijske mete dvama pristupima, i inhibicijom GSK3 $\beta$ , i njenom reaktivacijom, te su *in vitro* dobiveni ohrabrujući rezultati, a neki su od takvih lijekova ušli i u klinička istraživanja. Zaključno, za rasvjetljavanje uloge GSK3 $\beta$  u razvoju karcinoma jajnika potrebna su daljnja istraživanja, a u klinici individualni pristup svakoj pacijentici.

## 2. ABSTRACT

### **Role of glycogen synthase kinase-3 $\beta$ in the development of ovarian carcinoma**, Mislav Glibo

**Key words:** glycogen-synthase-kinase 3 $\beta$ , ovarian cancer

Enzyme glycogen-synthase-kinase 3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ ) is involved in the regulation of the cell metabolism, cell cycle, apoptosis and numerous cellular signalling pathways. In various tumours and under various circumstances, the enzyme could act both as a promoter and as a suppressor of tumour growth, invasion and metastases formation. The aim of this study was to review the literature on the matter and determine the role GSK3 $\beta$  plays in the formation of ovarian cancer, the most lethal one among gynaecologic malignancies, with which about 400 women in Croatia get diagnosed annually. The function of GSK3 $\beta$  depends on its phosphorylation status. For the activity of the enzyme the phosphorylation of tyrosine 216 is needed, which can be phosphorylated by GSK3 $\beta$  itself during its translation or by some other kinases. On the other hand, protein-kinase A and protein-kinase B (Akt) phosphorylate serine 9 and, by disabling the substrate binding, inhibit catalytic activity of GSK3 $\beta$ . The studies based on expression of GSK3 $\beta$  in ovarian cancer cells report increased expression, whereas those concerning Akt conclude that GSK3 $\beta$  is inactivated in cancer cells due to Akt hyperactivity. It seems that GSK3 $\beta$  suppresses epithelial-mesenchymal transition, which is a pre-condition for cancer invasion and metastasising. The data on prognostic value of GSK3 $\beta$  are inconsistent. Recently the possibility of therapeutic targeting GSK3 $\beta$  has been evaluated, by both inhibiting and reactivating it with encouraging results *in vitro*, and some of the drugs have entered clinical studies. In conclusion, further research is needed to enlighten the role of GSK3 $\beta$  in ovarian cancer formation.

### 3. KARCINOM JAJNIKA

Prema najnovijim dostupnim podacima Hrvatskog registra za rak (za 2017. godinu) u toj je godini 398 žena oboljelo od raka jajnika. Zajedno sa zloćudnim tumorima jajovoda i adneksa rak jajnika čini 4% novodijagnosticiranih malignih bolesti žena u Hrvatskoj te po učestalosti zauzima sedmo mjesto. Iste je godine od raka jajnika preminulo 330 žena (1). Prema europskoj statistici za 5% smrti žena uzrokovanih malignim bolestima u Europskoj uniji odgovoran je upravo rak jajnika (2).

Tumori jajnika značajno se razlikuju s obzirom na histološko podrijetlo. Mogu potjecati od bilo kojeg od tri tipa stanica prisutnih u jajniku: multipotentnog površinskog epitela, totipotentnih zametnih stanica i potporne strome jajnika. Tumori zametnih stanica uključuju disgerminome, teratome i koriokarcinome. Zajedničko im je da se javljaju u mlađoj životnoj dobi i da su u pravilu unilateralni. U tumore strome jajnika ubrajaju se granulosa-teka-stanični tumori, tekomi/fibromi i tumori Sertoli-Leydigovih stanica. Pojavljuju se u svakoj životnoj dobi te su također unilateralni. S izuzetkom tekoma, hormonalno su aktivni i mogu proizvoditi veće količine spolnih hormona. Granulosa-teka-stanični tumori proizvode estrogen, a tumori Sertoli-Leydigovih stanica androgene, što može dovesti do virilizacije (3).

Tumori podrijetla površinskog epitela u središtu su zanimanja ovog rada. To su ujedno i uvjerljivo najčešći tumori jajnika – čine i do 90% svih zloćudnih tumora jajnika. Njihovo točno stanično podrijetlo još nije sa sigurnošću utvrđeno te se dijele na tip 1 i tip 2. Tip 1 uključuje tumore koji su nastali kao benigni cistadenomi

te su, preko tumora graničnog stupnja malignosti, maligno alterirali i postali serozni karcinomi niskog stupnja malignosti (engl. *low grade serous carcinoma*, LGSC) ili mucinozni karcinomi. Analogna je progresija endometrioma u endometriodni karcinom jajnika. Tip 2 čine tumori koji nastaju iz inkluzijskih cista epitela jajovoda preko intraepitelnih prekursora, koje obično nije moguće uočiti. U taj tip pripadaju serozni karcinomi visokog stupnja malignosti (engl. *high grade serous carcinoma*, HGSC) (3,4).

Za tumore tipa 1 svojstvena je niža nestabilnost genoma, očuvani mehanizmi popravka DNA te mutacije *KRAS* (engl. *Kirsten rat sarcoma*), *BRAF* (engl. *B-rapidly accelerated fibrosarcoma*) i *ERBB2* (engl. *erythroblastic oncogene B*) gena, dok tumore tipa 2 karakteriziraju mutacije *TP53* (engl. *tumour protein 53*), *BRCA1* (engl. *breast cancer 1*) i *BRCA2* (engl. *breast cancer 2*) gena (5).

Rizični čimbenici za razvoj karcinoma jajnika uključuju stariju dob, opterećenu obiteljsku anamnezu, mutacije pojedinih tumor-supresorskih gena i manji broj trudnoća. Dugotrajna uporaba oralne hormonske kontracepcije smatra se, pak, protektivnim čimbenikom (3).

Simptomi su tumora jajnika abdominalna bol, nadutost, postmenopauzalna krvarenja, gubitak tjelesne mase i gubitak apetita (6). Klinička sumnja postavlja se na temelju ultrazvučnog pregleda i serumske razine CA-125 te po potrebi CT ili MR snimaka (7), a konačna dijagnoza patohistološkim pregledom preparata nakon kirurškog zahvata. Histološku klasifikaciju donijela je Svjetska zdravstvena organizacija 2016. godine, a proširenost karcinoma stupnjuje se po klasifikaciji Međunarodne federacije ginekologa i opstetričara (FIGO). Stadij I ograničen je na jedan ili oba jajnika, a u stadiju II tumorom su zahvaćena i intraperitonealna tkiva

zdjelice. Stadij III označava zahvaćanje peritoneuma izvan zdjelice ili retroperitonealnih limfnih čvorova, dok stadij IV obilježava proširena bolest s udaljenim metastazama (8).

Zbog nespecifičnosti i kasnog javljanja simptoma te nepostojanja efikasnog načina probira pacijentica (9) dijagnoza se najčešće postavlja u FIGO stadiju III. U Hrvatskoj je 2017. godine 11,1% karcinoma jajnika otkriveno u fazi lokalizirane bolesti, 25,9% u stadiju regionalne proširenosti i u istom tolikom postotku već pri dijagnozi bile su prisutne udaljene metastaze (1). U Tablici 1 dana je usporedba s ostalim zloćudnim tumorima ženskog spolnog sustava i dojke.

**Tablica 1.** Učestalost pojedinih stadija bolesti pri dijagnozi među novodijagnosticiranim zloćudnim bolestima ženskog spolnog sustava i dojke u Hrvatskoj 2015. godine, prema (1). Ostatak do 100% kod svakog sijela čine tumori čiji je stadij nepoznat.

Sijelo tumora	Lokalizirana bolest	Regionalno proširena bolest	Udaljene metastaze
Vrat maternice	27,0%	15,7%	5,1%
Tijelo maternice	41,3%	11,8%	2,6%
Dojka	38,4%	24,7%	3,7%
Jajnik	11,1%	25,9%	25,9%

Ranije javljanje simptoma (karcinom tijela maternice) te programi probira (karcinomi dojke i vrata maternice) pridonose ranijoj dijagnozi. Zbog nedostatka

navedenog kod raka jajnika učestalost metastatske bolesti pri postavljanju dijagnoze višestruko je veća.

Smjernice Hrvatskog društva za ginekologiju i opstetriciju Hrvatskog liječničkog zbora naglašavaju ulogu multidisciplinarnog tima u pristupu pacijenticama oboljelima od karcinoma jajnika. Tim se u prvom redu sastoji od ginekološkog onkologa, patologa, radiologa i onkologa, a prema potrebi pridružuju mu se i abdominalni kirurg ili urolog (7).

Terapija karcinoma jajnika zasniva se na citoreduktivnoj kirurgiji nakon koje slijedi kemoterapijski protokol koji sadrži u prvoj liniji derivat platine i taksan. Kod karcinoma jajnika rezistentnog ili refraktornog na platinu koriste se i drugi citostatici i hormonska terapija tamoksifenom, s relativno niskom razinom odgovora na terapiju (7,10). Kod bolesnica s uznapredovalom bolešću može se prvo provesti neoadjuvantna kemoterapija (7). Bolest je sklona relapsu, koji je često obilježen rezistencijom na citostatsku terapiju i praćen visokom smrtnošću (11).

Petogodišnje preživljenje karcinoma jajnika u SAD-u poraslo je s 36% na 45% u proteklih 30-ak godina (12). Međutim, zbog kasnog otkrivanja i čestih rezistentnih relapsa smrtnost od karcinoma jajnika i dalje je najveća među ginekološkim karcinomima. Stoga istraživanje etiologije i molekularne patogeneze, metoda ranog otkrivanja i efikasnijeg liječenja karcinoma jajnika ostaju veliki izazov znanstvenicima i ginekološkim onkolozima.

## **4. ENZIM GLIKOGEN-SINTAZA-KINAZA 3 $\beta$**

### **4.1. Struktura i funkcija**

Enzim glikogen-sintaza-kinaza 3 (GSK3) monomerna je serin-treoninska kinaza otkrivena 1980. godine u skeletnom mišiću štakora. Premda nosi broj 3, taj je enzim jedini za koji je dokazano da provodi fosforilaciju glikogen-sintaze, dok je za enzime koji su prethodno nosili brojeve 1 i 2 naknadno utvrđeno da tu funkciju ne obavljaju (13). Kasnije su otkriveni i brojni drugi supstrati ovog enzima te je danas poznato da ima važnu ulogu u procesima embrionalnog razvoja, kancerogeneze, imunskog odgovora, cijeljenja tkiva, apoptoze, autofagije i neurodegeneracije (14–18).

GSK3 ima dvije izoforme, glikogen-sintaza-kinazu 3 $\alpha$  (GSK3 $\alpha$ ) i glikogen-sintaza-kinazu 3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ ). Obje sadrže sedam antiparalelnih beta-naboranih ploča, kratki prijelazni dio i alfa-uzvojnica, ali ih kodiraju različiti geni i njihova se ekspresija u pojedinim tkivima i organima razlikuje. GSK3 $\beta$  kodiran je na dugom kraku trećeg kromosoma (19) i izraženiji u tkivima NK stanica u krvi, granulocitima koštane srži i tkivu jajnika (20). Za razliku od GSK3 $\alpha$ , nema produljenje glicinom bogate N-terminalne domene i lokaliziran je i u jezgri i u citoplazmi (21). Molekularna masa GSK3 $\beta$  od 47 kDa nešto je niža od mase GSK3 $\alpha$ . Prisutstvo jedne izoforme ne može nadoknaditi gubitak druge, što je osobito bitno u embrionalnom razvoju, kada je gubitak funkcionalnog gena za GSK3 $\beta$  letalan (22).

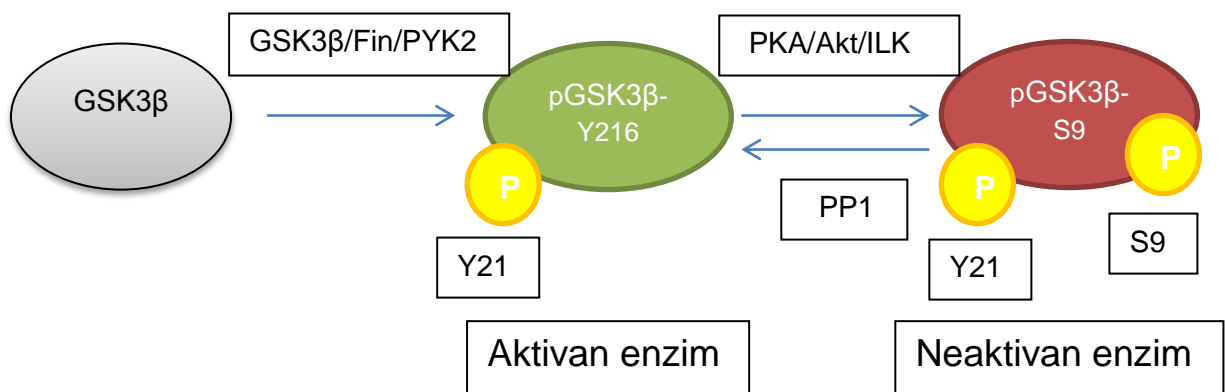
### **4.2. Aktivacija i inaktivacija**

GSK3 $\beta$  konstitutivno je aktivan enzim, za što se smatra odgovornom fosforilacija tirozina-216 (Y216) (23). Riječ je zapravo o autofosforilaciji tijekom procesa



translacije (24), što ukazuje na to da je GSK3 $\beta$  tijekom svoje sinteze tirozinska kinaza, a nakon završetka translacije poprima funkciju serin-treoninske kinaze (25). Postoje dokazi da i druge kinaze (PYK2 i Fin) te proapoptični signali mogu provesti aktivacijsku fosforilaciju enzima GSK3 $\beta$  na Y216 (26–28). Također, njezini su supstrati u pravilu prethodno fosforilirani djelovanjem neke druge kinaze (engl. *priming phosphorylation*) (29).

Fosforilacijom serina 9 (S9) u N-terminalnoj domeni GSK3 $\beta$  blokira se vezanje supstrata i postiže inaktivacija enzima, u čemu sudjeluju brojni faktori rasta i signalni putovi, koji će biti detaljnije opisani u nastavku (30). Moguće su fosforilacije GSK3 $\beta$  i na drugim položajima, koje također uzrokuju inaktivaciju enzima (31), kao i defosforilacije protein-fosfatazama na položaju S9 koje obnavljaju njegovu katalitičku aktivnost (32).



**Slika 1.** Aktivacija i inaktivacija GSK3 $\beta$

### 4.3. GSK3 $\beta$ kao dio staničnih signalnih putova

#### 4.3.1. Signalni put G-proteini/cAMP/protein-kinaza A (PKA)

Vežanjem glukagona ili adrenalina na svoje receptore aktivira se kaskada posredovana G-proteinima te dolazi do aktivacije adenilat-ciklaze i stvaranja cikličkog AMP-a (cAMP). cAMP veže se na svoja mjesta na regulacijskoj

podjedinici protein-kinaze A (PKA) te se odvaja aktivirana katalitička podjedinica. PKA zatim fosforilira niz staničnih proteina, među kojima je i GSK3 $\beta$ , što dovodi do njegove inaktivacije i posljedične defosforilacije glikogen-sintaze. Defosforilirana glikogen-sintaza neaktivna je te posljedično prestaju procesi glikogeneze i glukoneogeneze, a metabolizam glukoze usmjeren je k njenoj razgradnji u procesu glikolize.

#### 4.3.2. Signalni put PIP3/Akt/mTOR

Inzulin i neki čimbenici rasta svojim vezanjem na odgovarajuće receptore uzrokuju fosforilaciju fosfatidil-inozitol-4',5'-difosfata (PIP2) na položaju 3', uslijed čega nastaje fosfatidil-inozitol-3',4',5'-trifosfat (PIP3). PIP3 djeluje kao drugi glasnik i veže se na kinazu Akt (protein-kinaza B), što međutim nije dovoljno za njezinu aktivaciju. Potrebne su još dvije fosforilacije na dva različita mjesta, od čega jedno fosforilira kinaza PDK1, koju također aktivira PIP3, a drugo mTOR u sklopu kompleksa mTORC2. Sada aktivirani Akt fosforilira svoje supstrate, uključujući GSK3 $\beta$ , koji time inaktivira. Do aktivacije Akt kinaze i posljedične inaktivacije GSK3 $\beta$  može doći i u sklopu odgovora na oštećenje DNA (33). Interakcija Akt i GSK3 $\beta$  nije, međutim, jednosmjerna, nego i GSK3 $\beta$  može aktivacijom fosfataze PP1 posredovati ne samo vlastitu defosforilaciju i reaktivaciju već i defosforilaciju i inaktivaciju Akt (34). Također neka istraživanja pokazuju da GSK3 $\beta$  može aktivirati Akt u odgovoru na vezanje TNF-a (35). Osim toga, više je studija na staničnim linijama humanog karcinoma gušterače pokazalo da visoke razine Akt ne koreliraju uvijek s niskom aktivnošću GSK3 $\beta$ , odnosno ne inhibiraju aktivnost GSK3 $\beta$  u cijelosti (36,37).

#### 4.3.3. Signalni put Wnt

U nepodraženom stanju GSK3 u kompleksu s kazein-kinazom 1 (CK1), proteinom adenomatozne polipoze kolona (APC) i aksinom provodi fosforilaciju  $\beta$ -katenina, nakon čega dolazi do njegove ubikvitinacije i razgradnje u proteasomu. Fosforilacija kreatin-kinazom prethodi onoj posredovanoj GSK3 (38). Vežanje Wnt liganda na Frizzled receptor uzrokuje fosforilaciju proteina Dishevelled, što potiče fosforilaciju LRP. Fosforilacijom LRP otkriva se na njemu vezno mjesto za aksin te dolazi do dezintegracije kompleksa aksin/APC/GSK3/CK1. Posljedično izostaje fosforilacija  $\beta$ -katenina te se on translocira u jezgru, gdje stvara kompleks s transkripcijskim faktorom Tcf/Lef i pretvara ga iz represora u aktivator transkripcije brojnih ciljnih gena uključujući protoonkogene *MYC*, *JUN*, gene za cikline i matriks-metaloproteinaze (*MMP*) te *MDR-1*, gen za p-glikoprotein koji pridonosi rezistenciji na citostatsku terapiju. Osim toga,  $\beta$ -katenin povezuje aktin i (preko  $\alpha$ -katenina) E-kadherin u adherentim spojištima, što doprinosi čvrstoći međustaničnih spojeva (38,39). Gubitak te povezanosti jedna je od karakteristika malignih procesa. Osim tumor-supresorskog učinka fosforilacije  $\beta$ -katenina otkriveno je da GSK3 $\beta$  može fosforilirati i LRP i tako na njemu otkriti mjesto za aksin te potiče proliferaciju (40).

Mutacije gena *GSK3B* zasad nisu pronađene u ljudskim karcinomima, a čini se i da bi za potpunu inaktivaciju mutacijom morale biti zahvaćene obje izoforme enzima, što djeluje manje vjerojatno (41). Osim toga, čini se da je uloga GSK3 $\beta$  u Wnt signalnom putu neovisna o inaktivaciji enzima fosforilacijom serina-9 (42,43), što se objašnjava kao zaštita ovog izrazito važnog puta za proliferaciju stanice od aberantne aktivnosti uzrokovane inaktivacijom GSK3 nekom od kinaza. Također, aksin veže i brojne druge supstrate osim  $\beta$ -katenina (44) i omogućuje njihovu fosforilaciju enzimom GSK3, a i količina aksina u stanici puno je niža od količine

GSK3 (45) te izgleda da je dostupni aksin, a ne aktivnost GSK3 $\beta$ , ograničavajući čimbenik fosforilacije  $\beta$ -katenina ovim enzimom. Ipak, novije istraživanje na staničnim linijama humanog kolorektalnog karcinoma pokazuje smanjenu aktivnost GSK3 $\beta$  i povećanu ekspresiju  $\beta$ -katenina uslijed aktivacije Akt u slučaju povećanog djelovanja PGC-1 $\alpha$ , izostanak tih učinaka u stanicama s *knockdown* PGC-1 $\alpha$  i ponovnu prisutnost kad su *knockdown* stanice transficirane konstitutivno aktivnom Akt kinazom (46). Realna je i mogućnost mutacije APC ili  $\beta$ -katenina kao razlog zašto GSK3 $\beta$  ne može provesti fosforilaciju  $\beta$ -katenina i uzrokovati njegovu razgradnju (20).

#### 4.3.4. Signalni put Hedgehog

Ako na membranski receptor Patched (PTCH) nije vezan jedan od Hedgehog liganda (HH), on inhibira drugi transmembranski protein Smoothed (SMO) priječeći njegovu translokaciju u primarnu ciliju, a nizvodno PKA, CK1 i GSK3 (uz SuFu i Kif7) čine kompleks s jednim od proteina iz obitelji Gli. Gli1 isključivo je aktivator signalnog puta i njegova je ekspresija rezultat aktivnog HH signaliziranja, a funkcija Gli2 i Gli3 ovisna je o situaciji, s time da je Gli2 češće aktivator, a Gli3 češće represor (47). Gli1 nije supstrat GSK3 $\beta$ , dok fosforilacija Gli2 i Gli3 uzrokuje njihovu ubikvitinaciju i proteolitičku hidrolizu u proteasomu. Gli2 uglavnom se posve razgrađuje, a obrađeni Gli3 odlazi u jezgru i djeluje kao represor transkripcije (GliR) (48–50). U slučaju vezanja liganda SMO biva aktiviran, fosforiliraju ga CK1 i PKA te on djeluje na disocijaciju SuFu i Kif7 od Gli, koji aktiviran fosforilacijom drugim kinazama odlazi u jezgru i djeluje kao transkripcijski aktivator. Ciljni geni ovog signalnog puta uključuju komponente samog HH puta *GLI1*, *GLI2*, *PTCH1*, protoonkogene *IGF2* i *MYC* te inhibitor apoptoze *BCL2* (22).

GSK3 $\beta$  djeluje na više komponenti signalnog puta HH. Fosforilirajući Gli2 i Gli3, GSK3 $\beta$  uzrokuje njihovu razgradnju ili poprimanje represorske funkcije te djeluje kao negativni regulator signalnog puta (51,52). Međutim, fosforilirajući SuFu, GSK3 $\beta$  smanjuje njegovu sposobnost vezanja proteina Gli koji posljedično odlazi u jezgru te djeluje kao pozitivni regulator signalnog puta (53).

Suprotno ustaljenom shvaćanju, Trnski i sur. predlažu da GSK3 $\beta$  aktivirana fosforilacijom na Y216 ne može fosforilirati Gli3 te on ne podliježe hidrolizi i u cijeloj duljini kao aktivator (GliA) djeluje na transkripciju ciljnih gena. S druge strane, GSK3 $\beta$  fosforilirana na S9 (što bi trebala biti „neaktivna“ varijanta enzima) provodi odgovarajuću fosforilaciju Gli3 i uzrokuje njegovu proteolizu i prelazak u represorski oblik (54). Ista istraživačka skupina na temelju rada na uzorcima pacijenata i staničnim linijama kolorektalnog karcinoma primjećuje da fosforilacija GSK3 $\beta$  na S9 uzrokovana LiCl kao inhibitorom GSK3 $\beta$  zapravo pridonosi stvaranju kompleksa Gli3-SuFu-GSK3 $\beta$  i klasičnoj fosforilaciji i inaktivaciji Gli3, za razliku od potpunog nestanka enzima u *knockdown* stanicama za GSK3 $\beta$ , što uzrokuje aktivaciju HH signalnog puta (54). Važnost kompleksa Gli3-SuFu-GSK3 $\beta$  za fosforilaciju Gli3 naglašavaju i Kise i sur. (55).

#### 4.3.5. Signalni put NF $\kappa$ B

Vežanje TNF liganda na svoj receptor potiče fosforilaciju molekule I $\kappa$ B, njenu disocijaciju iz kompleksa s NF $\kappa$ B, ubikvitinaciju i razgradnju, a NF $\kappa$ B odlazi u jezgru i potiče transkripciju ciljnih gena (39). Prema istraživanju Takade i sur. na humanim fibroblastima GSK3 $\beta$  igra važnu ulogu i u ovom signalnom putu. Vežanje TNF aktivira GSK3 $\beta$  i pokreće kaskadu aktivacije kinaza: GSK3 $\beta$  aktivira MAP2K, a MAP2K aktivira IKK, koja fosforilira I $\kappa$ B. U fibroblastima s isključenim

genom *GSK3B* nije došlo do prijenosa ovog signala, odnosno fosforilacije I $\kappa$ B i nuklearne translokacije NF $\kappa$ B (35). Osim ovog kanonskog puta, GSK3 $\beta$  fosforilirajući inhibitor p100 uzrokuje njegovu razgradnju i posljedično pozitivno regulira signalni put pospješujući preživljenje stanica multiplog mijeloma (56). S druge strane, GSK3 $\beta$  u astrocitima inhibira IKK i stabilizira I $\kappa$ B, (57) a na HeLa stanicama pokazano je da GSK3 $\beta$  fosforilacijom p65 podjedinice NF $\kappa$ B tu molekulu usmjerava prema ubikvitinaciji i razgradnji, čime preuzima ulogu negativnog regulatora ovog signalnog puta (58).

#### 4.3.6. Signalni put Notch

Notch signalni put uglavnom koči diferencijaciju stanica (59). Aktivacija signalnog puta Notch uzrokuje odvajanje unutarstanične domene receptora Notch (*Notch intracellular domain* – NICD). GSK3 $\beta$  *in vitro* na staničnim linijama sisavaca fosforilacijom u područjima serin/treonin-prolin-serin/treonin stabilizira NICD, uzrokuje njegovu translokaciju u jezgru i transkripcijsku aktivnost (60). Slično je pokazano i na liniji humanih embrionalnih fibroblasta, a istraživanje je provedeno na receptoru Notch1 (61). Međutim, čini se i da GSK3 $\beta$  sprečava recikliranje receptora Notch1 i djeluje kao negativni regulator signalnog puta (62). S Notch2 rezultati također idu u prilog negativne regulacije – GSK3 $\beta$  fosforilira N2ICD (*Notch2 intracellular domain*) i inhibira njegovu transkripcijsku aktivnost (63). Inhibicija Notch3 potiče apoptozu stanica hepatocelularnog karcinoma u odgovoru na sorafenib, a čini se da je taj učinak posljedica inaktivacije GSK3 $\beta$  (64).

#### 4.3.7. Signalni put TGF- $\beta$ i epitelno-mezenhimalna tranzicija

U odgovoru na TGF- $\beta$  kinaza ERK fosforilira i inaktivira GSK3 $\beta$ , a posljedično se stabilizira i nakuplja protein Snail, bitan za epitelno-mezenhimalnu tranziciju

(EMT) (65,66) koja se očituje gubitkom polarnosti epitelnih stanica, sklonosti invazivnom rastu i metastaziranju (20). Suprotno tome, GSK3 $\beta$  može smanjiti osjetljivost stanice na učinak TGF- $\beta$  fosforilacijom Smad3 uz pomoć aksina i njegovim upućivanjem u razgradnju. Na protein Smad2, koji ima užu spektr interakcija s drugim proteinima, GSK3 $\beta$  u bazalnim uvjetima nema učinka (67).

#### 4.3.8. Signalni put p53

GSK3B fosforilira p53 prethodno fosforiliran DNA-protein-kinazom (DNA-PK). Te fosforilacije blokiraju njegovu interakciju s inhibitornim MDM2 i pridonose stabilizaciji p53 i njegovom djelovanju kao aktivatora transkripcije proapoptotičkih gena. Ova je aktivnost specifična za GSK3 $\beta$ , odnosno GSK3 $\alpha$  ne provodi tu fosforilaciju (68). Osim toga, aktivnost GSK3 $\beta$  povećava se kad stupi u interakciju s p53 mehanizmom neovisnim o fosforilaciji (69), a inhibicija GSK3 $\beta$  dovodi do sekvestracije GSK3 $\beta$ , MDM2 i p53 u citoplazmi, gdje p53 ne može potaknuti transkripciju (70). Nasuprot tome, pretpostavlja se da GSK3 $\beta$  može djelovati i antiapoptotički fosforilirajući MDM2 te tako izazvati aktivaciju MDM2 i razgradnju p53 jer se pokazalo da inhibicija GSK3 $\beta$  pridonosi hipofosforilaciji MDM2 i nakupljanju p53 te posljedičnoj apoptozi kao reakciji na izloženost stanice zračenju (71).

#### 4.4. Uloga GSK3 $\beta$ u apoptozi

GSK3 $\beta$  može djelovati i proapoptotički i antiapoptotički ovisno o vrsti stanica, trenutnoj situaciji i stanju signalnih putova (22).

GSK3 $\beta$  potiče apoptozu u stanjima hipoksije (72) i oštećenja DNA (69) inhibicijom signala preživljenja, kao što su CREB i *heat shock factor-1* (73), te aktivacijom

proapoptotičkih transkripcijskih faktora, kao što je p53 (69). Osim toga, GSK3 $\beta$  fosforilacijom proteina Bax djeluje na njegovu lokalizaciju u mitohondriju i proapoptotičku funkciju (74). Inhibicija GSK3 $\beta$  smanjuje količinu i aktivnost Bax (75) i oslobađanje citokroma c iz mitohondrija, koji preko kaspaze 9 aktivira ključnu kaspazu 3 i potiče apoptozu (69), što potvrđuje ulogu GSK3 $\beta$  u promociji apoptoze.

Suprotno gore navedenom, istraživanja malignih stanica leukemije (76) i multiformnog glioblastoma (77) pokazala su da inhibicija GSK3 $\beta$  pridonosi apoptozi uslijed smanjenog djelovanja c-myc i posljedične snižene aktivacije antiapoptotičkog gena *BCL2*, što ukazuje na antiapoptotički učinak enzima GSK3 $\beta$ .

#### **4.5. Uloga GSK3 $\beta$ u autofagiji**

Autofagija je kompleksni mehanizam uključen u razgradnju nepotrebnih ili disfunkcionalnih staničnih komponenata njihovim odvajanjem u autofagosome, koji se stapaju s lizosomima, pri čemu lizosomske hidrolaze konačno provode razgradnju (20). Deficit staničnih nutrijenata često je uzročnik pokretanja autofagije (78). mTOR kinaza središnja je molekula u kontroli autofagije. Ona je senzor unutarstaničnih količina aminokiselina, ATP-a i hormona te djeluje kao inhibitor autofagije (78,79).

GSK3 $\beta$  opire se autofagiji već svojim metaboličkim učinkom poticanja utilizacije glukoze u stanici, a osim toga fosforilacijom proteina raptora (engl. *regulatory-associated protein of mTOR*) povezanog s mTOR u sklopu mTORC1 aktivira taj kompleks i dodatno suprimira autofagiju, kao i izoforma GSK3 $\alpha$  (80).



#### **4.6. GSK3 $\beta$ i stanični ciklus**

GSK3 $\beta$  ima snažan utjecaj na stanični ciklus jer su među njezinim supstratima svi njegovi glavni regulatori (ciklini, ciklin-ovisne kinaze, inhibitori u kontrolnim točkama i transkripcijski čimbenici) (22,81). GSK3 $\beta$  fosforilira cikline D i E ključne za prelazak iz G1 u S-fazu i uzrokuje njihovu razgradnju (82,83). To potvrđuje i otkriće da inhibicija GSK3 $\beta$  u stanicama karcinoma gušterače suprimira fosforilaciju Rb proteina kompleksom ciklin D1/CDK4/6 (84) pa se čini da je GSK3 $\beta$  jedan od promotora staničnog ciklusa. GSK3 $\beta$  fosforilira, međutim, i transkripcijske faktore c-myc i c-fos (promotore prelaska u S-fazu) prethodno fosforilirane kinazom DYRK2 i time potiče njihovu razgradnju (85), zbog čega se istovremeno svrstava i u inhibitore staničnog ciklusa.

#### **4.7. Uloga GSK3 $\beta$ u epitelno-mezenhimalnoj tranziciji i invazivnosti tumora**

Epitelno-mezenhimalna tranzicija obilježena je gubitkom funkcionalnog E-kadherina. Kao što je već spomenuto u poglavlju 4.3.7., GSK3 $\beta$  fosforilacijom inhibira protein Snail, represor transkripcije gena za E-kadherin te posredno povećava ekspresiju E-kadherina, a snižava ekspresiju matriks-metaloproteinaza (MMP) (86), čemu GSK3 $\beta$  pridonosi i poticanjem razgradnje  $\beta$ -katenina. Čini se, dakle, da GSK3 $\beta$  pridonosi očuvanju fenotipa matične stanice kod tumorskih stanica, ali ne umanjuje njihov metastatski potencijal (87). Suprotno tome, Abe i sur. zaključili su da inhibicija GSK3 $\beta$  smanjuje ekspresiju MMP-2 (88).

#### **4.8. GSK3 $\beta$ i rak**

Na temelju dosad navedenog jasno je da je uloga GSK3 $\beta$  u razvoju raka i dalje kontroverzna. Postoje dokazi za tumor-supresorski, kao i za onkogeni učinak

ovog enzima. GSK3 $\beta$  načelno djeluje supresorski na ključne signalne putove koji imaju ulogu u razvoju raka, no učinak enzima često je višestruk na svaki pojedini signalni put pa su neki učinci i proonkogeni. Slično je i s apoptozom; u nekim tumorskim stanicama GSK3 $\beta$  povećava ekspresiju antiapoptotičkog Bcl-2, dok u nekima potiče funkciju proapoptotičkog Bax. Čini se da je utjecaj GSK3 $\beta$  na autofagiju nedvosmislen – GSK3 $\beta$  inhibira taj proces, ali učinak same autofagije nije posve jasan u kontekstu razvoja tumora. Autofagija s jedne strane oslobađa metaboličke prekursore potrebne za tumorski rast ili sintezu ATP-a, što bi djelovalo u smjeru progresije tumora, dok je s druge strane pokazano da su geni odgovorni za ovaj proces u tumorskim stanicama često deletirani, utišani ili mutirani (20,89). Utjecaj GSK3 $\beta$  na stanični ciklus ponovno je dvojak. Sažeto su sva ta svojstva navedena u Tablici 2.

**Tablica 2.** Učinci GSK3 $\beta$  koji pospešuju i inhibiraju tumorski rast i invazivnost

Signalni put ili proces	Pospješenje rasta ili invazivnosti	Inhibicija rasta ili invazivnosti
Wnt	Fosforilacija LRP (40)	Fosforilacija $\beta$ -katenina (39)
HH	Fosforilacija SuFu (53)	Fosforilacija Gli2 i Gli3 (51)
Notch	Fosforilacija N1ICD (60,61)	Fosforilacija N2ICD (63) Sprečavanje recikliranja Notch1 (62)
NF $\kappa$ B	Fosforilacija MAP2K i aktivacija IKK (35) Fosforilacija p100 (56)	Inaktivacija IKK (57) Fosforilacija p65 (58)
TGF- $\beta$	Fosforilacija Smad3 (67)	Fosforilacija Snail (20)

p53	Fosforilacija MDM2 (71)	Fosforilacija TP53 (68)
Apoptoza	Aktivacija Bcl-2 i c-myb (76,77)	Inhibicija CREB i <i>heat shock factor-1</i> (73) Fosforilacija TP53 (68) Aktivacija Bax (74)
Autofagija	Supresija autofagije (80)	
Stanični ciklus	Fosforilacija c-myc i c-fos (85)	Fosforilacija ciklina D i E (82,83)
Stanični metabolizam	Iskorištenje glukoze	-

Učinci GSK3 $\beta$  ispitani su dosad u mnogim tumorima te je, sukladno gore navedenom, u nekima pokazan proonkogeni, a u nekima tumor-supresorski učinak. U Tablici 3. prikazani su ti rezultati.

**Tablica 3.** Učinak GSK3 $\beta$  u humanim malignim tumorima

učinak	tumor	Ref.
Proonkogeni	Multiformni glioblastom	(77)
	Karcinom gušterače	(90,91)
	Kolorektalni karcinom	(36,92)
	Karcinom bubrega	(93)
	Sinovijalni sarkom, fibrosarkom	(88)
Tumor-supresorski	Melanom	(94)
	Karcinom dojke	(95)
	Karcinom usne šupljine	(96)
	Karcinom pluća	(97)

## 5. ULOGA GSK3 $\beta$ U KARCINOMU JAJNIKA

### 5.1. GSK3 $\beta$ kao čimbenik u razvoju karcinoma jajnika

Istraživanje GSK3 $\beta$  kao čimbenika u razvoju karcinoma jajnika počelo je krajem 90-ih godina dvadesetog stoljeća kad je analiza 61 uzorka karcinoma jajnika različitih histoloških tipova u Japanu otkrila da je 33% uzoraka endometrioidnog i 14% uzoraka mucinoznog karcinoma nosilo mutaciju gena za  $\beta$ -katenin. Sve su te mutacije mijenjale serinske i treoninske ostatke koji su potencijalna ciljna mjesta fosforilacije enzimom GSK3 $\beta$ , što je uzrokovalo translokaciju  $\beta$ -katenina u jezgru i njegovu jaku nuklearnu ekspresiju. Prosječna dob takvih pacijentica bila je desetak godina niža od prosječne dobi svih pacijentica uključenih u istraživanje (98). 2003. prva je studija pokazala povećanu ekspresiju GSK3 $\beta$  u adenokarcinomima jajnika. Osim toga uočena je povećana ekspresija  $\beta$ -katenina te smanjena ekspresija APC. Na staničnim linijama karcinoma jajnika pronađena je i nuklearna lokalizacija  $\beta$ -katenina, što nije bio slučaj na uzorcima tkiva karcinoma. To je objašnjeno povećanom ekspresijom E-kadherina koji veže  $\beta$ -katenin u kompleks perimembranskih proteina. Ostalo je pitanje je li  $\beta$ -katenin u razvoj karcinoma jajnika uključen kao transkripcijski aktivator, stabilizator integriteta stanice ili oboje (99). Nadalje, Usongo i sur. nalaze membransku ekspresiju  $\beta$ -katenina u normalnim površinskim stanicama jajnika, dok stimulacija istih stanica Wnt3a ligandom ili inhibicijom GSK3 $\beta$  litijevim kloridom (LiCl) uzrokuje proliferaciju tih stanica i nuklearnu ekspresiju  $\beta$ -katenina, ali, zanimljivo, ne i transkripciju njegovih ciljnih gena (100).

U usporedbi s Wnt putom HH i p53 put relativno su manje zastupljeni u istraživanjima. Pokazano je da inhibicija GSK3 $\beta$  smanjuje ekspresiju aktivatorskog Gli3A i ekspresiju PTCH kao markera aktivnosti HH signalnog puta

(101). Uočeno je da GSK3 $\beta$  u karcinomskim stanicama smanjuje prisutnost tumor-supresorske mikroRNA Let-7, a čini se da je u mehanizam uključen p53. Njegova je ekspresija pak, suprotno očekivanjima, bila manja pri aktivnom GSK3 $\beta$  i povećala se nakon inhibicije GSK3 $\beta$  (102). Moguće je objašnjenje da oštećena regulacija glikozilacije proteina u tumorskim stanicama uzrokuje nakupljanje tih proteina u endoplazmatskom retikulumu i razvoj stresa endoplazmatskog retikuluma. Takvo stanje još nepoznatim mehanizmom potiče aktivnost enzima GSK3 $\beta$ , koji fosforilira p53 na serinu 376, što djeluje kao biljeg za njegovu razgradnju (103). Suprotno tome, istraživanje resveratrola kao induktora apoptoze aktivacijom GSK3 $\beta$ , supresijom N-glikozilacije proteina i izazivanjem stresa u endoplazmatskom retikulumu ukazuje na proapoptotični učinak GSK3 $\beta$  i posljedičnog stresa u endoplazmatskom retikulumu (104).

Wulfskuhle i sur. otkrivaju da ekspresija GSK3 $\beta$  više varira unutar uzoraka istog histološkog tipa nego između različitih tipova te stoga naglašavaju važnost individualnog pristupa svakoj pacijentici (105). Cao i sur. imunohistokemijski određuju ukupnu ekspresiju GSK3 $\beta$ , kao i ekspresiju enzima fosforiliranog na serinu 9 (pGSK3 $\beta$ -S9). I oni nalaze povećanu ukupnu ekspresiju, a ekspresija fosforiliranog oblika razlikovala se u dvije stanične linije uključene u istraživanje. Oni eksperimentalno provode inhibiciju GSK3 $\beta$  litijevim kloridom (LiCl), koji povećava fosforilaciju GSK3 $\beta$  na serinu 9, i spojem SB216763, koji je specifični kompetitivni inhibitor na veznom mjestu enzima za adenzin-trifosfat (ATP). Stoga su očekivani rezultati da su stanice tretirane s LiCl imale povećanu ekspresiju pGSK3 $\beta$ -S9, a one tretirane SB216763 nepromijenjenu. Ukupna ekspresija GSK3 $\beta$  također je ostala nepromijenjena. Broj stanica bio je smanjen nakon inhibicije GSK3 $\beta$  bilo kojim od inhibitora, što je navelo istraživače na zaključak o

ulozi GSK3 $\beta$  kao promotora proliferacije i tumorskog rasta. Osim toga, razine ciklina D bile su značajno niže nakon inhibicije GSK3 $\beta$ , a ponovno su se povećavale nakon transfekcije stanica konstitutivno aktivnom formom GSK3 $\beta$ -S9A. Navedena eksperimentalna opažanja u suprotnosti su s teorijskim očekivanjima da GSK3 $\beta$  fosforilira ciklin D, nakon čega dolazi do njegove razgradnje. Važnost fosforilacije i razgradnje ciklina D (doduše spojem ShetA2 neovisno o enzimu GSK3 $\beta$ ) u zaustavljanju progresije staničnog ciklusa u stanicama karcinoma jajnika, čak i u uvjetima konstitutivne ekspresije ciklina E, naglašavaju i Masamha i Benbrook 2009 (106). Studija Cao i sur. zaključuje stoga da je GSK3 $\beta$  glavna pokretačka sila u razvoju karcinoma jajnika suprotno tradicionalnom poimanju GSK3 $\beta$  kao supresora tumorskog rasta. To je objašnjeno metaboličkim utjecajem GSK3 $\beta$  u vidu smanjene sinteze glikogena i povećane razgradnje glukoze procesom glikolize i njena metaboličkog iskorištenja (107), a poznato je da tumorske stanice imaju veće potrebe za energijom (108) i da u energetske procesima ovise uglavnom o glikolizi (109). Osim toga naglašen je onkogeni učinak GSK3 $\beta$  na NF $\kappa$ B putu (iako je to samo pretpostavka jer utjecaj GSK3 $\beta$  na NF $\kappa$ B put također može biti dvosmjernan) (107). Metabolički efekt inhibicije glikolize važan je segment antitumorskog učinka apatiniba, koji osim toga smanjuje ekspresiju fosforilirane (i aktivne) forme VEGF-receptora 2 i Akt te inaktivne pGSK3 $\beta$ -S9 te dovodi do supresije rasta malignih stanica staničnih linija ovarijskog karcinoma i *in vitro* i *in vivo* presađenih u miša (110). Fu i sur. ponovno imunohistokemijski određuju ekspresiju GSK3 $\beta$  u uzorcima karcinoma jajnika uz ekspresiju aktivne forme fosforilirane na tirozinu 216 pGSK3 $\beta$ -Y216. Kao i prethodnici, pronalaze povećanu ekspresiju GSK3 $\beta$ , ali i povećanu ekspresiju aktivnog oblika pGSK3 $\beta$ -Y216, što snažno sugerira proonkogeni ulogu enzima.

Štoviše, veću ekspresiju GSK3 $\beta$  nalaze u uzorcima pacijentica koje su bile u višem FIGO stadiju i imale veće serumske razine biljega CA-125. Ekspresija aktivne forme pGSK3 $\beta$ -Y216 korelira ne samo s višim FIGO stadijem i višom razinom CA-125 nego i s postojanjem rezidualne tumorske mase i slabijim odgovorom na liječenje kemoterapijom. Usporedbom Kaplan-Meierovih krivulja pacijentica s visokom i niskom ekspresijom GSK3 $\beta$  i pGSK3 $\beta$ -Y216 nađeno je statistički značajno kraće preživljenje u skupinama s visokim ekspresijama. Inhibicija GSK3 $\beta$  na staničnim linijama ponovno dovodi do inhibicije tumorskog rasta, što je pokazano i s transplantatima tumorskih stanica miševima – mase tumora bile su značajno niže kod miševa koji su dobivali LiCl, dok su se volumeni tumora značajno razlikovali tijekom trajanja eksperimenta, ali ne i na njegovu kraju (111).

S obzirom na podatke o povećanoj ekspresiji i pretpostavljenoj hiperaktivnosti GSK3 $\beta$  u karcinomima jajnika više se istraživanja bavilo uzvodnom regulacijom enzima, prvenstveno ekspresijom i aktivnošću kinaze Akt koja fosforilacijom inaktivira GSK3 $\beta$ . Do i sur. istražuju utjecaj peptidnog hormona aktivina A na Akt/GSK3 signalnu kaskadu. Aktivin A jedan je od regulatora razvoja folikula i ekspresije gena za  $\beta$ -lanac folikulostimulacijskog hormona (FSH) (112,113). Djeluje preko Smad proteina (slično kao i TGF- $\beta$ ) ili neovisno o njima preko MAPK i PIP3K (114). Nema utjecaj na proliferaciju normalnih epitelnih stanica jajnika, međutim potiče bujanje karcinomskih stanica (115). Pokazalo se da aktivin A aktivira Akt i posljedično se fosforilira (na serinu 9) i inaktivira GSK3 $\beta$  mnogo izrazitije nego GSK3 $\alpha$ . Imunohistokemijski izražaj pGSK3 $\beta$ -S9 razlikovao se ovisno o malignosti tumora. Benigni tumori eksprimirali su pGSK3 $\beta$ -S9 pretežno samo polarizirano uz apikalne tijesne spojeve, tumori granične

malignosti mješovito (i difuzno i polarizirano), a maligni tumori difuzno. Inaktivacijski status GSK3 $\beta$  korelirao je s preživljenjem tako da su pacijentice s nižom razinom inaktivnog GSK3 $\beta$  preživljavale statistički značajno dulje (116). Ova studija dakle zagovara supresorski učinak GSK3 $\beta$  na razvoj karcinoma jajnika jer njegova inhibicija pridonosi tumorskom rastu. Slično nalaze Cianfrocca i sur. istražujući aktivaciju Akt preko endotelinskog receptora u odgovoru na endotelin-1. Osim fosforilacije i inhibicije GSK3 $\beta$  kaskadom endotelinski receptor  $\rightarrow$   $\beta$ -arrestin  $\rightarrow$  PIP3K  $\rightarrow$  kinaza povezana s integrinima (ILK)  $\rightarrow$  Akt  $\rightarrow$  GSK3 $\beta$ , otkrili su da aktivacija endotelinskog receptora uzrokuje isključenje GSK3 $\beta$  iz kompleksa koji veže i degradira  $\beta$ -katenin (117). Gwak i sur. također su ispitivali utjecaj inhibicije Akt na proliferaciju staničnih linija karcinoma jajnika i otkrili da metformin smanjuje brzinu tumorskog rasta *in vitro*, a predloženi je mehanizam već poznata aktivacija AMPK kinaze metforminom (118), koja fosforilira i inhibira Akt, a to dovodi do smanjenja fosforilacije GSK3 $\beta$  i njene aktivacije. Aktivirana GSK3 $\beta$  tada fosforilira ciklin D i dolazi do njegove razgradnje, kako je i opisano u prethodnom poglavlju (119). Osim već opisanog proapoptotičnog učinka izazivanjem stresa endoplazmatskog retikuluma, resveratrol inhibira i Akt i ERK te tako reaktivira GSK3 $\beta$  na stanicama linije OVCAR-3, što kao posljedicu ima sniženu ekspresiju ciklina D1 i redukciju broja tumorskih stanica (120). I drugi inhibitori Akt (GSK690693, GSK2141795, GDC-0068, MK-2206, AKT-IN-1, AKT-IN-2) postigli su statistički značajnu redukciju tumorske mase u miševa s transplantiranim malignim stanicama podrijetla staničnih linija humanih karcinoma jajnika te su neki od njih ušli u kliničke studije (121).



## 5.2. Uloga GSK3 $\beta$ u EMT, neoangiogenezi i invazivnosti karcinoma jajnika

Sukladno svojem mezotelnom podrijetlu normalne stanice pokrovnog epitela jajnika eksprimiraju mezenhimalni N-kadherin, a ne epitelni E-kadherin (122). Tek stanice zahvaćene metaplazijom eksprimiraju E-kadherin, a E-kadherin u stanicama jajnika može potaknuti EMT (123). Stanice ranih karcinoma također pokazuju ekspresiju E-kadherina, dok stanice uznapredovalih karcinoma, a osobito metastaza imaju nisku ekspresiju (124), što ide u prilog gubitku E-kadherina kao preduvjetu invazivnosti. Smatra se da je Snail uz  $\beta$ -katenin ključan faktor u indukciji EMT, a pacijentice čiji karcinomi pokazuju višu razinu ekspresije Snail imaju i značajno kraće preživljenje (125). Čini se da putovi TGF- $\beta$  i Wnt aktivirani svaki pojedinačno usmjeravaju tumorsku stanicu prema EMT (126), ali zanimljivi su rezultati Mitre i Roya da isti putovi aktivirani zajedno taj proces suprimiraju. Štoviše, o koncentraciji inhibitora GSK3 $\beta$  litijeva klorida ovisi ekspresija  $\beta$ -katenina, a o njoj sudbina procesa EMT. Niže doze LiCl i niže koncentracije  $\beta$ -katenina zaustavljale su EMT, a više doze LiCl i više koncentracije  $\beta$ -katenina poticale su EMT, čak i bez istovremene koaktivacije puta TGF- $\beta$  (127).

Osim već spomenutog proliferacijskog učinka, aktivacija endotelinskog receptora potiče i EMT uslijed inhibicije GSK3 $\beta$  kinazama ILK i Akt, smanjene razgradnje  $\beta$ -katenina i Snail te njihovih transkripcijskih učinaka. Smanjuje se ekspresija E-kadherina i ponovno javlja mezenhimalni N-kadherin (128). Sličan učinak postiže i molekula FOXC2 aktivacijom Akt i/ili ERK u staničnim linijama karcinoma jajnika rezistentnima na cisplatinu (129). Ulogu GSK3 $\beta$  u supresiji EMT potvrđuje i činjenica da spojevi koji smanjuju stupanj fosforilacije GSK3 $\beta$  na serinu 9 i

pridonose njenoj reaktivaciji (emodin, antrakinon izoliran iz biljaka rabarbare i aloe, i molekula sPSB3) inhibiraju EMT na staničnim linijama karcinoma jajnika (130–132), što je nedavno pokazano i za male RNA molekule miR16 i miR203a-3p premda još nije poznat točan molekularni mehanizam preko kojeg reaktiviraju GSK3 $\beta$  (133,134).

Istraživanje Burkhalter i sur. pokazalo je da integrini  $\alpha$ 2,  $\alpha$ 3 i  $\beta$ 1 imaju važnu i kompleksnu ulogu u EMT i kontroli razine  $\beta$ -katenina jer smanjuju membransku ekspresiju E-kadherina (vjerojatno preraspodjelom staničnog E-kadherina jer ne smanjuju njegovu ukupnu ekspresiju), što samo po sebi pospješuje EMT. Osim toga,  $\beta$ -katenin oslobođen iz kompleksa s E-kadherinom odlazi u jezgru i potiče transkripciju ciljnih gena (prvenstveno matriks-metaloproteinaza), što opet ide u prilog EMT i nudi moguće objašnjenje za hiperaktivaciju Wnt puta i bez mutacija ili epigenetskog utišavanja njegovih komponenata (135). Povrh toga, integrin  $\beta$ 1 aktivira ILK kinazu koja fosforilira i inhibira GSK3 $\beta$ , što dalje doprinosi akumulaciji  $\beta$ -katenina. Prema Lu i sur. dio učinka emodina može se objasniti inhibicijom ILK i restitucijom aktivnosti GSK3 $\beta$  (131).

U uvjetima normalne opskrbe kisikom GSK3 $\beta$  suprimira proces neoangiogeneze fosforilirajući hipoksijom induciran faktor 1 (engl. *hypoxia induced factor 1*; Hif1), čime se povećava njegov afinitet prema ubikvitin-ligazi, pri čemu dolazi do ubikvitinacije i razgradnje Hif1. U stanjima hipoksije smanjuje se aktivnost GSK3 $\beta$  te dolazi do stabilizacije Hif1, transkripcije njegovog ciljnog gena *VEGF* i posljedično do angiogeneze (136). Djelujući na susjedne stanice, VEGF aktivira Akt i dodatno suprimira aktivnost GSK3 $\beta$  (137). Uslijed hipoksije pojačano se sintetizira i prijenosnik glukoze GLUT1, a citotoksična aktivnost doksorubicina i cisplatine značajno je reducirana (138).

### 5.3. GSK3 $\beta$ kao čimbenik rezistencije na terapiju

*In vitro* rezultati pokazuju da se ekspresija GSK3 $\beta$  mijenja u malignim stanicama rezistentnima na tri važna kemoterapeutika koji se koriste u terapiji karcinoma jajnika, pa je očekivano da GSK3 $\beta$  ima određenu ulogu u toj rezistenciji (139–141).

#### 5.3.1. Vinkristin

Opetovanim izlaganjem stanica linije SKOV3 vinkristinu dobivena je subpopulacija stanica rezistentnih na ovaj lijek. Molekularnobiološkim metodama pokazano je da su te stanice imale statistički značajno veće razine liganda Wnt5a, survivina i  $\beta$ -katenina te povećanu fosforilaciju Akt i GSK3 $\beta$  (na serinu 9). Utišavanje gena *Wnt5a*, kao i inhibicija PIP3K, uspjeli su smanjiti izražaj survivina i  $\beta$ -katenina te smanjiti razinu fosforilacije kinaza Akt i GSK3 $\beta$ . Čini se da hiperaktivacija Wnt puta smanjenjem aktivnosti GSK3 $\beta$  i nakupljanjem  $\beta$ -katenina pridonosi rezistenciji tumora na vinkristin (139).

#### 5.3.2. Paklitaksel

U stanicama karcinoma jajnika rezistentima na paklitaksel (dobivenim analogno stanicama rezistentnima na vinkristin) uočena je povećana ekspresija proteina Dishevelled, pozitivnog regulatora Wnt puta. Nizvodno je bila povećana fosforilacija GSK3 $\beta$  na serinu 9, kao i ekspresija i nuklearna lokalizacija  $\beta$ -katenina te ekspresija njegovih ciljnih gena uključenih u rezistenciju na kemoterapiju općenito (*MDR1*) i negativnih aktivatora apoptoze (*BCL2*), što se čini ključnim učincima u rezistenciji na lijek. U inhibiciju aktivnosti GSK3 $\beta$  i ovim signalnim mehanizmom uključena je Akt kinaza. Dodavanje inhibitora proteina

Dishevelled, kao i inhibitora Akt, dovelo je do regresije gore opisanih učinaka i reaktivacije GSK3 $\beta$  (140). Druga grupa kineskih znanstvenika izvještava, pak, o povećanoj ukupnoj ekspresiji GSK3 u stanicama rezistentnima na paklitaksel, našavši 4 puta veću ekspresiju GSK3 u rezistentnim stanicama. Budući da stanice linije SKOV3 kojima su se koristili normalno ne eksprimiraju GSK3 $\alpha$  (11), djeluje vjerojatno da bar dio te ekspresije otpada na GSK3 $\beta$ . Međutim, nije određena ekspresija fosforilirane forme, tako da je moguće da je riječ o povećanoj ekspresiji neaktivnoga enzima koja, shodno tome, ne bi pridonosila rezistenciji.

### 5.3.3. Cisplatina

Stanice staničnih linija karcinoma jajnika rezistentne na cisplatinu imale su podjednaku ekspresiju ukupne GSK3 $\beta$  i forme fosforilirane na tirozinu 216 pGSK3B-Y216, ali značajno veću ekspresiju utišane pGSK3 $\beta$ -S9. Ulogu GSK3 $\beta$  u protekciji stanica od rezistencije na cisplatinu dodatno potkrepljuju činjenice da stanice tretirane inhibitorom GSK3 $\beta$  LiCl imaju značajno nižu stopu apoptotske smrti stanica u odgovoru na cisplatinu, da je za takve stanice inhibitorna koncentracija 50 (IC<sub>50</sub>) cisplatine značajno viša te da se opisani učinci poništavaju transfekcijom konstitutivno aktivne forme GSK3 $\beta$ -S9A koja ne podliježe fosforilaciji na serinu 9 (141). Flavonoid iz citrusnog voća tangeretin u *in vitro* uvjetima uspijeva je rezistentim stanicama vratiti svojstvo osjetljivosti na cisplatinu, a taj je učinak bio 60% slabiji u stanicama tretiranim inhibitorom GSK3 $\beta$  (142). Aktivnost GSK3 $\beta$  pokazala se nižom u rezistentnim stanicama i u istraživanju učinka mikroRNA mi-R29 na cisplatinsku rezistenciju, uz povišenu aktivnost ERK, ali nepromijenjenu aktivnost Akt u odnosu na ishodišnu staničnu liniju (143).

#### **5.4. Ekspresija GSK3 $\beta$ kao prognostički čimbenik**

U dosadašnjem tekstu već su izneseni međusobno suprotni rezultati dviju studija koje su se bavile ekspresijom GSK3 $\beta$  kao prognostičkim čimbenikom kod bolesnica s karcinomom jajnika: prema Fu i sur. preživljenje je dulje kod pacijentica s nižim ekspresijama GSK3 $\beta$  i aktivne forme pGSK3 $\beta$ -Y216 (111), dok je prema Do i sur. preživljenje dulje kod pacijentica s nižim ekspresijama neaktivne forme pGSK3 $\beta$ -S9 (116). Treće pak istraživanje, Shin i sur., ograničeno samo na serozne karcinome jajnika, nalazi da je u pacijentica s višom ekspresijom ukupne GSK3 $\beta$  niži udio onih koje su u FIGO stadijima 3 i 4, blizu razine statističke značajnosti od  $p=0,05$ , ali ipak bez nje. Osim toga, za razliku od DNA-PK, Akt3 i p53, čija je povišena ekspresija jasno korelirala s nižim preživljenjem, GSK3 $\beta$  nije se pokazao korisnim biljegom preživljenja jer su pacijentice s povećanom ekspresijom imale nešto više preživljenje, ali ponovno bez statističke značajnosti, u ovom slučaju s puno većom  $p$  vrijednošću od 0,39 (14).

#### **5.5. GSK3 $\beta$ kao meta terapije**

S obzirom na različite pretpostavljene uloge enzima GSK3 $\beta$  u promociji ili zaustavljanju tumorskog rasta različite studije predstavljaju različite strategije terapije usmjerene na GSK3 $\beta$ .

##### **5.5.1. Aktivacija GSK3 $\beta$ kao terapijska strategija**

Već je spomenuto istraživanje u kojem je metforminom inducirana aktivacija AMPK *in vitro* izazvala inhibiciju Akt i obnovu aktivnosti GSK3 $\beta$  te je uslijed toga nađena smanjena ekspresija ciklina D1 zbog povećane razgradnje, kao i zasto

stanica u G1 fazi ciklusa (119). Neovisno o mehanizmu učinka, povoljan utjecaj metformina na preživljenje pacijentica s karcinomom jajnika otkrilo je nekoliko studija (144,145), a potvrđen je u nedavno objavljenom metaanalizi (146).

Inhibitori Akt aktiviraju GSK3 $\beta$ , a desetak njih ušlo je u klinička ispitivanja za liječenje karcinoma jajnika (147).

Osim konvencionalnih lijekova ispitivani su učinci nekih fitokemikalija i lijekova tradicionalne kineske medicine na aktivnost GSK3 $\beta$  u stanicama jajnika i njihova uloga u supresiji tumorskog rasta.

Ekstrakt gljive *Trametes robiniophila* (kineski *huaier*) i fuling zrnca (mješavina biljaka *Aconitum napellus*, *Wolfiporia extensa*, *Patrinia heterophylla* i korijena biljke *Paeonia rubra*), terapijska sredstva kojima se koristi tradicionalna kineska medicina, također djeluju kao inhibitori Akt, reduciraju ekspresiju  $\beta$ -katenina i induciraju apoptozu, dok fuling zrnca dodatno djeluju kao inhibitori signalnog puta TGF- $\beta$  i suprimiraju EMT (148,149).

Polifenol resveratrol, sastojak crnih vina, koji djeluje protuupalno i štiti od oksidacijskog oštećenja, ima više učinaka na redukciju tumorske mase (150). Dokazano je da može inhibirati Akt i ERK i potaknuti ponovnu aktivnost GSK3 $\beta$  *in vitro* na staničnim linijama karcinoma jajnika (120) te potaknuti apoptozu malignih stanica (104).

#### 5.5.2. Inhibicija GSK3 $\beta$ kao terapijska strategija

Više se studija bavilo suprotnom strategijom, inhibicijom GSK3 $\beta$  u uvjetima njegove povećane ekspresije.

Litijev klorid, već spomenut u tekstu, na dva načina inhibira aktivnost GSK3 $\beta$ :

litijev kation natječe se s magnezijevim za vezna mjesta na enzimu, a kako mu je naboj 1+ u usporedbi s magnezijevih 2+, time mijenja gustoću naboja oko enzima. (151) Osim toga, litijev klorid potiče inaktivacijsku fosforilaciju GSK3 $\beta$  na serinu 9 (152). U suprotnosti s rezultatima Cao i sur., koji su opazili smanjen broj stanica i smanjenu ekspresiju ciklina D nakon izlaganja stanica litijevu kloridu, kao i smanjenu tumorsku masu *in vivo* (107), novije istraživanje Novetskyja i sur. izvještava o minimalno značajnoj aktivnosti samog litijeva klorida u redukciji broja stanica te posve beznačajnoj aktivnosti litijeva klorida udruženog s cisplatinom ili paklitakselom. Prema njihovim rezultatima jedino je statistički značajno smanjenje metaboličke aktivnosti stanica, i to nakon izloženosti litijevu kloridu u koncentraciji od 10 mM (kojom su se koristili i Cao i sur.), dok koncentracija LiCl od 1 mM nema nikakvih učinaka (153).

Spoj 9ING41 također potiče fosforilaciju GSK3 $\beta$  na serinu 9, ali djeluje i kao kompetitivni inhibitor veznog mjesta za ATP. Nakon njegove primjene u stanicama linije SKOV3 primijećena je povećana ekspresija ciklina D1, što je u skladu s teorijskim postavkama da inhibicija GSK3 $\beta$  dovodi do stabilizacije i nakupljanja ciklina D1. Međutim, unatoč toj povećanoj ekspresiji ciklina D1, nije došlo do ubrzane proliferacije stanica, nego je, baš naprotiv, pojačan proces apoptoze. 9ING41 uspješno je reducirao tumorsku masu kod miševa s transplantiranim malignim stanicama karcinoma jajnika, a pritom nije izazivao nuspojave bez obzira na put primjene. Primjena litijeva klorida u ovom istraživanju nije reducirala tumorsku masu *in vivo* (154).

(2Z,3E)-6-bromoindirubin-3'-oksim (BIO) kompetitivni je inhibitor GSK3 $\beta$  na veznom mjestu za ATP koji se pokazao djelotvornim u supresiji proliferacije i redukciji broja stanica na staničnim linijama karcinoma dojke, karcinoma

gušterače, osteosarkoma i melanoma (155–158). Yu i Zhao pokazali su da BIO postiže iste učinke i na staničnim linijama karcinoma jajnika, uz smanjenje broja stanica u S i M fazi ciklusa te smanjenje broja invazivnih i migrirajućih stanica, a u pozadini tih učinaka bila je smanjena ekspresija GSK3 $\beta$ ,  $\beta$ -katenina i matriks-metaloproteinaza te odgovarajućih mRNA molekula za te proteine (159).

Slično tome spoj AZD1080 (također kompetitivni inhibitor veznog mjesta za ATP) smanjuje ekspresiju mRNA i proteina GSK3 $\beta$ , CDK1, CDK2, ciklina D1, MMP9 i Bcl-xL, usporava proliferaciju, formiranje filopodija, invazivnost i metastaziranje staničnih linija karcinoma jajnika (160).

Gao i sur. razvili su, pod pretpostavkom da se inhibicija kompetitivnim inhibitorima može nadvladati povećanom količinom supstrata, niz nekompetitivnih odnosno alosteričkih inhibitora enzima GSK3 $\beta$ , od kojih je većina pokazala umjerenu antiproliferacijsku aktivnost na staničnim linijama karcinoma jajnika. Aktivnost ovih spojeva na dvjema staničnim linijama (A2780 i OVCA433) mijenjala se u ovisnosti o broju ugljikovih atoma u njihovoj strukturi, a spoj radnog naziva 20g postizao je najveći antiproliferacijski i proapoptotični učinak na objema ispitanim linijama, kao i najveću specifičnost upravo prema kinazi GSK3 $\beta$ . Njegovi su učinci potvrđeni i *in vivo* na mišjim modelima s transplantiranim tumorskim stanicama humanih staničnih linija karcinoma jajnika (161).

Ursolična kiselina izolirana iz biljke *Oldenlandia diffusa* inducirala je apoptozu u stanicama leukemije, melanoma te karcinoma prostate, dojke i kolona djelujući na različite signalne putove (Akt, NF $\kappa$ B, ERK, c-Jun) i koncentraciju kisikovih radikala (162–166). Na staničnim linijama karcinoma jajnika SKOV3 i A2780 pokazalo se da ursolična kiselina potiče fosforilaciju GSK3 $\beta$  na serinu 9 i njenu inaktivaciju,



stabilizaciju i nakupljanje  $\beta$ -katenina te, iznenađujuće, smanjenu ekspresiju signala za preživljenje stanice (c-Myc i Bcl-xL) i MMP enzima, što u konačnici dovodi do apoptoze i smanjene invazivnosti malignih stanica (167).

Inhibitor GSK3 $\beta$  enzastaurin ušao je u drugu fazu kliničkih ispitivanja u sklopu triju različitih studija, od kojih jedna ima objavljene rezultate: na uzorku od 27 pacijentica s karcinomom jajnika u monoterapiji enzastaurinom nađen je medijani OS (ukupno preživljenje, engl. *overall survival*) od 15,1 mjeseci (istraživanje još traje) i medijani PFS (preživljenje bez progresije bolesti, engl. *progression-free survival*) od svega 1,8 mjeseci, a 12 pacijentica doživjelo je teže nuspojave liječenja (168).

## 6. RASPRAVA I ZAKLJUČAK

Kao i općenito u razvoju tumora, uloga GSK3 $\beta$  ne može se jednoznačno odrediti ni u razvoju karcinoma jajnika jer postoje rezultati znanstvenih istraživanja koji idu u prilog oba shvaćanja. U Tablici 4. sumarno su dani rezultati pregleda literature iz 5. poglavlja ovog rada.

**Tablica 4.** Učinak GSK3 $\beta$  u razvoju karcinoma jajnika

GSK3 $\beta$ kao promotor rasta karcinoma jajnika	GSK3 $\beta$ kao supresor rasta karcinoma jajnika
<ul style="list-style-type: none"><li>- povećana ekspresija GSK3<math>\beta</math> u uzorcima karcinoma (99,107,111)</li><li>- represija supresorske miRNA Let-7 (102)</li><li>- smanjena proliferacija nakon inhibicije GSK3<math>\beta</math> (107)</li><li>- povećana ekspresija aktivne forme pGSK3<math>\beta</math>-Y216 u karcinomskim stanicama (111)</li><li>- veće preživljenje pacijentica s nižom ekspresijom GSK3<math>\beta</math> (111)</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>- mutacije <math>\beta</math>-katenina na mjestu fosforilacije GSK3<math>\beta</math> u karcinomskim stanicama (98)</li><li>- inhibicija GSK3<math>\beta</math> dovodi do proliferacije tumorskih stanica (100,115,117,119,121)</li><li>- veće preživljenje pacijentica s nižom ekspresijom inaktivne pGSK3<math>\beta</math>-S9 (116)</li><li>- inhibicija EMT (94,130,132,134)</li><li>- inhibicija neoangiogeneze (136)</li></ul>

Za rasvjetljavanje uloge GSK3 $\beta$  neophodna su dodatna istraživanja. Na nekima od signalnih putova opisanih u uvodnom prikazu enzima GSK3 $\beta$  nije provedeno nijedno istraživanje funkcije GSK3 $\beta$  na stanicama karcinoma jajnika (npr. Notch), što je potrebno jer ovaj enzim vrši različite uloge ovisno o vrsti stanice. Osim toga, signalni se putovi promatraju izolirano, a tako se gubi mogućnost sagledavanja

GSK3 $\beta$  iz šire perspektive – GSK3 $\beta$  kao enzim s brojnim aktivatorima i represorima te brojnim ciljnim molekulama (supstratima) potencijalno je mjesto interakcije između više različitih signalnih putova (engl. *crosstalk*) (169).

Istraživanja koja se bave ekspresijom GSK3 $\beta$  u karcinomima jajnika uglavnom izvještavaju o povišenoj ekspresiji tog enzima, a jedno je istraživanje osim ukupne ekspresije mjerilo i ekspresiju aktivne forme pGSK3 $\beta$ -Y216 te se iz njegovih rezultata čini da je u karcinomima jajnika povećana i ekspresija i aktivnost GSK3 $\beta$  (111). No, ekspresija inaktivne forme fosforilirane na serinu 9 nije mjerena u ovakvim istraživanjima, a rezultati su konzistentni neovisno o korištenim staničnim linijama. Premda povećana ekspresija ne implicira nužno i povećanu aktivaciju ili aktivnost enzima i premda nisu mjerene ekspresije inaktivne forme na koju teoretski može otpadati velik dio ukupne ekspresije, istraživanja ekspresije GSK3 $\beta$  na staničnim linijama i uzorcima karcinoma jajnika praktički su jednoglasna u ocjeni povećane ekspresije, pretpostavljene povećane aktivnosti i promotorske uloge enzima u razvoju karcinoma (99,107,111).

S druge strane, istraživanja koja su se bavila različitim signalnim putovima koji su dovodili do aktivacije kinaze Akt pretežno zaključuju da je GSK3 $\beta$  zapravo inhibitor tumorskog rasta (116,117) jer aktivacijom Akt dolazi do njegove inhibicije te, prema iznesenome u teorijskom uvodu, stabilizacije i nakupljanja  $\beta$ -katenina, Gli, ciklina D i sl., što zajedno vodi u proliferaciju stanice. Ovakve rezultate potvrđuje smanjenje proliferacije nakon inhibicije Akt nekim od inhibitora i restitucije aktivnosti GSK3 $\beta$  (119). I ovdje su rezultati konzistentni na različitim staničnim linijama korištenima u istraživanjima. Ipak, do aberantne aktivnosti signalnih putova može doći uslijed mutacija sudionika tih putova i uz normalnu aktivnost GSK3 $\beta$ . Primjerice, do povećane ekspresije ciljnih gena Wnt puta može

doći mutacijama gena za  $\beta$ -katenin koje pogađaju ciljna mjesta fosforilacije enzimom GSK3 $\beta$  (98), mutacijama i konstitutivnom aktivnošću pozitivnih regulatora puta (npr. Frizzled), mutacijama ili epigenetskim utišavanjem negativnih regulatora signalnog puta te mutacijama gena koji kodiraju proteine u kompleksu s GSK3 $\beta$  (170). Osim toga, na koncentraciju slobodnog  $\beta$ -katenina utječe i količina E-kadherina (135).

S obzirom na te oprečne rezultate iznenađuje činjenica da je samo istraživanje Caija i sur. iz 2007. koje se bavilo cisplatinom rezistencijom određivalo ekspresiju obiju formi (pGSK3 $\beta$ -S9 i pGSK3 $\beta$ -Y216) na istim uzorcima, a jedina je zapažena razlika između stanica osjetljivih i rezistentnih na cisplatinu bila u povećanoj ekspresiji pGSK3 $\beta$ -S9 u populaciji rezistentnih stanica (141).

Da bi shvaćanje pGSK3 $\beta$ -Y216 kao aktivne i pGSK3 $\beta$ -S9 kao neaktivne forme moglo biti suviše pojednostavljeno, ukazuje detaljniji mehanizam uloge fosforilacije na S9. Fosfatna skupina sa serina 9 upada na vezno mjesto enzima koje prepoznaje fosfatnu skupinu prethodno fosforiliranog supstrata nekom drugom kinazom. Dakle, za prethodno nefosforilirane supstrate, koje GSK3 $\beta$  također može fosforilirati, ovaj mehanizam ne predstavlja inhibiciju aktivnosti GSK3 $\beta$  (45). Nadalje, riječ je o kompeticiji fosfatne skupine na S9 samog enzima s fosfatnom skupinom prethodno fosforiliranog supstrata, odnosno o kompetitivnoj inhibiciji (45), pa je jasno da se takva inhibicija može nadvladati povećanom koncentracijom supstrata. I konačno, fosforilacijski status S9 u dinamičkoj je ravnoteži, odnosno fluktuiru, što znači da fosforilacija S9 ne znači i trajni gubitak aktivnosti enzima GSK3 $\beta$  (45). Na sličnom su tragu ideje da fosforilacija GSK3 $\beta$  na S9 ne utječe na Wnt signalni put (42,43) te da fosforilaciju Gli3 na HH signalnom putu provodi zapravo pGSK3 $\beta$ -S9, a ne pGSK3 $\beta$ -Y216 (54). Čini se i

da GSK3 $\beta$  kao dio proteinskih kompleksa (aksin-APC-CK1-GSK3 $\beta$  i Gli3-SuFu-GSK3 $\beta$ ) ne podliježe inhibiciji fosforilacijom S9. Shvaćanje fosforilacije serina 9 kao fiksnog *on-off* mehanizma moglo bi dakle biti nedovoljno fleksibilno za objašnjenje učinaka GSK3 $\beta$  u genezi tumora. Na tragu toga su i rezultati Mitre i Roya, prema kojima sudbina stanice ovisi o koncentraciji inhibitora GSK3 $\beta$  i  $\beta$ -katenina, pri čemu su se njihove niže razine suprotstavljale tumorskoj invaziji, a više ju poticale. Možda je potrebna kritična razina nakupljenog  $\beta$ -katenina za inicijaciju procesa EMT (127).

U dosadašnjim radovima, unatoč važnosti koja joj se pridaje u patogenezi, GSK3 $\beta$  nije se pokazala jednoznačno korisnom u prognozi pacijentica oboljelih od karcinoma jajnika. Studija koja se bavi ekspresijom, sukladno gore navedenom, nalazi dulje preživljenje kod pacijentica s nižom ekspresijom i aktivnošću (111), a studija koja se bavi kinazom Akt, nalazi dulje preživljenje kod pacijentica s nižim razinama inhibirane GSK3 $\beta$  (116). Treća studija, koja je ispitivala isključivo povezanost ekspresije DNA-PK, TP53, Akt3 i GSK3 $\beta$  s preživljenjem, nije našla statističku značajnost za GSK3 $\beta$ , za razliku od preostalih proteina (14).

U terapiji su i inhibicija i aktivacija GSK3 $\beta$  dale određene rezultate, ali su za oba pristupa potrebne daljnje studije, s jedne strane zbog detaljnijeg utvrđivanja farmakokinetike novih tvari, a s druge strane zbog dvojne uloge GSK3 $\beta$  u tumorskom rastu. Drugim riječima, potreban je oprez da se djelovanjem na GSK3 $\beta$  ne bi izazvale neželjene posljedice inhibicije njenih supresorskih učinaka u slučaju terapijske inhibicije enzima, odnosno poticanja njenih promotorskih učinaka u slučaju aktivacije enzima u svrhu liječenja, pogotovo s obzirom na pretpostavljenu ulogu GSK3 $\beta$  u sprečavanju EMT i zaštiti od razvoja kemorezistencije.

Budući da jednoznačna uloga GSK3 $\beta$  još nije detektirana, potrebna su dodatna istraživanja regulacije aktivnosti ovog enzima te njegove uloge u staničnim procesima i signalnim putovima. Unatoč optimističnim rezultatima terapije usmjerene ka GSK3 $\beta$  *in vitro*, klinička je primjena još u povojima te pri eventualnom ciljanju GSK3 $\beta$  u terapiji karcinoma jajnika treba individualno pristupiti svakoj pacijentici i odvagnuti moguće koristi i štete takvog pristupa.

## 7. LITERATURA

1. Šekerija M, Bubanović L, Novak P, Veltruski J, Glibo M, Stavinoha M, i ostali. Registar za rak Republike Hrvatske. Incidencija raka u Hrvatskoj 2017. Hrv zavod za javno Zdr. 2020.; Bilten 42(42).
2. Health at a Glance: Europe 2018. 2018.
3. Kumar V, Abbas AK, Aster JC. Female Genital System and Breast. U: Robbins Basic Pathology. 10th izd. Amsterdam: Elsevier Ltd; 2018. str. 713–47.
4. Shih IM, Kurman RJ. Ovarian tumorigenesis: a proposed model based on morphological and molecular genetic analysis. *Am J Pathol.* 2004.;164:1511–8.
5. Vang R, Shih I-M, Kurman RJ. Ovarian low-grade and high-grade serous carcinoma: pathogenesis, clinicopathologic and molecular biologic features, and diagnostic problems. *Adv Anat Pathol.* 2009.;16:267–82.
6. Goff B, Mandel L, Drescher C. Development of an ovarian cancer symptom index: possibilities for earlier detection. *Cancer.* 2007.;109:221–7.
7. Hrvatski liječnički zbor. Kliničke upute za dijagnostiku, liječenje i praćenje bolesnica oboljelih od raka jajnika. 385(0).
8. FIGO Ovarian Cancer Staging Effective Jan. 1, 2014.
9. U. S. Preventive Services Task Force. The Guide to Clinical Preventive Services 2010 - 2011: Recommendations of the U.S. Preventive Services Task Force. 2010.;
10. Eisenhauer EA. Real-world evidence in the treatment of ovarian cancer. *Ann Oncol [Internet].* 2017.;28(Supplement 8):viii61–5. Dostupno na:

<http://dx.doi.org/10.1093/annonc/mdx443>

11. Fu Y, Hu D, Qiu J, Xie X, Ye F, Lu WG. Overexpression of glycogen synthase kinase-3 in ovarian carcinoma cells with acquired paclitaxel resistance. *Int J Gynecol Cancer*. 2011.;21(3):439–44.
12. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2015. *CA Cancer J Clin*. 2015.;65(1):5–29.
13. Patel P, Woodgett JR. Glycogen Synthase Kinase 3: A Kinase for All Pathways? [Internet]. 1. izd. Sv. 123, *Current Topics in Developmental Biology*. Elsevier Inc.; 2017. 277–302 str. Dostupno na: <http://dx.doi.org/10.1016/bs.ctdb.2016.11.011>
14. Shin K, Kim KH, Yoon MS, Suh DS, Lee JY, Kim A, i ostali. Expression of interactive genes associated with apoptosis and their prognostic, value for ovarian serous adenocarcinoma. *Adv Clin Exp Med*. 01. svibanj 2016.;25(3):505–11.
15. Naruse K, Ueno M, Satoh T, Nomiyama H, Tei H, Takeda M, i ostali. A YAC contig of the human CC chemokine genes clustered on chromosome 17q11.2. *Genomics*. 1996.;34:236–40.
16. Gillitzer R, Goebeler M. Chemokines in cutaneous wound healing. *J Leukoc Biol*. 2001.;69:513–21.
17. Goodyear A, Jones A, Troyer R, Bielefeldt-Ohmann H, Dow S. Critical protective role for MCP-1 in pneumonic *Burkholderia mallei* infection. *J Immunol*. 2010.;184:1445–54.



18. Fujimoto H, Sangai T, Ishii G, Ikehara A, Nagashima T, Miyazaki M, i ostali. Stromal MCP-1 in mammary tumors induces tumor-associated macrophage infiltration and contributes to tumor progression. *Int J Cancer*. 2009.;125:1276–84.
19. GSK3B Gene - GeneCards [Internet]. Dostupno na: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=GSK3B>
20. Mancinelli R, Carpino G, Petrunaro S, Mammola CL, Tomaipitnca L, Filippini A, i ostali. Multifaceted roles of GSK-3 in cancer and autophagy-related diseases. *Oxid Med Cell Longev*. 2017.;2017.
21. Azoulay-Alfaguter I, Yaffe Y, Licht-Murava A. Distinct molecular regulation of glycogen synthase kinase-3 alpha isozyme controlled by its N-terminal region: functional role in calcium/calpain signaling. *J Biol Chem*. 2011.;286(15):13470–80.
22. Nagini S, Sophia J, Mishra R. Glycogen synthase kinases: Moonlighting proteins with theranostic potential in cancer. *Semin Cancer Biol* [Internet]. 2019.;56(July 2017):25–36. Dostupno na: <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2017.12.010>
23. Cohen P, Frame S. The renaissance of GSK3. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2001.;2(10):769–76.
24. Goc A, Al-Husein B, Katsanevas K, Steinbach A, Lou U, Sabbineni H. Targeting Src-mediated Tyr216 phosphorylation and activation of GSK-3 in prostate cancer cells inhibit prostate cancer progression in vivo and in vitro. *Oncotarget*. 2014.;5:775–87.

25. Cole A, Frame S, Cohen P. Further evidence that the tyrosine phosphorylation of glycogen synthase kinase-3 (GSK3) in mammalian cells is an autophosphorylation event. *Biochem J.* 2004.;377:249–55.
26. McCubrey MA, Steelman LS, Bertrand FE, Davis NM, Sokolosky M, Abrams SL. GSK-3 as a potential target for therapeutic intervention in cancer. *Oncotarget.* 2014.;5:2881–911.
27. Jacobs K. M, Bhave SR, Ferraro DJ, Jaboin JJ, Hallahan DE, Thotala D. GSK-3B: a bifunctional role in cell death pathways. *Int J Cell Biol.* 2012.;
28. Sayas CL, Ariaens A, Ponsioen B, Moolenaar WH. GSK-3 is activated by the tyrosine kinase Pyk2 during LPA1-mediated neurite retraction. *Mol Biol Cell.* 2006.;17:1834–44.
29. Forde JE, Dale TC. Glycogen synthase kinase 3: a key regulator of cell fate. *Cell Mol Life Sci.* 2007.;64(15):1930–44.
30. Frame S, Cohen P, Biondi RM. A common phosphate binding site explains the unique substrate specificity of GSK3 and its inactivation by phosphorylation. *Mol Cell.* 2001.;7:1321–7.
31. Thornton TM, Pedraza-Alva G, Deng B, Wood CD, Aronshtam A, Clements JL. Phosphorylation by p38 MAPK as an alternative pathway for GSK3beta inactivation. *Science (80- ).* 2008.;320:667–70.
32. Bennecib M, Gong CX, Grundke-Iqbal I, Iqbal K. Role of protein-phosphatase - 2A and -1 in the regulation of GSK3, cdk5 and cdc2 and the phosphorylation of tau in rat forebrain. *FEBS Lett.* 2000.;485:87–93.

33. Boehme K, Kulikov R, Blattner C. p53 stabilization in response to DNA damage requires Akt/PKB and DNA-PK. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008.;105:7785–90.
34. Zhang F, Phiel CJ, Spece L, Gurvich N, Klein PS. Inhibitory phosphorylation of glycogen synthase kinase-3 (GSK-3) in response to lithium. Evidence for autoregulation of GSK-3. *J Biol Chem*. 2003.;278:33067–77.
35. Takada Y, Fang X, Jamaluddin MS, Boyd DD, Aggarwal BB. Genetic deletion of glycogen synthase kinase-3 $\beta$  abrogates activation of I $\kappa$ B $\alpha$  kinase, JNK, Akt, and p44/p42 MAPK but potentiates apoptosis induced by tumor necrosis factor. *J Biol Chem*. 2004.;279(38):39541–54.
36. Shakoori A, Ougolkov A, Yu ZW. Deregulated GSK3B activity in colorectal cancer: its association with tumor cell survival and proliferation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005.;334(4):1365–73.
37. Ougolkov A V., Fernandez-Zapico ME, Savoy DN, Urrutia RA, Billadeau DD. Glycogen synthase kinase-3B participates in nuclear factor  $\kappa$ B-mediated gene transcription and cell survival in pancreatic cancer cells. *Cancer Res*. 2005.;65(6):2076–81.
38. Wu G, Huang H, Garcia Abreu J, He X. Inhibition of GSK3 phosphorylation of beta-catenin via phosphorylated PPPSPXS motifs of Wnt coreceptor LRP6. *PLoS One*. 2009.;4:e4926.
39. Cooper GM, Hausman RE. *Stanica-molekularni pristup*. 2010. 603–770 str.
40. Zeng X, Tamai K, Doble B, Li S, Huang H, Habas R, et al. A dual-kinase mechanism for Wnt co-receptor phosphorylation and activation. *Nature*. 2005.;438:873–7.

41. Polakis P. The many ways of Wnt in cancer. *Curr Opin Genet Dev.* 2007.;17:45–51.
42. Ng SS, Mahmoudi T, Danenberg E, Bajaoui I, de Lau W, Korswagen HC, iostali. Phosphatidylinositol 3-kinase signaling does not activate the wnt cascade. *J Biol Chem.* 2009.;284:35308–13.
43. Woodgett JR. Judging a protein by more than its name: GSK-3. *Sci STKE.* 2001.;re12.
44. Kim NG, Xu C, Gumbiner BM. Identification of targets of the Wnt pathway destruction complex in addition to b-catenin. *Proc Natl Acad Sci.* 2009.;106:5165–70.
45. Beurel E, Grieco SF, Jope RS. Glycogen-synthase kinase-3 (GSK3): regulation, actions, and diseases. *Pharmacol Ther.* 2016.;0:114–31.
46. Yun S-H, Park J-I. PGC-1 $\alpha$  Regulates Cell Proliferation and Invasion via AKT/GSK-3 $\beta$ /B-catenin Pathway in Human Colorectal Cancer SW620 and SW480 Cells. *Anticancer Res.* 2020.;40:653–64.
47. Sasaki H, Nishizaki Y, Hui C, Nakafuku M, Kondoh H. Regulation of Gli2 and Gli3 activities by an amino-terminal repression domain: implication of Gli2 and Gli3 as primary mediators of Shh signaling. *Development.* 1999.;126:3915–24.
48. Wang B, Fallon JF, Beachy PA. Hedgehog regulated processing of Gli3 produces anterior/posterior repressor gradient in the developing vertebrate limb. *Cell* 100. 2000.;423–34.
49. Pan Y, Bai CB, Joyner AL, Wang B. Sonic hedgehog signaling regulates Gli2

- transcriptional activity by suppressing its processing and degradation. *Mol Cell Biol.* 2006.;26:3365–77.
50. Bai CB, Auerbach W, Lee JS, Stephen D, Joyner AL. Gli2, but not Gli1, is required for initial Shh signaling and ectopic activation of the Shh pathway. *Dev Camb Engl.* 2002.;129:4753–61.
  51. Kong JH, Siebold C, Rohatgi R. Biochemical mechanisms of vertebrate hedgehog signaling. *Dev.* 2019.;146(10).
  52. Niewiadomski P, Kong JH, Ahrends R, Ma Y, Humke EW, Khan S, i ostali. Gli protein activity is controlled by multi-site phosphorylation in vertebrate Hedgehog signaling. 2015.;6(1):168–81.
  53. Takenaka K, Kise Y, Miki H. GSK3 $\beta$  positively regulates Hedgehog signaling through Sufu in mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007.;353(2):501–8.
  54. Trnski D, Sabol M, Gojević A, Martinić M, Ozretić P, Musani V, i ostali. GSK3 $\beta$  and Gli3 play a role in activation of Hedgehog-Gli pathway in human colon cancer - Targeting GSK3 $\beta$  downregulates the signaling pathway and reduces cell proliferation. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis.* 2015.;1852(12):2574–84.
  55. Kise Y, Morinaka A, Teglund S, Miki H. Sufu recruits GSK3 $\beta$  for efficient processing of Gli3. *Biochem Biophys Res Commun [Internet].* 2009.;387(3):569–74. Dostupno na:  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.07.087>
  56. Busino L, Millman SE, Scotto L, Kyratsous CA, Connor OO, Hoffmann A, i

- ostali. Survival Mechanism in Multiple Myeloma. 2012.;14(4):375–85.
57. Sanchez JF, Sniderhan LF, Williamson AL, Fan S, Chakraborty-Sett S, Maggirwar SB. Glycogen synthase kinase 3 $\beta$ -mediated apoptosis of primary cortical astrocytes involves inhibition of nuclear factor kappaB signaling. *Mol Cell Biol*. 2003.;23(13):4649–62.
58. Schmitz ML, Frank R, Livingstone M, Resch K, Kracht M. Phosphorylation of Serine 468 by GSK-3 $\alpha$  Negatively Regulates Basal p65 NF- $\kappa$ B Activity \*. 2004.;49571–5.
59. Kopan R, Turner DL. The Notch pathway: democracy and aristocracy in the selection of cell fate. *Curr Opin Neurobiol*. 1996.;6(5):594–601.
60. Han X, Ju J hyun, Shin I. Glycogen synthase kinase 3- $\beta$  phosphorylates novel S/T-P-S/T domains in Notch1 intracellular domain and induces its nuclear localization. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 2012.;423(2):282–8. Dostupno na: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.05.111>
61. Foltz DR, Santiago MC, Berechid BE, Nye JS. Glycogen synthase kinase-3 $\beta$  modulates notch signaling and stability. *Curr Biol*. 2002.;12(12):1006–11.
62. Zheng L, Conner SD. Glycogen synthase kinase 3 $\beta$  inhibition enhances Notch1 recycling. *Mol Biol Cell*. 2018.;29(4):389–95.
63. Espinosa L, Inglés-Esteve J, Aguilera C, Bigas A. Phosphorylation by glycogen synthase kinase-3 $\beta$  down-regulates Notch activity, a link for Notch and Wnt pathways. *J Biol Chem*. 2003.;278(34):32227–35.
64. Giovannini C, Baglioni M, Baron Toaldo M, Ventrucci C, D'Adamo S, Cipone M,

- i ostali. Notch3 inhibition enhances sorafenib cytotoxic efficacy by promoting GSK3 $\beta$  phosphorylation and p21 down-regulation in hepatocellular carcinoma. *Oncotarget*. 2013.;4(10):1618–31.
65. Marchetti A, Colletti M, Cozzolino AM, Steindler C, Lunadei M, Mancone C, i ostali. ERK5/MAPK is activated by TGF $\beta$  in hepatocytes and required for the GSK-3 $\beta$ -mediated Snail protein stabilization. *Cell Signal*. 2008.;20(11):2113–8.
66. Li S, Lu J, Chen Y, Xiong N, Li L, Zhang J, i ostali. MCP-1-induced ERK/GSK-3 $\beta$ /Snail signaling facilitates the epithelial-mesenchymal transition and promotes the migration of MCF-7 human breast carcinoma cells. *Cell Mol Immunol*. 2017.;14(7):621–30.
67. Guo X, Ramirez A, Waddell DS, Li Z, Liu X, Wang XF. Axin and GSK3- $\beta$  control Smad3 protein stability and modulate TGF- $\beta$  signaling. *Genes Dev*. 2008.;22(1):106–20.
68. Turenne GA, Price BD. Glycogen synthase kinase3 beta phosphorylates serine 33 of p53 and activates p53's transcriptional activity. *BMC Cell Biol*. 2001.;2.
69. Watcharasit P, Bijur GN, Zmijewski JW. Direct, activating interaction between glycogen synthase kinase-3b and p53 after DNA damage. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002.;99(12):7951–5.
70. Thotala DK, Hallahan DE, Yazlovitskaya EM. Glycogen synthase kinase 3b inhibitors protect hippocampal neurons from radiation-induced apoptosis by regulating MDM2-p53 pathway. *Cell Death Differ*. 2011.;19:387–96.
71. Kulikov R, Boehme K, Blattner C. Glycogen synthase kinase 3-dependent phosphorylation of Mdm2 regulates p53 abundance. *Mol Cell Biol*.

- 2005.;25(16):7170–80.
72. Loberg RD, Vesely E, Brosius FC. Enhanced glycogen synthase kinase 3b activity mediates hypoxia-induced apoptosis of vascular smooth muscle cells and is prevented by glucose transport and metabolism. *J Biol Chem.* 2002.;277(44):41667–73.
73. Grimes CA, Jope RS. The multifaceted roles of glycogen synthase kinase 3b in cellular signaling. *Prog Neurobiol.* 2001.;65(4):391–426.
74. Linsemann DA, Butts BD, Precht TA, Phelps RA, Le SS, Laessig TA, et al. Glycogen synthase kinase-3beta phosphorylates Bax and promotes its mitochondrial localization during neuronal apoptosis. *J Neurosci.* 2004.;24:9993–10002.
75. Thotala DK, Geng L, Dickey AK, Hallahan DE. A new class of molecular targeted radioprotectors: GSK-3B inhibitors. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2010.;76(2):557–65.
76. Zhou F, Zhang L, van Laar T, van Dam H, Ten Dijke P. GSK3B inactivation induces apoptosis of leukemia cells by repressing the function of c-Myb. *Mol Biol Cell.* 2011.;22:3533–40.
77. Kotliarova S, Pastorino S, Kovell LC, Kotliarov Y, Song H, Zhang W, et al. Glycogen synthase kinase-3 inhibition induces glioma cell death through c-MYC, nuclear factor-kappaB, and glucose regulation. *Cancer Res.* 2008.;68:6643–51.
78. Glick D, Barth S, Macleod KF. Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *J Pathol.* 2010.;34(2):3–12.



79. Ziparo E, Petrunaro S, Marini ES, Al. E. Autophagy in prostate cancer and androgen suppression therapy. *Int J Mol Sci.* 2013.;14(6):12090–106.
80. Azoulay-Alfaguter I, Elya R, Avrahami L, Katz A, Eldar-Finkelmann H. Combined regulation of mTORC1 and lysosomal acidification by GSK-3 suppresses autophagy and contributes to cancer cell growth. *Oncogene.* 2015.;34(35):4613–23.
81. McCubrey JA, Rakus D, Gizak A, Steelman LS, Abrams SL, Lertpiriyapong K, i ostali. Effects of mutations in Wnt/ $\beta$ -catenin, hedgehog, Notch and PI3K pathways on GSK-3 activity—Diverse effects on cell growth, metabolism and cancer. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res [Internet].* 2016.;1863(12):2942–76. Dostupno na: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2016.09.004>
82. Mishra R. Glycogen synthase kinase 3 beta: can it be a target for oral cancer. *Mol Cancer.* 2010.;9:144.
83. Welcker M, Singer J, Loeb KR, Grim J, Bloecher A, Gurien-West M-. Multisite phosphorylation by Cdk2 and GSK3 controls cyclin E degradation. *Mol Cell.* 2003.;12:381–92.
84. Kitano A, Shimasaki T, Chikano Y, Nakada M, Hirose M, Higashi T. Aberrant glycogen synthase kinase 3b is involved in pancreatic cancer cell invasion and resistance to therapy. *PLoS One.* 2013.;8:e55289.
85. Taira N, Mimoto R, Kurata M, Yamaguchi T, Kitagawa M, Miki Y, i ostali. DYRK2 priming phosphorylation of c-Jun and c-Myc modulates cell cycle progression in human cancer cells. *J Clin Invest.* 2012.;122(3):859–72.
86. Doble BW, Woodgett JR. Role of glycogen synthase kinase-3 in cell fate and

- epithelial-mesenchymal transitions. *Cells Tissues Organs*. 2007.;185:73–84.
87. Domoto T, Pyko I V., Furuta T, Miyashita K, Uehara M, Shimasaki T. Glycogen synthase kinase-3b is a pivotal mediator of cancer invasion and resistance to therapy. *Cancer Sci*. 2016.;107:1363–72.
  88. Abe K, Yamamoto N, Domoto T, Bolidong D, Hayashi K, Takeuchi A, i ostali. Glycogen synthase kinase 3 $\beta$  as a potential therapeutic target in synovial sarcoma and fibrosarcoma. *Cancer Sci*. 2020.;111(2):429–40.
  89. Kung CP, Budina A, Balaburski G, Bergenstock MK, Murphy M. Autophagy in tumor suppression and cancer therapy. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*. 2011.;21(1):71–100.
  90. Garcea G, Manson MM, Neal CP, Pattenden CJ, Sutton CD, Dennison AR. Glycogen synthase kinase-3 beta: a new target in pancreatic cancer. *Curr Cancer Drug Targets*. 2007.;7:209–15.
  91. Marchand B, Arsenault D, Raymond-Fleury A, Boisvert FM, Boucher MJ. Glycogen synthase kinase-3 (GSK3) inhibition induces prosurvival autophagic signals in human pancreatic cancer cells. *J Biol Chem*. 2015.;290:5592–605.
  92. Shakoory A, Mai W, Miyashita K, Yasumoto K, Takahashi Y, Ooi A. Inhibition of GSK-3 beta activity attenuates proliferation of human colon cancer cells in rodents. *Cancer Sci*. 2007.;98:1388–93.
  93. Pal K, Cao Y, Gaisina IN, Bhattacharya S, Dutta SK, Wang E. Inhibition of GSK-3 induces differentiation and impaired glucose metabolism in renal cancer. *Mol Cancer Ther*. 2014.;13:285–96.

94. Qiu HJ, Lu XH, Yang SS, Weng CY, Zhang EK, Chen FC. MiR-769 promoted cell proliferation in human melanoma by suppressing GSK3B expression. *Biomed Pharmacother.* 2016.;82:117–23.
95. Farago M, Dominguez I, Landesman-Bollag E, Xu X, Rosner A, Cardiff RD. Kinase-inactive glycogen synthase kinase 3beta promotes Wnt signaling and mammary transformation. *Cancer Res.* 2005.;65:5792–801.
96. Mishra R, Nagini S, Rana A. Expression and inactivation of glycogen synthase kinase 3 alpha/beta and their association with the expression of cyclin D1 and p53 in oral squamous cell carcinoma progression. *Mol Cancer.* 2015.;14:20.
97. Zheng H, Saito H, Masuda S, Yang X, Takano Y. Phosphorylated GSK3beta-ser9 and EGFR are good prognostic factors for lung carcinomas. *Anticancer Res.* 2007.;27:3561–9.
98. Sagae S, Kobayashi K, Nishioka Y, Sugimura M, Ishioka S, Nagata M, i ostali. Mutational analysis of  $\beta$ -catenin gene in Japanese ovarian carcinomas: Frequent mutations in endometrioid carcinomas. *Japanese J Cancer Res.* 1999.;90(5):510–5.
99. Rask K, Nilsson A, Brännström M, Carlsson P, Hellberg P, Janson PO, i ostali. Wnt-signalling pathway in ovarian epithelial tumours: Increased expression of  $\beta$ -catenin and GSK3 $\beta$ . *Br J Cancer.* 2003.;89(7):1298–304.
100. Usongo M, Li X, Farookhi R. Activation of the canonical WNT signaling pathway promotes ovarian surface epithelial proliferation without inducing  $\beta$ -catenin/Tcf-mediated reporter expression. *Dev Dyn.* 2013.;242(3):291–300.
101. Ozretić P, Trnski D, Musani V, Maurac I, Kalafatić D, Orešković S, i ostali. Non-

- canonical Hedgehog signaling activation in ovarian borderline tumors and ovarian carcinomas. *Int J Oncol.* 2017.;51(6):1869–77.
102. Guo R, Abdelmohsen K, Morin PJ, Gorospe M. Novel MicroRNA Reporter Uncovers Repression of Let-7 by GSK-3 $\beta$ . *PLoS One.* 2013.;8(6).
103. Stavridi ES, Halazonetis TD. p53 and stress in the ER. *Genes Dev.* 2004.;18:241–4.
104. Gwak HR, Kim S, Dhanasekaran DN, Song YS. Resveratrol triggers ER stress-mediated apoptosis by disrupting N-linked glycosylation of proteins in ovarian cancer cells. *Cancer Lett [Internet].* 2016.;371(2):347–53. Dostupno na: <http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2015.11.032>
105. Wulfschlegel JD, Aquino JA, Calvert VS, Fishman DA, Coukos G, Liotta LA, et al. Signal pathway profiling of ovarian cancer from human tissue specimens using reverse-phase protein microarrays. *Proteomics.* 2003.;3(11):2085–90.
106. Masamha CP, Benbrook DM. Cyclin D1 degradation is sufficient to induce G1 cell cycle arrest despite constitutive expression of cyclin E2 in ovarian cancer cells. *Cancer Res.* 2009.;69(16):6565–72.
107. Cao Q, Lu X, Feng YJ. Glycogen synthase kinase-3 $\beta$  positively regulates the proliferation of human ovarian cancer cells. *Cell Res.* 2006.;16(7):671–7.
108. Macheda ML, Rogers S, Best JD. Molecular and cellular regulation of glucose transporter (GLUT) proteins in cancer. *J Cell Physiol.* 2005.;202:654–62.
109. Gatenby RA, Gawlinski E. The glycolytic phenotype in carcinogenesis and tumor invasion: insights through mathematical models. *Cancer Res.*

- 2003.;63:3847–54.
110. Chen L, Cheng X, Tu W, Qi Z, Li H, Liu F, et al. Apatinib inhibits glycolysis by suppressing the VEGFR2/AKT1/SOX5/GLUT4 signaling pathway in ovarian cancer cells. *Cell Oncol.* 2019.;42(5):679–90.
  111. Fu Y, Wang X, Cheng X, Ye F, Xie X, Lu W. Clinicopathological and biological significance of aberrant activation of glycogen synthase kinase-3 in ovarian cancer. *Onco Targets Ther.* 2014.;7:1159–68.
  112. Thompson TB, Cook RW, Chapman SC, Jardetzky TS, Woodruff TK.  $\beta$ A versus  $\beta$ B: is it merely a matter of expression? *Mol Cell Endocrinol.* 2004.;225:9–17.
  113. Pangas SA, Woodruff TK. Activin signal transduction pathways. *Trends Endocrinol Metab.* 2000.;11:309–14.
  114. Dupont J, McNeilly J, Vaiman A, Canepa S, Combarrous Y, Taragnat C. Activin signaling pathways in ovine pituitary and LH $\beta$ 2 gonadotrope cells. *Biol Reprod.* 2003.;68:1877–87.
  115. Choi KC, Kang SK, Nathwani PS, Cheng KW, Auersperg N, Leung PC. Differential expression of activin/inhibin subunit and activin receptor mRNAs in normal and neoplastic ovarian surface epithelium. *Mol Cell Endocrinol.* 2001.;174:99–110.
  116. Do TV, Kubba LA, Antenos M, Rademaker AW, Sturgis CD, Woodruff TK. The role of activin A and Akt/GSK signaling in ovarian tumor biology. *Endocrinology.* 2008.;149(8):3809–16.

117. Cianfrocca R, Rosanò L, Spinella F, Di Castro V, Natali PG, Bagnato A.  $\beta$ -arrestin-1 mediates the endothelin-1-induced activation of Akt and integrin-linked kinase. *Can J Physiol Pharmacol*. 2010.;88(8):796–801.
118. Pernicova I, Korbonits M. Metformin-mode of action and clinical implications for diabetes and cancer. *Nat Rev Endocrinol*. 2014.;10:143–56.
119. Gwak HR, Kim Y, An H, Dhanasekaran DN, Song YS. Metformin induces degradation of cyclin D1 via AMPK/GSK3 $\beta$  axis in ovarian cancer. *Mol Carcinog*. 2017.;56(2):349–58.
120. Vergara D, Simeone P, Toraldo D, Del Boccio P, Vergaro V, Leporatti S, et al. Resveratrol downregulates Akt/GSK and ERK signalling pathways in OVCAR-3 ovarian cancer cells. *Mol Biosyst*. 2012.;8(4):1078–87.
121. Song M, Bode AM, Dong Z, Lee MH. AKt as a therapeutic target for cancer. *Cancer Res*. 2019.;79(6):1019–31.
122. Peralta Soler A, Knudsen KA, Tecson-Miguel A, McBrearty FX, Han AC, Salazar H. Expression of E-cadherin and N-cadherin in surface epithelial-stromal tumors of the ovary distinguishes mucinous from serous and endometrioid tumors. *Hum Pathol*. 1997.;28(6):734–9.
123. Auersperg N, Pan J, Grove BD, Peterson T, Fisher J, Maines-Bandiera S, et al. E-cadherin induces mesenchymal-to-epithelial transition in human ovarian surface epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999.;96(11):6249–54.
124. Imai T, Horiuchi A, Shiozawa T, Ai E. Elevated expression of E-cadherin and  $\alpha$ - ,  $\beta$ - i  $\gamma$ -catenins in metastatic lesions compared with primary epithelial ovarian carcinomas. *Hum Pathol*. 2004.;35:1469–76.

125. Blechschmidt K, Sassen S, Schmalfeldt B, Schuster T, Hoefler H, Becker KF. The E-cadherin repressor Snail is associated with lower overall survival of ovarian cancer patients. *Br J Cancer*. 2008.;98(2):489–95.
126. Matsumoto T, Yokoi A, Hashimura M, Oguri Y, Akiya M, Saegusa M. TGF- $\beta$ -mediated LEFTY/Akt/GSK-3 $\beta$ /Snail axis modulates epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cell properties in ovarian clear cell carcinomas. *Sv. 57, Molecular Carcinogenesis*. 2018. 957–967 str.
127. Mitra T, Roy SS. Co-activation of TGF $\beta$  and Wnt signalling pathways abrogates EMT in ovarian cancer cells. *Cell Physiol Biochem*. 2017.;41(4):1336–45.
128. Rosanò L, Spinella F, Di Castro V, Nicotra MR, Dedhar S, Garcia De Herreros A, i ostali. Endothelin-1 promotes epithelial-to-mesenchymal transition in human ovarian cancer cells. *Cancer Res*. 2005.;65(24):11649–57.
129. Li C, Ding H, Tian J, Wu L, Wang Y, Xing Y, i ostali. Forkhead Box Protein C2 Promotes Epithelial-Mesenchymal Transition, Migration and Invasion in Cisplatin-Resistant Human Ovarian Cancer Cell Line (SKOV3/CDDP). *Cell Physiol Biochem*. 2016.;39(3):1098–110.
130. Hu C, Dong T, Li R, Lu J, Wei X, Liu P. Emodin inhibits epithelial to mesenchymal transition in epithelial ovarian cancer cells by regulation of GSK-3/-catenin/ZEB1 signaling pathway. *Oncol Rep*. 2016.;35(4):2027–34.
131. Lu J, Xu Y, Wei X, Zhao Z, Xue J, Liu P. Emodin Inhibits the Epithelial to Mesenchymal Transition of Epithelial Ovarian Cancer Cells via ILK/GSK-3  $\beta$  /Slug Signaling Pathway. *Biomed Res Int*. 2016.;2016.
132. Liu Y, Zhou H, Zhu R, Ding F, Li Y, Cao X, i ostali. SPSB3 targets SNAIL for

- degradation in GSK-3 $\beta$  phosphorylation-dependent manner and regulates metastasis. *Oncogene*. 2018.;37(6):768–76.
133. Li N, Yang L, Sun Y, Wu X. MicroRNA-16 inhibits migration and invasion via regulation of the wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway in ovarian cancer. *Oncol Lett*. 2019.;17(3):2631–8.
134. Liu HY, Zhang YY, Zhu BL, Feng FZ, Zhang HT, Yan H, i ostali. MiR-203a-3p regulates the biological behaviors of ovarian cancer cells through mediating the Akt/GSK-3 $\beta$ /Snail signaling pathway by targeting ATM. *J Ovarian Res*. 2019.;12(1):1–13.
135. Burkhalter RJ, Symowicz J, Hudson LG, Gottardi CJ, Stack MS. Integrin regulation of  $\beta$ -catenin signaling in ovarian carcinoma. *J Biol Chem*. 2011.;286(26):23467–75.
136. Cassavaugh JM, Hale SA, Wellman TL, Howe AK, Wong C, Lounsbury KM. Negative regulation of HIF-1 $\alpha$  by an FBW7-mediated degradation pathway during hypoxia. *J Cell Biochem*. 2011.;112(12):3882–90.
137. Kim BR, Lee SH, Park MS, Seo SH, Park YM, Kwon YJ, i ostali. MARCKSL1 exhibits anti-angiogenic effects through suppression of VEGFR-2-dependent Akt/PDK-1/mTOR phosphorylation. *Oncol Rep*. 2016.;35(2):1041–8.
138. Iida Y, Aoki K, Asakura T, Ueda K, Yanaihara N, Takakura S, i ostali. Hypoxia promotes glycogen synthesis and accumulation in human ovarian clear cell carcinoma. *Int J Oncol*. 2012.;40(6):2122–30.
139. Feng-lan WU, Hong-lian C, Xiao-wei HU, Li-ying L, Wan-ling XU. Wnt5a 通过 PI3K / Akt / GSK3 $\beta$  信号通路调控人卵巢癌 SKOV3 / VCR 细胞对长春新碱的敏



- 感性. *Acta Physiol Sin.* 2019.;71(132300410315):415–23.
140. Zhang K, Song H, Yang P, Dai X, Li Y, Wang L, i ostali. Silencing dishevelled-1 sensitizes paclitaxel-resistant human ovarian cancer cells via AKT/GSK-3 $\beta$ / $\beta$ -catenin signalling. *Cell Prolif.* 2015.;48(2):249–58.
141. Cai G, Wang J, Xin X, Ke Z, Luo J. Phosphorylation of glycogen synthase kinase-3  $\beta$  at serine 9 confers cisplatin resistance in ovarian cancer cells. *Int J Oncol.* 2007.;31(3):657–62.
142. Arafa ESA, Zhu Q, Barakat BM, Wani G, Zhao Q, El-Mahdy MA, i ostali. Tangeretin sensitizes cisplatin-resistant human ovarian cancer cells through downregulation of phosphoinositide 3-kinase/Akt signaling pathway. *Cancer Res.* 2009.;69(23):8910–7.
143. Yu PN, Yan M De, Lai HC, Huang RL, Chou YC, Lin WC, i ostali. Downregulation of miR-29 contributes to cisplatin resistance of ovarian cancer cells. *Int J Cancer.* 2014.;134(3):542–51.
144. Kumar S, Meuter A, Thapa P, Langstraat C, Giri S, Chien J, i ostali. Metformin intake is associated with better survival in ovarian cancer: A case-control study. *Cancer.* 2013.;119(3):555–62.
145. Simonelli C, Bertolotti M, Sabbatini P, Berek JS, Pfisterer J, Binaschi M, i ostali. Effect of metformin on recurrence-free survival and overall survival in diabetic patients affected by advanced ovarian cancer. *J Clin Oncol.* 2013.;31(15):supplement.
146. Majidi A, Na R, Dixon-Suen S, Jordan SJ, Webb PM. Common medications and survival in women with ovarian cancer: A systematic review and meta-

- analysis. *Gynecol Oncol* [Internet]. 2020.;(xxxx). Dostupno na:  
<https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2020.03.028>
147.  
<https://clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=Ovarian+Cancer+&term=Akt&cntry=&state=&city=&dist=>.
148. Yan X, Lyu T, Jia N, Yu Y, Hua K, Feng W. Huaier Aqueous Extract Inhibits Ovarian Cancer Cell Motility via the AKT/GSK3 $\beta$ / $\beta$ -Catenin Pathway. *PLoS One*. 2013.;8(5).
149. Tao F, Ruan S, Liu W, Wang L, Xiong Y, Shen M. Fuling granule, a traditional chinese medicine compound, suppresses cell proliferation and TGF $\beta$ -induced EMT in ovarian cancer. *PLoS One*. 2016.;11(12):1–20.
150. Rauf A, Imran M, Butt MS, Nadeem M, Peters DG, Mubarak MS. Resveratrol as an anti-cancer agent: A review. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2018.;58(9):1428–47.
151. Ryves WJ, Harwood AJ. Lithium inhibits glycogen synthase kinase-3 by competition for magnesium. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001.;280:720–5.
152. Li X, Friedman AB, Zhu W, Al. E. Lithium regulates glycogen synthase kinase-3 $\beta$  in human peripheral blood mononuclear cells: implication in the treatment of bipolar disorder. *Biol Psychiatry*. 2007.;61:216–22.
153. Novetsky AP, Thompson DM, Zigelboim I, Thaker PH, Powell MA, Mutch DG, i ostali. Lithium chloride and inhibition of glycogen synthase kinase 3 $\beta$  as a potential therapy for serous ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer*. 2013.;23(2):361–6.

154. Hoda Badr, Cindy L. Carmack, Deborah A. Kashy, Massimo Cristofanilli and TAR. 基因的改变 NIH Public Access. *Bone*. 2011.;23(1):1–7.
155. Nicolaou KA, Liapis V, Evdokiou A, Constantinou C, Magiatis P, Skaltsounis AL, i ostali. Induction of discrete apoptotic pathways by bromo-substituted indirubin derivatives in invasive breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012.;425:76–82.
156. Liu L, Nam S, Tian Y, Yang F, Wu J, Wang Y, i ostali. 6-bromoindirubin-3'-oxime inhibits JAK/STAT3 signaling and induces apoptosis of human melanoma cells. *Cancer Res*. 2011.;71:3972–9.
157. Cao H, Chu Y, Lv X, Qiu P, Liu C, Zhang H, i ostali. GSK3 inhibitor BIO regulates proliferation of immortalized pancreatic mesenchymal stem cells (iPMSCs). *PLoS One*. 2012.;7:e31502.
158. Dastjerdi F V., Zeynali B, Tafreshi AP, Shahraz A, Chavoshi MS, Najafabadi IK, i ostali. Inhibition of GSK-3beta enhances neural differentiation in unrestricted somatic stem cells. *Cell Biol Int*. 2012.;36:967–72.
159. Yu AS, Zhao L. Effects of the GSK-3 $\beta$  inhibitor (2Z,3E)-6-bromoindirubin-3'-oxime upon ovarian cancer cells. *Tumor Biol*. 2016.;37(4):4857–64.
160. Chen S, Sun KX, Feng MX, Sang XB, Liu BL, Zhao Y. Role of glycogen synthase kinase-3 $\beta$  inhibitor AZD1080 in ovarian cancer. *Drug Des Devel Ther*. 2016.;10:1225–32.
161. Gao Y, Ye DY, Zhou WC, Chu Y. The discovery of novel benzothiazinones as highly selective non-ATP competitive glycogen synthase kinase 3 $\beta$  inhibitors for the treatment of ovarian cancer. *Eur J Med Chem [Internet]*. 2017.;135:370–

81. Dostupno na: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.04.039>
162. Kim SH, Ahn BZ, Ryu SY. Antitumor effects of ursolic acid isolated from *Oldenlandia diffusa*. *Phytother Res*. 1998.;12:553–6.
163. Shanmugan MK, Manu KA, Ong TH, Ramachandran L, Surana R, Bist P, iostali. Inhibition of CXCR4/CXCL12 signaling axis by ursolic acid leads to suppression of metastasis in transgenic adenocarcinoma of mouse prostate model. *Int J Cancer*. 2011.;129:1552–63.
164. Kassi E, Sourlingas TG, Spiliotaki M, Papoutsi Z, Pratsinis H, Aligiannis N, iostali. Ursolic acid triggers apoptosis and Bcl-2 downregulation in MCF-7 breast cancer cells. *Cancer Invest*. 2009.;27:723–33.
165. Manu KA, Kuttan G. Ursolic acid induces apoptosis by activating p53 and caspase-3 gene expressions and suppressing NF-kappaB mediated activation of bcl-2 in B16F-10 melanoma cells. *Int Immunopharmacol*. 2008.;8:974–81.
166. Andersson D, Liu JJ, Nilsson A, Duan RD. Ursolic acid inhibits proliferation and stimulates apoptosis in HT29 cells following activation of alkaline sphingomyelinase. *Anticancer Res*. 2003.;23:3317–22.
167. Song YH, Jeong SJ, Kwon HY, Kim B, Kim SH, Yoo DY. Ursolic acid from *Oldenlandia diffusa* induces apoptosis via activation of caspases and phosphorylation of glycogen synthase kinase 3 beta in SK-OV-3 ovarian cancer cells. *Biol Pharm Bull*. 2012.;35(7):1022–8.
168. No Title [Internet]. Dostupno na:  
<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/results/NCT00407758?term=enastaurin&cond=Ovarian+Cancer&draw=2&rank=2>

169. Woodgett JR, Cormier KW. Recent advances in understanding the cellular roles of GSK-3. *F1000Research*. 2017.;6(0):1–7.
170. Nguyen VHL, Hough R, Bernaudo S, Peng C. Wnt/ $\beta$ -catenin signalling in ovarian cancer: Insights into its hyperactivation and function in tumorigenesis. *J Ovarian Res*. 2019.;12(1):122.

## 8. ZAHVALE

Zahvaljujem svojem mentoru doc. dr. sc. Alanu Šermanu na povjerenju, vođenju rada i napomenama pri pisanju.

Veliku zahvalnost dugujem prof. dr. sc. Ljiljani Šerman što mi je omogućila da već nekoliko godina sudjelujem u istraživanjima pod njenim vodstvom te na stalnoj podršci i mnogim savjetima i sugestijama prilikom pisanja ovog diplomskog rada.

Također puno hvala asistentici Valentini Karin-Kujundžić, mag. biol. mol., na vrijednim primjedbama na tekst rada, kao i na nebrojenim satima koje je provela sa mnom u laboratoriju, laboratorijskim metodama kojima me podučila, strpljenju, optimizmu, pomoći i podršci.

Hvala svim kolegicama i kolegama s kojima sam prolazio izazove studija, a posebno Filipu, Luki i Zvonimiru, koji su od kolega postali prijatelji, na lijepim zajedničkim trenutcima, druženjima, izlascima, međusobnoj pomoći i motivaciji.

Hvala Antunu, Blaženki, Teni, Stjepanu, Ani i Tinu što su i tijekom razdoblja studija ostali moji prijatelji, što sam uvijek mogao računati na njih, na razumijevanju, zabavi, dugim razgovorima, druženjima i podršci.

Hvala mami Mariji, tati Ivici, sestri Luciji, baki Kati, teti Barbari i njenoj obitelji te prabaki Slavici na velikoj potpori od početka školovanja do danas.

## 9. ŽIVOTOPIS

Rođen sam u Zagrebu 12. 12. 1995. Osnovnu školu i prirodoslovno-matematičku gimnaziju završio sam u Kutini. Tijekom srednje škole više sam puta bio državni prvak iz hrvatskog jezika i geografije te sam sudjelovao kao član hrvatske reprezentacije na Međunarodnoj geografskoj olimpijadi 2013. u Kyotu i 2014. u Krakovu i na obje osvojio zlatnu medalju.

Medicinski fakultet upisao sam 2014. godine. Od akademske godine 2015./16. bio sam demonstrator na kolegijima Medicinska kemija i biokemija 1 i 2, a od akademske godine 2018./19. i na kolegiju Klinička propedeutika na KB Merkur kod prof. dr. sc. Slobodanke Ostojić Kolonić i doc. dr. sc. Nikole Sobočana. Tijekom studija sudjelovao sam u organizaciji studentskog kongresa *Croatian Student Summit* (CROSS) 14, 15 i 16 kao član i predsjednik Znanstvenog i programskog odbora. Od 2016. godine sudjelovao sam u istraživanjima epigenetičke regulacije puteva Wnt i Hedgehog u karcinomima jajnika i intrauterinom zastoju u rastu na Zavodu za medicinsku biologiju pod mentorstvom prof. dr. sc. Ljiljane Šerman te sam koautor na jednom radu objavljenom u časopisu indeksiranom u CC-u. Dobitnik sam Dekanove nagrade za uspjeh na studiju 2015. godine i Rektorove nagrade za organizaciju kongresa CROSS15 2019. godine.

U slobodno vrijeme volim putovanja i bavim se trčanjem, istrčao sam više utrka na 5 i 10 kilometara te polumaraton u Zagrebu 2019. godine.

Služim se engleskim, njemačkim i talijanskim jezikom i imam vozačku dozvolu B-kategorije.