

# Nove spoznaje o inhibitorima signalnog puta Wnt i njihova uloga u liječenju tumora

---

Aničić, Sara

Master's thesis / Diplomski rad

2021

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:105:495911>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-12**



Repository / Repozitorij:

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



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Sara Aničić**

**Nove spoznaje o inhibitorima signalnog puta  
Wnt i njihova uloga u liječenju tumora**

**DIPLOMSKI RAD**



Zagreb, 2021.

Ovaj diplomski rad izrađen je u Zavodu za biologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom prof.dr.sc. Nives Pećine-Šlaus i predan je na ocjenu u akademskoj godini 2020/2021.

## KRATICE I POJAŠNJENJA

APC – adenomatozna polipoza kolona

BCL9 – eng. B-cell CLL/lymphoma 9 protein

BRAF – B-Raf proto-onkogen

CBP – eng. CREB-binding protein (cAMP response element binding protein); CREB-vezujući protein

CDX – eng. cell line derived xenograft, stanične linije usađene u miševe

CK1 $\alpha$  – kazein kinaza 1 $\alpha$

c-myc – eng. cellular myelocytomatosis oncogene

CTNNB1 – gen za  $\beta$ -katenin

Daam1 – eng. Dishevelled associated activator of morphogenesis 1

DAG – diacilglicerol

Dkk – eng. Dickkopf

DLT – eng. dose limiting toxicity; toksičnost koja je toliko ozbiljna da ograničava povećanje doze ili korištenje primijenjene doze pri kojoj se toksičnost pojavila

DSH/DVL – eng. Dishevelled

FZD – eng. Frizzled

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

IgG1 – imunoglobulin G 1

IL-6 – interleukin 6

IP3 – inozitol-1,4,5-trifosfat

JNK C – Jun N-terminalna kinaza

Ksenograft – model za proučavanje tumora u kojem se stanična linija nekog tumora (CDX) ili tumor direktno deriviran iz pacijenta (PDX) presađuje u imunosuprimiranog miša kako bi se mogao približno procijeniti odnos utjecaja neke terapije na tumor i štetnog utjecaja na zdrav organizam

LEF – eng. lymphoid enhancer factor

LRP 5/6 – eng. low-density lipoprotein receptor-related protein 5/6

MCC – eng. Mutated in Colorectal Cancers (mutiran u kolorektalnim karcinomima)

miRNA – mala jednolančana nekodirajuća RNA molekula - microRNA koja *utišava* RNA post-transkripcijskom regulacijom ekspresije gena

MITF – eng. Melanocyte Inducing Transcription Factor

mRNA – glasnička RNA

MMP7 –matriks metaloproteinaza 7

MTD – maksimalna tolerirana doza

NKD2 – eng. Naked cuticle 2

NLS – eng. nuclear localization sequence; slijed aminokiselina koji "označava" protein za transport u staničnu jezgru

PARP –poli ADP -riboza-polimeraza

PCP – eng. planar cell polarity, planarna polarnost stanica

PDE6 – fosfodiesteraza 6

PDX – eng. patient derived xenograft; tumori presađeni izravno iz pacijenta u miša

PIP2 – fosfatidil-inozitol-bifosfat

PI3K – fosfoinozimid 3 kinaza

PKC – protein kinaza C

PLAGL-2 – eng. PLAG1 Like Zinc Finger 2

PTK7 – protein tirozin kinaza 7

P1NP – eng. Procollagen type I N-terminal propeptide ; prokolagen tip I N-terminalni propeptid

RNF43 – Ring Finger Protein 43

ROCK – eng. Rho-associated kinase; kinaza povezana s Rho

ROR2 – eng. tyrosine kinase-like orphan receptor

RYK – eng. Receptor Like Tyrosine Kinase

SFRP – eng. secreted Frizzled-related protein

Shh – eng. Sonic Hedgehog

shRNA – eng. short hairpin RNA; umjetna RNA molekula obično kodirana DNA vektorom koji se može unijeti u stanice transfekcijom plazmida ili virusnom transdukcijom; može se koristiti za utišavanje ekspresije ciljanog gena putem RNA interferencije

siRNA – eng. small interfering RNA; mala interferirajuća RNA, dvolančana, egzogena (nije kodirana ljudskim genomom za razliku od miRNA), koristi se za utišavanje ekspresije ciljanog gena putem RNA interferencije

Sox9 – eng. SRY-Box transkripcijski faktor 9

TCF – eng. T-cell factor; T-stanični faktor

TERT – eng. Telomerase Reverse Transcriptase; telomerazna reverzna transkriptaza

TGI – inhibicija rasta tumora,  $TGI (\%) = [1 - (RTV \text{ tretirane skupine}) / (RTV \text{ kontrolne skupine})] \times 100 (\%)$ ; gdje je RTV (relativni volumen tumora) = (volumen tumora na dan mjerenja) / (volumen tumora na nulti dan)

TP53 – tumorski protein P53

T / C% – inhibicija rasta tumora;  $T / C\% = [(\text{medijan volumena tumora liječene skupine na dan X}) / (\text{medijan volumena tumora kontrolne skupine na dan X})] \times 100$

VEGF – eng. vascular endothelial growth factor; vaskularni endotelni čimbenik rasta

WIF1 – eng. Wnt inhibitory factor 1; Wnt inhibitorni čimbenik 1

Wnt – Wingless/Integrated

WRE – Wnt response element; element odgovora na Wnt

$\beta$ -TrCP – eng. beta transducin repeats containing protein

$\beta$ -CTX – eng. beta-C-terminal cross-linking telopeptide of type 1 collagen

3'-UTR – eng. 3' untranslated region; 3' neprevođena regija

# SADRŽAJ

SAŽETAK.....	7
SUMMARY .....	8
1.UVOD.....	1
2.SIGNALNI PUT WNT .....	1
3.KANONSKI WNT SIGNALNI PUT .....	2
4.NEKANONSKI WNT SIGNALNI PUTEVI .....	6
5. PROMJENE KOMPONENATA SIGNALNOG PUTA WNT U HUMANIM TUMORIMA .....	7
6. INHIBITORI WNT PUTA .....	12
6.1. INHIBITORI O-palmitoiltransferaze PORCN .....	16
6.2. ANTAGONISTI LIGANADA WNT .....	17
6.3. ANTAGONISTI RECEPTORA FRIZZLED .....	19
6.4. ANTAGONISTI KORECEPTORA LRP.....	22
6.5. INHIBITORI TANKIRAZE .....	24
6.6. MOLEKULE KOJE POJAČAVAJU AKTIVNOST GSK3 $\beta$ .....	27
6.7. MOLEKULE KOJE POTIČU PROTEASOMSKU RAZGRADNJU $\beta$ -KATENINA.....	28
6.8. INHIBITORI PROTEINSKO-PROTEINSKIH INTERAKCIJA $\beta$ -KATENINA S TRANSKRIPCIJSKIM FAKTORIMA I KOAKTIVATORIMA .....	29
6.8.1. INHIBITORI INTERAKCIJE $\beta$ -KATENINA i TCFa .....	29
6.8.2. INHIBITORI INTERAKCIJE $\beta$ -KATENIN i CBP .....	29
6.8.3. INHIBITORI INTERAKCIJE $\beta$ -KATENIN/BCL9.....	31
6.9. INHIBITORI KINAZA CLK.....	31
7. NUSPOJAVE WNT INHIBITORA .....	35
8. KOMBINACIJA WNT INHIBITORA S DRUGIM OBLICIMA ANTITUMORSKE TERAPIJE .....	37
9. ZAKLJUČAK.....	39
10. LITERATURA.....	41
11. ZAHVALE .....	54
12. ŽIVOTOPIS.....	55

# SAŽETAK

Novo spoznaje o inhibitorima signalnog puta Wnt i njihova uloga u liječenju tumora

Sara Aničić

U neprekidnim nastojanjima za poboljšanjem antitumorske terapije, otkrivena je važnost promjena Wnt signalnog puta u tumorima čovjeka i prepoznata ideja da bi se njegovom inhibicijom mogao poboljšati ishod i preživljenje bolesnika. U ljudskom organizmu Wnt signalni put uključen je u regulaciju embrionalnog razvoja, kao i obnovu tkiva i organa u odrasloj dobi. Budući da su komponente Wnt puta često mutirane ili epigenetski promijenjene u tumorima te nerijetko doprinose malignosti i invazivnosti tumora, nove molekule koje inhibiraju taj put pojačano se istražuju. Rezultati prijašnjih istraživanja pokazali su da blokada Wnt puta putem *knockdowna* njegovih komponenata djeluje inhibitoryno na rast tumora *in vivo* i *in vitro*. Stoga se slični efekti nastoje postići primjenom Wnt inhibitora. Uz to, pretpostavlja se da bi inhibicija Wnt puta mogla zaustaviti i epitelno-mezenhimsku tranziciju, proces kojim tumorska stanica stječe invazivni fenotip. U posljednjih tridesetak godina otkrivene su molekule koje mogu inhibirati Wnt signalizaciju djelujući na specifične molekularne ciljeve u signalnom putu Wnt. U ovom pregledu bit će opisani dosad otkriveni inhibitori kanonskog Wnt puta, dosadašnje studije o njihovoj učinkovitosti u monoterapiji ili u kombinaciji s drugim kemoterapeuticima, kao i primijećene nuspojave. Prije svega bit će objašnjen Wnt signalni put i uloga njegovih glavnih komponenata, često mutiranih u tumorima, koje su ujedno i mjesta djelovanja inhibitora. Neke od molekula koje su prepoznate kao inhibitori Wnt puta dospjele su do ranih faza kliničkih ispitivanja, međutim neke od ovih molekula su tek otkrivene i nisu ušle u faze kliničkih ispitivanja te još nemaju svoju primjenu u liječenju humanih tumora. Nadalje, budući da Wnt signalni put osigurava diferencijaciju osteoblasta, kao i regeneraciju mnogih tkiva, posebno onih s brzom izmjenom stanica, poput hematopoetskog i gastrointestinalnog sustava, inhibicija  $\beta$ -katenina nosi određene rizike poput smanjene čvrstoće kostiju, kao i anemiju, neutropeniju, trombocitopeniju, mučninu, proljev i povraćanje. Unatoč tome, rana klinička ispitivanja pokazala su da ozbiljnost ovih nuspojava nije značajna u usporedbi s potencijalnom terapijskom koristi. Iz ovog preglednog rada jasno je vidljivo da inhibicija signalnog puta Wnt ima potencijala za budući razvoj terapijskih djelovanja.

Ključne riječi: signalni put Wnt,  $\beta$ -katenin, Wnt inhibitori, mutacije, tumori



# SUMMARY

Novel findings on Wnt signaling inhibitors and their role in tumor treatment

Sara Aničić

In a continuous search for the improvement of antitumor therapies, the importance of alterations in the Wnt signaling pathway in human tumors was discovered and the idea that its inhibition could improve clinical outcomes and survival of patients was recognized. In the human body, the Wnt signaling pathway is involved in the regulation of embryonic development, as well as tissue and organ regeneration in adulthood. Because the components of the Wnt pathway are often mutated or epigenetically altered in tumors and often contribute to tumor malignancy and invasiveness, new molecules that inhibit this pathway are being intensively investigated. The results of previous studies have shown that blockade of the Wnt pathway by *knockdown* of its components has an inhibitory effect on tumor growth *in vivo* and *in vitro*, so similar effects are expected after the application of Wnt inhibitors. In addition, it is assumed that inhibition of Wnt signaling could stop epithelial-mesenchymal transition cellular process needed for the acquisition of an invasive phenotype. In the last thirty years, molecules that can inhibit Wnt signaling by acting on specific molecular targets in the Wnt pathway have been observed. This review will discuss the inhibitors of the canonical Wnt pathway that have been discovered so far, summarize previous studies on their effectiveness in monotherapy or in combination with other chemotherapeutics and debate on side effects. Primarily the thesis will explain the Wnt signaling pathway and the role of its main components, which are also the site of inhibitor action and the site of frequent mutations in tumors. Some of the molecules identified as Wnt pathway inhibitors have reached earlier stages of clinical trials, however some of these molecules have only just been discovered and have no application in the treatment of human tumors. Furthermore, since the Wnt signaling pathway ensures osteoblast differentiation as well as regeneration of many tissues, especially those with rapid cell turnover, such as the hematopoietic and gastrointestinal systems, inhibition of  $\beta$ -catenin carries certain risks for side effects such as decreased bone strength as well as anemia, neutropenia, thrombocytopenia, nausea, diarrhea and vomiting. Nevertheless, early clinical trials have shown that the severity of these side effects is not significant compared to the potential therapeutic benefits. From this review, it is clear that inhibition of the Wnt signaling pathway has the potential for development of future therapy.

Keywords: Wnt signaling pathway,  $\beta$ -catenin, Wnt inhibitors, mutations, tumors

# 1. UVOD

Signalni put Wnt ima ključnu ulogu u embrionalnom razvoju kao i u obnovi tkiva u odraslom organizmu kroz regulaciju proliferacije, diferencijacije i migracije normalnih stanica organizma.[2] Da bi se mogla održavati pravilna homeostaza tkiva i organa, Wnt signalizacija mora biti vrlo precizno regulirana, a poremećaji pojedinih komponenata ovog puta kao posljedicu mogu imati nastanak ili razvoj raznih vrsta tumora. Kako se krajem 20. stoljeća nepravilna aktivacija puta Wnt počela sve više povezivati s razvojem tumora, porastao je interes za razvoj inhibitora ovog signalnog puta.[3] Dosadašnje inhibitore puta Wnt možemo podijeliti u nekoliko skupina ovisno o njihovom mjestu djelovanja u Wnt signalizaciji. Skupine nisu međutim jasno razgraničene. Također, neki od inhibitora već su upotrebljavani u svrhu liječenja drugih bolesti, a kod nekih je inhibicija puta Wnt samo jedan od nekoliko mehanizama njihovog djelovanja. Glavne skupine čine inhibitori porcupina, antagonisti Wnt-liganada, antagonisti receptora Frizzled, antagonisti koreceptora LRP, inhibitori tankiraze, inhibitori interakcija  $\beta$ -katenina s transkripcijskim koaktivatorima, te inhibitor ekspresije gena uključenih u Wnt signalizaciju. Tu su i molekule koje pojačavaju aktivnost GSK3, kao i molekula koja potiče proteosomsku razgradnju  $\beta$ -katenina. Molekule odnosno lijekovi koji su trenutno podvrgnuti fazi I kliničkih ispitivanja su antagonist Wnt signalizacije - Ipafriccept, antagonisti receptora frizzled (FZD) - Vantictumab i OTSA 101-DTPA-90Y, inhibitori porcupina - LGK974, ETC-159, RXCOO4 i CG1321 te inhibitori interakcije  $\beta$ -katenina s CBP - PRI-724 i CWP232291. [4] [5] [6] [7]

## 2.SIGNALNI PUT WNT

Signalni put Wnt dijeli se na kanonski ili  $\beta$ -kateninski put i dva nekanonska: put planarne polarnosti stanica i Wnt/kalcijski put. [4] Kanonski signalni put Wnt zaslužan je za formiranje tjelesnih osi u embrionalnom razvoju, kao i za morfogenezu udova, CNS-a i drugih organa. [8] [9] U odraslom organizmu ima važnu ulogu u obnovi tkiva iz matičnih stanica, regulaciji proliferacije i diferencijacije stanica.[3] [10][11] Aktivacija kanonskog Wnt puta dovodi do transkripcije Wnt ciljnih gena.

Put planarne polarnosti stanica služi za oblikovanje citoskeleta te polarizaciju stanica uzduž apikalno-bazalne ravnine. I treći tip Wnt signalizacije, kalcijски put, regulira koncentraciju citoplazmatskog kalcija. Kanonski put uključen je u nastanak i razvoj brojnih tumora.[13] Osim kanonskog, pretpostavlja se da i PCP put također ima važnost u patogenezi tumora i stjecanju metastatskih svojstava, upravo zbog njegove uloge u reorganizaciji citoskeleta čime stanice postaju sposobne metastazirati. [14] Budući da postoji 19 različitih Wnt liganada [15] koji mogu aktivirati Wnt signalizaciju, koji od ova tri signalna puta će biti aktiviran vjerojatno prvenstveno ovisi o vrsti samog liganda, kao i prisutnosti pojedinih tipova receptora, koreceptora i ostalih regulatornih molekula. Treba također naglasiti da neki od Wnt liganada mogu aktivirati i kanonski i nekanonske signalne puteve, dok su drugi specifični i aktiviraju isključivo jedan put.

### 3.KANONSKI WNT SIGNALNI PUT

Kanonski Wnt signalni put, kada je aktivan, doprinosi stabilizaciji citoplazmatske koncentracije  $\beta$ -katenina, molekule koja u kompleksu s transkripcijskim faktorima i koaktivatorima TCF, LEF, PYGO, BCL9, p300 i CBP aktivira transkripciju Wnt ciljnih gena [16]. Osim toga  $\beta$ -katenin dio je pričvrstnih međustaničnih spojeva gdje se nalazi vezan za unutarnju stranu E-kadherina, te za  $\alpha$ -katenin koji je povezan s proteinima citoskeleta.

Kada je Wnt put neaktivan, degradirajući kompleks fosforilira slobodni citoplazmatski  $\beta$ -katenin i tako ga čini podložnim za ubikvitinizaciju i degradaciju u proteasomu. [4] [5] [6] [7] Prva komponenta kanonskog signalnog puta Wnt su Wnt ligandi, proteini koji prolaze dvostruku palmitoilaciju pomoću proteina Porcupine te glikozilaciju u endoplazmatskom retikulumu i Golgijevom tijelu, nakon čega se u sekretornim vezikulama secerniraju u izvanstanični prostor. [17] U izvanstaničnom prostoru se sada palmitoilirani glikoproteini Wnt vežu na Frizzled receptore i LRP5/6 koreceptore na membranama vlastite ili stanica u okolini, dakle djelujući parakrino ili autokrino. [10]

Frizzled je receptor koji posjeduje 7 transmembranskih domena i povezan je s G-proteinom. Nakon vezanja Wnt-liganda, dolazi do stvaranja kompleksa Wnt-FZD-LRP i fosforilacije LRP. LRP veže aksin, nakon čega dolazi do hiperfosforilacije proteina Dishevelled (DVL) koji se veže za unutarstanični dio receptora FZD i za aksin pomoću svoje DIX domene. [18] Ovime je aksin izdvojen iz degradacijskog kompleksa te je onemogućeno njegovo uklapanje u kompleks za razgradnju  $\beta$ -katenina tzv. degradacijski kompleks. U normalnim okolnostima degradacijski

se kompleks sastoji od aksina, APC-a, kazein kinaze  $1\alpha$  i glikogen sintaze kinaze  $3\beta$ . [5] [19] [10] Kada je Wnt put neaktivan, prvo CK- $1\alpha$  fosforilira  $\beta$ -katenin na Ser45, a to omogućuje glikogen sintazi kinazi 3 da prepozna taj slijed aminokiselina, te “nizvodno”, prema N-amino kraju  $\beta$ -katenina fosforilira serinske/treoninske ostatke na Thr41, Ser37 i Ser33 mjestu. [20] [21] Fosforilirani Ser33 i Ser37 su vezno mjesto za  $\beta$ -Trcp- E3-ubikvitin ligazu, koja ubikvitinira  $\beta$ -katenin i time ga obilježava za degradaciju u proteasomu.[21] [19] [10]

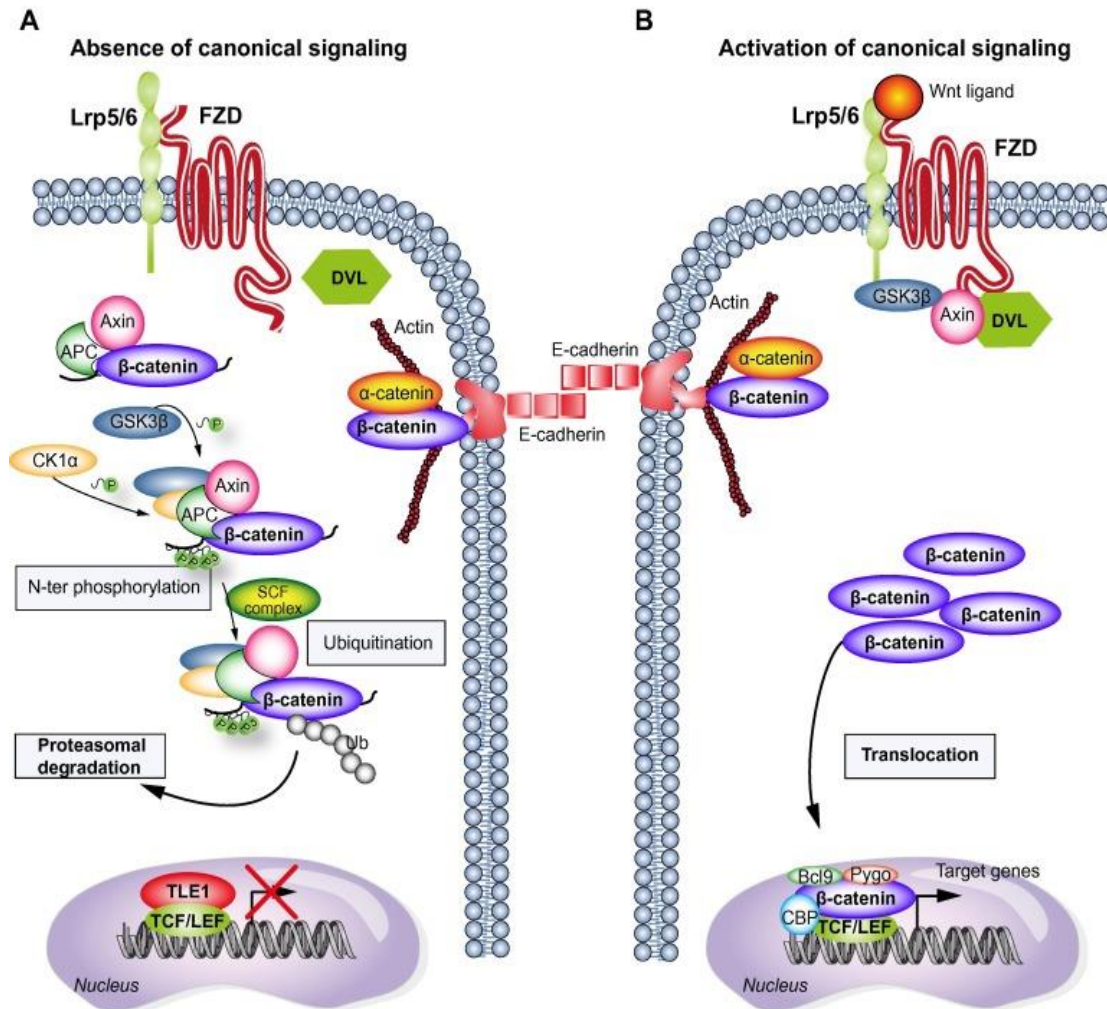
Na N-terminalnoj domeni  $\beta$ -katenina, koja je ujedno i najčešća meta mutacija, nalaze se fosforilacijska mjesta za GSK3 i CK- $1\alpha$  i Bcl9. C-terminalna domena ovog proteina služi za transaktivaciju Wnt ciljnih gena kroz interakciju s transkripcijskim faktorima TCF/LEF. Pomoću svoje domene armadillo, koja se sastoji od 12 armadillo ponavljanja, [22],  $\beta$ -katenin ostvaruje interakcije s E-kadherinom, APC, PYGO, aksinom, a dijelom i TCF-om.

U slučaju kada je Wnt put aktivan, razina  $\beta$ -katenina u citoplazmi se povećava te on prelazi u jezgru, gdje se veže s transkripcijskim faktorima i koaktivatorima i potiče transkripciju Wnt ciljnih gena. [6] [5] (Slika 1) Neki od Wnt ciljnih gena uključeni su u regulaciju staničnog ciklusa (c-myc, N-myc, c-jun, ciklin D1, Sox9) ili u procese koji olakšavaju metastatsko širenje tumora (MMP-7, VEGF), a gen TERT kodira jednu komponentu enzima telomeraze čija aktivnost predstavlja važno obilježje besmrtnih stanica. [23] Aktivacijom ciljnih gena za ciklin D i c-myc, dolazi do povećanja njihove koncentracije što pospješuje prelazak stanice iz G1 u S fazu te time i proliferaciju stanica.[12]

Aktivacija puta Wnt i transkripcijska aktivnost  $\beta$ -katenina ne moraju imati iste posljedice u svim uvjetima i u svim stanicama. Na primjer, mehanizmi kojima matična stanica nekog tkiva “odlučuje” hoće li podleći asimetričnoj ili simetričnoj diobi, koja može ići u smjeru diferencijacije ili očuvanja pluripotentnosti stanice, nisu dovoljno razjašnjeni i vjerojatno ovise o brojnim ulaznim signalima iz okoliša. Postoji hipoteza prema kojoj je jedan od prvih koraka pri odluci o pokretanju diferencijacijskog ili proliferacijskog transkripcijskog programa u Wnt signalizaciji korištenje transkripcijskog koaktivatora CBP umjesto koaktivatora p300. Pod ovom pretpostavkom inhibitori interakcije CBP i katenina trebali bi doprinostiti usmjerenju diferencijacijskog transkripcijskog programa stanice.[24] [3]

Budući da  $\beta$ -katenin ne sadrži slijed aminokiselina potreban za ulazak u jezgru, tzv. NLS (engl. *nuclear localization sequence*), još uvijek se raspravlja o načinu na koji on ulazi u jezgru. Postoje suprotni zaključci nekoliko studija o pitanju direktnog vezanja  $\beta$ -katenina za nukleoporinski kompleks jezgrine ovojnice. Stoga bi inhibitori interakcije  $\beta$ -katenina s

nukleoporinskim kompleksom imali potencijalnu terapijsku korist, no takve molekule još nisu nađene. [25] [26]



Slika 1. Kanonski Wnt signalni put. Prema: Lee Y i sur. (2015.) [42]

Nadalje, poznato je da se  $\beta$ -katenin nalazi vezan za E-kadherin u dimeru s  $\alpha$ -kateninom, dok se u svojoj monomernoj formi veže za transkripcijske faktore. [27] Kao što je već spomenuto, neke domene  $\beta$ -katenina služe istodobno kao vezno mjesto više molekula, kao na primjer domena armadillo koja služi kao vezno mjesto za E-kadherin, ali i za APC i dijelom TCF. Tako bismo potencijalnom inhibicijom tog veznog mjesta za interakciju s TCF-om, mogli prouzročiti disfunkciju međustaničnih spojeva ali isto tako i inhibiciju degradacije  $\beta$ -katenina. [28] Međutim, pokazalo se da vezno mjesto za E-kadherin i TCF nije sasvim identično te da je za vezanje  $\beta$ -katenina za TCF odnosno E-kadherin potrebna različita pozicija armadillo-ponavljanja. Naime, za vezanje  $\beta$ -katenina s TCF potrebna su armadillo ponavljanja od 3. do 10., dok je za vezanje s E-kadherinom potrebno svih 12 armadillo ponavljanja. [29] Osim toga,

dio C-terminalne domene može se vezati s dijelom armadillo domene i tako dovesti do selektivnosti vezanja  $\beta$ -katenina za TCF. Dakle, konformacijska promjena  $\beta$ -katenina kada C-terminalna domena prekriva dio veznog mjesta za E-kadherin dovodi do situacije gdje se  $\beta$ -katenin može vezati samo za TCF. [29] Pretpostavlja se da aktivacija Wnt puta, osim što povećava količinu  $\beta$ -katenina u citoplazmi, uzrokuje i konformacijsku promjenu  $\beta$ -katenina koja favorizira vezanje za TCF u odnosu na E-kadherin. S druge strane, u eksperimentima na miševima je kod delecije dijela C-terminalne domene, zvane helix C, funkcija međustaničnih spojeva bila u potpunosti očuvana, dok je transkripcijska aktivnost  $\beta$ -katenina bila onemogućena. [22] Nadalje, interakcija  $\alpha$ -katenina s N-terminalnom domenom  $\beta$ -katenina dovodi do konformacijske promjene C-terminalne domene koja olakšava vezanje E-kadherina za  $\beta$ -katenin.[30] Zanimljivo je da, nasuprot situaciji kod nekih vrsta nematoda kao što je *Caenorhabditis elegans*, gdje postoje tri različite molekule koje vrše funkcije  $\beta$ -katenina, dvojna uloga  $\beta$ -katenina u sisavaca je ostvarena na ovaj način kako bi se djelomično antagonizirale spomenute oprečne funkcije. [22] [29] Također, prema jednom istraživanju, protein kinaza B (PKB/Akt) može uzrokovati disocijaciju  $\beta$ -katenina iz međustaničnih pričvrstnih spojeva fosforilacijom na mjestu Ser552, nakon čega se on akumulira u citosolu, gdje ga može vezati protein 14-3-3 $\zeta$ . Ovo vezanje potiče njegovu translokaciju u jezgru, ključnu za daljnje djelovanje – transkripciju Wnt ciljnih gena. [28]

Osim dosad spomenutih molekula, također je važno spomenuti da postoji šest obitelji proteina koji djeluju kao izvanstanični inhibitori kanonskog Wnt puta. To su Dickkopf, WIF, SOST/Sclerostin, Cerberus, SFRP te IGFBP4. [10] [31] Naime, ovi proteini, slično kao i Wnt-ligandi, lokalizirani su izvan stanice. DKK-1 i DKK-2 i Sclerostin su proteini koji se vežu za LRP5 i 6 te djeluju kao antagonisti Wnt puta, te se često karakteriziraju kao tumor supresorski proteini. Obitelj glikoproteina SFRP obuhvaća SFRP1, 2, 3, 4 i 5. Njihove dvije domene, *cysteine rich domain* (CRD) te *netrin-related motif* (NTR), omogućuju im da se vežu za Wnt ligande i onemogućuju vezanje Wnt liganada za receptore FZD. [133] Također, proteini SFRP mogu stvarati i neaktivne komplekse sa samim receptorom FZD, što sprječava vezanje Wnt liganada na ovaj receptor. [31]

## 4.NEKANONSKI WNT SIGNALNI PUTEVI

U nekanonske Wnt signalne puteve spadaju put planarne polarnosti stanica (PCP) i kalcijски Wnt put. Nekanonski Wnt putevi bit će vrlo kratko opisani s obzirom da se radi o ograncima Wnt signalizacije koji nisu dovoljno proučeni i poznati. Put planarne polarnosti stanica počinje vezanjem Wnt (Wnt4,Wnt5a,Wnt10a, Wnt10b, Wnt11) liganda za FZD i koreceptor ROR2,PTK7 ili RYK, što aktivira protein DVL. Treba uočiti da ovdje nije potreban LRP koreceptor. Dolazi do formiranja kompleksa DVL s proteinom Daam-1. Taj kompleks stupa u interakciju s WGEF koji aktivira malu GTP-azu Rho, koja zatim aktivira Rho-associated-kinazu (ROCK). S druge strane, DVL preko DEP domene, neovisno o Daam-1, aktivira drugu malu GTP-azu, Rac1, a posljedično i kinazu JNK. ROCK i JNK reguliraju polimerizaciju aktina. [34] [33] [32][10] [86]

Kalcijски Wnt put utječe na unutarstaničnu koncentraciju kalcijevih iona, preko njihovog izlaska iz endoplazmatskog retikuluma, što također ima ulogu u razvojnim procesima i međustaničnoj adheziji. Signalizacija se ostvaruje na sljedeći način. Ligandi koji započinju prijenos signala u ovoj inačici puta su Wnt5a i FZD2. Wnt/FZD preko G-proteina aktivira fosfolipazu C, koja cijepa PIP2 na diacilglicerol i inozitol trifosfat. DAG ostaje u membrani gdje aktivira protein kinazu C, dok IP3 stimulira otvaranje kalcijskih kanala na endoplazmatskom retikulumu. S druge strane, Wnt/FZD aktivira i cGMP-specifičnu fosfodiesterazu PDE6, koja hidrolizom cGMP-a te smanjenjem njegove koncentracije onemogućuje djelovanje cGMP-ovisne protein kinaze (PKG) i tako dodatno pojačava izlazak kalcijevih iona iz endoplazmatskog retikuluma. Povećana koncentracija kalcija može preko aktivacije nekoliko proteinskih kinaza dalje utjecati na stanične procese kao što su regulacija staničnog ciklusa, međustanična adhezija i promjene morfologije citoskeleta. [2] [33] [10]

## 5. PROMJENE KOMPONENATA SIGNALNOG PUTA WNT U HUMANIM TUMORIMA

Wnt signalni put neispravno je aktivan u brojnim tumorima, uključujući kolorektalni karcinom, karcinom dojke, glioblastom, melanom, karcinom pankreasa i mnoge druge.

Iako nije upitna presudna uloga Wnt puta u održavanju i proliferaciji normalnih matičnih stanica organizma, što se dokazalo na stanicama intestinalnog sustava kao i dlačnih folikula, koje gube kapacitet samoobnavljanja pri inhibiciji Wnt puta [35][36], njegova uloga u obnavljanju tumorskih masa iz subpopulacije tumorskih matičnih stanica još uvijek je kontroverzna. Smanjenje klonogenosti inhibicijom Wnt puta uočeno je u studijama provedenim na raznim vrstama tumora. [37] [38] [39] [40] [41] [23] Osim toga, Wnt signalizacija ima ulogu u tumorskoj invazivnosti i procesima metastaziranja budući da  $\beta$ -katenin tvori pričvrstne međustanične spojeve koji se raspadaju prilikom stanične pokretljivosti.  $\beta$ -katenin također aktivira transkripcijske represore Slug i Snail, koji smanjuju ekspresiju E-kadherina i tako potiču epitelno mezenhimsku tranziciju. [18][132] Stoga, mutacije molekularnih sudionika signalnog puta Wnt sudjeluju i u epitelno-mezenhimskoj tranziciji, gdje stanice gube dodir sa svojim okolišem i stječu sposobnost metastaziranja.[23]

Promjene u aktivnosti Wnt signalnog puta povezane su s raznim tumorima, ali i drugim bolestima u ljudi koje uključuju bolesti kostiju, neurodegenerativne bolesti, shizofreniju i artritis.[3][6] Što se tiče promjena komponenata Wnt puta u zloćudnim tumorima, one mogu biti mutacijske ili nemutacijske. Nemutacijske obuhvaćaju epigenetske promjene - metilaciju DNA, modifikaciju histona i RNA interferenciju. Promjene koje potiču rast i invazivnost tumora najčešće dovode do gubitka funkcije komponenata koje djeluju kao negativni regulatori Wnt puta ili do prekomjerne ekspresije komponenata koje djeluju aktivirajuće na put Wnt. Najčešće mutacije Wnt signalnog puta u tumorima općenito su mutacije gena APC te N-terminalne domene  $\beta$ -katenina. Mutantni protein APC nema sposobnost vezanja aksina i razgradnje  $\beta$ -katenina. Mutacija u egzonu 3 CTNNB1 gena čini 90% mutacija ovog gena u tumorima, a dovodi do promjene u N-terminalnoj domeni  $\beta$ -katenina kojom  $\beta$ -katenin gubi ključna mjesta za djelovanja enzima degradacijskog kompleksa. Ovime je onemogućena razgradnja  $\beta$ -katenina zbog čega dolazi do porasta njegove koncentracije. [132] U slijedećim odjeljcima ovog poglavlja ukratko ću navesti najčešće tipove tumora u čiju etiologiju je uključen signalni put Wnt, s naglaskom na tumore glijalnog podrijetla.



Prve otkrivene mutacije u tumorskom tkivu bile su u kolorektalnim tumorima, pa otuda potječe i ime gena APC (adenomatozna polipoza kolona). Mutacije gena APC prisutne su u oko 85% kolorektalnih tumora, dok je kod 50% tumora koji ne sadrže APC mutaciju prisutna aktivirajuća mutacija  $\beta$ -katenina. [23] S druge strane, mutacije u genu RNF43, identificirane su u do 18% kolorektalnih karcinoma i međusobno isključive s APC mutacijom. RNF43 kodira E3 ubikvitin ligazu koja ubikvitinira Frizzled receptore i inhibira Wnt put. [49] Mutacija barem jedne regulatorne komponente puta Wnt prisutna je u preko 93% kolorektalnih karcinoma [49], a povećana razina nuklearnog  $\beta$ -katenina povezana je s lošijom prognozom [50]. Mutacije gena APC naročito su važne u kolorektalnom karcinomu koji nastaje iz polipa, gdje ih nalazimo u sporadičnom, kao i nasljednom obliku. [6] Nadalje, epigenetičke promjene na razini miRNA su također uključene u razvoj kolorektalnog karcinoma. U kolorektalnom karcinomu, u odnosu na zdravo tkivo crijeva, prisutna je povećana razina određenih miRNA koje interferiraju s ekspresijom gena Wnt puta. Na primjer, za miR-494 pokazalo se da se direktno vezuje za 3'-UTR regiju mRNA za APC, smanjuje ekspresiju proteina APC što u konačnici potiče proliferaciju stanica kolorektalnog karcinoma. Sve u svemu, prekomjerna aktivacija Wnt puta prisutna je u značajnom postotku kolorektalnih karcinoma. [51] [52] [53]

Sljedeći karcinom u kojem signalizacija Wnt igra važnu ulogu je svakako i karcinom dojke. Istraživanja su pokazala da je signalni put Wnt aktivan u preko 50% ispitanih karcinoma dojke, što je bilo povezano s lošijim preživljenjem. Najviše je aktivan u trostruko negativnim karcinomima dojke, gdje su najčešće hiperekspimirani Wnt ligandi i receptori, dok su secernirani Wnt antagonisti hipoekspimirani. Sam  $\beta$ -katenin je međutim rijetko mutiran u karcinomima dojke. [23]

Splicing mutacije koje ometaju ispravno izrezivanje introna u procesima splicinga primarnog transkripta za LRP nađene su u 85% karcinoma dojke i dovode do aktivacije puta Wnt. Također su nađene i delecije gena antagonista Wnt puta, DKK-1, DKK-3, WIF1, SFRP5, APC, GSK3B, MCC i CTNNBIP1, u 32-44% ispitanih uzoraka, a metilacije promotora antagonista Wnt puta u 40-68% karcinoma dojke. Postoji mala nekodirajuća mikroRNA, miR-221/222 koja ometa transkripciju antagonista Wnt puta, među kojima su WIF1, SFRP2, DKK2 te AXIN2. [7] Promjene u Wnt putu također su pronađene i u premalignom fibroepitelnom tumoru dojke. [7] Pokazano je također da je put Wnt najaktivniji u matičnim stanicama karcinoma dojke u odnosu na ostatak tumorske mase. Studije pokazuju da je gubitak Wnt1 smanjio formaciju sfera, struktura koje stvaraju tumorske matične stanice, i ekspresiju markera tumorskih matičnih stanica – CD44/CD24, ALDH1 i Sca-1. [10]

Preklinička istraživanja pokazala su prekomjernu ekspresiju gena FZD 6, 7 i 8 u trostruko-negativnim karcinomima dojke što je bilo povezano s lošijim preživljenjem, invazivnošću i karakteristikama matičnih stanica tumora. Pacijenti s trostruko-negativnim karcinomom dojke s neispravnim kanonskim Wnt putom imaju veće šanse za razvoj plućnih i moždanih metastaza. [54] U trostruko-negativnim karcinomima dojke identificirano je preko dvadeset endogenih miRNA, a za neke od njih pretpostavlja se da na posttranskripcijskoj razini reguliraju ekspresiju gena Wnt signalizacije. Primjerice, prekomjerna ekspresija miR-374a dovela je do supresije gena WIF1 i PTEN i poticanja epitelno mezenhimske tranzicije u staničnim linijama trostruko-negativnog karcinoma dojke. S druge strane, indukcija miR-340 suprimirala je ekspresiju CTNNB1, MYC, ROCK1 i SOX2 gena te je povezana sa smanjenom invazivnošću i proliferacijom, a istovremeno je njezina razina smanjena u trostruko-negativnim karcinomima dojke. MiR-218-5p hiperekspimirana je u trostruko-negativnim karcinomima dojke kao i u koštanih metastaza pacijentica s karcinomom dojke. Primjena anti-miR-218-5p dovela je do smanjenja aktivacije Wnt puta, antiproliferativnog učinka *in vitro* i smanjenja rasta tumora *in vivo*, dok je transfekcija miR-218-5p rezultirala suprotnim učincima. [54]

Međutim, promjene Wnt puta nisu u svim tumorima povezane s lošijom prognozom. Naime, više studija ukazuje na manje invazivan fenotip i povećanje stope preživljenja kod pacijenata s melanomom s povećanom razinom  $\beta$ -katenina u jezgri. [55] [23] Ovo se tumači različitim utjecajem aktivacije Wnt puta u različitim vrstama stanica ovisno o prisutnosti različitih transkripcijskih faktora; među ostalim, transkripcijskog faktora MITF specifičnog za stanice melanocitnog podrijetla. [56] Nasuprot tome, rezultati druge studije pokazuju da, neovisno o prisutnosti mutacije gena MAPK, primarni kožni melanomi s istodobnom mutacijom gena CTNNB1 pokazuju više proliferativnih obilježja (veća dubina prodora po Breslowu, veći mitotski indeks i ulceracije) nego oni s divljim tipom CTNNB1 gena. [131] Također naglašava se važnost ne-kanonskog puta planarne polarnosti stanica u progresiji melanoma. Naime, aktivacija Wnt5a/ROR2 inducira neku vrstu reverzibilne senescencije u stanicama melanoma, pri čemu je stanica pojačano kemorezistentna i radiorezistentna, a ima povećan motilitet i sekreciju proinflammatoryh i proangiogenih citokina kao što je IL-6. Uz to, Wnt5a preko aktivacije Wnt kalcijevog puta potiče epitelno-mezenhimsku tranziciju i metastaziranje melanoma. [33] [23] [56]

Osim melanoma, postoji još jedan tip tumora gdje je Wnt aktivacija povezana s dobrom prognozom. Radi se o meduloblastomima u pedijatrijskoj populaciji. Mutacija fosforilacijskog mjesta  $\beta$ -katenina u egzonu 3 prisutna je u 18-22% svih meduloblastoma, a u još 5% prisutne

su mutacije u genima APC ili AXIN1. [42] Meduloblastomi s ovim, ali i drugim, rjeđim mutacijama koje aktiviraju put Wnt, čine Wnt-pozitivnu podgrupu meduloblastoma. Mutacija  $\beta$ -katenina u meduloblastomima dovodi do poremećaja fosforilacije i razgradnje  $\beta$ -katenina te do konstitutivne aktivacije puta Wnt. [42] Međutim, od četiri podgrupe meduloblastoma, Wnt-pozitivna podgrupa ima najbolju prognozu što se tiče recidiva i metastaza, i petogodišnje preživljenje koje iznosi 95%. [85]

Treba spomenuti i ostale tipove tumora u kojima je Wnt signalizacija neispravna i koji bi mogli profitirati od primjene inhibitornih molekula.

Znanstvena istraživanja koja se bave ulogom Wnt signalizacije u hepatocelularnom karcinomu pokazala su da je u oko 25-50% hepatocelularnih karcinoma prisutna prekomjerna Wnt aktivacija. Najčešće su promijenjeni geni AXIN1 ili CTNNB1, dok promjene gena APC nisu česte kod ovih tumora. [49] Međutim, različite studije koje povezuju Wnt aktivaciju s prognozom pacijenata s hepatocelularnim karcinomom došle su do različitih zaključaka. [84] Prema podacima s cBioportala, baze podataka o molekularnim promjenama u humanim karcinomima (<https://www.cbioportal.org/>), od 998 pacijenata s hepatocelularnim karcinomom ili adenomom, 28% imalo je mutaciju u genu za  $\beta$ -katenin, a petogodišnje preživljenje iznosilo je 66.26% kod skupine s CTNNB1 mutacijom u usporedbi s 61.20% kod skupine bez mutacije (<https://bit.ly/3gmvwW3>, pristupljeno dana 9.5.2021.).

Što se tiče tumora prostate pokazano je da je transkripcijski kofaktor LEF1 prekomjerno izražen u oko 50% tumora prostate. Wnt-aktivirajuće promjene u APC i CTNNB1 genima prisutne su u do 22% na kastraciju rezistentnih karcinoma prostate. [57]

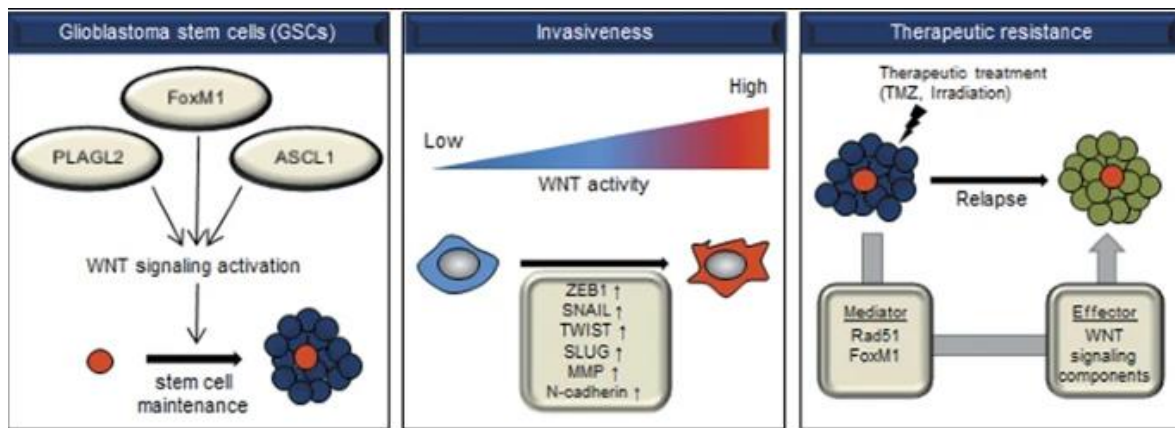
U oko 10-15% karcinoma pankreasa prisutna je *loss-of-function* mutacija RNF4 koja kodira već spomenutu E3 ubikvitin ligazu, što dovodi do povećanja broja Frizzled receptora na membrani. [58]

I na kraju pregleda relevantnih tumora svakako treba opisati gliome. Gliomi su najčešći intrakranijski tumori, a često su nažalost otporni na terapiju. Mogu se podijeliti u astrocitome, oligodendrogliome i ependimome. Svaki od tih tipova tumora dijeli se još i u četiri stupnja prema malignosti, od kojih je najmaligniji oblik stupanj IV tj. glioblastom. Kako signalni put Wnt ima važnu ulogu u održavanju i proliferaciji neuralnih matičnih stanica, pretpostavljeno je da je isti signalni put važan i za proliferaciju matičnih stanica glioma i glioblastoma. [42] Više istraživanja pokazalo je da je prekomjerna aktivacija kanonskog Wnt puta uključena u proces razvoja glioma i povezana s njihovom lošijom prognozom [18,43]. U istraživanju provedenom

na astrocitomima različitog stupnja malignosti utvrđeno je da je SFRP1 gen hipermetiliran u 32% uzoraka, a proteinska ekspresija SFRP1 bila je smanjena u 45.8% uzoraka. Hipermetilacija SFRP1 kao i pojačana ekspresija LEF1 bile su povezane s većim gradusom tumora. [44] Također, neke od komponenata drugih signalnih puteva kao što su TCTP, KPNB1 te LGK4 hiperekspimirani su u gliomima i ostvaruju svoje proliferativne učinke kroz aktivaciju kanonskog Wnt puta [43]. Osim promjena na razini DNA, pretpostavlja se da su u etiopatogenezu ovih tumora uključene i male miRNA molekule koje mijenjaju ekspresiju ciljnih molekula Wnt puta. Među ostalim, miR-155 i miR-92b aktiviraju kanonski Wnt put i potiču proliferaciju stanica glioma, a miRNA-27a potiče progresiju i invazivnost glioma. Nadalje, pokazano je da miR-1249 potiče proliferaciju glioma tako da sprječava translaciju mRNA za APC. Neke druge miRNA, na primjer miRNA-216a, miR-202, miR-139-5p te miR-202 pokazuju suprotan učinak – inhibiraju Wnt put i negativno djeluju na rast tumora. [43]

Glioblastomi su tumori s najlošijom prognozom od svih primarnih tumora središnjeg živčanog sustava, a odlikuje ih znatna intertumoralna, kao i intratumoralna heterogenost, pri čemu tumor u različitim subpopulacijama svojih stanica sadrži raznovrsne mutacije. Pretpostavlja se da je aktivacija Wnt puta važna u održavanju i proliferaciji matičnih stanica glioblastoma, kao i njegovoj lokalnoj invazivnosti i infiltrativnosti te indukciji kemorezistencije i radiorezistencije. [45][42] (Slika 2) Kao što sam već prethodno spomenula, pokazalo se da u glioblastomima za aktivaciju Wnt puta epigenetske promjene imaju važniju ulogu od samih mutacijskih promjena. Primjerice opisano je epigenetsko stišavanje negativnih regulatora - hipermetilacija promotorskih regija gena WIF1 te SFRP, DKK-1 i obitelji Naked. [46] [134] Hipermetilacija promotora gena SFRP1, SFRP2 i NKD2 koji kodiraju inhibirajuće proteine, nađena u oko 40% *de novo* glioblastoma (glioblastoma koji nisu nastali progresijom iz glioma nižeg gradusa), a sličan metilacijski status prisutan je i u glioblastomima koji su nastali iz glioma, tzv. sekundarnim glioblastomima. Hipermetilacija promotora DKK1 nađena je u 60% glioblastoma nastalih iz glioma, [45][42] dok su Wnt3a, Wnt5a, FZD 2,6 i 7 bili pojačano ekspimirani u glioblastomima i gliomima II i III gradusa. Također je pokazano da ekspresija Wnt1,  $\beta$ -katenina i ciklina D1 korelira s gradusom glioma. [19] Wnt5a ligand preko aktivacije ne-kanonskog Wnt puta potiče migraciju stanica glioblastoma, dok mišji *knockdown* istoga gena inhibira migratornu sposobnost stanica glioma. [47] U glioblastomima je nađena povećana ekspresija molekula koje pozitivno djeluju na aktivaciju puta Wnt ili potiču nuklearnu translokaciju  $\beta$ -katenina, primjerice PLAGL-2. PLAGL-2 ima i direktne i indirektne (preko aktivacije kanonskog Wnt puta) utjecaje na proliferaciju matičnih stanica glioblastoma.

Sumirajući gore navedene nalaze možemo reći da su u tumorigenezi glioblastoma značajnije promjene komponenata na početku signalnog puta Wnt, te da se većinom radi o epigenetskim promjenama, a ujedno su to većinom promjene koje mogu aktivirati i kanonski i nekanonski put. Zanimljivo je napomenuti da su imunohistokemijske analize pokazale prekomjernu ekspresiju komponenata i kanonskog i nekanonskog puta Wnt u infiltrativnim dijelovima tumora u usporedbi s centralnim dijelom tumora ili normalnim moždanim tkivom. Ove analize upućuju na doprinos Wnt signalizacije invazivnosti tumora [19]. Uz to, prekomjerna ekspresija Wnt gena povezana je s povećanom otpornošću stanica glioblastoma na radioterapiju, a inhibicija Wnt puta putem male inhibitorne molekule XAV939 pojačala je osjetljivost glioblastoma na radioterapiju. [42] Štoviše, XAV939 spriječio je invazivnost stanica glioma i glijalno-mezenhimsku tranziciju. [9]



Slika 2. Uloga Wnt signalizacije u glioblastomima. Prema Lee Y i sur. (2015.) [42]

Rezultati prethodno opisanih istraživanja pokazuju bitnu ulogu signalnog puta Wnt u brojnim tumorima čovjeka. Stoga će se istraživanja i razvoj inhibitora ovoga puta pokazati korisnim kao potencijalna terapija.

## 6. INHIBITORI WNT PUTA

Razlog za potragom i pronalaženjem inhibitora puta Wnt dali su i rezultati prijašnjih istraživanja koja su djelovanjem na različite molekularne komponente pokazala da bi inhibicija puta Wnt mogla imati poželjan utjecaj na tumore. Na primjer, uočeno je da *knock-down*  $\beta$ -

katena pomoću siRNA djeluje inhibitory na rast kolorektalnih karcinoma in vitro i in vivo. Nakon *knock-downa*  $\beta$ -katena pomoću shRNA u staničnim linijama karcinoma kolona s APC mutacijom, došlo je do znatne inhibicije rasta kada su ove stanične linije presađene u miševе, a uz to primijećeno je poticanje diferencijacije i smanjenje markera proliferacije Ki67. Međutim, nakon prestanka djelovanja shRNA, nastupio je brzi oporavak tumorskog rasta, što nam govori da bi terapija Wnt inhibitorima zahtjevala kontinuiranu primjenu.[135] U staničnim linijama kolorektalnog karcinoma s mutacijama u genima za  $\beta$ -katenin i K-ras, značajan inhibitory efekt postignut je inhibicijom obje mutirane komponente.[135] Također, pokazalo se da *knock-down*  $\beta$ -katena i blokada Wnt puta u staničnim linijama humanih kolangiokarcinoma djeluje antiproliferativno, proapoptotski i dovodi do zastoja stanice u G0/G1 fazi. [1] Osim toga, sličan inhibitory efekt na tumorski rast nakon *knock-downa*  $\beta$ -katena primijećen je i u stanicama tumora bez mutacije u Wnt putu. [135] Još jedan aspekt inhibicije puta Wnt je inhibicija interakcije  $\beta$ -katena s TCF, koja je izazvala pojačanje apoptoze i zaustavljanje proliferacije staničnih linija adrenokortikalnih tumora. [138] Štoviše, pokazalo se da u usporedbi s *knockdownom*  $\beta$ -katena, *knockdown* TCF4 učinkovitije inhibira stvaranje kolonija i inducira apoptozu u staničnim linijama kolorektalnog karcinoma. [137] Inhibicija proteina BCL9 također predstavlja zanimljivu terapijsku opciju, zato što u crijevnom epitelu BCL9 nije potreban za normalno održavanje homeostaze, već samo tijekom regeneracije izazvane upalom. S druge strane potreban je za malignu progresiju kolorektalnih karcinoma, tako da njegovom inhibicijom očekujemo specifičnost za karcinomske stanice.[55] Iako se inhibicija Wnt puta putem *knock-downa*  $\beta$ -katena pokazala uspješnom u zaustavljanju rasta tumora, inhibicija samog  $\beta$ -katena donosi određene poteškoće. Kao što je već spomenuto,  $\beta$ -katenin tvori međustanične spojeve i vezno mjesto za E-kadherin mu se preklapa s veznim mjestima za transkripcijske faktore. S druge strane, ako nam je cilj inhibirati samo  $\beta$ -katenin koji je lokaliziran u jezgri, tu se pojavljuje problem u veličini inhibitory molekule koja bi trebala biti dovoljno mala da može proći kroz staničnu membranu i jezgrinu ovojnicu, a opet dovoljno velika kako bi bila što specifičnija i sposobnija „prekriti“ određeno vezno mjesto molekule  $\beta$ -katena. [59]

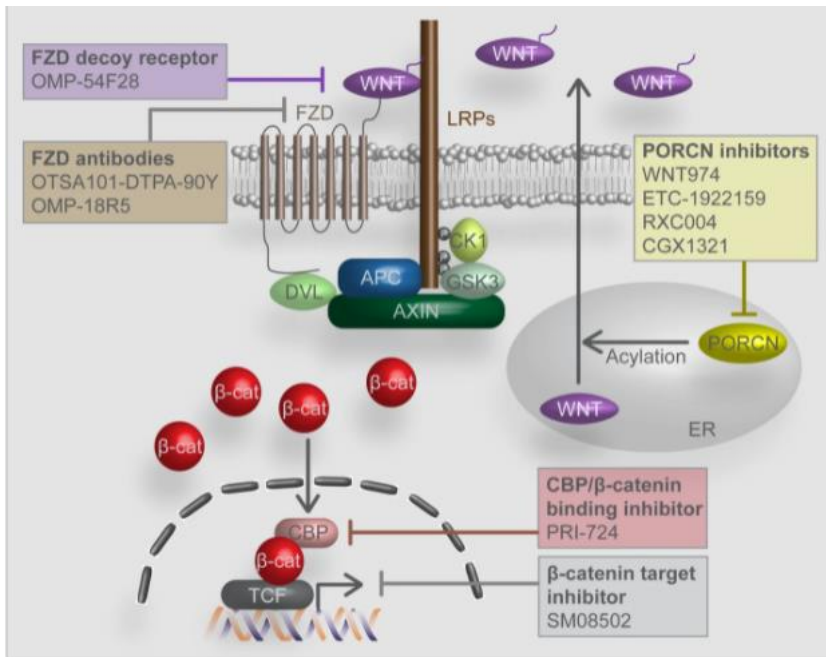
Sličan problem postoji i kod inhibicije transkripcijskih faktora i koaktivatora uključenih u transkripciju Wnt ciljnih gena; TCF, BCL9 te CBP. Molekule koje odgovaraju ovim zahtjevima pronađene su i bit će opisane u nastavku teksta.

Paralelna istraživanja su se također usmjerila na procjenu učinka inhibicije drugih ciljnih komponenti na rast tumora. Tako je primjerice otkriveno da je nakon *knock-downa* gena FZD7

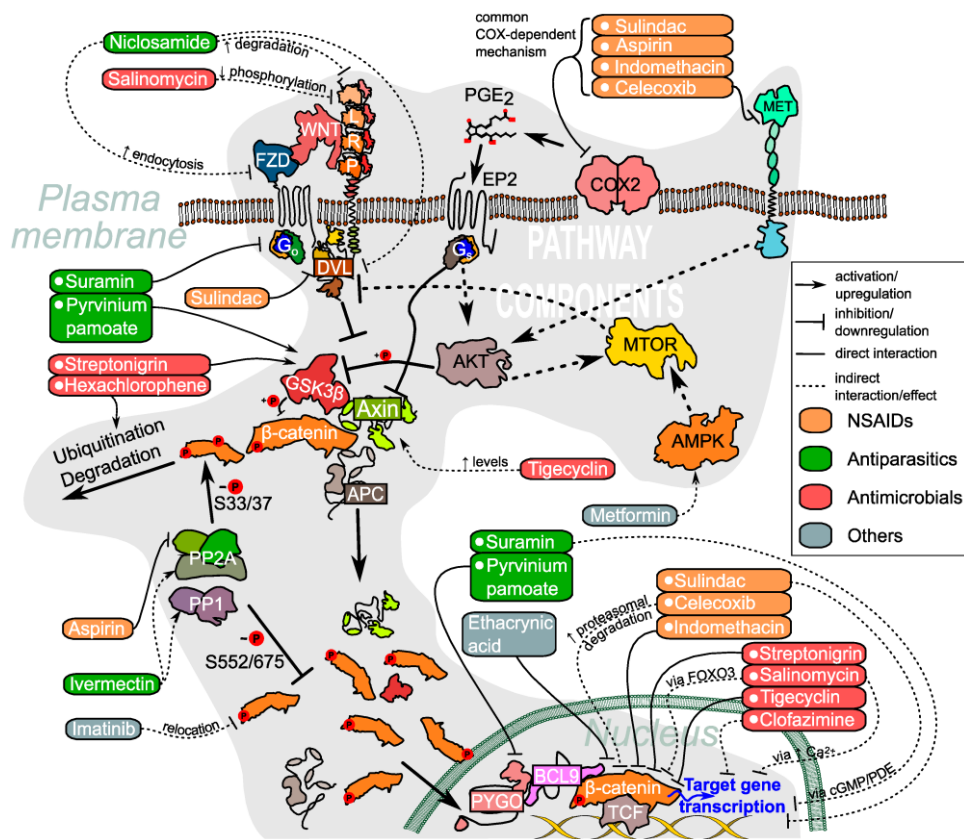
u staničnim linijama trostruko-negativnog karcinoma dojke smanjena ekspresija Wnt ciljnih gena i sposobnost formacije tumora *in vitro* i *in vivo* nakon presađivanja ovako modificiranih staničnih linija u miševе. Inače, u ovom modelu karcinoma dojke bila je prisutna pojačana aktivacija puta Wnt unatoč nepostojanju mutacija njegovih komponenata. [135] Sličan učinak pokazao je *knock-down* FZD7 - inhibirao je rast stanica, inducirao apoptozu i suzbijao migraciju i invaziju stanica planocelularnog karcinoma jednjaka *in vitro*. [139] Također uočeno je da inhibicija liganada Wnt-1 i Wnt-2 pomoću siRNA ili specifičnog protutijela potiče apoptozu u stanicama nesitnostaničnog karcinoma pluća. [136]

Na temelju ovih i drugih spoznaja ustanovljeni su molekularni ciljevi prema kojima su usmjereni Wnt inhibitori čijom se primjenom nastoje postići slični inhibitoryni efekti na tumorski rast. Osim navedenog, razvijane su i druge skupine inhibitora koji djeluju na tzv. negativne regulatore puta Wnt, kao što su aksin i GSK3 $\beta$ , te pojačavaju njihovu aktivnost.

Inhibitori kanonskog Wnt puta mogu se podijeliti prema mjestu djelovanja u signalizaciji, a bit će navedeni nizvodno prema komponenti Wnt puta na koju djeluju. Većina ovih molekula uzeta je u obzir kao inhibitor Wnt puta na temelju tzv. *screeninga* ili testiranja više tisuća molekula, što sintetskih što prirodnih, kako bi se identificirali oni najpotentniji za inhibiciju puta Wnt. Za evaluaciju inhibicije korišteni su različiti testovi, a najčešće je to bio TOPFlash esej, koji nam pokazuje koliko ispitivane molekule ometaju o  $\beta$ -kateninu ovisnu transkripciju dTF12 (*top flash-like luciferase reporter*). [59] U drugim slučajevima, mjerena je proteinska razina  $\beta$ -katenina ili drugih proteina pomoću imunohistokemijskih ili Western blot analiza ili razina mRNA pomoću qRT-PCR metode. Ovaj pristup *screeninga* identificirao je vrlo velik broj molekula koje inhibiraju put Wnt. Stoga ću se u ovom pregledu usredotočiti na inhibitore kanonskog Wnt puta s obzirom da je ovaj ogranak signalizacije danas najpoznatiji po svojoj uključenosti u humane tumore. Neki od inhibitora kanonskog puta Wnt međutim imaju utjecaja i na nekanonske signalne puteve, prvenstveno inhibitori porcupina, budući da oni ometaju sekreciju svih Wnt liganada. Kako bismo objedinili sve inhibitore koji će biti spomenuti u daljnjem tekstu te kako bi čitatelj dobio dojam o ciljnim mjestima inhibicije prikazane su tri sheme na slikama 3, 4 i 5.

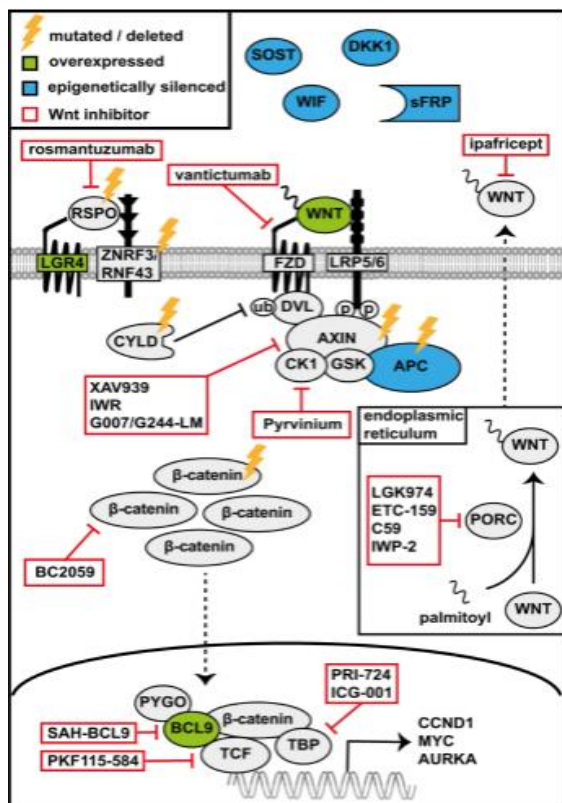


Slika 3. Neki od inhibitora kanonskog Wnt signalnog puta. Prema: Jung YS i sur. (2020.) [4]



Slika 4. Neki otprije postojeći lijekovi i njihova primjena u putu Wnt i srodnim putevima. Prema: Ahmed K I sur. (2016.) [144]





Slika 5. Shematski prikaz lijekova koji ciljaju kanonski Wnt put. Prema: van Andel H i sur. (2019.) [83]

## 6.1. INHIBITORI O-palmitoiltransferaze PORCN

Porcupin (PORCN) je O-palmitoiltransferaza koja u endoplazmatskom retikulumu acilira Wnt proteine prije njihove sekrecije u međustanični prostor, što je neophodno za njihovu sekreciju. Povećana ekspresija ovog enzima povezana je s lošijom prognozom u planocelularnim karcinomima glave i vrata. [55] Molekule koje inhibiraju PORCN sprječavaju sekreciju svih Wnt liganada, te su sposobne inhibirati i kanonski i nekanonske puteve. [55] Do sada su poznati sljedeći oralni inhibitori PORCNa, WNT974 (LGK974), ETC-1922159, RXC004 i CGX1321. LGK974 ili WNT974 mala je molekula za koju se pokazalo da može inhibirati proliferaciju i migraciju staničnih linija karcinoma svijetlih stanica bubrega AAHC i 0-974, povećati udio stanica u G1 fazi te izazvati smanjenje proteinske ekspresije Wnt ciljnih gena. [60] U pretkliničkim studijama, primjena LGK974 u dozi od 3 mg/kg dnevno dovela je do regresije tumora (T/C% = -63%) u roku od 13 dana u mišjem modelu raka dojke u kojem je insercijom MMTV virusa došlo do pojačane ekspresije gena WNT1 u dijelu stanica tumora.

Sličan učinak uz istu dozu ove molekule primijećen je i u HNSCC HN30 staničnim modelima planocelularnog karcinoma glave i vrata (T/C% = -50%). U obje studije LGK974 nije

prouzročio značajan gubitak tjelesne mase miševa. [61] LGK974 je hidrofobna molekula, slabo topljiva u vodi, zbog čega ima lošu bioraspoloživost. Međutim, ova prepreka se može prevladati stvaranjem kompleksa LGK974 s ciklodekstrinom. U mišjem ksenograftu karcinoma pluća, LGK974 u kompleksu s ciklodekstrinom pokazao je manju intestinalnu toksičnost i veći efekt na inhibiciju rasta tumora i preživljenje.[62] Također, LGK974 smanjuje rast tumora i pojavu metastaza u planocelularnih karcinoma glave i vrata *in vivo*. [10] Trenutno je u fazi I kliničkih ispitivanja u pacijenata s metastatskim planocelularnim karcinomima glave i vrata te u kombinaciji s BRAF inhibitorom LGX818 i cetuksimabom u pacijenata s metastatskim kolorektalnim karcinomima koji sadrže WNT i BRAF mutacije.[10] U međuvremenu su objavljeni rezultati prve spomenute studije i evaluirane su nuspojave stupnja 3 i 4 (prema *Common Terminology Criteria for Adverse Events* (CTCAE) za onkološke lijekove, stupanj 3: nuspojave koje zahtijevaju hospitalizaciju ili ograničavaju sposobnost pacijenta da skrbi o sebi; stupanj 4: životno ugrožavajuće nuspojave koje zahtijevaju urgentnu intervenciju). Od ukupno 68 pacijenata, 4.4% je prijavilo nedostatak snage i umor, a u 2.9% pojavio se gubitak apetita i enteritis stupnja 3/4. [34]

Mala molekula ETC-153 je još jedan inhibitor porcupina s visokom bioraspoloživošću nakon oralne primjene [63]. U pretkliničkoj studiji ETC-159 doveo je do inhibicije rasta mišjih modela karcinoma dojke s prekomjernom ekspresijom Wnt1, i to za 52% i 78% pri dnevnoj dozi od 1 odnosno 3 mg/kg, bez značajnog gubitka tjelesne težine miševa. Također, pokazao se uspješnim u inhibiciji rasta humanog karcinoma kolona s fuzijom gena za R-spondin 2 i 3 (RSPO2 i RSPO3), u mišjim ksenograftima. R-spondin je secernirani agonist kanonskog Wnt puta, a *gain-of-function* fuzije gena RSPO2 i RSPO3 dovode do povećanog broja FZD i LRP na membrani i tako mogu potencirati kanonsku Wnt signalizaciju [63]. U fazi I kliničkog ispitivanja evaluirana je njegova podnošljivost u pacijenata s uznapredovalim solidnim tumorima. Istraživanje je obuhvatilo šest kohorti kojima su se davale rastuće doze, maksimalno 30 mg *per os* svaki drugi dan. U oko 20% pacijenata razvile su se nuspojave u vidu osjećaja slabosti, regurgitacije, anoreksije, disgeuzije i poteškoća defekacije. [34]

## 6.2. ANTAGONISTI LIGANADA WNT

Ipafricept (OMP-54F28) je rekombinantno fuzionirano protutijelo koje se sastoji od izvanstaničnog dijela FZD8 receptora i Fc fragmenta humanog IgG1. Vežući ligande Wnt u

izvanstaničnom prostoru sprječava interakciju Wnt-liganada s FZD receptorima. [5] [6] [64] U mišjim ksenograftima karcinoma pankreasa deriviranih iz pacijenata, ipafricept je pokazao veću redukciju tumorskog rasta u usporedbi s kemoterapeutikom starije generacije - gemcitabinom, zatim smanjenje broja tumorskih matičnih stanica te jetrenih i plućnih metastaza. Svi ovi učinci bili su međutim jače izraženi u kombinaciji gemcitabinom. [64] U kliničkoj studiji faze I na 26 pacijenata sa solidnim tumorima, pacijenti su bili podijeljeni u šest kohorti pri čemu je svakoj sljedećoj kohorti davana veća intravenska doza ipafricepta (0.5, 1, 2.5, 5, 10, 15, i 20 mg/kg) svaka tri tjedna, a svakih 28 dana provjeravane su tzv. *dose-limiting* nuspojave; nuspojave koje su toliko ozbiljne da se ta ili viša doza lijeka ne bi smjela primjenjivati. Česte nuspojave koje su se pojavile bile su smanjeni apetit, umor, disgeuzija i mišićni spazmi. Za kliničke studije faze II preporučena je doza od 15 mg/kg svaka tri tjedna. [64] [4] [5] [6]

Provedeno je i kliničko ispitivanje faze Ib za kombinaciju ipafricepta s paklitakselom i karboplatinom na karcinomima jajnika. U istraživanje je uključeno je 30 pacijenata koji su dobivali ipafricept, karboplatin i paklitaksel svaka 3 tjedna intravenski, s time da su ipafricept dobivali 2 dana prije paklitaksela i karboplatina. Doze po kohortama, nakon revizije protokola, povećavale su se od 2 do 6 mg/kg. g. Ukupna stopa odgovora na terapiju bila je 75,7%, medijan preživljenja bio je 33 mjeseca (95% CI 23,4-NR), a medijan preživljenja bez progresije bolesti 10,3 mjeseca (95% CI 8,5–14,2).

Nuspojave primijećene u  $\geq 15\%$  pacijenata uključivale su umor (40%), mučninu (35%), proljev i smanjenje apetita (22%), disgeuziju (19%) i povraćanje (16,2%). U 21,6% pacijenata pojavile su se barem dvije nuspojave stupnja 3, od kojih je najčešća bila neutropenija (16%). Nije se pojavila *dose-limiting* toksičnost, a maksimalna tolerirana doza nije ustanovljena. [130]

Pokrenuta je još jedna klinička studija faze Ib koja je evaluirala kombinaciju ipafricepta s nab-paklitakselom i gemcitabinom u liječenju pacijenata s metastatskim karcinomom pankreasa, pri čemu svi uključeni pacijenti nisu prije liječeni kemoterapijom. Studija je uključila ukupno 26 pacijenata, od čega pet u kohorti 1 i po sedam u kohortama 2-4, kojima su davane rastuće doze terapije ipafriceptom počevši s dozom od 3,5 mg/kg na dane 1 i 15, u kombinaciji sa standardnim dozama nab-paklitaksela i gemcitabina. Uz to, pacijenti su dobivali bisfosfonate radi sprječavanja toksičnosti za kosti.

Nuspojave bilo kojeg stupnja povezane s ipafriceptom uključivale su umor, mučninu, povraćanje, anoreksiju i vrućicu. Nuspojave stupnja  $\geq 3$  uključivale su dva slučaja povišenja aspartat aminotransferaze i po jedan slučaj osipa, mučnine, povraćanja i leukopenije. Nisu primijećene nuspojave koje ograničavaju dozu (DLT) ili patološki prijelomi. Devet pacijenata

(34,6%) imalo je djelomični odgovor, 12 (46,2%) stabilnu bolest kao najbolji odgovor na terapiju. [143]

### 6.3. ANTAGONISTI RECEPTORA FRIZZLED

Vantictumab (OMP-18R5) je humano monoklonsko antitijelo klase IgG<sub>2</sub> koje inhibira receptore FZD 1, 2, 5, 7 i 8 te posljedično inaktivira kanonski put Wnt. Veže se na izvanstanične domene receptora FZD bogate cisteinom, te vjerojatno sterički inhibira vezanje Wnt liganada na ove receptore, čime blokira fosforilaciju LRP6 koreceptora, smanjuje koncentraciju  $\beta$ -katenina u stanici i posljedično inaktivira kanonski signalni put Wnt u tumorskim stanicama. [65] Prema ranijim in vitro i in vivo studijama, vantictumab inhibira tumorski rast u više vrsta tumora i smanjuje ponovni rast tumora nakon primjene visokih doza kemoterapije. U mišjim ksenograftima tumora dojke i pankreasa pokazalo se da vantictumab sam i u kombinaciji s taksanima ili gemcitabinom višestruko smanjuje broj tumorigeničnih (*tumor-initiating*) stanica, za razliku od monoterapije taksanima ili gemcitabinom. [66] [67] [68] [69] Studija na mišjim ksenograftima adenokarcinoma pankreasa i seroznog karcinoma jajnika pokazala je značajan sinergizam Wnt antagonista, vantictumaba i ipafricepta, s nab-paklitakselom, dok s gemcitabinom nije bilo sinergizma. Štoviše, veličina tumora je s nab-paklitakselom (također i gemcitabinom) sporije rasla u odnosu na kontrolu, a s kombinacijom nab-paklitaksela i vantictumaba te nab-paklitaksela i ipafricepta smanjivala se u sve četiri vrste ksenografta. Najbolji učinak na redukciju tumorske mase u ksenograftima trostruko-negativnog karcinoma dojke kao i gore spomenutim ksenograftima, postignut je kada se vantictumab davao 3 dana prije nab-paklitaksela, odnosno kada se ipafricept davao 2 dana prije nab-paklitaksela. Na slične spoznaje o sinergizmu pri sekvencioniranoj administraciji ovih dvaju lijekova ukazuje i nešto starije istraživanje na ne-sitnostaničnim karcinomima pluća [67]. Također, kombinacija vantictumaba s paklitakselom bila je znatno učinkovitija od samog paklitaksela u smanjenju rasta tumorske mase i u ksenograftima HER2 negativnog karcinoma dojke. [70] Međutim, doze vantictumaba u studijama [69] i [70] daleko su premašivale doze koje su se ustanovile kao sigurne u Ib kliničkim studijama (25 mg/kg 1x u 3 tjedna). [71]

Vantictumab je u monoterapiji znatno usporio rast tumorske mase i u četiri kulture planocelularnog karcinoma glave i vrata u ksenograft-modelima (20 mg/kg svaka 2 tjedna). Također, starija studija pokazala je vrlo potentan učinak kombinacije taksola i vantictumaba na

ksenograftima karcinoma dojke i pluća, a slabiji učinak u monoterapiji jednim ili drugim lijekom. [66]

Dodatno, sintetičko protutijelo F2.A, proširene specifičnosti jer dodatno inhibira i FZD4, jače je inhibiralo tumorski rast u staničnim linijama stanica dukalnog adenokarcinoma pankreasa s mutacijom RNF43 u odnosu na vantičumab, koji je također bio učinkovit. [72] [73] Tretiranjem trostruko negativnih karcinoma dojke (UM-PE13) različitim dozama vantičumaba s paklitakselom ustanovljena je minimalna efektivna doza od 5 mg/kg svaka 3 tjedna, koja djeluje bolje u usporedbi sa samim paklitakselom. [73]

U kliničkoj studiji faze Ia uključeni su pacijenti sa solidnim tumorima, uključujući kolon, dojku, sarkome te neuroendokrine tumore. Kod većine pacijenata terapija vantičumabom prekinuta je u roku od 60 dana zbog progresije bolesti, a kod tri starije pacijentice s neuroendokrinim tumorima došlo je pak do prolongirane faze stabilizacije bolesti. [74]

Provedeno je nekoliko dodatnih istraživanja u fazi Ib za ovaj lijek. U prvom istraživanju 31 dotad neliječen pacijent s metastatskim adenokarcinomom pankreasa dobivao je rastuće doze vantičumaba u kombinaciji s nab-paklitakselom i gemcitabinom, po principu 3+3. Zbog prekida istraživanja nije utvrđen MTD (maksimalna tolerirana doza). Evaluacijom smanjenja tumorske mase, 41.93% (13) pacijenata pokazalo je parcijalni odgovor na terapiju, a u 12.9% (2 pacijenta) bolest je progredirala. [75] U drugoj, slično strukturiranoj studiji, provedenoj na 19 pacijenata s metastatskim karcinomom pankreasa, polovina pacijenata imala je parcijalni odgovor na terapiju, a u trećine je zabilježena stabilna bolest.

Zbog važne uloge puta Wnt u metabolizmu koštanog tkiva, nuspojave vezane uz kosti i njihova učestalost bile su jedna od glavnih posljedica koje su se pokušavale evaluirati u istraživanjima. Vantičumab povećava koncentraciju biomarkera koštane degradacije  $\beta$ CTX čak i pri malim dozama, a pri dozama većim od 5 mg/kg svaka 3 tjedna, smanjuje koncentraciju markera stvaranja nove kosti, P1NP i osteokalcina. [65]

U istraživanju [74], najčešće prijavljene nuspojave bile su mučnina, umor, disgeuzija, povraćanje, zatvor i proljev. U cijelom istraživanju pojavila se samo jedna DLT (*dose limiting toxicity*) u obliku dehidracije stupnja 3, a u 9 ispitanika pojavile su se teže nuspojave. Frakture kostiju povezane s vantičumabom pojavile su se u 2/6 pacijenata u kohorti 2, kod kojih je doza bila 7 mg/kgTT svaka 2 tjedna. Nakon toga ponovljeno je istraživanje tako što su kohorte 3, 4 i 5 dobivale lijek 1 x u 4 tjedna. Na ukupno 16 ispitanika u tim kohortama pojavile su se 2 frakture, kod dviju ispitanica koje su međutim bile u postmenopauzalnom razdoblju. [75]

Druga studija došla je također do zaključka da vantičumab u dozi 3-5 mg/kg koja se daje jednom u 4 tjedna ne dovodi do *dose-limiting* toksičnosti. U obje studije došlo je do fraktura u pacijenata koji su primali 7 mg/kg 2x u 4 tjedna. Najčešće nuspojave također su bile umor i mučnina, kao i u studiji [73], u kojoj se kod jedne od 29 pacijentica pojavila DLT u obliku povraćanja i proljeva 3. stupnja. [70] Najčešće nuspojave vezane za vantičumab, umor i konstipacija, pojavile su se u 22.6% pacijentica. Pojavnost koštanih nuspojava može se prevenirati davanjem vitamina D, kalcijских preparata te zoledronske kiseline.[73] Vantičumab neće polučiti željeni učinak kod tumora s mutacijom neke od molekula silazno od njegovog mjesta djelovanja, receptora FZD, no djelovat će na zdravo tkivo. To se pokazalo u tumorima kolona s mutiranim APC/CTNNB [66], u kojima je primjena ovog antitijela inhibirala proliferaciju zdravih stanica i uzrokovala nuspojave.

OTSA101 je kimerično monoklonsko protutijelo napravljeno na receptor FZD10. Ovo protutijelo razvijeno je nakon što je utvrđeno da stanice sinovijalnog sarkoma eksprimiraju FZD10 znatno više nego normalna tkiva, izuzev tkiva placente. OTSA101 ima slabiju antitumorsku aktivnost od svog radioaktivnog oblika (OTSA 101-DTPA-90Y). [4] [5] [80]

U mišjim ksenograftima sinovijalnog sarkoma s hiperekspresijom FZD10 nakon jednokratne primjene 90Y-OTSA-101 u dozi od 3,7 MBq došlo je do značajnog smanjenja mase tumora. Medijan vremena do progresije tumora u tretiranih miševa bio je 58 dana u usporedbi s 9 dana u kontrolnoj skupini. [80]

U kliničkom ispitivanju u fazi Ib na pacijentima s metastatskim sinovijalnim sarkomima, prvo su pomoću ne-terapeuskog radioaktivnog oblika 111In-OTSA-101, odabrani pacijenti s relativno visokom ekspresijom FZD10 u tumorskim tkivima, za koje je procijenjeno da bi profitirali od terapije s potentnijim, terapeuskim radioaktivnom oblikom ove molekule, 90Y-OTSA-101. Nakon toga, u drugi dio studije uključeno je samo 8 od 20 pacijenata, od kojih su prva 3 pacijenta dobila jednu dozu od 370 MBq 90Y-OTSA-101, 4 pacijenta jednu dozu od 1110 MBq 90Y-OTSA-101 i 1 pacijentica dvije doze od 1110 MBq 90Y-OTSA-101. Nuspojave stupnja 3, i to najčešće hematološke, pojavile su se u 1/3 pacijenata pri nižoj dozi te 4/5 pacijenata pri višoj dozi. Kod 50-godišnje pacijentice nakon što je primila drugu injekciju od 1110 MBq 90Y-OTSA-101, došlo je do hemoptize sa smrtnim ishodom, za što se pretpostavlja da je posljedica i samih plućnih metastaza i trombocitopenije uzrokovane 90Y-OTSA-101. [80]

## 6.4. ANTAGONISTI KORECEPTORA LRP

Lijekovi koji djeluju antagonistički na koreceptor LRP većinom su registrirani za liječenje infekcija parazitima, no istražuje se njihov potencijal za liječenje tumora. Mehanizam njihovog djelovanja na Wnt put nije dovoljno jasan, ali smatra se da djeluju kao antagonisti LRP koreceptora.

Salinomicin je monokarboksilni polieterski ionofor koji je otprije poznat po svom antibiotskom i kokcidistatskom učinku. Ionofori su molekule hidrofilne iznutra, a hidrofobne izvana, koje reverzibilno vežu ione i omogućavaju im prijelaz preko membrane. Pošto sadrži karboksilnu skupinu, salinomicin je slaba kiselina, a ima afinitet prema kalijevim ionima, kojima olakšava prijelaz preko stanične ili mitohondrijske membrane. Brojna istraživanja pokazuju da ovaj lijek ima antitumorsku aktivnost, osobito protiv tumorskih matičnih stanica. Iako točan mehanizam djelovanja nije sasvim razjašnjen, predloženi su mnogi potencijalni mehanizmi. Jedan od njih je djelovanje na signalni put Wnt. Istraživanja pokazuju da salinomicin, osim što inducira degradaciju koreceptora LRP, aktivira transkripcijski faktor FOXO3a koji sprječava vezanje  $\beta$ -katenina za TCF, i na ta dva načina inaktivira put Wnt. [76] [77] Salinomicin smanjuje fosforilirani i ukupni LRP, što dovodi do inhibicije svih aktivnosti silazno od njega, i u konačnici do smanjenja ekspresije Wnt-ciljnih gena. Salinomicin je također potentni inhibitor P-glikoproteina (ABC transportera), što može doprinijeti liječenju tumora otpornih na više lijekova (tzv. *multidrug-resistant* tumora). [78] Osim djelovanja na put Wnt, salinomicin također djeluje inhibitorno na mnoge druge puteve: Akt, Nf-kB i Hedgehog. Salinomicin inhibira angiogenezu, a aktivira JNK, p38 i ERK signalizaciju. Ipak, čini se da najveću zaslugu za njegovu antitumorsku aktivnost ima sposobnost uzrokovanja ferroptoze. [77] Nakon tretiranja staničnih linija glioblastoma nanočesticama željezovog oksida sa salinomicinom, došlo je do negativne regulacije ciklina D1 i proteina Wnt1. [79] U stanicama kronične limfocitne leukemije s konstitutivno aktivnim Wnt putom, inducira apoptozu, dok u mononuklearnim stanicama zdravih donora nije primijećen takav efekt. [81] Daljnji pokusi upućuju na potencijalnu korist od kombinacije salinomicina s resveratrolom, budući da je ta kombinacija dovela do inhibicije Wnt puta, smanjenja ekspresije markera epitelno-mezenhimalne tranzicije, vimentina, te indukcije apoptoze u stanicama karcinoma dojke. [82] Iako kliničke studije još nisu započele, postoji opravdana bojazan da bi toksičnost ovog lijeka mogla biti znatna, s obzirom na brojnost staničnih puteva na koje utječe, kao i nedovoljnu istraženost mehanizama djelovanja.

Rottlerin je prirodni polifenol izoliran iz zrelih plodova biljke *Mallotus philippinensis*, a kroz povijest se koristio kao antihelmintik. Iako utječe na brojne druge signalne puteve u tumorima [87], rađeno je svega nekoliko studija o utjecaju rottlerina na put Wnt, od kojih je jedna pokazala da rottlerin dovodi do degradacije receptora LRP6 i inhibicije kanonskog puta Wnt. [87] U drugoj novijoj studiji, metodom Western blota nađena je smanjena ekspresija LRP6 i njegovog fosforiliranog oblika (p-LRP), kao i  $\beta$ -katenina nakon primjene rottlerina na staničnim linijama adrenokortikalnog karcinoma. Slično se dogodilo i in vivo, u mišjim ksenograftima gdje je nakon intraperitonealne primjene rottlerina, ekspresija LRP6, p-LRP6 i  $\beta$ -katenina bila manja. [88]

Monensin je antibiotik i antiparazitski lijek dobiven iz bakterije *Streptomyces cinnamonensis*, a inače je ionofor koji veže monovalentne katione, s deset puta većim afinitetom za natrijeve nego za kalijeve ione [89]. Također djeluje antiproliferativno, inhibirajući signalne puteve kao što su JAK/STAT, E2F/DP1, Elk-1/SRF i NF- $\kappa$ B i EGFR-signalni put. U tumorima jajnika i pankreasa pokazao je antiproliferativni, antimigratorni i pro-apoptotski učinak te sinergizam s oksaliplatinom odnosno erlotinibom i gemcitabinom. Pokazalo se da monensin inhibira kanonski Wnt signalni put u intestinalnim tumorima in vivo, bez učinka na zdrave stanice intestinalne sluznice, te da sprječava fosforilaciju i dovodi do degradacije LRP6 [89], a smanjuje ekspresiju i ciklina D1.[90] Nadalje, studija iz 2019. ukazuje na selektivni citotoksičan učinak monensina na stanice koje prolaze epitelno-mezenhimsku tranziciju [89]. Ove studije upućuju da bi monensin mogao biti dobar inhibitor Wnt signalnog puta.

Niklozamid je peroralni antihelmintik kojem se u zadnje vrijeme pripisuju učinci na široku paletu bolesti uključujući i tumore. Zabilježen je antiproliferativni učinak niklozamida u kolorektalnim karcinomima, karcinomima prostate, pluća, jajnika kao i dojke putem inhibicije signalnih puteva Wnt, mTOR, STAT3, Notch i NF- $\kappa$ B. [91] Također sprječava stvaranje sferoida u karcinomima dojke, te djeluje na put Wnt poticanjem degradacije LRP6 koreceptora [92]. Osim toga, pretpostavlja se da potiče internalizaciju receptora FZD1 i degradaciju DVL2 i  $\beta$ -katenina. Mehanizam kojim niklozamid degradira sudionike Wnt puta – FZD1 i  $\beta$ -katenin, nije u potpunosti jasan ali smatra se da je najvjerojatnije posredovan autofagijom. Autofagija dovodi do razlaganja makromolekula na njihove monomere, na što ukazuje studija u kojoj je marker autofagije LC3 kolokaliziran s ovim molekulama nakon primjene niklozamida. Štoviše, različitim metodama inhibicije autofagije ne dolazi do degradacije receptora FZD1 te se inhibicija smanjuje. Na sličan način se mogu objasniti i ostali učinci niklozamida na stanične signalne puteve, a isto tako trebalo bi se rasvijetliti djeluju li i drugi ionofori koji inhibiraju



Wnt put na sličan način. [93] [94] [95] Pokazalo se međutim, da su neke stanice rezistentne na niklozamid, a pretpostavljeni mehanizmi uključuju poremećenu autofagiju, poremećenu mTORC1 signalizaciju, efluks niklozamida iz stanice i slično. [93] Rezultati jedne studije navode na zaključak da niklozamid djeluje na mjestu nizvodno od  $\beta$ -katenina, budući da inhibira Wnt put i u stanicama s mutiranim  $\beta$ -kateninom, pritom ne smanjujući njegovu koncentraciju. [96] U karcinomima jajnika niklozamid smanjuje broj tumorskih matičnih stanica [91]. Niklozamid je nitroaromatski spoj, što znači da sadrži nitro skupinu ( $\text{NO}_2$ ). Nitro skupina se povezuje s ozbiljnim neželjenim pojavama kao što su hepatotoksičnost, mutagenost i supresija koštane srži [98]. Niklozamid se zbog loše bioraspoloživosti nije pokazao pogodan za sistemsko liječenje tumora [91]. Kako bi se povećala stabilnost ove molekule i produljio poluvijek razgradnje, proizveden je analog niklozamida u kojem je nitro skupina zamijenjena trifluorometilnom skupinom te analog kojem je modificiran salicilni dio molekule. Pokazalo se da djeluju jednako antiproliferativno kao i niklozamid, suprimiraju ekspresiju LRP6 te inhibiraju signalne puteve Wnt i mTOR/STAT3 u staničnim linijama karcinoma jajnika i karcinoma jajnika rezistentnih na kemoterapiju. Pokazalo se da im se povećala bioraspoloživost nakon oralne primjene. [91] U kliničkom ispitivanju u fazi Ib u kombinaciji s enzalutamidom kod pacijenata s karcinomom prostate rezistentnim na kastraciju, oralni niklozamid je odbačen kao daljnji perspektivan lijek za liječenje ove vrste tumora, budući da njegova koncentracija u plazmi pri maksimalnoj toleriranoj dozi nije bila dovoljna da prouzroči terapijski učinak. [97]

## 6.5. INHIBITORI TANKIRAZE

Tankiraza je enzim koji vrši poli-ADP-ribozilaciju aksina 1 i aksina 2 i doprinosi aktivaciji Wnt puta. ADP-ribozilacija proteina je reverzibilna post-translacijska modifikacija u kojoj se adenzin difosfat (ADP)-ribozni dio iz nikotinamid-adenin-dinukleotida (NAD) prenosi na ciljni protein. Ovom modifikacijom reguliraju se stanični procesi. Pomoću svojih višestrukih ANK ponavljajućih klastera (ARC), tankiraza prepoznaje ciljne proteine, među kojima je i aksin, a zatim im dodaje poli-ADP-ribozne ostatke. Takav poli-ADP-ribozilirani aksin (PAR-ilirani aksin) prepoznaje ubikvitin ligaza RNF146 te ga obilježava za razgradnju u proteasomu. Zbog posljedičnog smanjenja koncentracije aksina onemogućena je formacija degradacijskog kompleksa  $\beta$ -katenina pa se njegova koncentracija u citoplazmi povećava [99]. Kod kolorektalnih karcinoma, dokazano je *in vitro* i *in vivo* da će na terapiju inhibitorom tankiraze

biti osjetljive stanice koje imaju takozvanu kratku formu APC mutacije, pri čemu nedostaje svih sedam aminokiselinskih ponavljanja od po 20 aminokiselina koje služe za vezanje  $\beta$ -katenina, dok kod duge forme APC mutacije, koja sadrži dva ili više takvih ponavljanja, stanice će biti rezistentne na inhibitore tankiraze [100].

Inhibitor tankiraze XAV939 se veže na katalitičku domenu tankiraze [102], što dovodi do stabilizacije aksina kao komponente degradacijskog kompleksa  $\beta$ -katenina [4]. Zbog toga povećava se frakcija fosforiliranog  $\beta$ -katenina i njegova degradacija, smanjuje se koncentracija ukupnog  $\beta$ -katenina i ciklina D1 u stanicama, a također stanični ciklus se zaustavlja u G0/G1 fazi [101]. U usporedbi s nekim drugim Wnt inhibitorima, XAV939 ne utječe na druge signalne puteve kao što su NF- $\kappa$ B i TGF- $\beta$  signalni putevi.[102].

Ovim putem pojačava se stabilizacija aksina i inaktivnost Wnt puta je očuvana, osim ako se radi o mutaciji nizvodno na signalnom putu. U navedenim studijama nije međutim naveden status mutacija u staničnim linijama. XAV939 imao je inhibicijski učinak na stanične linije sitnostaničnog karcinoma pluća, a kombinacija s cisplatinom nije pokazala značajno jači učinak od samog XAV939. Protočnom citometrijom uočena je povećana frakcija stanica u apoptozi, ovisna o dozi XAV939 [102].

Druga studija provedena također na staničnim linijama sitnostaničnog karcinoma pluća zabilježila je smanjenje proliferacije ovisno o dozi XAV939 [103]. HeLa stanicama pretretiranim XAV939 dva sata prije radioterapije smanjila se vijabilnost sa  $77.12 \pm 0.13\%$  na  $69.39 \pm 1.34\%$  u usporedbi sa samom radioterapijom, u roku od 24 sata. Također, stopa stvaranja kolonija smanjila se s  $35.00 \pm 2.25\%$  na  $26.00 \pm 1.06\%$  u odnosu na stvaranje kolonija nakon radioterapiju u dozi od 2 Gy. Također, primjena XAV939 u kombinaciji s radioterapijom dovela je do smanjenja ekspresije Wnt proteina (Wnt3a, Wnt5b,  $\beta$ -katenin, ciklin D1, c-myc). Sama radioterapija kao i sam XAV939 imali su skroman efekt na ekspresiju ovih proteina, u roku od 24 sata nakon primjene terapije. Također, pretretman molekulom XAV939 povećao je omjer apoptotskih stanica u odnosu na samu radioterapiju za 46.53%, iako sam nije imao značajna učinka [104]. Ipak, treba uzeti u obzir da put Wnt nije prekomjerno aktivan u HeLa stanicama [105]. Još jedna studija *in vitro* na adenokarcinomima pluća izoliranim iz pacijenata pokazala je povećanu ekspresiju tankiraze i  $\beta$ -katenina u tumorima u odnosu na susjedno, zdravo tkivo pluća te smanjenu vijabilnost, proliferaciju i migraciju nakon primjene XAV939 u odnosu na kontrolu [106]. Nadalje, kombinacija paklitaksela i XAV939 pokazala se učinkovitijom u redukciji vijabilnosti stanica trostruko negativnog i ER+ karcinoma dojke u odnosu na monoterapiju. Na migracijsku sposobnost stanica nije imala bolji učinak od samog

paklitaksela, u dozi paklitaksel 20 mM + XAV939 10  $\mu$ M. Kombinacija paklitaksela i XAV939 značajno je smanjila rast tumora u mišjim ksenograftima u odnosu na monoterapije (u dozama od 10 mg/kg), dok se tjelesna masa miševa nije bitnije mijenjala kroz period od 35 dana. [106]

JW-55 i JW-74 također su inhibitori tankiraza. Povećavaju razinu citoplazmatskog aksina, degradaciju  $\beta$ -katenina i smanjuju ekspresiju Wnt ciljnih gena. U staničnim linijama kolorektalnog karcinoma s APC mutacijom primjena JW-74 dovela je do redukcije tumorskog rasta i zaustavljanja staničnog ciklusa u G1/S fazi, u usporedbi sa staničnim linijama bez aktiviranog Wnt puta.

JW-55 je također pokazao pojačanu antiproliferacijsku aktivnost u istoj staničnoj liniji u odnosu na HeLa i staničnu liniju humanih hepatocita. JW-55 nije testiran na mišjim ksenograftima, a JW-74 je smanjio tumorski rast za oko 30% nakon tri tjedna terapije, međutim rezultate treba dodatno provjeriti na većem uzorku i s duljim praćenjem [105] [4].

G007-LK je također inhibitor tankiraze. *In vitro*, u monoterapiji smanjuje proliferaciju i sposobnost formacije sfera matičnih stanica glioma. Potencira učinak temozolomida u sprječavanju formacije sfera, ali ne i proliferacije matičnih stanica glioma. Smanjuje ekspresiju proteina Wnt i Hippo signalnih puteva. [108] Drugo istraživanje je pokazalo da G007-LK inhibira Wnt signalizaciju i smanjuje frekvenciju LGR5+ duodenalnih matičnih stanica u miševa, međutim bez utjecaja na morfologiju tkiva (LGR5+ jedan je od Wnt ciljnih gena i ujedno marker intestinalnih matičnih stanica). Ovi učinci bili su reverzibilni, što je objašnjeno rezistencijom dijela stanica na G007-LK. Miševi nisu značajnije gubili na težini. [109]

Još jedan inhibitor tankiraza je derivat spirindolina RK-287107 [107]. Pri oralnoj primjeni u tolerabilnim dozama, inhibirao je rast kolorektalnog tumora s APC mutacijom *in vitro* i *in vivo*. Za ovaj lijek smatra se da je najizgledniji kandidat iz skupine inhibitora tankiraza za buduća klinička istraživanja. RK-287107 inhibirao je tankirazu 1 i 2 četiri odnosno osam puta više u usporedbi s G007-LK, s IC<sub>50</sub> vrijednosti od 14.3, odnosno 10.6 nmol/L, u genetski modificiranim sojevima plijesni *Schizosaccharomyces pombe*. [99] , a pokazao se kao vrlo selektivan za tankiraze (PARP5a i b) u odnosu na druge PARP enzime (PARP 1, 2 i 10). [107]. RK-287107 inhibirao je rast staničnih linija kolorektalnog karcinoma s kratkom formom APC mutacije, dok na rast staničnih linija s *gain-of-function* mutacijom CTNNB1, divljim tipom APC te dužom formom APC mutacije, s parcijalnom retencijom 20-AARs, nije imao značajnog učinka [99] GI<sub>50</sub> (50% *growth inhibition*) koncentracija za RK-287107 i G007-LK na staničnim linijama s kratkom formom APC mutacije bila je 0.449 odnosno 0.434  $\mu$ mol/L. Nalaz imunohistokemije pokazao je da RK-287107 i G007-LK smanjuju razinu nefosforiliranog  $\beta$ -

katzenina u usporedbi s kontrolom. Intenziteti imunofluorescencije aktivnog (nefosforiliranog  $\beta$ -katzenina) bili su 100%, 0.63%, 106% i 26.4% za DMSO, RK-287107, olaparib (PARP inhibitor koji se koristi u liječenju karcinoma jajnika s BRCA mutacijom) odnosno G007-LK-tretirane stanične linije. Prema rezultatima Western blota, nakon primjene RK-287107 povećala se količina tankiraze i aksina, što se objašnjava time da tankiraza također *poli-ADP-ribozilira* samu sebe i označava se za ubikvitinizaciju, a kada se ista funkcija inhibira, dolazi do njezine akumulacije u citoplazmi [99]. RK-287107 smanjio je i ekspresiju mRNA aksina 2 i MYC – kao Wnt ciljnih gena. Intraperitonealna (2x dnevno 150 mg/kg) te peroralna (2x dnevno 300 mg/kg) primjena ovog lijeka u mišjih ksenografta s kratkom formom APC mutacije rezultirala je 47.2% odnosno 51.9%-tnim TGI (inhibicijom tumorskog rasta). Farmakokinetičkom analizom utvrđene su veće koncentracije u plazmi nakon peroralne nego nakon intraperitonealne primjene [99], a bioraspoloživost kod peroralne primjene mu je oko 60%. [107] [4]

## 6.6. MOLEKULE KOJE POJAČAVAJU AKTIVNOST GSK3 $\beta$

Jedna od strategija inhibitornog djelovanja Wnt signalnog puta je putem molekula koje pojačavaju aktivnost kinaze odgovorne za degradaciju  $\beta$ -katzenina, GSK3 $\beta$ .

Pyrvinium je antihelminetik koji svoje antitumorske učinke ostvaruje preko inhibicije fosforilacije kinaze AKT glavne molekule PI3K signalnog puta, što rezultira smanjenjem fosforilacije GSK3 $\beta$  na mjestu aminokiseline S9 i pojačanjem aktivnosti GSK3 $\beta$  u fosforilaciji  $\beta$ -katzenina i degradaciju  $\beta$ -katzenina [110]. Prvotno se smatralo da Pyrvinium izravno pojačava aktivnost CK1 kinaze, ali prema novijim istraživanjima to nije slučaj [111] [112]. Također, navodi se da pyrvinium negativno regulira i transkripcijsku aktivnost  $\beta$ -katzenina degradacijom PYGO96. [4]. Budući da inhibira AKT, bilo bi zanimljivo istražiti utječe li ovaj lijek na smanjenje disocijacije  $\beta$ -katzenina iz kompleksa s E-kadherinom, s obzirom da je jedna studija pokazala da AKT pospješuje ovu disocijaciju.

## 6.7. MOLEKULE KOJE POTIČU PROTEASOMSKU RAZGRADNJU $\beta$ -KATENINA

Nova zanimljiva razina zaustavljanja aktivnosti signalnog puta Wnt je pomoću molekula koje potiču razgradnju  $\beta$ -katenina u proteasomu. MSAB ili metil-3(4-metilfenil)sulfonil amino-benzoat, identificiran je kao potentan i selektivan inhibitor Wnt signalizacije. Ovaj rezultat dobiven je skriningom 22000 molekula na staničnoj liniji kolorektalnog karcinoma s delecijom Ser45, fosforilacijskog mjesta CK-1 na  $\beta$ -kateninu.[113]

MSAB se veže za  $\beta$ -katenin i pojačava njegovu proteasomsku razgradnju [4], smanjuje razinu  $\beta$ -katenina u jezgri, a povećava onu citoplazmatsku, iako u manjoj mjeri. Također se pokazalo da MSAB povećava udio fosforiliranog  $\beta$ -katenina. Sve ove akcije ovisne su o aktivnosti proteasoma. Zaključeno je da MSAB potiče ubikvitinaciju i proteasomsku degradaciju  $\beta$ -katenina, i najvjerojatnije se veže za armadillo domenu, iako točan mehanizam još nije razjašnjen. Treba spomenuti da supstitucija metoksi skupine na fenilnom prstenu halogenim elementima ili pak zamjena esterskih skupina MSAB-a amidnima rezultiraju gubitkom aktivnosti MSAB-a.

Utvrđena je selektivnost MSAB-a za tumorske stanice s pojačanom Wnt signalizacijom u odnosu na normalne stanice; epitelne stanice dojke ili fibroblaste kože kao i u odnosu na stanice tumora neovisnih o Wnt-signalizaciji. MSAB je također izazvao redukciju veličine tumorske mase na mišjim ksenograftima s hiperaktivnim Wnt putom, uzrokujući apoptozu tumorskih stanica, dok u Wnt-neovisnim tumorima nije primijećen nikakav efekt. Važno je navesti da je MSAB inhibirao proliferaciju i u stanicama humanog adenokarcinoma kolona LS174T, koje posjeduju samo mutirani oblik  $\beta$ -katenina. Budući razvoj inhibitora  $\beta$ -katenina trebao bi biti usmjeren na nalaženje molekula koje bi bile selektivne za određenu vrstu mutirane varijante  $\beta$ -katenina u odnosu na divlji tip, i tako poštedile ne-tumorska tkiva. [59] [113] [28]

## 6.8. INHIBITORI PROTEINSKO-PROTEINSKIH INTERAKCIJA $\beta$ -KATENINA S TRANSKRIPCIJSKIM FAKTORIMA I KOAKTIVATORIMA

### 6.8.1. INHIBITORI INTERAKCIJE $\beta$ -KATENINA I TCF $\alpha$

U ranijim istraživanjima molekule PKF115-584, CGP049090 i PKF222-815, predstavljene su kao inhibitori interakcije TCF/ $\beta$ -katenina, međutim pokazale su se nedovoljno selektivne u odnosu na inhibiciju interakcije APC/ $\beta$ -katenina. [28] Stoga u situacijama kada je APC mutiran, ove molekule mogle bi se pokazati vrlo korisnima. Selektivna inhibicija dodatno je otežana zbog većeg afiniteta  $\beta$ -katenina za TCF, nego za APC i E-kadherin [114].

Za slijedeću skupinu malih molekula koje su nazvane UU-T02 i UU-T03, utvrđeno je da selektivno inhibiraju proteinsko-proteinske interakcije  $\beta$ -katenina i TCF, bez djelovanja na interakciju s E-kadherinom ili APC. UU-T03 učinkovito inhibira interakciju TCF/ $\beta$ -katenina i smanjuje ekspresiju Wnt ciljnih gena. Isto tako, pokazalo se da reducira rast kolorektalnog karcinoma *in vitro*, sa selektivnošću za tumorske u odnosu na normalne stanice. U istom istraživanju, na molekuli  $\beta$ -katenina dodatno su identificirani hidrofobni B i C džepovi koji su nužni samo za interakciju s TCF, ali ne i s E-kadherinom i APC-om, te zbog toga predstavljaju potencijalno ciljno mjesto za razvoj novih, selektivnijih lijekova odnosno unaprjeđenje navedenih. [114][28]

### 6.8.2. INHIBITORI INTERAKCIJE $\beta$ -KATENIN I CBP

Osim TCF i LEF, u transkripcijski kompleks  $\beta$ -katenina se još vežu koaktivatori CBP, p300 i PYGO. PRI-724 je mala molekula koja inhibira interakciju  $\beta$ -katenina i CBP, tako što se kompetitivno veže na CBP i posljedično onemogućuje vezanje beta-katenina. U pretkliničkim studijama utvrđeno je da PRI-724 potiče interakciju p300 i  $\beta$ -katenina, potiče diferencijaciju tumorskih matičnih stanica, i čini ih osjetljivijima na kemoterapiju. [34] [50] U kliničkoj studiji faze I na ukupno 18 pacijenata PRI-724 pokazao se podnošljiv u pacijenata sa solidnim tumorima u dozi od 905 mg/m<sup>2</sup> u kontinuiranoj infuziji kroz 7 dana svaki drugi tjedan, što je i preporučena doza za fazu II, budući da se DLT pojavio u jednog pacijenta tretiranog PRI-724 u dozi od 1280 mg/m<sup>2</sup>, u obliku hiperbilirubinemije trećeg stupnja. U ovoj

studiji medijan dobi pacijenata bio je 53, a medijan prethodnih terapija bio je 3. Od ostalih nuspojava primijećene su dijareja, povišenje razine bilirubina te hipofosfatemija u 11%, odnosno mučnina, umor, anoreksija, povišenje alkalne fosfataze i trombocitopenija u 6% slučajeva. PRI-724 također je smanjio ekspresiju survivina u cirkulirajućim stanicama tumora [115] [34], što ide u prilog već spomenutoj teoriji o aktivaciji različitih transkripcijskih programa ovisno o odabiru CBP ili P300 transkripcijskih koaktivatora.

Provedena je i klinička studija faze Ib s PRI-724 u kombinaciji s gemcitabinom na 20 pacijenata s metastatskim karcinomom pankreasa nakon FOLFOX ili FOLFIRINOX terapije. Medijan dobi pacijenata bio je 60 godina, a pacijenti su također podijeljeni u tri kohorte koje su dobivale PRI-724 u dozama 320, 640 odnosno 905 mg/m<sup>2</sup>/dan, u kombinaciji s gemcitabinom. Najbolji odgovor na terapiju bio je stabilna bolest, i to u 40% (8) pacijenata. Od toga u petero pacijenata zabilježen je pad razine CA-19-9 za više od 30%. Nuspojave stupnja 3 i 4 primijećene su u sedam pacijenata, u troje neutropenija, a u po jednoga anemija, umor, abdominalna bol i povišenje razine alkalne fosfataze, s tim da nijedna nuspojava nije bila *dose-limiting*. [116] [34]

Peptidna molekula CWP232291 još je jedan potentni inhibitor proteinsko-proteinskih interakcija β-katenina i CBP. [34] Provedene su dvije studije faze Ia. Jedna studija pratila je devetero pacijenata s relapsom ili refraktornim multiplim mijelomom, gdje su pacijenti CWP dobivali intravenski u dozama 198 - 446 mg/m<sup>2</sup> 2x tjedno 3 od 4 tjedna, s medijanom trajanja terapije 3 ciklusa. Najčešće nuspojave vezane su za gastrointestinalni sustav (proljevanje 77.8%, mučnina 55.6% te konstipacija 33.3%) i krvotvorni sustav (neutropenija 33.3% anemija i trombocitopenija po 22,2%). Uz to, pojavile su se i dvije *dose-limiting*-toksičnosti pri najvećoj dozi, hipoksija i trombocitopenija stupnja 3 odnosno 4. Nastavak ove studije planira imati evaluaciju kombinirane terapije CWP s lenalidomidom i deksametazonom u fazi Ib. [118]

Druga klinička studija na 56 pacijenata (53 s akutnom mijeloidnom leukemijom i 3 s mijelodisplastičnim sindromom), koji su dobivali CWP intravenski svaki dan 3 tjedna, polučila je kompletnu remisiju u jednog pacijenta u dozama 153 i 118 mg/m<sup>2</sup>. Među nuspojavama također su česte bile gastrointestinalne nuspojave, a *dose-limiting* nuspojave uključivale su mučninu, osip i anafilaktičku reakciju pri dozama od 54, 153 odnosno 198 mg/m<sup>2</sup>. [34] [117]

### 6.8.3. INHIBITORI INTERAKCIJE $\beta$ -KATENIN/BCL9

BCL9 jedan je od transkripcijskih koaktivatora koji s  $\beta$ -kateninom tvore transkripcijski kompleks. Karnozinska kiselina sprječava vezanje BCL9 i  $\beta$ -katenina tako što se veže uz vezujuće mjesto za BCL9 na  $\beta$ -kateninu [119] [4] . Do sada nema drugih studija koje bi potvrdile ili opovrgnule navedeno. Karnozinska kiselina je slaba kiselina i mala je molekula. Po kemijskoj strukturi je fenolni diterpen, prirodni spoj izoliran iz ružmarina, s antioksidativnim i antimikrobnim svojstvima, a nalazi se u hrani i u higijenskim proizvodima. Još jedna skupina molekula djeluje inhibitorno na kompleks BCL9 i  $\beta$ -katenina. Radi se o nedavno otkrivenim sulfono- $\gamma$ -AApeptidima koji svojom strukturom oponašaju  $\alpha$ -heliks molekule BCL9 (HD2 domenu), što im omogućuje da se vežu za  $\beta$ -katenin i ometaju proteinsko-proteinske interakcije  $\beta$ -katenina i BCL9. Uz to, ovi peptidi pokazali su izrazitu stabilnost i otpornost na proteolizu, što je obećavajuće jer je za inhibiranje kompleksnih interakcija nužno da peptid na putu do ciljne točke održi svoju 3D strukturu optimalnu za djelovanje na ciljnom mjestu. [120] [28]

### 6.9. INHIBITORI KINAZA CLK

SM08502 je inhibitor svih CDC-like kinaza (CLK). [121] Mala je molekula i može biti primijenjena oralnim putem. [122] U pokusu inhibicije 402 kinaze, ovaj lijek je pokazao selektivnost ( $IC_{50} \leq 0.05 \mu M$ ) za njih 19 (4.7%). Među njima treba izdvojiti kinaze CLK2 ( $IC_{50}=0.002 \mu M$ ), CLK3 (0.022  $\mu M$ ), CLK1 (0.008  $\mu M$ ), CLK4 (0.001  $\mu M$ ) i DYRK ( $IC_{50}$  0.002–0.013  $\mu M$ ). [122] Istovremeno rezultati govore o smanjenoj razini fosforiliranog SRSF5 i 6 u usporedbi s kontrolom. [122] Rezultati upućuju da SM08502 inhibira kinaze CLK1,2,3 i 4 (s tim da je presudna inhibicija CLK3 [122] ), posljedično smanjuju fosforilaciju SRSF-a, te ometaju njegovu ulogu u splicingu dovodeći do zadržavanja introna u genima VL2, TCF7, ERBB2 i LRP5 te preskakanja egzona u genima LEF1 i TCF7L2, što čini rezultatne mRNA nestabilnim. Kada se nestabilne mRNA stignu na ribosom, inducirat će se *nonsense-mediated mRNA decay (NMD)* put te neće doći do ekspresije navedenih gena. SM08502 smanjuje ekspresiju ovih gena neovisno o citoplazmatskim i nuklearnim razinama  $\beta$ -katenina. [122] Mjerenjem markera Wnt puta u usporedbi s markerima nekog drugog puta kao kontrolom pokazalo se da SM08502 značajno smanjuje ekspresiju Wnt ciljnih gena *in vitro*, inhibira Wnt put, te je 10 puta potentniji od PRI-724, inhibitora transkripcijske aktivnosti  $\beta$ -katenina. Ovi



pokusi rađeni su *in vitro* na stanicama kolorektalnog karcinoma s APC mutacijom. [122] SM08502 inhibira formaciju sferoida kako je pokazano na staničnim linijama karcinoma pankreasa [146]. Maksimalna tolerirana doza u miševa, koja iznosi 50 mg/kg/dan, utvrđena je pokusom u trajanju od 7 dana.[122] Provedeno je nekoliko vrlo sličnih studija na različitim vrstama tumora na staničnim linijama ili na mišjim ksenograftima. SM08502 je inducirao apoptozu u svim staničnim linijama gastrointestinalnih tumora *in vitro* te u mišjem ksenograftu kolorektalnog karcinoma.[122] U mišjim ksenograftima kolorektalnog karcinoma u većini ispitanih grupa (nekoliko različitih staničnih linija te nekoliko doza, iznad 12,5 mg/kg svaki drugi dan) došlo je do značajnog smanjenja rasta tumora za >50% u odnosu na kontrolu, neovisno o tome sadrže li tumori mutacije KRAS-a i β-katenina. Druga studija došla je do sličnih zaključaka o antiproliferativnoj aktivnosti SM08502 na karcinome pankreasa *in vivo* i *in vitro*. [123] Vrlo slična studija rađena je i na karcinomima jajnika. [121] *In vitro* su ovim lijekom tretirani razni histološki tipovi uključujući serozni karcinom jajnika visokog gradusa, endometrioidni, karcinom svijetlih stanica i teratokarcinom, a *in vivo* su upotrebljeni mišji ksenografti za tumore s mutacijom TP53, endometrioidni tumor s mutacijom CTNNB1 i teratokarcinom s mutacijom N-Ras. Kod svih staničnih linija smanjena je proliferativna sposobnost neovisno o mutaciji i histološkom tipu s prosječnom  $EC_{50}=0.123 \mu M$  [0.034 – 0.275]. Kod svih mišjih modela SM08502 TGI je također bila iznad 50%, pogotovo pri dozama od 25 mg/kg/dan. [121] Još jedna studija sličnog ustroja rađena je na trostruko negativnim karcinomima dojke. Kod nje je prosječni TGI na PDX modelima iznosio 69% te na CDX modelima 80%. SM08502 je trostruko smanjio broj CDX miševa s metastazama pluća (n=20). Kombinirana terapija SM08502, gemcitabinom i paklitakselom pokazala je značajan TGI (više od 80%), dok je njihova kombinacija još povećala TGI (na više od 93%;  $p<0.0001$ ) te dovela do regresije tumora u 3/10 odnosno 6/10 miševa. Sama kombinacija paklitaksela i gemcitabina nije uspjela izazvati regresiju tumora. *In vitro*, u usporedbi s normalnim stanicama dojke, u tumorskim stanicama dojke Wnt proteini kao što su TCF7, DVL2, LRP5 i ERBB2 bili su hiperekspimirani, te se SM08502 pokazao kao selektivan ( $EC_{50}=1.517 \mu M$  u odnosu na  $0.080 \mu M$ ) pri inhibiranju proliferacije tumorskih u odnosu na normalne stanice dojke [124]. U svim staničnim linijama karcinoma prostate, neovisno o njihovom mutacijskom statusu, SM08502 doveo je do inhibicije proliferacije ( $EC_{50}=0.319 \mu M$ ), također je inhibirao SRSF6 i ekspresiju Wnt gena. *In vivo*, SM08502 je također pokazao značajan TGI na CDX miševima s karcinomima prostate rezistentnim na kastraciju, dok je TGI za druge lijekove (enzalutamid, abirateron i docetaksel) bio negativan, međutim bez statističke značajnosti. Također, više tumorskih regresija nastupilo je uz kombinaciju SM08502 i docetaksela nego samog SM08502

[68] [125]. U modelima CDX i PDX karcinoma pankreasa, SM08502 u kombinaciji s gemcitabinom i paklitakselom izazvao je značajno manji ponovni rast tumora u odnosu na gemcitabin + paklitaksel nakon 27 dana liječenja i 40 dana praćenja [126]. Na kraju liječenja (27.dan) u CDX modelima dodavanje SM08502 u kombinaciji s gemcitabina i paklitakselom imalo je veći učinak na TGI i regresiju tumora, za razliku od PDX modela gdje dodatak SM08502 nije imao većeg učinka na TGI, no svejedno je smanjio ponovni rast tumora (za doze 25mg/kg u CDX te 12.5 mg/kg u PDX). Također se lijek pokazao vrlo uspješnim u inhibiciji rasta tumora modela CDX u svim dozama u kombinaciji s gemcitabinom i paklitakselom. [126] Budući da su preklinički rezultati *in vivo* i *in vitro* bili obećavajući, SM08502 je trenutno u fazi I kliničkih istraživanja.

Tablica 1. Inhibitori kanonskog Wnt puta u dosadašnjim kliničkim ispitivanjima. Prema: Jung SY i sur. (2020.) [4]

Lijek	Način djelovanja	Tip karcinoma	Faza	Identifikacijski broj
*WNT974 (=LGK974) (s LGX818 i cetuksimabom)	Inhibitor PORCN	Metastatski kolorektalni karcinom	Faza 1	NCT02278133
WNT974	Inhibitor PORCN	Planocelularni karcinomi glave i vrata	Faza 2	NCT02649530
WNT974	Inhibitor PORCN	Karcinom pankreasa Kolorektalni karcinom s BRAF mutacijom Melanom Trostruko-negativni karcinom dojke Glava i vrat Planocelularni karcinomi (cerviks, jednjak, pluća)	Faza 1	NCT01351103
ETC-1922159	Inhibitor PORCN	Solidni tumor	Faza 1	NCT02521844

Lijek	Način djelovanja	Tip karcinoma	Faza	Identifikacijski broj
RXC004	Inhibitor PORCN	Solidni tumor	Faza 1	NCT03447470
CGX1321	Inhibitor PORCN	Kolorektalni adenokarcinom Adenoakarcinom želuca Adenokarcinom pankreasa Karcinom žučnih vodova HCC Karcinom jednjaka Gastrointestinalni karcinom	Faza 1	NCT03507998
*CGX1321 (s pembrolizumabom)	Inhibitor PORCN	Solidni tumori Karcinomi gastrointestinalnog trakta	Faza 1	NCT02675946
OTSA101-DTPA-90Y	antagonist FZD10	Sinovijalni sarkom	Faza 1	NCT01469975
*OMP-18R5 (=Vantictumab; docetakselom)	Monoklonsko protutijelo protiv receptora FZD	Solidni tumori	Faza 1	NCT01957007
OMP-18R5	Monoklonsko protutijelo protiv receptora FZD	Metastatski karcinom dojke	Faza 1	NCT01973309
OMP-18R5	Monoklonsko protutijelo protiv receptora FZD	Solidni tumori	Faza 1	NCT01345201
*OMP-18R5 (s nab-paklitakselom gemcitabinom)	Monoklonsko protutijelo protiv receptora FZD	Karcinom pankreasa Karcinom pankreasa stadija IV	Faza 1	NCT02005315
*OMP-54F28 (sa sorafenibom)	neaktivni mimetik FZD8 receptora	Hepatocelularni karcinom Karcinom jetre	Faza 1	NCT02069145
*OMP-54F28 (s paklitakselom karboplatinom)	neaktivni mimetik FZD8 receptora	Karcinom jajnika	Faza 1	NCT02092363

Lijek	Način djelovanja	Tip karcinoma	Faza	Identifikacijski broj
*OMP-54F28 (s nab-paklitaxelom i gemcitabinom)	neaktivni mimetik FZD8 receptora	Karcinom pankreasa Karcinom pankreasa stadija IV	Faza 1	NCT02050178
OMP-54F28	neaktivni mimetik FZD8 receptora	Solidni tumori	Faza 1	NCT01608867
PRI-724	antagonist CBP/ $\beta$ -katenin	Uznapredovali karcinom pankreasa Metastatski karcinom pankreasa Adenokarcinom pankreasa	Faza 1	NCT01764477
PRI-724	antagonist CBP/ $\beta$ -katenin	Uznapredovali solidni tumori	Faza 1	NCT01302405
PRI-724	antagonist CBP/ $\beta$ -katenin	Akutna mijeloidna leukemija Kronična mijeloidna leukemija	Faza 2	NCT01606579
*PRI-724 (s leukovorin kalcijem, oksaliplatinom ili florouracilom)	antagonist CBP/ $\beta$ -katenin	Akutna mijeloidna leukemija Kronična mijeloidna leukemija	Faza 2	NCT02413853
SM08502	Inhibitor ekspresije gena kontrolirane $\beta$ -kateninom	Solidni tumori	Faza 1	NCT03355066

## 7. NUSPOJAVE WNT INHIBITORA

Zbog inhibicije esencijalnog staničnog puta Wnt očekuju se nuspojave povezane s nemogućnošću obnove tkiva. [6] Naime, činjenica da je optimalno regulirana aktivacija Wnt puta presudna za obnavljanje tkiva zdravog organizma, a posebice tkiva s brzim obratom stanica kao što su gastrointestinalni sustav, folikuli dlake te hematopoetski sustav, mogla bi drastično ograničiti upotrebu inhibitora Wnt puta kao sistemske terapije u liječenju tumora.

Pokazalo se da su najizglednije posljedice inhibicije Wnt puta gastrointestinalne nuspojave, gubitak kose, imunosupresija, vitiligo, lomovi kostiju te neurodegeneracija. Sukladno tome, kod većine pacijenata kod kojih su primjenjeni inhibitori puta Wnt najčešće prijavljene nuspojave bile su mučnina, umor, povraćanje, bol u abdomenu, proljev ili konstipacija, anemija, neutropenija, trombocitopenija, svrbež kože te rjeđe patološki prijelomi.

Osim ovih nuspojava, zapažene su i povišenje razine bilirubina i alkalne fosfataze, kao i hipofosfatemija. Ove nuspojave mogle bi se objasniti koštanom pregradnjom, ali i činjenicom da je uredna Wnt signalizacija važna pri obnovi jetrenog i bubrežnog tkiva nakon ozljede [127]. Slaba točka ovih studija predstavlja neprovjeravanje jesu li pacijenti kod kojih su zabilježene navedene nuspojave tijekom uzimanja terapije imali ozljede ili bolesti bubrega.

S obzirom da Wnt put na kompleksan način regulira koštanu pregradnju, jedna od nuspojava Wnt inhibitora prijavljena u ranim kliničkim fazama je povećanje koštane pregradnje. Pokazalo se međutim da se ona može prevenirati bisfosfonatima, konkretno zolendronskom kiselinom. Na temelju prethodnih studija poznato je da smanjena ekspresija LRP5 u mišjim osteoblastima dovodi do osteopeničnog fenotipa, dok kod povećane ekspresije LRP5 nalazimo povećanu koštanu masu. [128] Naime, aktivacija kanonskog puta Wnt potiče diferencijaciju mezenhimskih progenitorskih stanica u osteoblaste. [5] Osim toga,  $\beta$ -katenin potiče ekspresiju osteoprotegerina u diferenciranim osteoblastima, koji vezanjem za RANKL sprječava njegovu interakciju s RANK na osteoklastima, te tako doprinosi inhibiciji diferencijacije osteoklasta.

Dakle, aktivacija kanonskog Wnt puta doprinosi pomaku ravnoteže prema izgradnji u odnosu na resorpciju kostiju. Štoviše, i ne-kanonski Wnt put doprinosi funkciji osteoblasta, primjerice Wnt7b preko aktivacije PKC $\delta$  stimulira diferencijaciju osteoblasta, a neki Wnt ligandi također aktiviraju mTORC1 što promovira izgradnju kosti. Navedeno bi objasnilo mehanizam nastanka koštanih nuspojava i patoloških prijeloma prilikom farmakološke inhibicije Wnt puta, što je već primijećeno u ranim fazama kliničkih ispitivanja pojedinih Wnt inhibitora. [128] Tako je poznato da se agonisti Wnt puta istražuju kao potencijalna terapija za osteoporozi, kao i za druge bolesti gdje je potrebno potaknuti obnovu tkiva ili organa.

Ne treba dodatno naglašavati da su svi inhibitori Wnt puta apsolutno kontraindicirani u trudnoći. Naime, Wnt signalizacija među stanicama pokazala se izrazito bitnom u morfogenezi središnjeg živčanog sustava. Gradijent Wnt signalizacije upravlja uspostavljanjem anteriorno-posteriornih odnosa u središnjem živčanom sustavu, a Wnt signalizacija također ima ulogu u navođenju dendrita i aksona i sinaptogenezi. [9] Pri formaciji neuralnog grebena Wnt signalizacija je izraženija u dorzalnim strukturama, a u anteriornim je inhibirana pomoću

parakrinih proteina DKK-1. Inhibicija DKK-1 dovodi do posteriorizacije anteriornih dijelova mozga, a knock-out-om Wnt3a spriječen je razvoj hipokampusa u miša. Inhibicija LRP-a dovodi do hipoplazije dorzalnog talamusa. [9, 129] U fazama kliničkih istraživanja ostaje otvoreno pitanje kako bi inhibicija puta Wnt utjecala na kognitivne sposobnosti bolesnika, pogotovo mlađih. U odraslom mozgu, pravilna aktivacija Wnt puta presudna je za adultnu neurogenezu i preživljenje neurona u supraventrikularnoj zoni i hipokampusu, održavanje viših kognitivnih funkcija te dopaminergičkih puteva u mezencefalonu, a čini se da utječe i na formiranje sinapsi. [3] [129] Eventualne nuspojave ovakvog tipa možda neće biti uočene u studijama na štakorima.

Sve u svemu, nuspojave koje možemo očekivati kod Wnt inhibitora slične su već poznatim nuspojavama dosadašnjih kemoterapeutika, a u nekim slučajevima, kod primjene kombinirane terapije, nije moguće razlučiti jesu li nuspojave posljedica kemoterapeutika ili striktno Wnt inhibitora. Isto tako nedovoljno su istražene interakcije s drugim molekulama eventualno slične kemijske strukture ili funkcije, što može dovesti do tzv. *off-target* nuspojava. [28] Kako bi se prevladale nuspojave sistemske inhibicije puta Wnt, predložene su strategije za dopremanje Wnt inhibitora direktno do tumorskih stanica, pomoću nanočestica, liposoma ili povezivanja inhibitora s nekom od molekula koje određeni tumor privlači.[55]

## 8. KOMBINACIJA WNT INHIBITORA S DRUGIM OBLICIMA ANTITUMORSKE TERAPIJE

Tijekom istraživanja djelovanja Wnt inhibitora na tumorske stanice, u nekim studijama primijećen je i njihov povoljan utjecaj na druge modalitete antitumorske terapije.

Na primjer, novija istraživanja upućuju na potencijalno suzbijanje rezistencije na *checkpoint* inhibitore pomoću Wnt inhibitora. Checkpoint inhibitori su vrsta imunoterapije, a djeluju tako da blokiraju tzv. *checkpoin*te, proteine koji omogućuju imunskim stanicama prepoznavanje i pošteđivanje tumorskih stanica od imunskog odgovora.[141]

Wnt signalizacija može uzrokovati rezistenciju na *checkpoint* inhibitore modulacijom tumorskog mikrookoliša kroz interakciju s makrofagima povezanim s tumorom, ili poticanjem proizvodnje mliječne kiseline i stvaranjem kiselog tumorskog okoliša koji djeluje imunosupresivno za citotoksične T-limfocite. Dakle, Wnt signalizacija na ovaj način može

potaknuti sprječavanje akumulacije imunskih stanica u blizini tumora, tzv. *immune cell exclusion*, a budući da imunske stanice ne mogu doprijeti do tumorskih stanica, tumor postaje rezistentan na *checkpoint* inhibitore.[142]

Nekoliko prekliničkih studija pokazalo je da inhibicija kanonskog puta Wnt u kombinaciji s *checkpoint* inhibitorima može učinkovito prevladati ovu rezistenciju.[142] Jedno novije istraživanje pokazalo je da farmakološka inhibicija proksimalne Wnt signalizacije senzibilizira transgenične mišje modele melanoma i raka pluća na imunoterapiju *checkpoint* inhibitorom anti-PD-1, kroz ukidanje tolerancije dendritičnih stanica i suzbijanje regrutacije granulocitnih supresorskih stanica iz koštane srži u tumor.[141]

Klinička studija faze 1 koja je koristila inhibitor porcupina LGK974 u kombinaciji sa spartalizumabom, monoklonskim protutijelom na PD-1, izvijestila je o impresivnim rezultatima u pacijenata s nekoliko vrsta solidnih tumora, što je uključivalo stabilnu bolest u 53% pacijenata koji su prethodno bili otporni na *checkpoint* inhibitore. [142]

Također, neka istraživanja su ukazala na dobrobit kombinacije Wnt inhibitora s taksanima. Taksani, među kojima su paklitaksel, nab-paklitaksel i docetaksel, djelovanjem na mikrotubule blokiraju diobu stanica u M fazi. Komponente Wnt puta također imaju ulogu u M fazi staničnog ciklusa.  $\beta$ -katenin je nužan za razdvajanje centrosoma pri formaciji diobenog vretena, dok APC i Dishevelled sudjeluju u regulaciji vezanja diobenog vretena na kinetohore, a zajedno s FZD i LRP utječu na orijentaciju diobenog vretena. Inhibicija Wnt signalizacije dovodi do defekata diobenog vretena. Uz to, rezistencija na taksane povezuje se s povećanjem frekvencije tumorigenih stanica, dakle stanica koje su sposobne inicirati rast tumora nakon serijske transplantacije tumora. Naime, nab-paklitaksel je u mišjih ksenografta s tumorima pankreasa deriviranim iz pacijenata izazvao povećanje broja stanica u G2-M fazi, povišenje razina  $\beta$ -katenina u stanicama te trostruko povišenje razina  $\beta$ -katenina u stanicama u mitozu. Tretiranje istih tumora gemcitabinom nije polučilo ovakve efekte. Budući da se  $\beta$ -katenin u kompleksu s transkripcijskim faktorima i koaktivatorima veže na promotorsko mjesto gena za CD44, koji je inače jedan od markera tumorskih stanica, pretpostavljeno je da bi inhibicija Wnt puta doprinijela smanjenju ovog efekta. Sve u svemu, sinergizam Wnt inhibitora s taksanima mogao bi se objasniti dvostrukim djelovanjem na funkciju mikrotubula i ometanje diobe stanice te sprječavanjem aktivacije Wnt puta nakon primjene taksana. Kombinacija ipafricepta te vantictumaba s taksanima evaluirana je na mišjim ksenograftima tumora dojke, jajnika i pankreasa, među kojima nisu bili tumori s mutacijama nizvodno od mjesta djelovanja ipafricepta i vantictumaba. Pokazalo se da Wnt inhibitori pojačavaju citotoksični učinak taksana

modulacijom aktivnosti Wnt puta u mitotskim stanicama, a manje su učinkoviti u kombinaciji s blokatorima S-faze ili lijekovima na bazi platine. U ovom istraživanju doze vantictumaba i ipafricepta bile su 25 mg/kg svaka 2 ili 3 tjedna, jer se takav režim doziranja pokazao i učinkovitiji i manje toksičan za kosti nego kada bi se manje doze davale češće. Za optimalan učinak ove kombinacije lijekova nužno je davati Wnt inhibitor prije taksana, jer se obrnuta ili istovremena primjena pokazala manje učinkovitom. Isto tako, pokazalo se da Wnt inhibitori potenciraju sposobnost taksana da izazove mitotičku katastrofu; vrstu staničnog odgovora na neispravnu mitozu koja rezultira apoptozom, nekrozom ili senescencijom. Kao što je navedeno, terapija taksanima povećava frekvenciju tumorigenih stanica, a ovaj efekt značajno je smanjen koristeći gore naveden režim pre-tretiranja tumora Wnt inhibitorima. [6] [69] [130] [48] [66] Klinička istraživanja ove kombinacije lijekova opisana su u dijelu o ipafriceptu

## 9. ZAKLJUČAK

Brojna istraživanja iznjedrila su molekule koje su sposobne inhibirati nepravilnu aktivnost Wnt signalizacije u tumorskim stanicama. Rezultati pretkliničkih i kliničkih istraživanja za velik dio spomenutih molekula su obećavajući. Međutim, mutacijski status  $\beta$ -katenina i transkripcijskih faktora i koaktivatora nije uzet u obzir u svim spomenutim studijama, pa ostaje otvoreno pitanje bi li pojedini inhibitor interakcija  $\beta$ -katenina s transkripcijskim faktorima i koaktivatorima imao učinka i na njihove mutirane oblike. Isto tako valja naglasiti kako većina navedenih studija nije pratila napredovanje bolesti niti pojavu metastaza i recidiva tumora, barem ne dugoročno, a umjesto toga glavna mjerena vrijednost inhibitornog učinka bila je veličina ili masa tumora. Za sada najviše izgleda za uključivanje u buduću antitumorsku terapiju ima inhibitor PRI-724, koji je trenutno došao do II faze kliničkih ispitivanja. Što se tiče ostalih inhibitora, potrebno je razlučiti vrste tumora u kojima bi određena skupina Wnt inhibitora imala uspjeha. Na primjer, za inhibitore porcupine, antagoniste Wnt liganada ili antagoniste receptora FZD ne bi se očekivao efekt u kolorektalnim i drugim spomenutim karcinomima s konstitutivno aktivnim Wnt putem nizvodno od njihovih mjesta djelovanja. Međutim, njihova primjena kod glioma i glioblastoma predstavlja bolji izbor s obzirom na visoki postotak promjena Wnt-liganada, FZD receptora te izvanstaničnih negativnih modulatora kao što su SFRP i DKK. U ovim tumorima također možemo djelovati na inhibiciju palmitoilacije i sekreciju Wnt liganada PCP puta, uključujući i Wnt5a koji je hiperekprimiran u glioblastomima. Potrebno je dalje razjasniti zašto



je aktivacija Wnt puta u nekim tumorima povezana s agresivnim ponašanjem dok u drugima nije, pri čemu bi, na primjer, trebalo istražiti utjecaj signala iz tumorskog okoliša kao i specifičnosti vrste tumorskih stanica na odabir transkripcijskih koaktivatora  $\beta$ -katenina i posljedice transkripcije Wnt ciljnih gena. S obzirom na mnoge ozbiljne nuspojave koje su se izazvane primjenom ovih molekula, kao i zbog nedovoljnog poznavanja potencijalnih štetnih učinaka Wnt inhibitora preporuča se provedba daljnjih istraživanja. Medikamentna regulacija signalnog puta Wnt i dalje predstavlja jedan od perspektivnih pristupa budućem liječenju tumora u kombinaciji s postojećim lijekovima.

## 10. LITERATURA

1. Zhang KS, Zhou Q, Wang YF, Liang LJ. Inhibition of Wnt signaling induces cell apoptosis and suppresses cell proliferation in cholangiocarcinoma cells. *Oncol Rep.* 2013;30(3):1430–8.
2. Duchartre Y, Kim YM, Kahn M. The Wnt signaling pathway in cancer. Vol. 99, *Critical Reviews in Oncology/Hematology.* 2016. p. 141–9.
3. Kahn M. Can we safely target the WNT pathway? Vol. 13, *Nature Reviews Drug Discovery.* 2014. p. 513–32.
4. Jung YS, Park J II. Wnt signaling in cancer: therapeutic targeting of Wnt signaling beyond  $\beta$ -catenin and the destruction complex. Vol. 52, *Experimental and Molecular Medicine.* 2020. p. 183–91.
5. Tabatabai R, Linhares Y, Bolos D, Mita M, Mita A. Targeting the Wnt Pathway in Cancer: A Review of Novel Therapeutics. *Target Oncol.* 2017;12(5):623–41.
6. Krishnamurthy N, Kurzrock R. Targeting the Wnt/beta-catenin pathway in cancer: Update on effectors and inhibitors. Vol. 62, *Cancer Treatment Reviews.* 2018. p. 50–60.
7. Mukherjee N, Panda CK. Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling Pathway as Chemotherapeutic Target in Breast Cancer: An Update on Pros and Cons. Vol. 20, *Clinical Breast Cancer.* 2020. p. 361–70.
8. Hikasa H, Sokol SY. Wnt signaling in vertebrate axis specification. Vol. 5, *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology.* 2013.
9. McCord M, Mukouyama Y, Gilbert MR, Jackson S. Targeting WNT Signaling for Multifaceted Glioblastoma Therapy. *Front Cell Neurosci* [Internet]. 2017 Oct 13;11.
10. Ghosh N, Hossain U, Mandal A, Sil PC. The Wnt signaling pathway: a potential therapeutic target against cancer. *Ann N Y Acad Sci* [Internet]. 2019 May 24;1443(1):54–74.
11. Voronkov A, Krauss S. Wnt/beta-Catenin Signaling and Small Molecule Inhibitors. *Curr Pharm Des* [Internet]. 2012 Feb 1;19(4):634–64.
12. Bryja V, Červenka I, Čajánek L. The connections of Wnt pathway components with cell cycle and centrosome: side effects or a hidden logic? *Crit Rev Biochem Mol Biol* [Internet]. 2017 Nov 2;52(6):614–37.

13. Le PN, McDermott JD, Jimeno A. Targeting the Wnt pathway in human cancers: Therapeutic targeting with a focus on OMP-54F28 [Internet]. Vol. 146, Pharmacology and Therapeutics. 2015. p. 1–11.
14. Daulat AM, Borg J-P. Wnt/Planar Cell Polarity Signaling: New Opportunities for Cancer Treatment. Trends in Cancer [Internet]. 2017 Feb;3(2):113–25.
15. Miller JR. The Wnts. Genome Biol. 2002;3(1):REVIEWS3001. doi: 10.1186/gb-2001-3-1-reviews3001. Epub 2001 Dec 28.
16. Taciak B, Pruszynska I, Kiraga L, Bialasek M, Krol M. Wnt signaling pathway in development and cancer. J Physiol Pharmacol. 2018 Apr;69(2).
17. Laura Novellademunt, Pedro Antas and VSWL. Targeting Wnt signaling in colorectal cancer. A Review in the Theme: Cell Signaling: Proteins, Pathways and Mechanisms. Am J Physiol Physiol. 2015;309(8):C511–21.
18. Kafka A, Bašić-Kinda S, Pećina-Šlaus N. The cellular story of dishevelleds. Croat Med J. 2014 Oct;55(5):459-67. doi: 10.3325/cmj.2014.55.459. PMID: 25358879; PMCID: PMC4228291.
19. Tompa, M., Kalovits, F., Nagy, A. et al. Contribution of the Wnt Pathway to Defining Biology of Glioblastoma. Neuromol Med 2018, 20, 437–451.
20. Jiang S, Zhang M, Sun J, Yang X. Casein kinase 1 $\alpha$ : biological mechanisms and theranostic potential. Cell Communication and Signaling. 2018;16(1).
21. Kimelman D, Xu W.  $\beta$ -Catenin destruction complex: insights and questions from a structural perspective. Oncogene. 2006;25(57):7482-7491.
22. Valenta T, Hausmann G, Basler K. The many faces and functions of  $\beta$ -catenin. EMBO J. 2012 Jun 13;31(12):2714-36.
23. Zhan T, Rindtorff N, Boutros M. Wnt signaling in cancer. Oncogene. 2016;36(11):1461-1473.
24. Kahn M. Symmetric division versus asymmetric division: a tale of two coactivators. Future Medicinal Chemistry. 2011;3(14):1745-1763.
25. Shang S, Hua F, Hu Z. The regulation of  $\beta$ -catenin activity and function in cancer: therapeutic opportunities. Oncotarget. 2017;8(20):33972-33989.
26. Morgan R, Ridsdale J, Tonks A, Darley R. Factors Affecting the Nuclear Localization of  $\beta$ -Catenin in Normal and Malignant Tissue. Journal of Cellular Biochemistry. 2014;115(8):1351-1361.
27. Pokutta S, Weis W. Structure of the Dimerization and  $\beta$ -Catenin- Binding Region of  $\alpha$ -Catenin. Molecular Cell. 2000;5(3):533-543.

28. Zhang X, Wang L, Qu Y. Targeting the  $\beta$ -catenin signaling for cancer therapy. *Pharmacological Research*. 2020;160:104794.
29. Gottardi C, Gumbiner B. Distinct molecular forms of  $\beta$ -catenin are targeted to adhesive or transcriptional complexes. *Journal of Cell Biology*. 2004;167(2):339-349.
30. Castaño J, Raurell I, Piedra J, Miravet S, Duñach M, de Herreros A.  $\beta$ -Catenin N- and C-terminal Tails Modulate the Coordinated Binding of Adherens Junction Proteins to  $\beta$ -Catenin. *Journal of Biological Chemistry*. 2002;277(35):31541-31550.
31. Liang C, Wang Z, Chang Y, Lee K, Lin W, Lee J. SFRPs Are Biphasic Modulators of Wnt-Signaling-Elicited Cancer Stem Cell Properties beyond Extracellular Control. *Cell Reports*. 2019;28(6):1511-1525.e5.
32. Komiya Y, Habas R. Wnt signal transduction pathways. *Organogenesis*. 2008;4(2):68-75.
33. Wang Y. Wnt/Planar cell polarity signaling: A new paradigm for cancer therapy. *Molecular Cancer Therapeutics*. 2009;8(8):2103-2109.
34. Harb J, Lin P, Hao J. Recent Development of Wnt Signaling Pathway Inhibitors for Cancer Therapeutics. *Current Oncology Reports*. 2019;21(2).
35. Korinek V, Barker N, Moerer P, van Donselaar E, Huls G, Peters P et al. Depletion of epithelial stem-cell compartments in the small intestine of mice lacking Tcf-4. *Nature Genetics*. 1998;19(4):379-383.
36. Andl T, Reddy S, Gaddapara T, Millar S. WNT Signals Are Required for the Initiation of Hair Follicle Development. *Developmental Cell*. 2002;2(5):643-653.
37. Kanwar S, Yu Y, Nautiyal J, Patel B, Majumdar A. The Wnt/ $\beta$ -catenin pathway regulates growth and maintenance of colonospheres. *Molecular Cancer*. 2010;9(1):212.
38. Ramachandran I, Ganapathy V, Gillies E, Fonseca I, Sureban S, Houchen C et al. Wnt inhibitory factor 1 suppresses cancer stemness and induces cellular senescence. *Cell Death & Disease*. 2014;5(5):e1246-e1246.
39. Jin X, Jeon H, Joo K, Kim J, Jin J, Kim S et al. Frizzled 4 Regulates Stemness and Invasiveness of Migrating Glioma Cells Established by Serial Intracranial Transplantation. *Cancer Research*. 2011;71(8):3066-3075.
40. Vermeulen L, De Sousa E Melo F, van der Heijden M, Cameron K, de Jong J, Borovski T et al. Wnt activity defines colon cancer stem cells and is regulated by the microenvironment. *Nature Cell Biology*. 2010;12(5):468-476.

41. Fodde R, Brabletz T. Wnt/ $\beta$ -catenin signaling in cancer stemness and malignant behavior. *Current Opinion in Cell Biology*. 2007;19(2):150-158.
42. Lee Y, Lee J, Ahn S, Lee J, Nam D. WNT signaling in glioblastoma and therapeutic opportunities. *Laboratory Investigation*. 2015;96(2):137-150.
43. He L, Zhou H, Zeng Z, Yao H, Jiang W, Qu H. Wnt/ $\beta$ -catenin signaling cascade: A promising target for glioma therapy. *Journal of Cellular Physiology*. 2018;234(3):2217-2228.
44. Kafka A, Karin-Kujundžić V, Šerman L, Bukovac A, Njirić N, Jakovčević A et al. Hypermethylation of Secreted Frizzled Related Protein 1 gene promoter in different astrocytoma grades. *Croatian Medical Journal*. 2018;59(5):213-223.
45. Arnés M, Casas Tintó S. Aberrant Wnt signaling: a special focus in CNS diseases. *Journal of Neurogenetics*. 2017;31(4):216-222.
46. Gussyatiner O, Hegi M. Glioma epigenetics: From subclassification to novel treatment options. *Seminars in Cancer Biology*. 2018;51:50-58.
47. Kamino M, Kishida M, Kibe T, Ikoma K, Iijima M, Hirano H et al. Wnt-5a signaling is correlated with infiltrative activity in human glioma by inducing cellular migration and MMP-2. *Cancer Science*. 2011;102(3):540-548.
48. Bumbaca B, Li W. Taxane resistance in castration-resistant prostate cancer: mechanisms and therapeutic strategies. *Acta Pharmaceutica Sinica B*. 2018;8(4):518-529.
49. Schatoff E, Leach B, Dow L. WNT Signaling and Colorectal Cancer. *Current Colorectal Cancer Reports*. 2017;13(2):101-110.
50. Cheng X, Xu X, Chen D, Zhao F, Wang W. Therapeutic potential of targeting the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway in colorectal cancer. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2019;110:473-481.
51. Zhang Y, Guo L, Li Y, Feng G, Teng F, Li W et al. MicroRNA-494 promotes cancer progression and targets adenomatous polyposis coli in colorectal cancer. *Molecular Cancer*. 2018;17(1).
52. Slattery M, Mullany L, Sakoda L, Samowitz W, Wolff R, Stevens J et al. Expression of Wnt-signaling pathway genes and their associations with miRNAs in colorectal cancer. *Oncotarget*. 2017;9(5):6075-6085.
53. Liu N, Jiang F, Han XY, Li M, Chen WJ, Liu QC, Liao CX, Lv YF. MiRNA-155 promotes the invasion of colorectal cancer SW-480 cells through regulating the Wnt/ $\beta$ -catenin. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2018 Jan;22(1):101-109.

54. Pohl S, Brook N, Agostino M, Arfuso F, Kumar A, Dharmarajan A. Wnt signaling in triple-negative breast cancer. *Oncogenesis*. 2017;6(4):e310-e310.
55. Zimmerli D, Hausmann G, Cantù C, Basler K. Pharmacological interventions in the Wnt pathway: inhibition of Wnt secretion versus disrupting the protein-protein interfaces of nuclear factors. *British Journal of Pharmacology*. 2017;174(24):4600-4610.
56. Gajos-Michniewicz A, Czyz M. WNT Signaling in Melanoma. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020;21(14):4852.
57. Murillo-Garzón V, Kypta R. WNT signalling in prostate cancer. *Nature Reviews Urology*. 2017;14(11):683-696.
58. Zhong Z, Sepramaniam S, Chew X, Wood K, Lee M, Madan B et al. PORCN inhibition synergizes with PI3K/mTOR inhibition in Wnt-addicted cancers. *Oncogene*. 2019;38(40):6662-6677.
59. Lyou Y, Habowski A, Chen G, Waterman M. Inhibition of nuclear Wnt signalling: challenges of an elusive target for cancer therapy. *British Journal of Pharmacology*. 2017;174(24):4589-4599.
60. Li J, Wu G, Xu Y, Li J, Ruan N, Chen Y et al. Porcupine Inhibitor LGK974 Downregulates the Wnt Signaling Pathway and Inhibits Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *BioMed Research International*. 2020;2020:1-16.
61. Liu J, Pan S, Hsieh M, Ng N, Sun F, Wang T et al. Targeting Wnt-driven cancer through the inhibition of Porcupine by LGK974. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2013;110(50):20224-20229.
62. Guimaraes P, Tan M, Tammela T, Wu K, Chung A, Oberli M et al. Potent in vivo lung cancer Wnt signaling inhibition via cyclodextrin-LGK974 inclusion complexes. *Journal of Controlled Release*. 2018;290:75-87.
63. Madan B, Ke Z, Harmston N, Ho S, Frois A, Alam J et al. Wnt addiction of genetically defined cancers reversed by PORCN inhibition. *Oncogene*. 2015;35(17):2197-2207.
64. Jimeno A, Gordon M, Chugh R, Messersmith W, Mendelson D, Dupont J et al. A First-in-Human Phase I Study of the Anticancer Stem Cell Agent Ipafricept (OMP-54F28), a Decoy Receptor for Wnt Ligands, in Patients with Advanced Solid Tumors. *Clinical Cancer Research*. 2017;23(24):7490-7497.
65. Smith D, Rosen L, Wang M, Zhang C, Xu L, Chugh R et al. Abstract B24: Biomarker analysis in the first-in-human phase 1a study for vantiutumab (OMP-

- 18R5; anti-Frizzled) demonstrates pharmacodynamic (PD) modulation of the Wnt pathway in patients with advanced solid tumors. *Biomarkers*. 2013;.
66. Gurney A, Axelrod F, Bond C, Cain J, Chartier C, Donigan L et al. Wnt pathway inhibition via the targeting of Frizzled receptors results in decreased growth and tumorigenicity of human tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2012;109(29):11717-11722.
  67. ZHANG C, Cattaruzza F, Yeung P, Yen W, Fischer M, Brunner A et al. Abstract A30: Predictive and pharmacodynamic biomarkers of vantiactumab (OMP-18R5; anti-Frizzled) in non-small cell lung cancer. *Biomarkers*. 2015;.
  68. Bossard C, Cruz N, Chiu K, Eastman B, Mak C, KC S et al. SM08502, a novel, small-molecule CDC-like kinase (CLK) inhibitor, demonstrates strong antitumor effects and Wnt pathway inhibition in castration-resistant prostate cancer (CRPC) models. *Cancer Chemistry*. 2020;.
  69. Fischer M, Cancilla B, Yeung V, Cattaruzza F, Chartier C, Murriel C et al. WNT antagonists exhibit unique combinatorial antitumor activity with taxanes by potentiating mitotic cell death. *Science Advances*. 2017;3(6):e1700090.
  70. Mita M, Becerra C, Richards D, Mita A, Shagisultanova E, Osborne C et al. Phase 1b study of WNT inhibitor vantiactumab (VAN, human monoclonal antibody) with paclitaxel (P) in patients (pts) with 1st- to 3rd-line metastatic HER2-negative breast cancer (BC). *Journal of Clinical Oncology*. 2016;34(15\_suppl):2516-2516.
  71. Le P, Keysar S, Miller B, Eagles J, Chimed T, Reisinger J et al. Wnt signaling dynamics in head and neck squamous cell cancer tumor-stroma interactions. *Molecular Carcinogenesis*. 2018;58(3):398-410.
  72. Pavlovic Z, Adams J, Blazer L, Gakhal A, Jarvik N, Steinhart Z et al. A synthetic anti-Frizzled antibody engineered for broadened specificity exhibits enhanced anti-tumor properties. *mAbs*. 2018;10(8):1157-1167.
  73. Papadopoulos K, Rosen L, Chugh R, Tolcher T. A Phase Ia study in patients with advanced solid tumors for the human monoclonal antibody vantiactumab (OMP-18R5; anti-Frizzled) targeting the WNT pathway. *European Cancer Congress 2013 (ECCO-ESMO-ESTRO)*. 2013;.
  74. Davis S, Cardin D, Shahda S, Lenz H, Dotan E, O'Neil B et al. A phase 1b dose escalation study of Wnt pathway inhibitor vantiactumab in combination with nab-paclitaxel and gemcitabine in patients with previously untreated metastatic pancreatic cancer. *Investigational New Drugs*. 2019;38(3):821-830.

75. Messersmith W, Cohen S, Shahda S, Lenz H, Weekes C, Dotan E et al. Phase 1b study of WNT inhibitor vantictumab (VAN, human monoclonal antibody) with nab-paclitaxel (Nab-P) and gemcitabine (G) in patients (pts) with previously untreated stage IV pancreatic cancer (PC). *Annals of Oncology*. 2016;27:vi228.
76. Wang Z, Feng T, Zhou L, Jiang D, Zhang Y, He G et al. Salinomycin nanocrystals for colorectal cancer treatment through inhibition of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling. *Nanoscale*. 2020;12(38):19931-19938.
77. Versini A, Saier L, Sindikubwabo F, Müller S, Cañeque T, Rodriguez R. Chemical biology of salinomycin. *Tetrahedron*. 2018;74(39):5585-5614.
78. Dewangan J, Srivastava S, Rath S. Salinomycin: A new paradigm in cancer therapy. *Tumor Biology*. 2017;39(3):101042831769503.
79. Norouzi M, Yathindranath V, Thliveris J, Miller D. Salinomycin-Loaded Iron Oxide Nanoparticles for Glioblastoma Therapy. *Nanomaterials*. 2020;10(3):477.
80. Giraudet A, Cassier P, Iwao-Fukukawa C, Garin G, Badel J, Kryza D et al. A first-in-human study investigating biodistribution, safety and recommended dose of a new radiolabeled MAb targeting FZD10 in metastatic synovial sarcoma patients. *BMC Cancer*. 2018;18(1).
81. Lu D, Choi M, Yu J, Castro J, Kipps T, Carson D. Salinomycin inhibits Wnt signaling and selectively induces apoptosis in chronic lymphocytic leukemia cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2011;108(32):13253-13257.
82. Venkatadri R, Iyer A, Kaushik V, Azad N. A novel resveratrol–salinomycin combination sensitizes ER-positive breast cancer cells to apoptosis. 2021.
83. van Andel H, Kocemba K, Spaargaren M, Pals S. Aberrant Wnt signaling in multiple myeloma: molecular mechanisms and targeting options. *Leukemia*. 2019;33(5):1063-1075.
84. Khalaf AM, Fuentes D, Morshid AI, Burke MR, Kaseb AO, Hassan M, Hazle JD, Elsayes KM. Role of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling in hepatocellular carcinoma, pathogenesis, and clinical significance. *J Hepatocell Carcinoma*. 2018 Jun 27;5:61-73.
85. Juraschka K, Taylor M. Medulloblastoma in the age of molecular subgroups: a review. *Journal of Neurosurgery: Pediatrics*. 2019;24(4):353-363.
86. Sharma M, Castro-Piedras I, Simmons G, Pruitt K. Dishevelled: A masterful conductor of complex Wnt signals. *Cellular Signalling*. 2018;47:52-64.



87. Ma J, Hou Y, Xia J, Zhu X, Wang ZP. Tumor suppressive role of rottlerin in cancer therapy. *Am J Transl Res*. 2018 Nov 15;10(11):3345-3356.
88. Zhu Y, Wang M, Zhao X, Zhang L, Wu Y, Wang B, Hu W. Rottlerin as a novel chemotherapy agent for adrenocortical carcinoma. *Oncotarget*. 2017 Apr 4;8(14):22825-22834.
89. Vanneste M, Huang Q, Li M, Moose D, Zhao L, Starnes M et al. High content screening identifies monensin as an EMT-selective cytotoxic compound. *Scientific Reports*. 2019;9(1).
90. Markowska A, Kaysiewicz J, Markowska J, Huczyński A. Doxycycline, salinomycin, monensin and ivermectin repositioned as cancer drugs. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2019;29(13):1549-1554.
91. Arend R, Londoño-Joshi A, Gangrade A, Katre A, Kurpad C, Li Y et al. Niclosamide and its analogs are potent inhibitors of Wnt/ $\beta$ -catenin, mTOR and STAT3 signaling in ovarian cancer. *Oncotarget*. 2016;7(52):86803-86815.
92. Chen W, Mook R, Premont R, Wang J. Niclosamide: Beyond an antihelminthic drug. 2021.
93. Wang J, Ren X, Piao H, Zhao S, Osada T, Premont R et al. Niclosamide-induced Wnt signaling inhibition in colorectal cancer is mediated by autophagy. *Biochemical Journal*. 2019;476(3):535-546.
94. Fonseca B, Diering G, Bidinosti M, Dalal K, Alain T, Balgi A et al. Structure-Activity Analysis of Niclosamide Reveals Potential Role for Cytoplasmic pH in Control of Mammalian Target of Rapamycin Complex 1 (mTORC1) Signaling. *Journal of Biological Chemistry*. 2012;287(21):17530-17545.
95. Jurgeit A, McDowell R, Moese S, Meldrum E, Schwendener R, Greber U. Niclosamide Is a Proton Carrier and Targets Acidic Endosomes with Broad Antiviral Effects. *PLoS Pathogens*. 2012;8(10):e1002976.
96. Sack U, Walther W, Scudiero D, Selby M, Kobelt D, Lemm M et al. Novel Effect of Antihelminthic Niclosamide on S100A4-Mediated Metastatic Progression in Colon Cancer. *JNCI Journal of the National Cancer Institute*. 2011;103(13):1018-1036.
97. Schweizer M, Haugk K, McKiernan J, Gulati R, Cheng H, Maes J et al. A phase I study of niclosamide in combination with enzalutamide in men with castration-resistant prostate cancer. *PLOS ONE*. 2018;13(6):e0198389.

98. Patterson S, Wyllie S. Nitro drugs for the treatment of trypanosomatid diseases: past, present, and future prospects. *Trends Parasitol.* 2014 Jun;30(6):289-98.
99. Mizutani A, Yashiroda Y, Muramatsu Y, Yoshida H, Chikada T, Tsumura T et al. RK -287107, a potent and specific tankyrase inhibitor, blocks colorectal cancer cell growth in a preclinical model. *Cancer Science.* 2018;109(12):4003-4014.
100. Tanaka N, Mashima T, Mizutani A, Sato A, Aoyama A, Gong B et al. APC Mutations as a Potential Biomarker for Sensitivity to Tankyrase Inhibitors in Colorectal Cancer. *Molecular Cancer Therapeutics.* 2017;16(4):752-762.
101. Que F, Dai L, Zhou D, Lin Q, Zeng X, Yu L et al. AT-101 induces G1/G0 phase arrest via the  $\beta$ -catenin/cyclin D1 signaling pathway in human esophageal cancer cells. *Oncology Reports.* 2018;.
102. Guo W, Shen F, Xiao W, Chen J, Pan F. Wnt inhibitor XAV939 suppresses the viability of small cell lung cancer NCI-H446 cells and induces apoptosis. *Oncology Letters.* 2017;.
103. Pan F, Shen F, Yang L, Zhang L, Guo W, Tian J. Inhibitory effects of XAV939 on the proliferation of small-cell lung cancer H446 cells and Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway in vitro. *Oncology Letters.* 2018;.
104. Zhang J, Si J, Gan L, Guo M, Yan J, Chen Y et al. Inhibition of Wnt signalling pathway by XAV939 enhances radiosensitivity in human cervical cancer HeLa cells. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology.* 2020;48(1):479-487.
105. Ferri M, Liscio P, Carotti A, Ascitti S, Sardella R, Macchiarulo A et al. Targeting Wnt-driven cancers: Discovery of novel tankyrase inhibitors. *European Journal of Medicinal Chemistry.* 2017;142:506-522.
106. Li C, Zheng X, Han Y, Lv Y, Lan F, Zhao J. XAV939 inhibits the proliferation and migration of lung adenocarcinoma A549 cells through the WNT pathway. *Oncology Letters.* 2018;.
107. Shirai F, Tsumura T, Yashiroda Y, Yuki H, Niwa H, Sato S et al. Discovery of Novel Spiroindoline Derivatives as Selective Tankyrase Inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry.* 2019;62(7):3407-3427.
108. Kierulf-Vieira K, Sandberg C, Waaler J, Lund K, Skaga E, Saberniak B et al. A Small-Molecule Tankyrase Inhibitor Reduces Glioma Stem Cell Proliferation and Sphere Formation. *Cancers.* 2020;12(6):1630.

109. Norum J, Skarpen E, Brech A, Kuiper R, Waaler J, Krauss S et al. The tankyrase inhibitor G007-LK inhibits small intestine LGR5+ stem cell proliferation without altering tissue morphology. *Biological Research*. 2018;51(1).
110. Zheng L, Liu Y, Pan J. Inhibitory effect of pyrvinium pamoate on uveal melanoma cells involves blocking of Wnt/ $\beta$ -catenin pathway. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*. 2017;49(10):890-898.
111. Venerando A, Girardi C, Ruzzene M, Pinna L. Pyrvinium pamoate does not activate protein kinase CK1, but promotes Akt/PKB down-regulation and GSK3 activation. *Biochemical Journal*. 2013;452(1):131-137.
112. XU L, ZHANG L, HU C, LIANG S, FEI X, YAN N et al. WNT pathway inhibitor pyrvinium pamoate inhibits the self-renewal and metastasis of breast cancer stem cells. *International Journal of Oncology*. 2016;48(3):1175-1186.
113. Hwang S, Deng X, Byun S, Lee C, Lee S, Suh H et al. Direct Targeting of  $\beta$ -Catenin by a Small Molecule Stimulates Proteasomal Degradation and Suppresses Oncogenic Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling. *Cell Reports*. 2016;16(1):28-36.
114. Huang Z, Zhang M, Burton S, Katsakhyan L, Ji H. Targeting the Tcf4 G13ANDE17 Binding Site To Selectively Disrupt  $\beta$ -Catenin/T-Cell Factor Protein–Protein Interactions. *ACS Chemical Biology*. 2013;9(1):193-201.
115. El-Khoueiry A, Ning Y, Yang D, Cole S, Kahn M, Zoghbi M et al. A phase I first-in-human study of PRI-724 in patients (pts) with advanced solid tumors. *Journal of Clinical Oncology*. 2013;31(15\_suppl):2501-2501.
116. Ko A, Chiorean E, Kwak E, Lenz H, Nadler P, Wood D et al. Final results of a phase Ib dose-escalation study of PRI-724, a CBP/beta-catenin modulator, plus gemcitabine (GEM) in patients with advanced pancreatic adenocarcinoma (APC) as second-line therapy after FOLFIRINOX or FOLFOX. *Journal of Clinical Oncology*. 2016;34(15\_suppl):e15721-e15721.
117. Cortes J, Faderl S, Pagel J, Jung C, Yoon S, Koh Y et al. Phase 1 study of CWP232291 in relapsed/refractory acute myeloid leukemia (AML) and myelodysplastic syndrome (MDS). *Journal of Clinical Oncology*. 2015;33(15\_suppl):7044-7044.
118. Yoon S, Min C, Kim J, Manasanch E, Hauptschein R, Choi J et al. Ongoing Phase 1a/1b Dose-Finding Study of CWP232291 (CWP291) in Relapsed or Refractory Multiple Myeloma (MM). *Blood*. 2016;128(22):4501-4501.

119. Tran F, Zheng J. Modulating the wnt signaling pathway with small molecules. *Protein Science*. 2017;26(4):650-661.
120. Sang P, Zhang M, Shi Y, Li C, Abdulkadir S, Li Q et al. Inhibition of  $\beta$ -catenin/B cell lymphoma 9 protein–protein interaction using  $\alpha$ -helix–mimicking sulfono- $\gamma$ -AApeptide inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2019;116(22):10757-10762.
121. Chung H, Sitts L, Creger E, Liao E, Eastman B, Mak C et al. Abstract A09: SM08502, a novel, small-molecule CDC-like kinase (CLK) inhibitor, demonstrates strong inhibition of the Wnt signaling pathway and antitumor effects in diverse ovarian cancer models. *Poster Presentations - Proffered Abstracts*. 2020;.
122. Tam B, Chiu K, Chung H, Bossard C, Nguyen J, Creger E et al. The CLK inhibitor SM08502 induces anti-tumor activity and reduces Wnt pathway gene expression in gastrointestinal cancer models. *Cancer Letters*. 2020;473:186-197.
123. Bossard C, Cruz N, Eastman B, Mak C, Sunil K, Tam B et al. SM08502, a novel, small-molecule CDC-like kinase (CLK) inhibitor, downregulates the Wnt signaling pathway and demonstrates antitumor activity in pancreatic cancer cell lines and in vivo xenograft models. *Tumor Microenvironment*. 2019;.
124. Chung H, Sitts L, Creger E, Nguyen J, Eastman B, Mak C et al. Abstract P3-13-01: SM08502, a novel, small-molecule CDC-like kinase (CLK) inhibitor, demonstrates strong inhibition of the Wnt signaling pathway and antitumor effects as monotherapy and in combination with chemotherapy in triple-negative breast cancer (TNBC) models. *Poster Session Abstracts*. 2020;.
125. Chung H, Sitts L, Wu C, Eastman B, Mak C, KC S et al. Abstract 6401: SM08502, a novel, small-molecule CDC-like kinase (CLK) inhibitor, demonstrates strong antitumor effects and Wnt and cyclin D-CDK4/6-RB pathway inhibition in hormone-receptor-positive (HR+) breast cancer models. *Experimental and Molecular Therapeutics*. 2020;.
126. Bossard C, Astsaturov I, Cruz N, Eastman B, Mak C, Sunil K et al. Abstract C09: Inhibition of tumor growth and post-treatment regrowth by SM08502, a novel, small-molecule CDC-like kinase (CLK) inhibitor, in combination with standard of care in pancreatic cancer models. *Model Systems*. 2019;.
127. He W, Dai C, Li Y, Zeng G, Monga SP, Liu Y. Wnt/beta-catenin signaling promotes renal interstitial fibrosis. *J Am Soc Nephrol*. 2009 Apr;20(4):765-76.

128. Karner C, Long F. Wnt signaling and cellular metabolism in osteoblasts. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2016;74(9):1649-1657.
129. Zuccarini M, Giuliani P, Ziberi S, Carluccio M, Iorio P, Caciagli F et al. The Role of Wnt Signal in Glioblastoma Development and Progression: A Possible New Pharmacological Target for the Therapy of This Tumor. *Genes*. 2018;9(2):105.
130. Moore K, Gunderson C, Sabbatini P, McMeekin D, Mantia-Smaldone G, Burger R et al. A phase 1b dose escalation study of ipafricept (OMP 54F28) in combination with paclitaxel and carboplatin in patients with recurrent platinum-sensitive ovarian cancer. *Gynecologic Oncology*. 2019;154(2):294-301.+
131. Oulès B, Mourah S, Baroudjian B, Jouenne F, Delyon J, Louveau B et al. Clinicopathologic and molecular characterization of melanomas mutated for CTNNB1 and MAPK. *Virchows Archiv*. 2021;.
132. Bukovac A, Kafka A, Raguž M, Brlek P, Dragičević K, Müller D, Pećina-Šlaus N. Are We Benign? What Can Wnt Signaling Pathway and Epithelial to Mesenchymal Transition Tell Us about Intracranial Meningioma Progression. *Cancers (Basel)*. 2021 Apr 1;13(7):1633.
133. Cruciat C, Niehrs C. Secreted and Transmembrane Wnt Inhibitors and Activators. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2012;5(3):a015081-a015081.
134. Kafka A, Bukovac A, Brglez E, Jarmek A, Poljak K, Brlek P et al. Methylation Patterns of DKK1, DKK3 and GSK3 $\beta$  Are Accompanied with Different Expression Levels in Human Astrocytoma. *Cancers*. 2021;13(11):2530.
135. Polakis P. Drugging Wnt signalling in cancer. *EMBO J*. 2012 Jun 13;31(12):2737-46. doi: 10.1038/emboj.2012.126. Epub 2012 May 22. Erratum in: *EMBO J*. 2012 Aug;31(15):3375.
136. Mazieres J, He B, You L, Xu Z, Jablons D. Wnt signaling in lung cancer. *Cancer Letters*. 2005;222(1):1-10.
137. Xie J, Xiang D, Wang H, Zhao C, Chen J, Xiong F et al. Inhibition of Tcf-4 Induces Apoptosis and Enhances Chemosensitivity of Colon Cancer Cells. *PLoS ONE*. 2012;7(9):e45617.
138. Leal LF, Bueno AC, Gomes DC, Abduch R, de Castro M, Antonini SR. Inhibition of the Tcf/beta-catenin complex increases apoptosis and impairs adrenocortical tumor cell proliferation and adrenal steroidogenesis. *Oncotarget*. 2015 Dec 15;6(40):43016-32.

139. Liu X, Yan Y, Ma W, Wu S. Knockdown of frizzled-7 inhibits cell growth and metastasis and promotes chemosensitivity of esophageal squamous cell carcinoma cells by inhibiting Wnt signaling. *Biochem Biophys Res Commun.* 2017 Aug 26;490(3):1112-1118.
140. WU X, LUO F, LI J, ZHONG X, LIU K. Tankyrase 1 inhibitor XAV939 increases chemosensitivity in colon cancer cell lines via inhibition of the Wnt signaling pathway. *International Journal of Oncology.* 2016;48(4):1333-1340.
141. DeVito NC, Sturdivant M, Thievanthiran B, Xiao C, Plebanek MP, Salama AKS, Beasley GM, Holtzhausen A, Novotny-Diermayr V, Strickler JH, Hanks BA. Pharmacological Wnt ligand inhibition overcomes key tumor-mediated resistance pathways to anti-PD-1 immunotherapy. *Cell Rep.* 2021 May 4;35(5):109071.
142. Chehrazi-Raffle A, Dorff TB, Pal SK, Lyou Y. Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling and Immunotherapy Resistance: Lessons for the Treatment of Urothelial Carcinoma. *Cancers (Basel).* 2021 Feb 20;13(4):889.
143. Dotan E, Cardin DB, Lenz HJ, Messersmith W, O'Neil B, Cohen SJ, Denlinger CS, Shahda S, Astsaturov I, Kapoun AM, Brachmann RK, Uttamsingh S, Stagg RJ, Weekes C. Phase Ib Study of Wnt Inhibitor Ipafricept with Gemcitabine and nab-paclitaxel in Patients with Previously Untreated Stage IV Pancreatic Cancer. *Clin Cancer Res.* 2020 Oct 15;26(20):5348-5357.
144. Ahmed K, Shaw H, Koval A, Katanaev V. A Second WNT for Old Drugs: Drug Repositioning against WNT-Dependent Cancers. *Cancers.* 2016;8(7):66.
145. PubChem [Internet]. Pubchem.ncbi.nlm.nih.gov. 2021 [pristupljeno 7. lipnja 2021]. Dostupno na: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>
146. Bossard C, Cruz N, Eastman B, Mak C, KC S, Tam B et al. SM08502, a novel, small-molecule CDC-like kinase (CLK) inhibitor, demonstrates activity against cancer stem cell (CSC)-enriched pancreatic cancer cells and suppresses stemness in vitro. *Signaling.* 2019;.

## 11. ZAHVALE

Zahvaljujem mentorici prof.dr.sc. Nives Pećini-Šlaus koja je svojim savjetima pomogla nastanku ovog rada.

## 12. ŽIVOTOPIS

### OSOBNI PODACI

Ime i prezime: Sara Aničić

Datum rođenja: 23.8.1996.

Mjesto rođenja: Zagreb, Republika Hrvatska

### OBRAZOVANJE

Osnovna škola Ivana Mažuranića, Zagreb (2003.-2011.)

XV.gimnazija, Zagreb (2011.-2015.)

Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu (2015.-2021.)