

Uloga signalnog puta Hedgehog u razvoju tumora

Škoda, Ana Marija

Master's thesis / Diplomski rad

2017

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:105:658696>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-24**



Repository / Repozitorij:

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



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Ana Marija Škoda

**Uloga signalnog puta *Hedgehog* u razvoju
tumora**

DIPLOMSKI RAD



Zagreb, 2017.

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Ana Marija Škoda

**Uloga signalnog puta *Hedgehog* u razvoju
tumora**

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, 2017.

Ovaj diplomski rad izrađen je na Katedri za biologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom prof. dr. sc. Ljiljane Šerman, dr. med. i predan je na ocjenu u akademskoj godini 2016./2017.

POPIS I OBJAŠNENJE KRATICA

aa	aminokiselina (engl. amino acid)
ABCG2	engl. ATP-binding cassette subfamily G member 2
aPKC-ι/λ	atipična protein kinaza C ι/λ (engl. Atypical protein kinase C ι/λ)
ATO	engl. Arsenic trioxide
BCC	bazocelularni karcinom (engl. Basal cell carcinoma)
BCL2	limfom B-stanica 2 (engl. B-cell lymphoma 2)
BCNS	nevoidni bazocelularno karcinomski sindrom (engl. Basal Cell Nevus Syndrom)
BET	engl. Bromodomain proteins
cAMP	ciklički adenzin monofosfat (engl. Cyclic adenosine monophosphat)
CCND2	engl. G1/S-specific cyclin-D2
CCNE1	engl. G1/S-specific cyclin-E1
CK1	kazein kinaza 1 (engl. Casein kinase 1)
CRC	kolorektalni karcinom (engl. Colorectal cancer)
CRD	domena bogata cisteinom (engl. Cysteine rich domain)
DHh	engl. Desert hedgehog
Disp	engl. Dispatched
ER	endoplazmatski retikulum (engl. Endoplasmatic reticulum)
FDA	Američka Agencija za hranu i lijekove (engl. US Food and Drug Administration)
FGF4	engl. Fibroblast growth factor 4
FOXM1	engl. Forkhead box protein M1

Gli	engl. Glioma-associated oncogene
GliA	Gli aktivacijski oblik (engl. Gli activation form)
GliFL	engl. Full-length Gli
GliR	Gli represorski oblik (engl. Gli repression form)
GNP	engl. Granule neural progenitor
Gpr161	engl. Orphan G-protein-coupled receptor
GRK2	engl. G-protein-coupled receptor kinase 2
GSK3	glikogen sintaza kinaza 3 (engl. Glycogen synthase kinase 3)
Hh	engl. Hedgehog
HhN	N-terminalna Hh signalna domena (engl. N-terminal Hh signaling domain)
Hip	engl. Hedgehog-interacting protein
HPI	inhibitori Hh signalnog puta (engl. Hh signaling pathway inhibitors)
IFT-A	intraflagelarni transport (engl. Intraflagellar transport)
IHh	engl. Indian hedgehog
JAG1	engl. Jagged 1
Kif7	kinezin protein (engl. Kinesin protein)
laBCC	lokalno uznapredovali bazocelularni karcinom (engl. locally advanced Basal cell carcinoma)
MB	meduloblastom (engl. Medulloblastoma)
mBCC	metastatski bazocelularni karcinom (engl. metastatic Basal cell carcinoma)
MPF	faktor koji promovira M-fazu (engl. M-phase promoting factor)
MYCN	engl. N-myc proto-oncogene protein

Nrp	engl. Neuropilin
PAX	engl. Paired box protein
PC	karcinom gušterače (engl. Pancreatic cancer)
PC	primarna cilija (engl. Primary cilium)
PD4D	fosfodiesteraza 4D (engl. Phosphodiesterase 4D)
PI(3)P	fosfatidilinozitol 3-fosfat (engl. Phosphatidylinositol 3-phosphate)
PI(4)P	fosfatidilinozitol 4-fosfat (engl. Phosphatidylinositol 4-phosphate)
PI(4,5)P₂	fosfatidilinozitol 4,5-bisfosfat (engl. Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate)
PI3K-C2α	fosfatidilinozitol 3-kinaza C2α (engl. Phosphatidylinositol 3-kinase C2α)
PKA	protein kinaza A (engl. Protein kinase A)
PP2A	protein fosfataza 2 (engl. Protein phosphatase 2)
PPFIA1	engl. Protein Tyrosine Phosphatase, Receptor Type, F Polypeptide (PTPRF), Interacting Protein (Liprin), Alpha 1
Ptch	engl. Patched
Sema3	engl. Semaphorin 3
SHh	engl. Sonic hedgehog
Ski	engl. Skinny
Smo	engl. Smoothened
SSD	sterol-osjetljiva domena (engl. Sterol-sensing domain)
Sufu	supresor fuzijskog proteina (engl. Suppressed fusion protein)
Tulp3	engl. Tubby-like-protein 3
VEGFA	engl. Vascular endothelial growth factor A
β -TrCP	engl. β-transducin-repeat containing protein

SADRŽAJ

POPIS I OBJAŠNJENJE KRATICA.....	1
SADRŽAJ	0
SAŽETAK	2
SUMMARY	3
1. UVOD.....	1
2. GLAVNE KOMPONENTE Hh SIGNALNOG PUTA	10
2.1 <i>Hedgehog</i> gen/protein	10
2.2 <i>Patched</i> gen/protein	12
2.3 <i>Smoothed</i> gen/protein	13
2.4 <i>Gli</i> gen/protein	15
2.5 <i>Suppressed fusion</i> protein.....	16
2.6 Kif7	16
2.7 cAMP i PKA.....	17
2.8 Ciljni geni.....	17
2.9 Primarna cilija (PC).....	19
3. ULOGA Hh SIGNALNOG PUTA U KARCINOGENEZI	21
3.1 Tip 1 - Ligand-neovisno signaliziranje inicirano mutacijom.....	21
3.2 Tip 2- Autokrina ili jukstakrina signalizacija ovisna o ligandu.....	24
3.3 Tip 3 - Parakrina signalizacija ovisna o ligandu	25
3.4 Tumorske matične stanice.....	27
3.5 Epigenetske promjene.....	27
4. TERAPIJA	28
4.1 Inhibitori Hh liganda.....	29
4.2 Antagonisti Smo	29
4.3 Gli inhibitori.....	33
4.4 BET inhibitori	33

4.5	aPKC inhibitori.....	34
4.6	Inhibitori fosfodiesteraza.....	34
4.7	Prirodni spojevi.....	34
5.	ZAKLJUČAK.....	36
6.	ZAHVALE	37
7.	LITERATURA	38
8.	ŽIVOTOPIS	55

SAŽETAK

Uloga signalnog puta *Hedgehog* u razvoju tumora

Ana Marija Škoda

Hedgehog (Hh) signalni put, prvi put opisan u vinskoj mušici, evolucijski je visoko očuvan put prijenosa signala od stanične membrane do jezgre, a ima ključnu ulogu tijekom normalnog embrionalnog razvoja. Hh signalni put ostvaruje svoj utjecaj kroz signalnu kaskadu koja kulminira promjenom ravnoteže između aktivacijskih (GliA) i represorskih oblika (GliR) transkripcijskih faktora Gli. U prijenosu informacije do Gli transkripcijskih faktora sudjeluju različite komponente signalnog puta: Hh ligandi (SHh, IHH i DHH), Ptch receptor (Ptch1, Ptch2), Smo koreceptor, Sufu, Kif7, PKA i cAMP. GliA putuje u jezgru i potiče transkripciju ciljnih gena vezanjem na njihove promotore. Glavni ciljni geni signalnog puta Hh su *Ptch1*, *Ptch2* i *Gli1*. Poremećeno funkcioniranje Hh signalnog puta povezuje se s razvojnim malformacijama i tumorima, primjerice Gorlinovim sindromom, bazocelularnim karcinomom, meduloblastomom te karcinomom gušterače, dojke, debelog crijeva, jajnika, sitnostaničnim karcinomom pluća i mnogim drugima. Aberantna aktivacija Hh signalnog puta uzrokovana je ili mutacijama u samom signalnom putu (neovisno o ligandu) ili pretjeranom ekspresijom Hh signalnog puta (ovisno o ligandu-autokrina ili parakrina signalizacija). Mnogi inhibitori Hh signalnog puta poput vismodegib-a i sonidegib-a danas se koriste u liječenju karcinoma te predstavljaju obećavajuću skupinu lijekova, posebice u pacijenata s lošom prognozom.

Ključne riječi: *Hedgehog* signalni put, tumorogeneza

SUMMARY

The role of the *Hedgehog* signaling pathway in tumor development

Ana Marija Škoda

The *Hedgehog* (Hh) signaling pathway, which was identified for the first time in the common fruit fly, is a highly preserved evolutionary pathway of signal transmission from the cell membrane to the cell nucleus. The Hh signaling pathway plays an important role in the embryonic development. It has a biological influence through a signal cascade culminating in a change of balance between activation (GliA) and repression forms (GliR) of Gli transcription factors. The components of the Hh signaling pathway involved in the information transfer to the Gli transcription factors are: Hh ligands (Shh, Ihh and Dhh), Ptch receptor (Ptch1, Ptch2), Smo coreceptor, Sufu, Kif7, PKA and cAMP. GliA travels to the nucleus and stimulates the transcription of target genes by binding to their promoters. The main target genes of the Hh signaling pathway are *Ptch1*, *Ptch2* and *Gli1*. The malfunction of the Hh signaling pathway is associated with the developmental anomalies and tumors, such as Gorlin syndrome, basal cell carcinoma, medulloblastoma, and pancreatic, breast, colon, and ovarian cancer as well as small-cell lung carcinoma etc. The aberrant activation of the Hh signaling pathway is either caused by mutations in the signal pathway (ligand independent signaling) or by the excessive expression of the Hh signaling pathway (ligand dependent signaling-autocrine or paracrine). Numerous Hh pathway inhibitors, like vismodegib and sonidegib, have been developed for cancer treatment. They are regarded as a promising treatment to be used in cancer therapy, especially for patients with a poor prognosis.

Keywords: *Hedgehog* signaling pathway, tumorigenesis

1. UVOD

Rak je jedan od glavnih uzroka smrti u novije vrijeme, ne samo u razvijenim zemaljama već i u zemljama u razvoju. Procjenjuje se da uzrokuje 7,6 milijuna smrtnih slučajeva širom svijeta. Budući da rak nastaje zbog poremećaja temeljnih regulacijskih staničnih mehanizama, bolest treba razumjeti na molekularnoj i staničnoj razini. Proliferacija, diferencijacija i preživljavanje pojedinačne stanice u višestaničnom organizmu pažljivo su regulirani tako da zadovoljavaju interese organizma kao cjeline. U stanicama raka te regulacije nema ili je poremećena te one nekontrolirano rastu i dijele se. Naposljetku se šire po čitavom tijelu i ometaju funkciju normalnih tkiva i organa. Biologija raka ovisi o različitim signalnim putevima koji sudjeluju u njegovom rastu i metastaziranju, a među značajnije ubraja se *Hedgehog* (Hh) signalni put (1).

Hh signalni put poznat i pod nazivima, kao što su *Hedgehog-Patched* (Hh-Ptc), *Hedgehog-Gli* (Hh-Gli) ili *Hedgehog-Patched-Smoothened* (Hh/Ptc/Smo), evolucijski je visoko očuvan put prijenosa signala od stanične membrane do jezgre. Prvi put je opisan u vinskoj mušici (lat. *Drosophila melanogaster*), u kojoj je mutacija gena *Hedgehog* (engl. jež), dovela do nastanka ličinke, koja zbog bodljikavih izraslina nalikuje ježu, pa otuda naziv ovom genu. Osnovni principi signalnog puta kod *D.melanogaster* evolucijski su konzervirani, pa se tako mogu poistovjetiti sa signalnim putem kod čovjeka (2). Hh signalni put ima ključnu ulogu tijekom normalnog embrionalnog razvoja beskralješnjaka i kralješnjaka (3). Eksperimenti na *D.melanogaster* ukazali su da je gen *Hh* važan za pravilnu segregaciju, tj. polarnost organizma te ima važnu ulogu pri razvoju mnogih tkiva i organa.

U odraslom organizmu signalni put Hh većinom je inaktiviran ili slabo aktivan. Po potrebi se može aktivirati kao što je slučaj kod zacjeljivanja rana gdje Hh signalizacija ima jednu od ključnih uloga (4). Također, u odraslom organizmu, signalni put Hh uključen je u održavanje somatskih matičnih i pluripotentnih stanica važnih za obnovu tkiva (5). Do sada je povezan s nizom takvih somatskih matičnih stanica, npr. dojke (6), kože (7), živčanih stanica (8), eritropoetskih stanica (9), pluća (10) te nekih epitelnih stanica unutarnjih organa (11). U skladu s tim, Hh signalizacija kritična je za regeneraciju plućnog epitela (10), epitela prostate (12) i egzokrinih stanica gušterače (13). Važnu ulogu ima u oblikovanju i normalnoj funkciji folikula dlake (14).

U ostalim tkivima signalni put Hh prisutan je samo u primarnim cilijama (PC). PC-e su citoplazmatski izdanci na površini stanica, izgrađene od mikrotubula i zadužene za prijem mehaničkih, kemijskih i termičkih signala (15). Mogu se naći na mnogim stromalnim stanicama sisavaca. Signalni put Hh neophodan je za funkciju primarnih cilija i svi sudionici Hh signalnog puta se mogu naći u ovim citoplazmatskim izdancima (16).

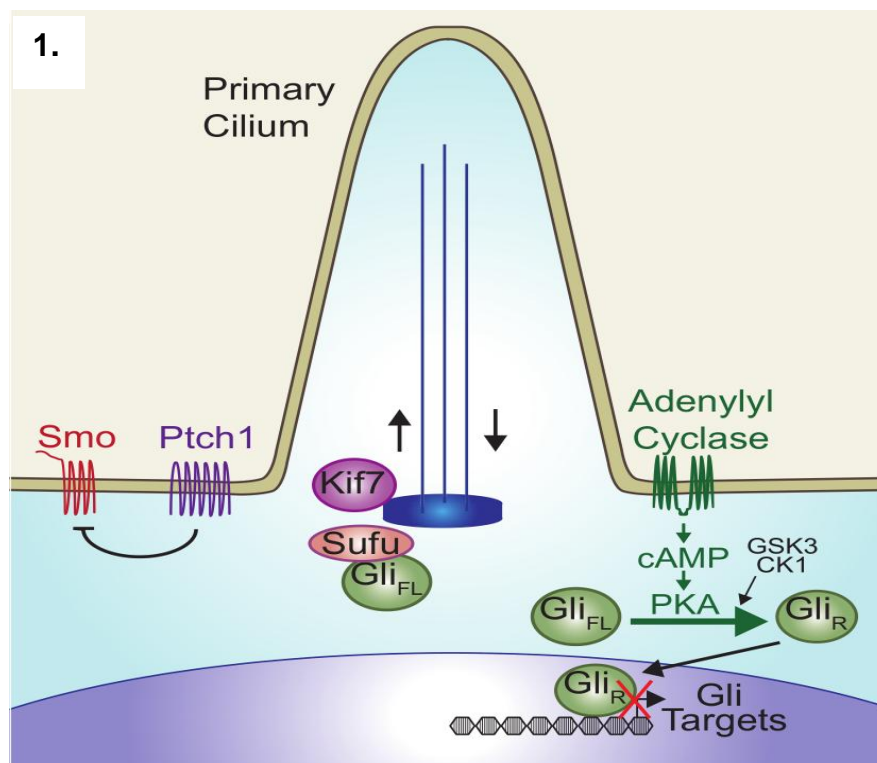
Poremećeno funkcioniranje Hh signalnog puta povezuje se s razvojnim deformacijama i tumorima (17). Tako kod ljudi postoji nasljedni oblik bazocelularnog karcinoma (engl. Basal Cell Nevus Syndrom; BCNS), poznat pod nazivom Gorlinov sindrom, koji nastaje kao posljedica mutacije gena *Patched 1* (*Ptch1*). Gorlinov sindrom ima dva glavna fenotipa: razvojne defekte i povećani rizik od razvoja karcinoma koji su povezani s mutacijama gena uključenih u Hh signalizaciju, uključujući bazocelularni karcinom (engl. Basal cell carcinoma; BCC), meduloblastom, rabdomiosarkom i meningeom (18).

Općenito, smatra se da poremećena regulacija bilo koje komponente Hh signalnog puta dovodi do njegove aberantne aktivacije što može rezultirati zloćudnom preobrazbom. Prema najnovijim procjenama, Hh signalni put sudjeluje u nastanku jedne trećine svih zloćudnih tumora, stoga postaje značajnom metom potencijalnih lijekova u terapiji raka (2).

Signalni put Hh dovodi do promjena u ponašanju stanica putem najmanje dvaju mehanizama: poticanjem transkripcije ciljnih gena i kontrolom staničnog ciklusa. Započinju ga tri proteina: Hedgehog (Hh), Patched (Ptch) i Smoothened (Smo). Hh ima ulogu liganda, Ptch, koji se nalazi na membrani stanice, receptora te Smo, koji se također nalazi na membrani, koreceptora (19). Karakteristika Ptch receptora jest da se on ne aktivira vezivanjem liganda već se ovom interakcijom suprimira. Aktivirani Hh signalni put rezultira otpuštanjem proteina Gli (engl. Glioma-associated oncogene) koji se translocira u jezgru i potiče ekspresiju Gli ciljnih gena, kao što su *Gli1* i *ciklin D1* zaduženih za rast stanica. Drugim riječima, Hh ostvaruje svoj biološki utjecaj kroz signalnu kaskadu koja kulminira promjenom ravnoteže između aktivacijskih (GliA) i represorskih oblika (GliR) Gli transkripcijskih faktora (20).

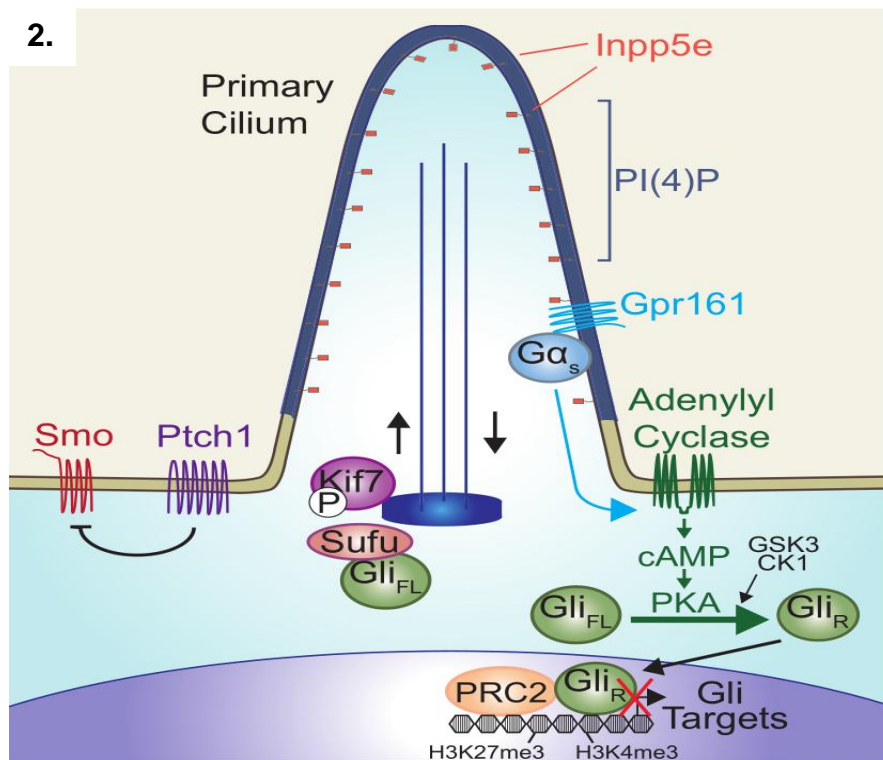
U prijenosu informacije do Gli transkripcijskih faktora sudjeluju i različite komponente signalnog puta (Sufu, Kif7, PKA, cAMP). Ovakav način aktivacije Hh signalnog puta naziva se kanonski.

U odsustvu liganda ("off-stanje"), Ptch1 suprimira Smo, inače konstitutivno aktivni signalni receptor čija je aktivnost neophodna za prijenos Hh signala kroz staničnu membranu u jezgru. Ptch1 djeluje kao sterolska pumpa i uklanja oksisterole stvorene pomoću 7-dehidrokolesterol reduktaze (21). Nizvodno od Smo u signalnoj kaskadi sudjeluje citoplazmatski proteinski kompleks sastavljen od Kif7 (engl. Kinesin protein), Sufu (engl. Supressor of fused) i GliFL (engl. full-length Gli). Kif7, Sufu i GliFL ulaze u PC-u, čime se potiče obrada GliFL u represorski oblik (GliR) nakon fosforilacije pomoću protein kinaze A (PKA), glikogen sintaze kinaze 3 (GSK3) i kazein kinaze 1 (CK1). GliR blokira transkripciju Hh ciljnih gena (22) (Slika 1).



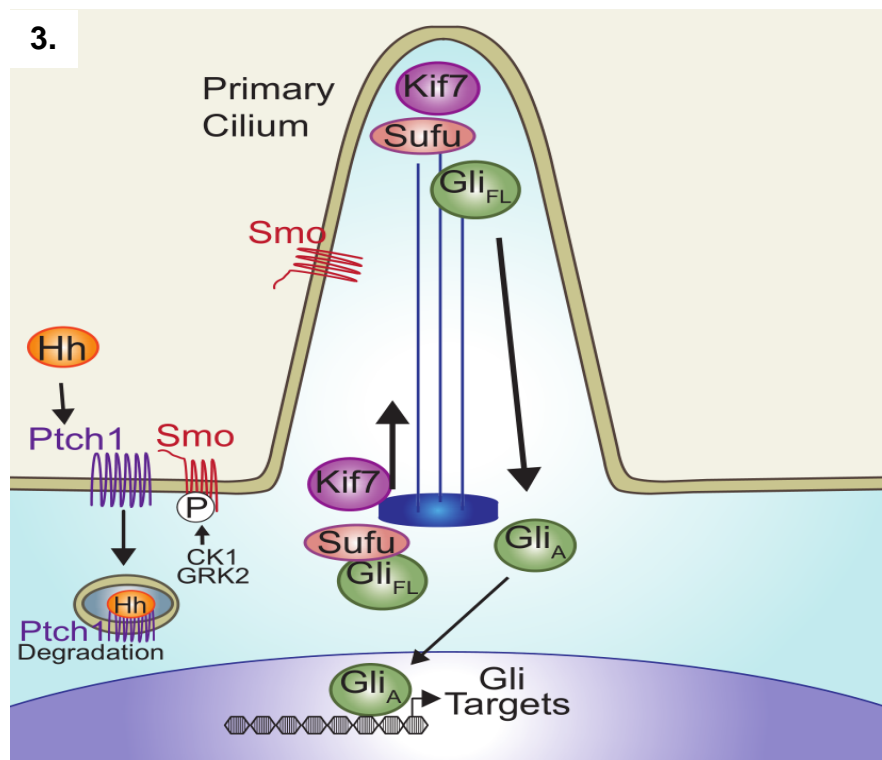
Slika 1. Prikaz kanonske aktivacije Hh signalnog puta: U odsustvu liganda, Ptch1 suprimira konstitutivno aktivni signalni receptor Smo, neophodan za transdukciju signala u jezgru. Nizvodno od Smo u signalnoj kaskadi sudjeluje citoplazmatski proteinski kompleks sastavljen od Kif7 (engl. Kinesin protein), Sufu (engl. Supressor of fused) i GliFL (engl. full-length Gli). Kompleks potiče obradu GliFL u represorski oblik (GliR) nakon fosforilacije pomoću protein kinaze A (PKA), glikogen sintaze kinaze 3 (GSK3) i kazein kinaze 1 (CK1). GliR blokira transkripciju Hh ciljnih gena. Preuzeto iz (22).

Fosfataza lokalizirana u PC-i, Inpp5e, održava lipidni sastav PC-e obogaćen fosfoinozitolom PI(4)P. PI(4)P regulira lokalizaciju modulatora Hh signalnog puta, npr. Gpr161 (engl. Orphan G-protein-coupled receptor), unutar PC-e. U odsustvu Hh liganda, Gpr161 se nalazi na PC-i i potiče proizvodnju cAMP aktivacijom $G\alpha_s$ -posredovane adenilil ciklaze. Time se potiskuje Hh signalizacija. U jezgri, PRC2 kompleks održava represiju histona H3K27me3 čime se blokira ekspresija ciljnih gena na epigenetskoj razini (22) (Slika 2).



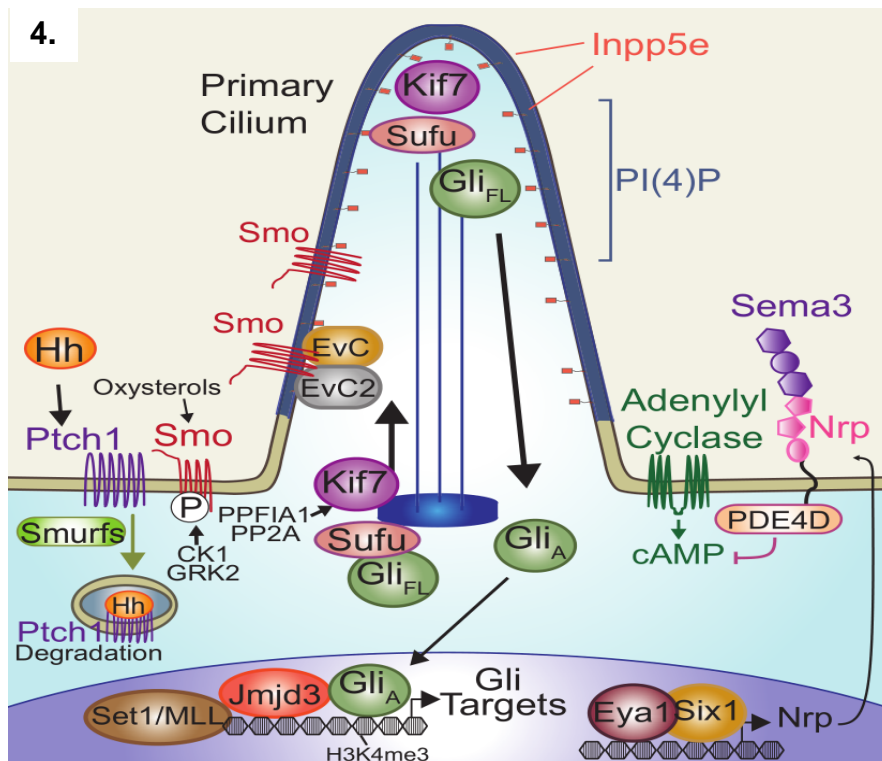
Slika 2. Inpp5e, fosfataza lokalizirana u primarnoj ciliji (PC), održava lipidni sastav PC-e bogat fosfatidilinozitolom 4-fosfatom PI(4)P. PI(4)P regulira lokalizaciju modulatora Hh signalnog puta, Grp161 (engl. Orphan G-protein-coupled receptor), unutar PC-e. Kada Hh ligand nije vezan za receptor, Grp161 aktivira $G\alpha_s$ -posredovanu adenilil ciklazu koja potiče stvaranje cAMP-a i potiskuje Hh signalizaciju. U jezgri se blokira ekspresija ciljnih gena PRC2 kompleksom. Preuzeto iz (22).

U tzv. "on-stanju" Hh ligand se veže na receptor Ptch1. Tada se ligand i receptor internaliziraju i razgrade u lizosomima. CK1 (engl. Casein kinase 1) i GRK2 (engl. G-protein-coupled receptor 2) fosforiliraju Smo koji poprima aktivnu konformaciju i prelazi u PC-u. Kif7, Sufu i GliFL se također nakupljaju u PC-i, gdje aktivirani Smo potiče disocijaciju Sufu-Gli kompleksa (uklanja se Sufu inhibitorni učinak) i aktivaciju Gli-a (GliA). GliA putuje u jezgru i potiče transkripciju ciljnih gena vezanjem na njihove promotore (22) (Slika 3).



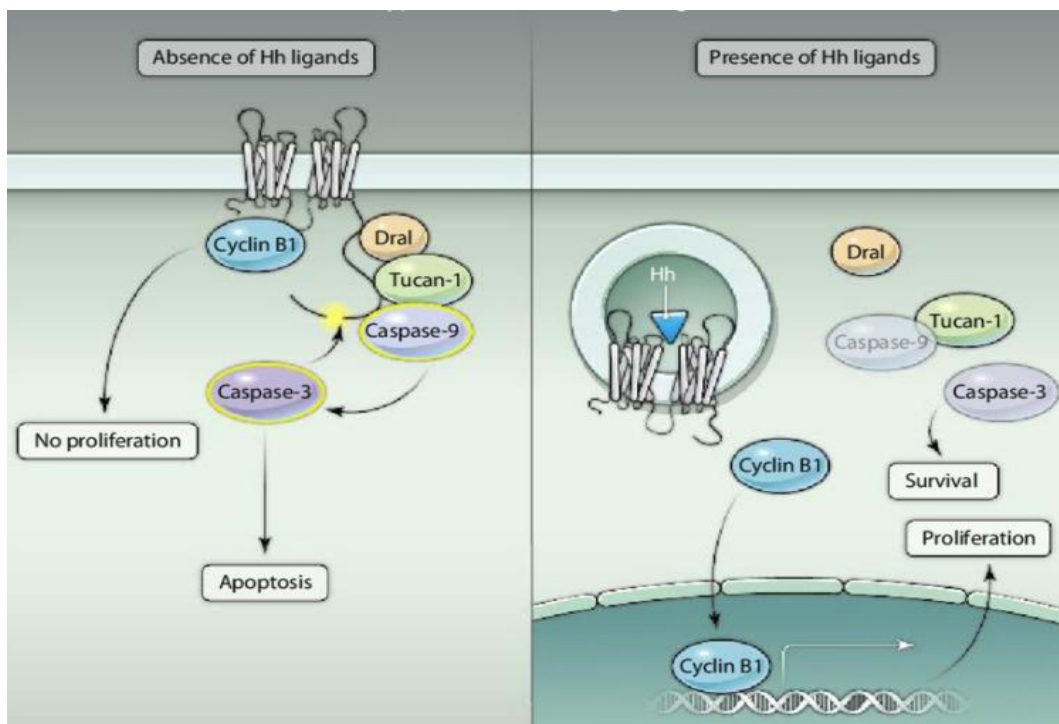
Slika 3. Prikaz vezanja Hh liganda na Ptch1 receptor. Dolazi do internalizacije liganda i receptora te njihove razgradnje u lizosomima. CK1 (engl. Casein kinase 1) i GRK2 (engl. G-protein-coupled receptor 2) fosforiliraju Smo koji poprima aktivnu konformaciju i prelazi u PC-u. Aktivirani Smo potiče disocijaciju Sufu-Gli-Kif7 kompleksa lokaliziranog u PC-i i aktivaciju GliFL-a (GliA). GliA se u jezgri veže na promotore ciljnih gena i potiče njihovu transkripciju. Preuzeto iz (22).

Vežanjem Hh liganda na receptor Ptch1 potiče se ubikvitinacija, endocitoza i degradacija Ptch1 posredovana proteinom Smurf. Smo se aktivira, a njegova aktivnost može biti pojačana oksisterolima, modulatorima na bazi lipida, koji se vežu na izvanstaničnu domenu Smo-a. Aktivirani Smo prelazi u PC-u i može se lokalizirati u specijaliziranoj zoni zvanj EvC zona. Iz EvC zone Smo prenosi signale za aktivaciju proteina Gli. Vežanje Hh liganda također potiče formiranje Kif7 kompleksa s proteinom PPFIA1 (engl. Protein Tyrosine Phosphatase, Receptor Type, F Polypeptide (PTPRF), Interacting Protein (Liprin), Alpha 1) i fosfatazom PP2A, što rezultira defosforilacijom Kif7 i njegovom translokacijom na vrh PC-e. U jezgri, aktivacija Hh ligandom regrutira Jmjd3, koji aktivira ciljne gene zamjenom PRC2, enzimatskim uklanjanjem H3K27me3, s kompleksom Set1/MLL-H3K4me3. Također, aktivna Hh signalizacija inducira Eya1/Six1 posredovanu transkripciju gena *Nrp*. Sema3 se veže na Nrp protein i promiče regrutaciju fosfodiesteraza PDE4D do citoplazmatske domene Nrp-a. PDE4D degradira cAMP i time smanjuje razinu PKA (22) (Slika 4).



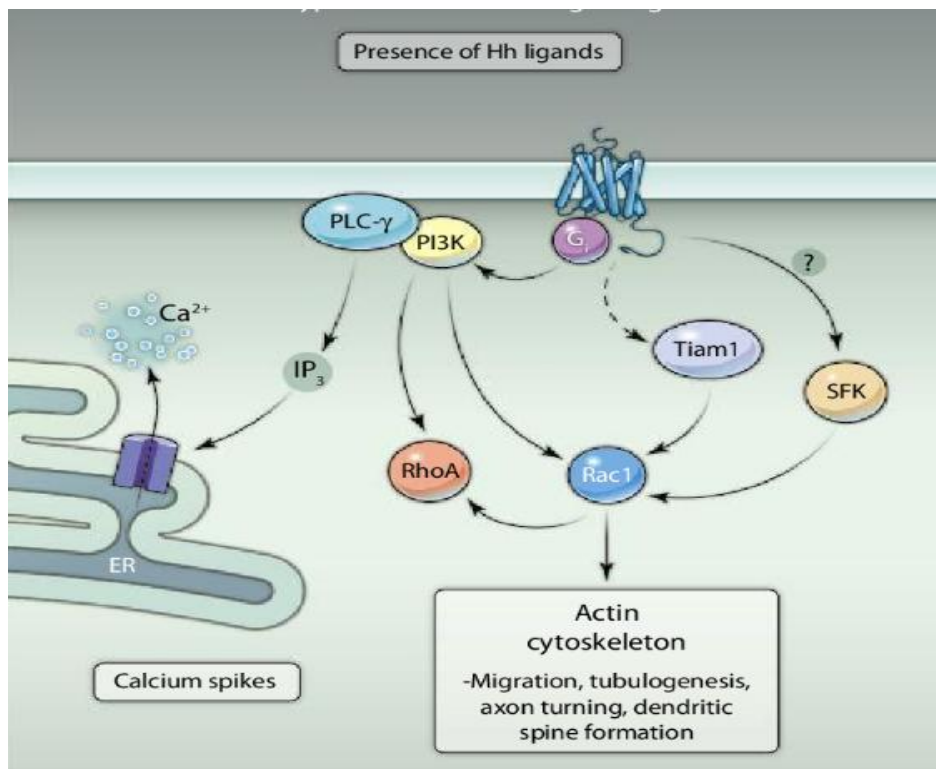
Slika 4. Ptch1 degradacija potaknuta je vezanjem Hh liganda, a posredovana proteinom Smurf. Time je smanjen inhibitorski učinak Ptch1 na koreceptor Smo koji poprima aktiviranu konformaciju i prelazi u EvC zonu PC-e gdje dalje prenosi signale za aktivaciju proteina Gli. Aktivnost koreceptora Smo pojačana je oksisterolima. Također, potiče se formiranje kompleksa Kif7 s proteinom PPFIA1 (engl. Protein Tyrosine Phosphatase, Receptor Type, F Polypeptide (PTPRF), Interacting Protein (Liprin), Alpha 1) i fosfatazom PP2A. Rezultat je defosforilacija Kif7 i njegova translokacija na vrh PC-e. U jezgri dolazi do aktivacije ciljnih gena Jmjd3-om koji enzimatskim uklanjanjem H3K27me3 potiče zamjenu PRC2 s kompleksom Set1/MLL-H3K4me3. U jezgri je inducirana i transkripcija gena *Nrp* pomoću kompleksa Eya1/Six1. Na protein Nrp se veže Sema3. Time se promiče regrutacija fosfodiesteraze PDE4D do citoplazmatske domene Nrp-a i degradacija cAMP-a što smanjuje razinu PKA. Preuzeto iz (22).

Unazad nekoliko godina dokazano je da Hh proteini mogu sudjelovati u signalnoj transdukciji preko takozvanog Gli-neovisnog mehanizma koji se još označava i kao nekanonski Hh signalni put (23). Do sada su opisana dva tipa nekanonske Hh signalne kaskade. Prvi tip ne zahtjeva prisustvo Smo receptora, ali zahtjeva prisustvo Hh liganda i Ptch receptora. U odsustvu Hh liganda, Ptch se udružuje s ciklinom B1 i proapoptotskim kompleksom kojeg čine kaspaza-9, protein Tucan-1 i adapterski protein Dral. Ova interakcija inhibira proliferaciju onemogućavajući ciklinu B1 ulazak u jezgru. U nekim tipovima stanica regrutiranje ovog proapoptotskog kompleksa ovisi o prethodnom cijepanju Ptch u C-terminalnoj domeni pomoću kaspaze-3. To rezultira autofagijom i aktivacijom kaspaze-9. Ona ubrzava stvaranje ovog kompleksa i potiče povratnu aktivaciju kaspaze-3 što u konačnici dovodi do apoptoze. U prisustvu Hh liganda narušavaju se ove interakcije što dovodi do stanične proliferacije (24) (Slika 5).



Slika 5. Prikaz prvog tipa nekanonske signalizacije: U odsustvu Hh liganda, Ptch se udružuje s ciklinom B1 i proapoptotskim kompleksom kojeg čine kaspaza-9, protein Tucan-1 i adapterski protein Dral. Kompleks onemogućava ulazak ciklina B1 u jezgru i ne dolazi do proliferacije stanica. U nekim tipovima stanica kaspaza-3 cijepa Ptch u njegovoj C-terminalnoj domeni što rezultira autofagijom i aktivacijom kaspaze-9. Ona ubrzava stvaranje proapoptotskog kompleksa i potiče povratnu aktivaciju kaspaze-3. Rezultat je apoptoza stanice. U prisustvu Hh liganda narušavaju se ove interakcije što dovodi do stanične proliferacije. Preuzeto iz (24).

Drugi tip nekanonskog Hh signalnog puta je također poznat kao Smo-ovisan Gli-neovisan signalni put. Ovaj signalni put sudjeluje u regulaciji aktinskog citoskeleta aktivacijom malih GTP-aza RhoA i Rac1. U fibroblastima se ta regulacija odvija pomoću G proteina i kinaze PI3K, a u neuronima pomoću proteina Tiam1 ili kinaze SFK. Također, Smo u spinalnim neuronima stimulira otpuštanje kalcija iz endoplazmatskog retikuluma (ER) (24) (Slika 6).



Slika 6. Prikaz drugog tipa nekanonske signalizacije: U fibroblastima se regulacija aktinskog citoskeleta odvija pomoću G proteina i kinaze PI3K te aktivacijom malih GTP-aza RhoA i Rac1. U neuronima regulacija se vrši pomoću proteina Tiam1 ili kinaze SFK. Koreceptor Smo u spinalnim neuronima stimulira otpuštanje kalcija iz endoplazmatskog retikuluma (ER). Preuzeto iz (24).

2. GLAVNE KOMPONENTE Hh SIGNALNOG PUTA

2.1 *Hedgehog* gen/protein

Gen *Hh* visoko je konzerviran od vinske mušice do čovjeka i ključni je regulator u embrionalnom razvoju (3). Za razliku od *D. melanogaster* u koje se nalazi jedan *Hh* gen, u kralješnjaka su otkrivena njegova tri homologa: *Sonic hedgehog* (*SHh*), *Indian hedgehog* (*IHh*) i *Desert hedgehog* (*DHh*) (25)(26)(27). Sva tri produkta ekspresije ovih gena mogu se vezati za Ptch1 i biti aktivatori Hh signalnog puta (28), ali tu aktivnost ostvaruju u različitim organskim sustavima (25)(27). Proteini Hh mogu djelovati kao mitogeni, morfogeni i diferencijacijski čimbenici tijekom različitih faza razvoja na različitim mjestima, na većim ili manjim udaljenostima (19).

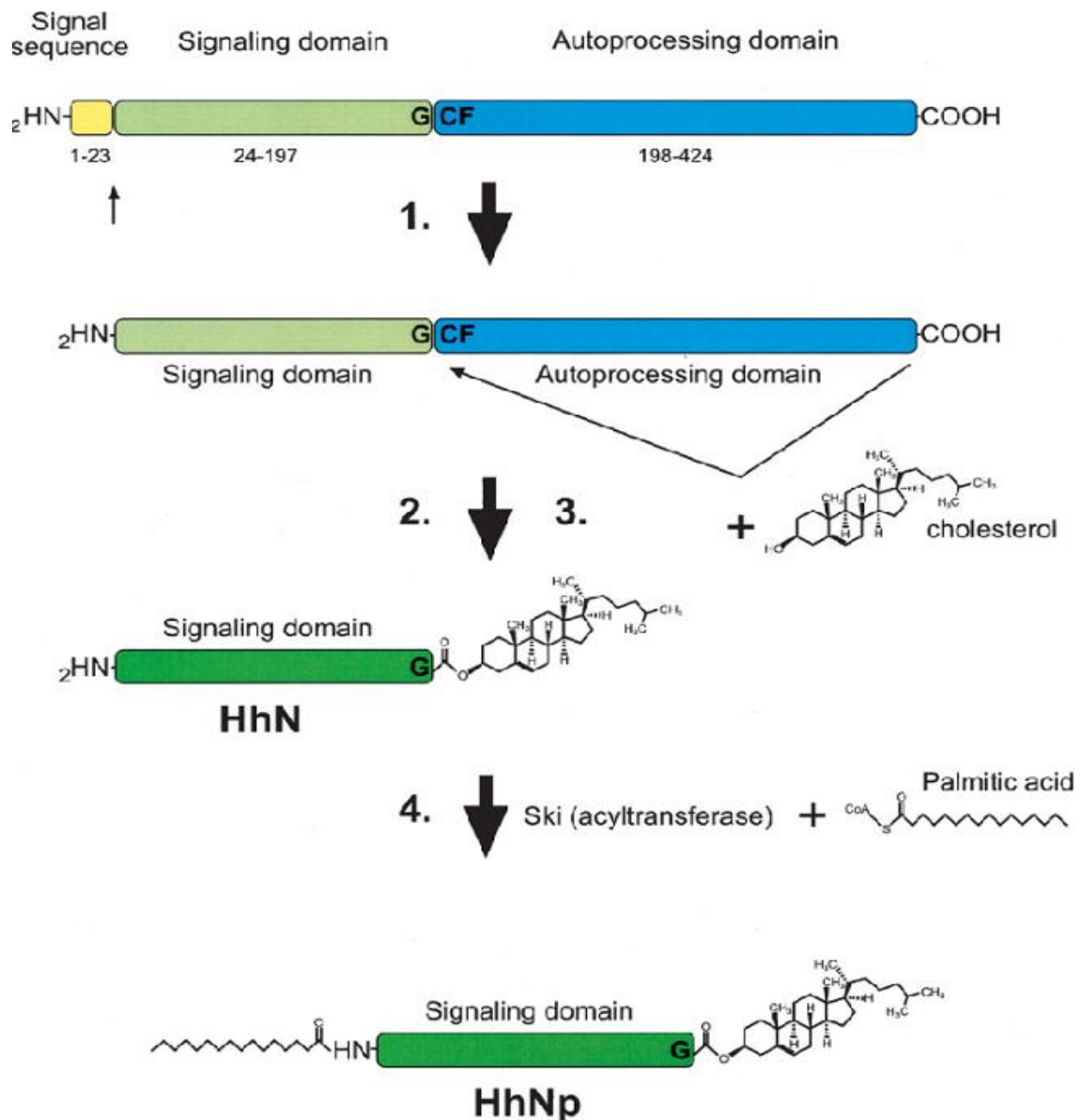
Najviše proučavan od svih Hh liganda je SHh. On pokazuje najjaču aktivnost te je tijekom embriogeneze uključen u razvoj različitih organa. Ekspimiran je u razvoju središnjeg živčanog sustava, pluća, zuba, crijeva i folikula dlaka (29)(30)(31)(32). Djelovanje SHh može biti autokrino (na stanice iz kojih se izlučuje) ili parakrino (na stanice iz bliže ili dalje okoline).

IHh je uključen u endhondralnu formaciju kosti kao negativni regulator diferencijacije hondrocita (33). Također, zapaženo je da IHh sudjeluje u razvoju gastrointestinalnog trakta (34) i mliječnih žlijezdi (6).

Od svih otkrivenih Hh proteina najviši stupanj sličnosti s Hh ligandom *D. melanogaster* pokazuje DHh (24). DHh se izražava uglavnom u Sertolijevim stanicama sjemenika gdje ima ključnu ulogu u diferencijaciji spolnih stanica (35).

Svi Hh proteini prolaze procese sazrijevanja (Slika 7) prije nego se njihovi aktivni oblici otpuste iz stanica i aktiviraju Hh signalni put (36). Nakon translacije, s polipeptida veličine oko 45 kDa uklanja se N-terminalna signalna sekvenca. Polipeptid se potom autokatalitički cijepa između glicina i cisteina pri čemu nastaje N-terminalni fragment. C-terminalna domena (autoprocisuirajuća domena) Hh polipeptida potiče vezanje kolesterola za glicin na C-kraju N-terminalnog fragmenta. Pri tome nastaje N-terminalna Hh signalna domena (HhN) veličine oko 19 kDa koja je povezana s nizom poznatih signalizirajućih aktivnosti (37). Nakon toga se za cistein na N-terminalnom kraju uz pomoć enzima Skinny (Ski) hedgehog aciltransferaze

veže palmitoilna skupina palmitinske kiseline pri čemu nastaje dvostruko izmijenjena Hh signalna domena (HhNp) odnosno aktivni Hh protein (38). Sekretija zrelog, funkcionalno aktivnog Hh proteina regulirana je Dispatched (Disp) proteinom, koji omogućava njegovo otpuštanje iz stanica u kojima nastaje.



Slika 7. Prikaz procesa sazrijevanja Hh proteina: 1 - odcepljenje signalne sekvence; 2, 3 - C-terminalna domena (autoprocusuirajuća domena) polipeptida Hh potiče reakciju vezanja kolesterola za glicin pri čemu nastaje N-terminalna Hh signalna domena (HhN) koja je izmijenjena kolesterolom na C-terminalnom kraju. Spajanje HhN s membranom uzrokuje vezani kolesterol na C-terminalnom kraju. 4 - dodavanje palmitoilne skupine palmitinske kiseline pomoću Skinny (Ski) hedgehog aciltransferaze na N-terminalni kraj. Rezultat je nastanak dvostruko izmijenjene Hh signalne domene (HhNp). Preuzeto iz (3).

2.2 *Patched* gen/protein

Protein Patched (Ptch) je receptor Hh proteina. U kralješnjaka su izolirana dva homologa proteina: Ptch1 i Ptch2 (39). Oni vežu SHh, IHH i DHH ligande sličnim afinitetom te oba mogu tvoriti kompleks s proteinom Smo (40). Ljudski gen *Ptch1* smješten je na kromosomu 9q22.3, sadrži 23 egzona i kodira glikoprotein od 1447 aminokiselina (41)(42). Gen *Ptch2* lociran je na 1p34.1 i kodira protein od 1203 aminokiselina. Nadalje, geni *Ptch1* i *Ptch2* imaju različite funkcije temeljene na njihovoj različitoj ekspresiji tijekom razvoja epidermisa (43). *Ptch1* je prvenstveno eksprimiran u mezenhimskim stanicama u kojima se proizvodi SHh protein, dok je *Ptch2* eksprimiran u epitelnim stanicama kože i sjemenika (44).

Protein Ptch1 sastoji se od 12 transmembranskih domena, dvije velike ekstracelularne petlje i dvije velike intracelularne petlje (27). Unutar strukture ekstracelularne petlje nalazi se sterol-osjetljiva domena (engl. Sterol-sensing domain; SSD), za koju se pretpostavlja da stupa u interakciju s kolesterolom vezanim na Hh proteinu (45). U odsutnosti liganda, Ptch1 blokira aktivnost signalnog puta. Vežanje Hh liganda na Ptch1 receptor rezultira njihovom internalizacijom i degradacijom te otpuštanjem blokade Smo koreceptora i aktivacijom puta (46)(47). Dakle, vežanjem liganda ne uklanja se samo represija signalnog puta Ptch1-om, već se ograničava poluživot liganda. Mehanizmi kojima se Ptch1 uklanja s površine stanice nakon vežanja liganda nisu u potpunosti razjašnjeni. Pokazalo se da SHh ligandi induciraju nakupljanje Ptch1 i E3 ubikvitin ligaza, Smurf1 i Smurf2, u lipidnim splavima. Lipidne splavi predstavljaju glikolipoproteinske mikrodomene proteinskih receptora u staničnoj membrani (48). Ubikvitinirani Ptch1 putuje endosomima do lizosoma gdje se razgrađuje.

Proteini Ptch i Hh, dvojako reguliraju i stanični ciklus (49). Prvo, Ptch bez Hh liganda veže faktor koji promovira M-fazu (engl. M-phase promoting factor; MPF), a izgrađuju ga ciklin B1 i kinaza CDK-1. Vežanjem, odnosno zadržavanjem MPF-a u citoplazmi, sprječava se njegova aktivnost. Kada se protein Hh veže na Ptch, dolazi do otpuštanja vezanog ciklina B1 i daljnje progresije kroz stanični ciklus (19). Drugo, prijenos signala aktiviranim Hh signalnim putem dovodi do transkripcije ciklina D i ciklina E, čime se također potiče progresija kroz stanični ciklus (50).

Osim Ptch, i drugi receptori Hh liganda sudjeluju u modulaciji aktivacije signalnog puta (51). Pozitivni koreceptori su Cdo, Boc te, za kralješnjake specifičan, Gas1. Hhip receptor, djeluje kao negativni regulator Hh signalnog puta. Indukcijom puta, pozitivni koreceptori bivaju transkripcijski potisnuti, dok su negativni receptori (Ptch1 i Hhip) aktivirani. Proteoglikani također mogu djelovati kao koreceptori te imati pozitivne ili negativne učinke na signalizaciju Hh ovisno o njihovom jedinstvenom sastavu proteina i šećera. Stanice pravilno tumače trajanje i razinu aktivacije Hh signalnog puta zahvaljujući spomenutoj mreži receptora, koreceptora te povratne sprege.

2.3 Smoothened gen/protein

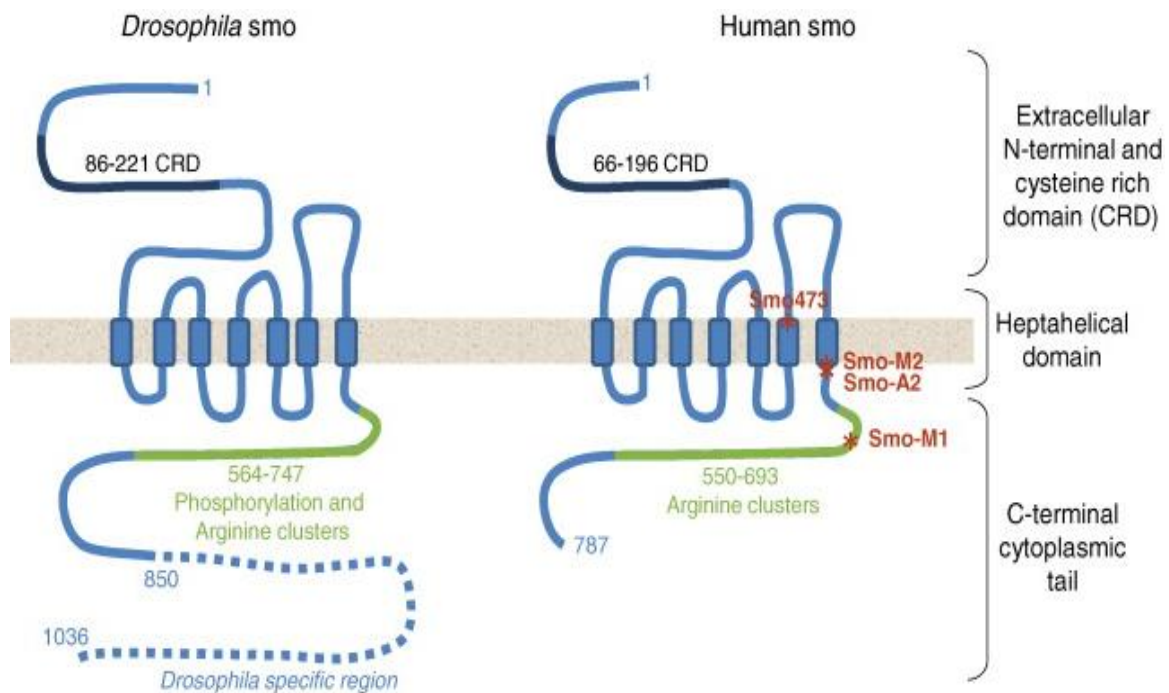
Protein Smoothened (Smo) je, kako je već spomenuto, koreceptor signalnog puta Hh tj. predstavlja signalnu komponentu receptorskog kompleksa. Građen je od sedam transmembranskih hidrofobnih domena i strukturno je sličan receptorima vezanim uz G-protein (52) (Slika 8).

Smo se smatra pozitivnim regulatorom signalnog puta, jer je u odsustvu inhibirajućeg Ptch1 konstitutivno aktivan i potiče aktivaciju nizvodnih komponenti ovog signalnog puta (2).

Mehanizmi kojima Ptch1 inhibira Smo su nepoznati. Prema dosadašnjim saznanjima, ne postoji fizička interakcija između Ptch1 i Smo, već Ptch1 regulira transport i sintezu male molekule (ili molekula) koja utječe na aktivnost Smo (53). 2006. godine lipofilni sekosteroid vitamina D₃ predložen je kao molekula koja je endogeni regulator Smo aktivnosti (54). Nedavna istraživanja dokazuju aktivaciju Smo pomoću oksisterola, derivata kolesterola (55). CRD (engl. Cysteine rich domain) mutante ne uspijevaju u potpunosti reagirati na Hh stimulaciju, ali pokazuju višu bazalnu razinu signalizacije u usporedbi s divljim tipom Smo-a, što ukazuje da CRD domena potiskuje osnovnu aktivnost Smo proteina. Međutim, Ptch1 još uvijek može inhibirati CRD mutante. Dakle, vezanje oksisterola može biti potrebno za maksimalnu Smo aktivnost, ali ne za posredovanje Ptch-ovisne inhibicije proteina Smo. Dodatni lipofilni Smo modulatori su endokanabinoidi koji mogu inhibirati Smo aktivnost (56). Unatoč spomenutim saznanjima o lipofilnim regulatorima aktivnosti proteina Smo,

mehanizmi kojima Ptch1 potiskuje Smo i kako Hh ligand uklanja tu represiju ostaju i dalje nepoznanica.

Nakon vezanja Hh liganda i razgradnje proteina Ptch1, kinaze CK1 i GRK2 fosforiliraju Smo koji potom prelazi u PC-u te preuzima aktivnu konformaciju (57). Smo prenosi signal prema citoplazmi fosforilacijskom kaskadom, kojoj je konačna meta protein Gli.



Slika 8. Prikaz strukture Smo proteina *D. melanogaster* i čovjeka: Brojevi predstavljaju aminokiseline (engl. amino acid; aa). CRD - domena bogata cisteinom (engl. Cysteine rich domain). Crvene zvjezdice na ljudskom proteinu Smo ukazuju na mutacije koje su identificirane kod pacijenata s rakom. M1, M2 i A2 su aktivirajuće mutacije proteina Smo utvrđene u bazocelularnom karcinomu. U M1 dolazi do zamjene arginina (Arg) glutaminom (Gln) u aa 562, dok u M2 nalazimo promijenu triptofana (Trp) leucinom (Leu) u aa 535. U Smo A2 mutiran je serin (Ser) aa 533. Preuzeto iz (58).

2.4 *Gli* gen/protein

Obitelj *Gli* su „proteini s motivom cinkovog prsta”, koji su ime dobili po glioblastomu iz kojeg su prvi put izolirani (59). U kralježnjaka postoje tri člana obitelji gena *Gli*: *Gli1*, *Gli2* i *Gli3*. *Gli1* je genski produkt aktivne Hh signalizacije koji postoji samo kao transkripcijski aktivator. Naime, N-terminalna domena proteina *Gli* sadrži dominantnu, represorsku aktivnost, a C-terminalna regija aktivacijsku domenu i domenu za smještaj u citoplazmi. *Gli1* protein ima skraćenu N-terminalnu domenu, čime se kod njega izgubila represorska aktivnost pa tako protein djeluje isključivo kao aktivator (60). *Gli2* i *Gli3* mogu djelovati kao aktivatori i kao represori, s time da je *Gli2* primarno aktivator, dok je *Gli3* primarno represor.

Gli proteini reguliraju ekspresiju ciljnih gena direktnim vezanjem na njihove promotore (61). *Gli1* i *Gli3* proteini prepoznaju GACCACCCA sekvencu u promotorima ciljnih gena (62), a *Gli2* prepoznaje gotovo identičan GAACCACCCA motiv (63).

Nakon vezanja Hh liganda dolazi do razgradnje represorskih oblika (*GliR*), a u slučaju da liganda nema, represorski oblici koče ekspresiju ciljnih gena. U odsutnosti Hh liganada, *GliFL* fosforilira protein kinaza A (PKA), glikogen sintetaza kinaza 3 (GSK3) i kazein kinaza 1 (CK1) (64)(65). Hiperfosforilirani *GliFL* veže se za protein adaptor, β -TrCP (engl. β -transducin-repeat containing protein), a rezultirajući kompleks ubikvitinira se Cul1-based E3 ligazom i obrađuje u proteosomu. Rezultat te obrade je skraćeni transkripcijski represor (*GliR*) (66). *GliR* blokira transkripciju ciljnih Hh gena. Fosforilacija *Gli2FL* pretežno uzrokuje njegovu potpunu proteosomsku degradaciju, dok se fosforilirani *Gli3FL* obrađuje u *Gli3R* (67). Sukladno tome *Gli2* je više aktivator nego represor Hh signalizacije (64).

Gli1 nije podložan PKA-posredovanoj proteosomskoj obradi već njegovu funkciju mijenja nekoliko drugih kinaza. Fosforilacija *Gli1* pomoću atipične protein kinaze Ci/λ (α PKC- i/λ) potiče maksimalno vezanje *Gli1* na molekulu DNA i transkripcijsku aktivaciju (68). Još jedan od enzima koji fosforilira *Gli1* je AMP-aktivirana protein kinaza (AMPK) koja fosforilacijom uzrokuje njegovu degradaciju (69).

Aktivacija kanonske Hh signalizacije dovodi do ukidanja proteolitičke degradacije Gli proteina ovisne o fosforilaciji, povećavajući na taj način njegovu citoplazmatsku i nuklearnu razinu te samim time i transkripciju ciljnih gena Hh signalnog puta. Podaci iz literature pokazuju da su ekspresija Gli transkripcijskih faktora i njihova aktivacija regulirane i drugim signalnim putevima. Dokazano je da TGF- β , EGF, MAPK i FGF signalni putevi mogu inducirati ekspresiju transkripcijskih faktora Gli (70).

2.5 *Suppressed fusion protein*

U stanicama sisavaca, supresor fuzijskog proteina (engl. Suppressed fusion protein; Sufu) ključni je regulator Hh puta, a funkcionira između Smo i Gli transkripcijskih faktora (71). Sufu se izravno veže na GliFL u citoplazmi i sekvstrira ga. Sekvestracijom faktora Gli sprječava se njegova nuklearna translokacija te se potiče fosforilacija i prerada GliFL u GliR (72). Sekvestracija također stabilizira Gli2FL i Gli3FL, štiteći ih od proteosomske degradacije i održavajući tako dostupne Gli proteine za signalnu transdukciju putem SHh (73). Osim citoplazmatske sekvestracije, Sufu se lokalizira u jezgri gdje se veže na Gli-vezujuće sekvence u molekuli DNA te sprječava transkripciju gena (74).

2.6 Kif7

Kinezin protein (Kif7), evolucijski je konzervirana komponenta Hh signalnog puta koja modulira funkciju Gli nizvodno od Smo (75). Kif7 djeluje u interakciji s Gli proteinima i ima pozitivne i negativne regulatorne uloge u Hh signalizaciji (76). Kif7 se nalazi u bazalnom dijelu PC-e u odsutnosti Hh liganda, ali kada je put aktiviran, prelazi u PC-u i važan je za nakupljanje Gli2 i Gli3 na vrhu PC-e.

Nedavno predloženi model usuglašava proces fosforilacije Kif7 s ranijim opažanjima (77). Kada je Hh put neaktivan, Kif7 je fosforiliran i lokaliziran u podnožju PC-e, a promet Kif7 i Gli u PC-i je ograničen. Kada je put aktiviran, protein PPFIA1 i fosfataza PP2A se regrutiraju te defosforiliraju Kif7, što dovodi do povećanog nakupljanja Kif7 i Gli proteina na vrhu PC-e, disocijacije Sufu od Gli proteina i Gli aktivacije. Zanimljiv dodatak ovom modelu dolazi od grupe Anderson koja je nedavno

predložila da je glavna uloga Kif7 u Hh signalizaciji kontroliranje duljine i arhitekture PC-e (78).

2.7 cAMP i PKA

Protein kinaza A (PKA), ovisna o c-AMP-u, glavni je negativni regulator Hh puta. PKA fosforilira Sufu i Gli2/3 faktore transkripcije. Sekvencijalna fosforilacija Sufu putem PKA i GSK3 stabilizira Sufu u kompleksu Gli2/3 koji se kreće u PC-i kao odgovor na Hh ligand (79) (Tablica 1). Mnoge molekule mogu modulirati aktivnost PKA. Na primjer, proizvodnja cAMP-a pomoću adenilil ciklaze i degradacija cAMP-a pomoću fosfodiesteraze mogu promicati odnosno smanjiti aktivnost PKA.

Aktiviran Hh signalni put inducira pozitivnom povratnom spregom ekspresiju Eya1 fosfataze i transkripcijskog faktora Six1. Oni sudjeluju u transkripciji transmembranskog receptora Neuropolina (Nrp). Na Nrp se veže ligand Sema3 (engl. Semaphorin 3) te oni tvore kompleks koji potiče interakciju fosfodiesteraze 4D (PD4D) i citoplazmatske domene Nrp-a. Interakcija dovodi do hidrolize cAMP-a, a time i redukcije razine PKA (80).

2.8 Ciljni geni

Glavni ciljni geni signalnog puta Hh su *Ptch1*, *Ptch2* (60) i *Gli1* koji u odgovoru na aktivirani signalni put pokazuju povišenu razinu mRNA i proteina (60). Povećana ekspresija gena *Ptch1*, *Ptch2* i *Gli1* je vrlo pouzdan pokazatelj aktiviranog signalnog puta i osigurava negativnu (*Ptch1*) i pozitivnu (*Gli1*) regulaciju Hh signalizacije mehanizmom povratne sprege (81). Post-translacijske modifikacije Gli proteina, uključujući fosforilaciju, acetilaciju i ubikvitinaciju također utječu na učinak proteina Gli na ciljne gene.

Ostali ciljni geni uključuju *Hip* (engl. *Hedgehog-interacting protein*) (82), regulatore staničnog ciklusa (*ciklin D2* i *ciklin E1*) (50) i apoptoze (*BCL2*) (83) te *MYCN* (84), *ABCG2* (85), *FGF4* (86), *VEGFA* (87), *PAX6*, *PAX7*, *PAX9* (88), *FOXM1* (89), *JAG1* te članove signalnog puta Wnt (90) (Tablica 1). Novija istraživanja ukazuju na postojanje interakcije između Wnt i Hh signalnog puta (34)(91). Aktiviranje i deaktiviranje ovih gena Hh može doprinijeti normalnom razvoju tkiva i organa, ali i nastanku tumora.

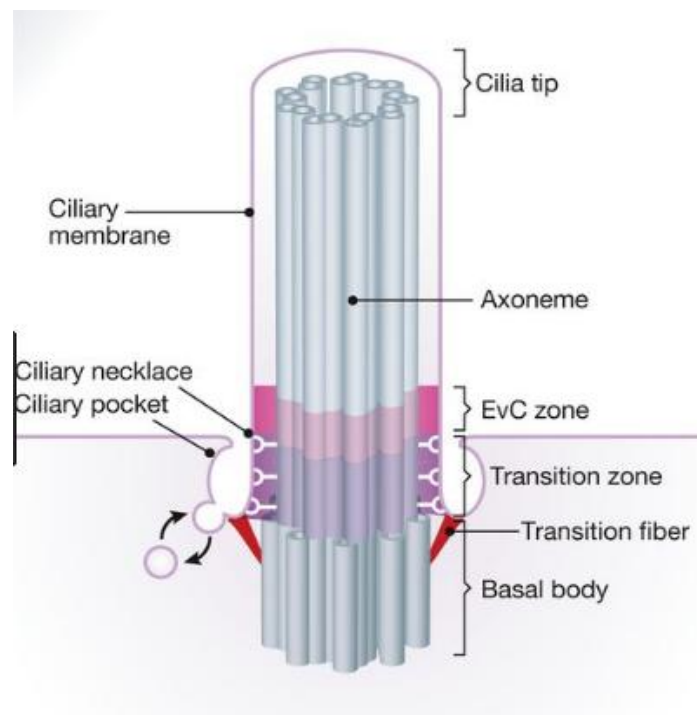
Tablica 1. Ciljni geni Hh signalnog puta

Kratica gena	Puno ime gena	Učinak genskog produkta	(Ref.)
Ptch1	engl. <i>Patched 1</i>	pokazatelj aktiviranog signalnog puta, negativna povratna sprega	(81)
Ptch2	engl. <i>Patched 2</i>	pokazatelj aktiviranog signalnog puta	(81)
Gli1	engl. <i>Glioma-associated oncogene 1</i>	pokazatelj aktiviranog signalnog puta, pozitivna povratna sprega	(81)
Hip	engl. <i>Hedgehog-interacting protein</i>	regulacija Hh signalnog puta	(82)
CCND2	engl. <i>G1/S-specific cyclin-D2</i>	regulator staničnog ciklusa	(50)
CCNE1	engl. <i>G1/S-specific cyclin-E1</i>	regulator staničnog ciklusa	(50)
MYCN	engl. <i>N-myc proto-oncogene protein</i>	proliferacija stanica i tumorigeneza	(84)
BCL2	engl. <i>B-cell lymphoma 2</i>	regulator apoptoze	(83)
ABCG2	engl. <i>ATP-binding cassette sub-family G member 2</i>	transport mnogih pozitivno i negativno nabijenih hidrofobnih molekula	(85)
FGF4	engl. <i>Fibroblast growth factor 4</i>	mitogena aktivnost, sudjeluje u različitim biološkim procesima (embrionalni razvoj, morfogeneza, popravak tkiva)	(86)
VEGFA	engl. <i>Vascular endothelial growth factor A</i>	angiogeneza, vaskulogeneza, rast endotelnih stanica	(87)
PAX6, PAX7, PAX9	engl. <i>Paired box protein Pax-6, 7 i 9</i>	faktori transkripcije tijekom embriogeneze	(88)
JAG1	engl. <i>Jagged 1</i>	ligand Notch i Wnt signalnog puta	(92)
FOXM1	engl. <i>Forkhead box protein M1</i>	transkripcijski faktor	(89)

2.9 Primarna cilija (PC)

Središnje komponente Hh signalizacije kod kralješnjaka, uključujući proteine Ptch1, Smo, Sufu, Kif7 i Gli, dinamički se lokaliziraju u PC-i (93)(94). Nakon vezanja Hh liganda, Ptch1 izlazi iz baze PC-e, dok se Smo nakuplja u ciliji. Aktivacija puta također potiče kretanje kompleksa Sufu-Gli u PC-i gdje se disociraju. To rezultira istodobnim nakupljanjem proteina Gli na distalnom vrhu cilije i translokacije Gli u jezgru. Translokacija Smo i Gli disocijacija pokazuju pozitivnu regulaciju Hh signalnog puta pomoću PC-e. PC sudjeluje u inhibiciji puta posredovanjem proteolitičke obrade GliFL u GliR koji smanjuje ekspresiju ciljnih gena. Tako, miševi s defektnom ili odsutnom PC-om pokazuju funkcionalni gubitak ili promijenjeni omjer GliA/GliR (94).

Precizna lokalizacija proteina unutar PC-e važna je za prijenos signala. Na primjer, EvC zona (Slika 9), nazvana po Ellis-van Creveldovom sindromu, nalazi se u podnožju PC-e i definira poseban odjeljak gdje se Smo akumulira vezanjem na proteine EVC i EVC2. Sidrenje EVC-EVC2 kompleksa u EvC zonu potrebno je za aktivaciju Gli2, ali ne i za regulaciju razine Gli3R (95).



Slika 9. Prikaz strukture primarne cilije: ružičasto je označena EvC zona. Preuzeto iz (96).

Lipidni sastav PC-e pridonosi prometu i signalizaciji komponenata Hh signalnog puta. Fosfatidilinozitol 4-fosfat (PI(4)P) prisutan je u ciliarnoj membrani, dok su oba PI(4)P i PI(4,5)P₂ (fosfatidilinozitol 4,5-bisfosfat) smještene u staničnoj membrani (97). Ovakav drugačiji lipidni sastav PC-e održava se fosfatazom smještenom na ciliji, Inpp5e, koja defosforilira PI(4,5)P₂ u PI(4)P. Gubitak Inpp5e rezultira akumulacijom PI(4,5)P₂ na membrani cilije regrutacijom Tubby-like-proteina 3 (Tulp3). Tulp3 ometa intraflagelarni transport (IFT-A) proteina u PC-i. Također, negativni Hh regulator, Gpr161, koristi Tulp3 i IFT-A kompleks za promet i akumulaciju u PC-i nakon gubitka Inpp5e. Akumulaciju Gpr161 prati povećana razina cAMP-a koja ometa aktivaciju ciljnih gena signalnog puta Hh. Gubitak Inpp5e također umanjuje akumulaciju Gli3 na vrhu cilije nakon stimulacije puta, ali ne utječe na promet Smo-a. Stoga, Inpp5e uspostavlja poseban fosfoinozidni sastav PC-e koji ograničava količinu akumuliranih negativnih Hh regulatora te time dopušta daljnji prijenos signala. Nadalje, studija (98) ističe važnost fosfatidilinozitol 3-fosfata (PI(3)P). Lipidna kinaza, fosfoinozimid 3 kinaza-C2α (PI3K-C2α), lokalizirana u području cilijarne baze regulira stvaranje i nakupljanje PI(3)P-a. PI(3)P aktivira Rab11 koji je zaslužan za aktivaciju Rab8 i nužan je za pravilnu elongaciju cilija. Nedostatak PI3K-C2α uzrokuje smanjenu akumulaciju proteina Smo pa samim time i smanjenu aktivaciju puta.

3. ULOGA Hh SIGNALNOG PUTA U KARCINOGENEZI

Abnormalna aktivacija Hh signalnog puta pridonosi razvoju nekih vrsta karcinoma. Takva aberantna aktivacija Hh signalnog puta uzrokovana je ili mutacijama u samom signalnom putu (neovisno o ligandu) ili pretjeranom ekspresijom Hh signalnog puta (ovisno o ligandu-autokrini ili parakrini signalizacija) (99).

U skladu s time, predložena su tri mehanizma aktivacije puta u različitim vrstama karcinoma (100):

3.1 Tip 1 - Ligand-neovisno signaliziranje inicirano mutacijom



Slika 10. Prikaz: Tip 1 - ligand neovisno signaliziranje. Ovaj tip obuhvaća: inaktivacijsku mutaciju *Ptch1* (plava zvjezdica) ili aktivacijsku mutaciju *Smo*-a (crvena zvjezdica) čime se gubi *Ptch1* inhibicija *Smo* koreceptora. Dolazi do aktivacije signalnog puta u odsustvu liganda. Preuzeto iz (101).

Ligand-neovisno signaliziranje inicirano mutacijom (Slika 10) prvi put je uočeno u bolesnika s, već spomenutim, nasljednim Gorlinovim sindrom. Ovi pacijenti nasljedili su aktivirajuće mutacije gena *Smo* ili inaktivirajuće mutacije gena *Ptch1*, što dovodi do konstitutivne aktivacije Hh signalnog puta u odsutnosti liganda (102). Budući da gen *Ptch* djeluje kao tumor supresorski gen, (103) mutacijom promijenjena ekspresija *Ptch* leži u osnovi različitih tumora (104). Tako u Gorlinovom sindromu postoji visoki

rizik oboljevanja od BCC-a i povećan rizik razvoja meduloblastoma (MB), meningeoma i rabdomyosarkoma (105).

Mutacije gena pronađene su i u sporadičnom BCC-u i MB-u. BCC je najčešći karcinom u ljudi, a kod 50% sporadičnih slučajeva detektirana je mutacija gena *Ptch1*, što upućuje na mogućnost postojanja mutacija i drugih gena u ovom tipu karcinoma kože. Doista, mutacije gena *Smo* nalaze se kod oko 10% sporadičnih BCC-a. S obzirom na navedena otkrića, predloženo je da je BCC bolest aberantne aktivacije Hh signalnog puta (40). U pozadini 30% BCC nije pronađena mutacija gena Hh signalnog puta. Molekularne studije upućuju kako aktivacija Hh signalnog puta u BCC-u dovodi do proliferacije stanica kroz povišenu ekspresiju PDGFR α (106), dok ciljana inhibicija Hh signalizacije uzrokuje apoptozu putem Fas indukcije (107).

Oko 30% svih slučajeva tumora mozga povezano je s Hh signalnim putem (108). Kod oko 45% slučajeva pronađene su mutacije gena *Ptch1* i česti kromosomski gubitak *Ptch1* lokusa, dok su *Smo* mutacije (<14%) manje uobičajene i češće kod odraslih u usporedbi s pedijatrijskim pacijentima (109). Uloga Hh signalizacije u formiranju MB-a na neki način nije iznenađujuća s obzirom na mitogenu ulogu SHh liganda u masovnoj proliferaciji GNP-a (engl. Granule neural progenitor) u razvoju cerebeluma (110). Ako je Hh signalni put konstitutivno aktiviran u GNP-u, proliferacija perzistira izvan normalnog razdoblja razvoja i može dovesti do formiranja MB-a (111).

Gubitak funkcije *Sufu*, također, rezultira formiranjem BCC-a i MB-a. Zanimljivo, ciljana inaktivacija *Sufu* u mišjoj koži rezultira zaustavljanjem staničnog ciklusa u G2/M fazi, ali ne dolazi do formiranja BCC-a (112). Štoviše, *Sufu* heterozigotni miševi nisu skloni tumorogenezi. Međutim miševi heterozigoti za *Sufu* i insuficijenti za oba p53 alela razvijaju MB (113). Iako spomenuti mišji modeli ukazuju da gubitak funkcije gena *Sufu* sam po sebi nije dovoljan za tumorogenezu, mutacije gena *Sufu* u zametnim stanicama i u BCC-u i MB-u bolesnika, ukazuju da je *Sufu* ipak autentični tumorsupresor gen (109). U MB-u ovisnom o Hh signalnom putu, pojavljuju se mutacije gena *Sufu* u oko 14% slučajeva, pri čemu je većina pronađena kod djece (0-3 godine) (109), dok su u BCC-u, *Sufu* mutacije rijetke (<10% somatske) (114).

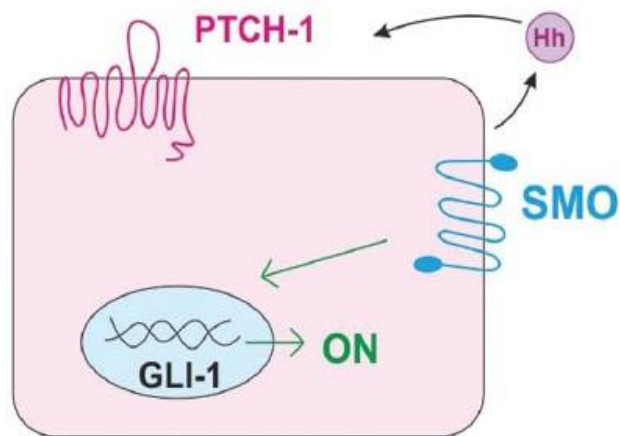
Smanjena aktivnost glavnog negativnog regulatora, PKA, pokreće onkogenu Hh signalizaciju. Tu činjenicu potkrepljuje istraživanje tumorskog supresora *Gnas*, koji kodira za G-proteini $G\alpha_s$. Spomenuti protein potiče PKA aktivnost ovisnu o cAMP-u. Gubitak funkcije proteina *Gnas* povezan je s nastankom MB-a u mišjim modelima (115). Slično tome, delecija gena *Gnas* u epidermalnim stanicama izaziva stvaranje lezija sličnih BCC-u (116). Mutacije gena *Gnas* zabilježene su i u ljudskom MB-u (117)(109), a njegova niska ekspresija detektirana je u posebno agresivnom podtipu MB-a (115).

Aberantna aktivacija Gli-posredovane transkripcije može zaobići čvrsto reguliranu kontrolu i promicati rast tumora neovisno o uzvodnim modulatorima i PC-i. Na primjer, ekspresija i aktivacija Gli1 pozitivnog regulatora, aPKC- λ , nužna je za rast stanica BCC-a (68). Štoviše, povećana aktivnost aPKC- λ može uzrokovati rezistenciju prema Smo inhibitorima. Slično tome, amplifikacija gena *Gli2* može potaknuti tumorogenezu. Oko 8% BCC-a i MB-a pokazuju amplifikaciju *Gli2* (114)(109). U MB-u, amplifikacije gena *Gli2* identificirane su kod djece u dobi od 4 do 17 godina i pretežno su povezane s mutacijama gena *TP53*. *TP53* je jedan od najčešće mutiranih gena u karcinomima te je često mutiran u BCC-u i MB-u. Ovaj gen kodira za protein p53, koji je važan za održavanje genomske stabilnosti. Kod pacijenata s MB-om i mutiranim *TP53*, petogodišnje preživljenje smanjeno je za gotovo polovicu u odnosu na pacijente bez te mutacije (118).

Amplifikacija transkripcijskog faktora, *MYCN*, je također uključena u stvaranje MB-a i posreduje stvaranju rezistencije na Smo inhibitore (111).

U trihoepiteliomima (119), planocelularnom karcinomu jednjaka (120) i karcinomu prijelaznih stanica mjehura (121) zabilježene su mutacije gena *Ptch1*. *Ptch2* mutacije, iako rijetke, zabilježene su u MB-u i karcinomima bazalnih stanica (43).

3.2 Tip 2- Autokrino ili jukstakrino signalizacija ovisna o ligandu



Slika 11. Prikaz: Tip 2 - autokrino/jukstakrino signaliziranje ovisno o ligandu. Ligand se otpušta iz samih tumorskih stanica i povratno djeluje na iste tumorske stanice (autokrino) ili na obližnje tumorske stanice (jukstakrino) te aktivira signalnu kaskadu Hh signalnog puta. Preuzeto iz (101).

Karcinomi ovisni o ligandu, povezani s prekomjernom ekspresijom Hh signalnog puta su: karcinomi jajnika i endometrija (33), gornjeg gastrointestinalnog trakta, gušterače (122), dojke, prostate, debelog crijeva, sitnostanični karcinom pluća, melanom, gliom (123) te ostali ekstrakutani tumori. Ligand izlučen iz tumorskih stanica djeluje autokrinom ili parakrinom sekrecijom na obližnje tumorske stanice, aktivirajući nizvodne signale Hh signalnog puta, čime se stimulira rast i proliferacija karcinoma (124) (Slika 11).

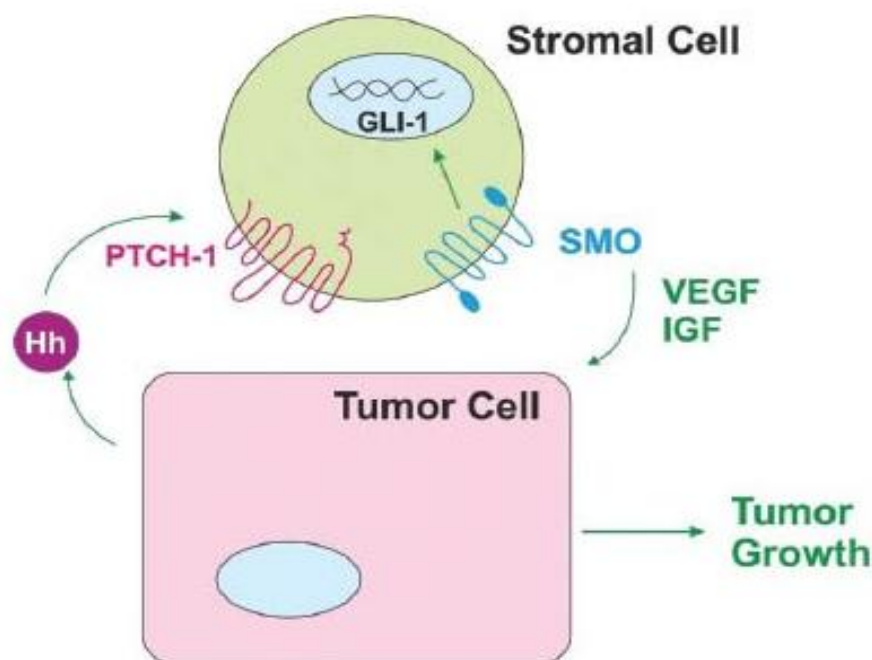
Istraživanja ukazuju da Hh signalizacija može biti uključena u različite faze karcinogeneze u različitim tumorima. Primjerice, kod karcinoma gušterače i jednjaka, aktivaciju ovog signalnog puta nalazimo kako u ranoj fazi razvoja tumora tako i u metastatskim tumorima (125)(126). U ostalim tumorima, kao što su karcinom želuca i prostate, aktivacija Hh signalnog puta povezana je s progresijom raka. U skladu s tim nalazima, inhibicija Hh signalizacije u stanicama karcinoma prostate i želuca smanjuje invazivnost stanica (12)(127). U sitnostaničnome karcinomu pluća signalizacija Hh može potaknuti razvoj raka, ali ne može potaknuti formiranje tumora.

Podaci o aktivaciji Hh signalnog puta u kolorektalnom karcinomu (CRC) međusobno su kontradiktorni. Nekolicina studija (128)(129) otkrila je povišenu razinu

članova Hh signalnog puta u CRC-u. Također, u *in vivo* stanicama CRC-a registrirana je povišena razina ekspresije SHh kako na razini mRNA tako i na razini proteina. Ovi nalazi upućuju na to da je SHh potreban u razvoju epitelnog tumora debelog crijeva *in vivo*. Suprotno tome, neki autori (130)(34)(91) dokazuju da je Hh signalni put tijekom progresije CRC-a inaktiviran. U prilog tome govori i činjenica da ciklopamin, kao inhibitor Hh signalnog puta, ne utječe na vijabilnost stanica CRC-a (130), za razliku od ostalih staničnih linija karcinoma probavnog trakta.

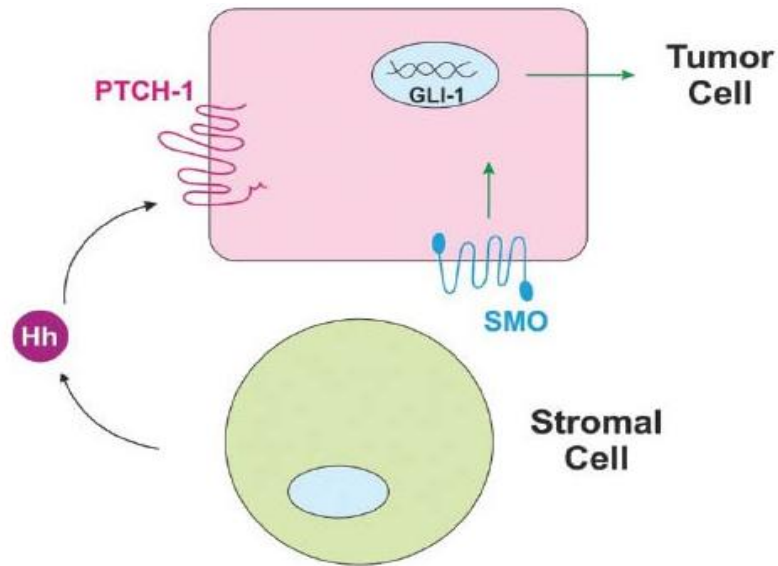
3.3 Tip 3 - Parakrina signalizacija ovisna o ligandu

Parakrina aktivacija Hh puta povezana je s karcinomom prostate, gušterače i debelog crijeva. Hh ligand, kojeg luče tumorske stanice, veže se na udaljene stromalne stanice što dovodi do stvaranja signala poput VEGF i IGF. Oni se prenose natrag do tumora i podržavaju njegov rast i preživljavanje (131) (Slika 12).



Slika 12. Prikaz: Tip 3 - parakrina signalizacija. Tumorske stanice sekretiraju Hh ligand koji djeluje na stromalne stanice. Stromalne stanice proizvode proteine VEGF i IGF koji djeluju na tumorske stanice potičući njihov rast i preživljavanje. Preuzeto iz (101).

Model reverzne parakrine signalizacije uočen je u limfomima B-stanica, multiplim mijelomima i leukemijama. U ovom modelu Hh ligand izravno luče stromalne, a ne tumorske stanice. Ove ligande u hematološkim zloćudnim bolestima proizvodi stroma koštane srži, a primaju ih tumorske stanice. Dakle, aktivacija Hh puta u stromalnim stanicama osigurava zadovoljavajuće okruženje za rast tumora (132) (Slika 13).



Slika 13. Prikaz: Tip 3 - reverzna parakrina signalizacija. Stromalne stanice proizvode Hh ligand koji se veže na receptor na tumorskim stanicama. Na taj način stromalne stanice pomažu u proliferaciji i rastu tumorskog tkiva. Preuzeto iz (101).

3.4 Tumorske matične stanice

Osim održavanja normalnih matičnih stanica, u zadnje vrijeme je popularan novi model razvoja tumora koji uključuje tumorske matične stanice (133)(134). Naime, unutar svakog tumora postoji set stanica koje se ponašaju kao matične stanice: dijele se sporo, ali u slučaju potrebe mogu vrlo brzo proliferirati i stvoriti novu populaciju tumorskih stanica (135). Aktivirani signalni putevi, među kojima i Hh, uključeni su u njihov rast, preživljenje, migraciju i proliferaciju (136). Matične stanice nekih tumora već su detektirane, primjerice u multiplim mijelomima (136) ili adenokarcinomu gušterače (137). Budući da su ove matične stanice potencijalno otporne na kemoterapiju i radioterapiju, smatraju se glavnim uzrokom relapsa nakon primjenjene terapije. Stoga se pokušavaju razviti nove generacije antitumorskih lijekova koje bi ciljano blokirale ovakve signalne puteve (138).

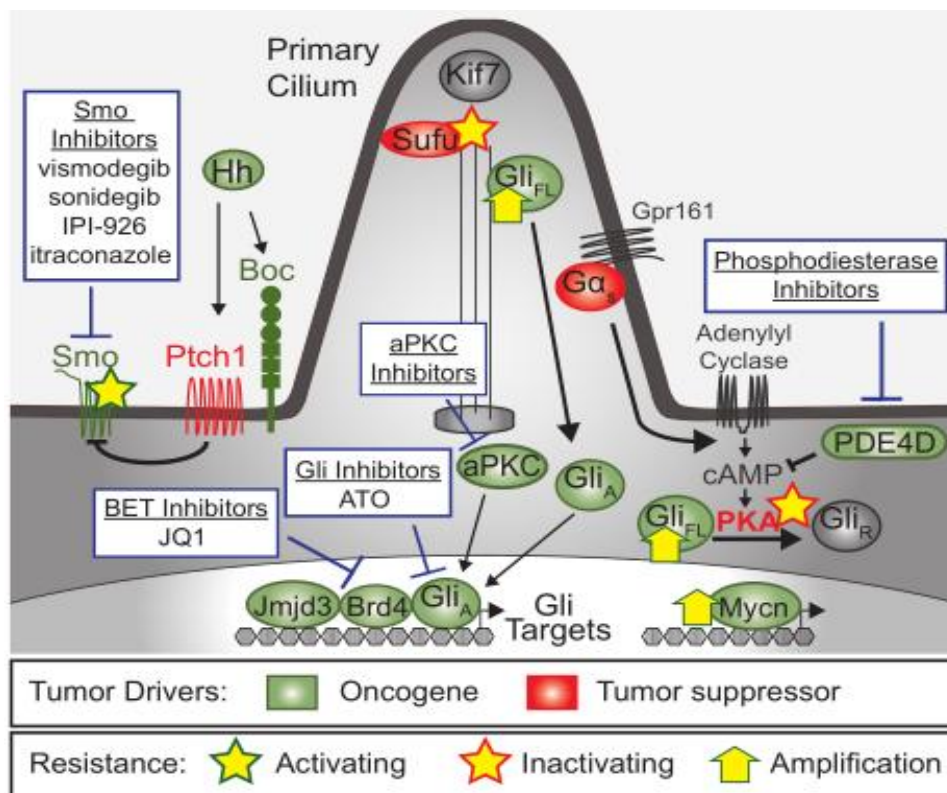
3.5 Epigenetske promjene

Najnoviji rezultati pokazuju da se osim mutacijama, ovaj signalni put može poremetiti i epigenetski, točnije metilacijom promotora gena. Do sada je pokazano da je metilacija promotora gena *Ptch1* povećana u dermoidima i fibromima jajnika (139) te karcinomu dojke (140), dok u MB-u SHh ligand inducira zamjenu epigenetskih kofaktora (iz represivnih u aktivne oblike) na ciljnim genima (141).

4. TERAPIJA

Novija saznanja o Hh signalnom putu i njegovoj ulozi u formiranju pojedinih tumora otvaraju nove poglede prema razvitku molekularno ciljane terapije i prevencije tumora povezanih s Hh signalizacijom. Mnogo je pažnje posvećeno ciljanoj inhibiciji Hh signalnog puta (HPI) kao sredstvu za liječenje naprednih BCC-a. Naime, BCC je spororastući tumor koji ima tendenciju recidiva, pojavljivanja na više lokacija i invazije lokalnih tkiva poput mišića, kosti ili hrskavica (laBCC). Metastatski BCC (mBCC) je vrlo rijedak s vrlo lošom prognozom preživljavanja. Nažalost, u tim stadijima tumora, radioterapija i operativno liječenje ne pružaju zadovoljavajuće stope izlječenja. Stoga HPI terapija predstavlja novu nadu za pacijente oboljele od laBCC-a i mBCC-a jer pokazuje veliki kurativni potencijal. Mogući izazovi u primjeni HPI terapije su: identifikacija pravih tumora za optimalnu terapijsku primjenu, pouzdani životinjski modeli za ispitivanje HPI spojeva i optimizacija doza lijeka kako bi se minimizirale nuspojave.

Utvrđeno je više od 50 HPI spojeva koji modificiraju aktivnost signalnog puta Hh na različitim razinama prijenosa signala (Slika 14). Međutim, do sada su samo dva HPI lijeka odobrena od strane US Food and Drug Administration (FDA): vismodegib i sonidegib. Općenito, HPI se kategoriziraju na sljedeći način: inhibitori Hh liganda, antagonisti Smo, Gli inhibitori, BET inhibitori, aPKC inhibitori i inhibitori fosfodiesteraze (Tablica 2).



Slika 14. Prikaz inicijatora karcinogeneze, mjesta djelovanja ciljnih lijekova i mehanizama rezistencije u onkogenoj Hh signalizaciji: tumorski supresori (crveno) i onkogeni (zeleno) koji dovode do razvoja bazocelularnog karcinoma (BCC) i meduloblastoma (MB). Aktivacijske odnosno inaktivacijske mutacije koje rezultiraju rezistencijom na terapiju (zvjezdice). Komponente signalnog puta uključene u mehanizam rezistencije na Smo inhibitore (strelice). Mjesto djelovanja pojedinih inhibitora signalnog puta (HPI) (bijeli okviri). Preuzeto iz (22).

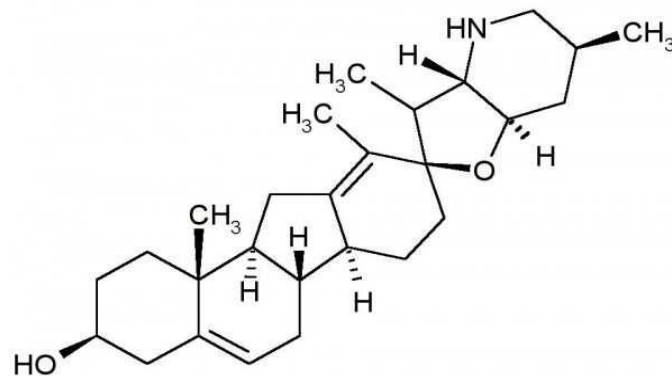
4.1 Inhibitori Hh liganda

U ovu skupinu spadaju Hh neutralizirajuća antitijela (5E1) i robotnikinin. Oni djeluju na najvišoj razini signalnog puta inhibirajući vezanje proteina Hh na receptor Ptch (142).

4.2 Antagonisti Smo

Ciklopamin (Slika 15) je prvi i najpoznatiji antagonist Smo. Veže se izravno na transmembranske helikse Smo te na taj način blokira prijenos signala nizvodno od Smo (143). Ciklopamin je po kemijskoj strukturi steroidni alkaloid, a izoliran je iz biljke planinskog ljiljana, *Veratrum californicum* (144), 1965. godine. Naziv je dobio zbog svoje sposobnosti inhibicije Hh signalnog puta, što rezultira kiklopijom kod potomaka

ovaca koje su pasle ovu biljku. U istraživanjima na staničnim kulturama i životinjama, ciklopamin je pokazao antikarcinogenu aktivnost. Međutim, niska topljivost i nestabilnost u vodi i u kiselim uvjetima te mnogi negativni učinci čine ga lošim kandidatom za primjenu u liječenju karcinoma ljudi.



Slika 15. Prikaz kemijske strukture ciklopamina. Preuzeto iz (144).

Upravo zato, posljednjih se godina ispituje niz različitih kemijskih spojeva kako bi se pronašli novi modulatori signalnog puta Hh koji bi imali poboljšanu aktivnost i manju toksičnost te bi se mogli primjenjivati u terapiji. Trenutno je sedam Smo inhibitora u postupku kliničkog ispitivanja ili je odobreno u liječenju Hh induciranih karcinoma. Ovi inhibitori uključuju derivate ciklopamina IPI-926 (saridegib), GDC-0449 (vismodegib), BMS833923 (XL-139), PF04449913 (glasdegib), LY2940680 (taladegib), LEQ506, TAK- 441 i LDE225 (sonidegib) (145)(100)(146). Farmakološka svojstva ovih lijekova kao i njihov inhibicijski potencijal i mogućnost topikalne uporabe značajno se razlikuju. Na primjer, LEQ-506 i TAK-441 povoljni su u liječenju minimalno invazivnih BCC-a zbog mogućnosti topikalne primjene i minimalnih nuspojava. Nasuprot tome, sonidegib i vismodegib imaju više nuspojava, ograničavajući njihovu upotrebu u manje invazivnim BCC-ima (147).

FDA je u srpnju 2015. odobrila sonidegib kao lijek za oralnu primjenu za liječenje recidivnog laBCC-a i mBCC-a ili BCC-a kod bolesnika koji nisu prikladni za operaciju ili radioterapiju. Pripada klasi bifenil-karboksamida (148). Vezno mjesto sonidegib-a na proteinu Smo (engl. drug-binding pocket) sastoji se uglavnom od 3 aminokiseline: arginin (R) 473, arginin (R) 400 i glutaminska kiselina. Vežući se na drug-binding pocket, sonidegib djeluje kao antagonist sprječavajući nizvodnu aktivaciju signala Hh kaskade (149)(150). Međutim, mutacije drug-binding pocket-a, uključujući Q476 i D473, sprječavaju vezanje sonidegib-a. Druge mutacije, primjerice S533 i W535, uzrokuju konformacijske promjene proteina Smo, blokirajući pristup sonidegib-a mjestu vezanja lijeka (150). Ove mutacije rezultiraju rezistencijom na sonidegib (151).

Mnoga farmakokinetička svojstva sonidegib-a čine ga učinkovitim terapijskim sredstvom (152). U visokom postotku veže se za proteine plazme (preko 99%). Kada se daje u otopini pokazuje između 69% i 100% oralne bioraspoloživosti. Posjeduje veliku sposobnost penetracije tkiva i prodora krvno-moždane barijere, što ga čini potencijalnom terapijom u MB-u. Ne pokazuje sposobnost inhibicije ili indukcije citokroma P450, što smanjuje mogućnost interakcije s metabolizmom drugih lijekova (149). Sonidegib ima topljivost ovisnu o pH, s malom topljivošću pri visokom pH (148).

Studija BOLT (153) prva je procijenila sigurnost lijeka i obuhvatila dugoročne podatke o praćenju bolesnika liječenih sonidegib-om. Od 94 pacijenata oboljelih od laBCC kod njih 18 bolest je napredovala ili su umrli, dok je više od polovice imalo pozitivan učinak dulje od 6 mjeseci. 80% bolesnika s mBCC također je pokazalo pozitivan odgovor nakon primjene terapije. Iako je lijek učinkovit, gotovo svi pacijenti imaju barem jednu neželjenu nuspojavu, a najčešće su: spazam mišića, alopecija, mučnina, umor, smanjenje težine, proljev, smanjenje apetita, mialgija te povraćanje. Ozbiljne nuspojave, uključujući rhabdmiolizu i vrlo visoku kreatin kinazu, vrlo su rijetko povezane sa sonidegib-om. Nijedna smrt u studiji nije bila povezana s uzimanjem sonidegib-a (153)(154). Unatoč tome, korist lijeka je znatno veća od potencijalnih nuspojava, a kroz edukaciju pacijenata, one se mogu svesti na minimum.

Postoji značajan interes u primjeni sonidegib-a u liječenju drugih karcinoma poput karcinoma bubrega, pluća, gušterače, mijeloidne leukemije, MB-a, karcinoma jajnika i limfoma. Međutim, većina studija provedena je na mišjim modelima. Postoje dokazi koji ukazuju na to da bi liječenje sonidegib-om zajedno s drugim agensima moglo biti učinkovitije.

Vismodegib je prvi u klasi HPI koji je FDA odobrila 2012. za liječenje BCC-a, a trenutno se proučava za uporabu u drugim vrstama karcinoma, uključujući rak debelog crijeva, rak gušterače i MB. Vismodegib se veže na isto vezno mjesto kao i sonidegib. Oba lijeka imaju sličan sigurnosni profil, međutim u II. fazi ispitivanja lijeka kod pacijenata liječenih vismodegib-om zabilježena je manja terapijska učinkovitost te mnoge ozbiljnije nuspojave poput značajnog umora, hiponatrijemije, hipokalijemije, mišićnog spazma i atrijske fibrilacije (155).

Itrakonazol spada također u skupinu Smo inhibitora, ali se ne veže na isto vezno mjesto kao vismodegib ili sonidegib. Stoga se smatra potencijalnim lijekom za liječenje rezistentnih tumora. Trenutno se provode klinička ispitivanja u liječenju BCC-a itrakonazolom (156).

Zaključno, iako terapija antagonistima Smo ima veliki potencijal u liječenju BCC-a, a u zadnje vrijeme i drugih tipova karcinoma, u kliničkim istraživanjima ta skupina lijekova pokazuje nešto slabije rezultate. Ukupna stopa odgovora na terapiju (~ 30%) prilično je niska u tumorima potaknutima mutacijama u genu *Ptch1*. Stopa odgovora u mBCC-u još je gora (<5%). Postoji niz razloga za različite odgovore kod bolesnika s BCC-om. Prvo, u mutacijama gena *Smo* ili *Sufu*, koje su moguće u 20% tumora, sonidegib i vismodegib neće biti učinkoviti. Drugo, odgovor pacijenata na lijekove značajno varira. Detaljna analiza biomarkera nakon liječenja može otkriti dodatne mehanizme zašto neki pacijenti odgovaraju bolje od drugih. Treće, iako je aberantna Hh signalizacija najvažniji put za razvoj BCC-a, poremećena signalizacija u drugim signalnim putovima, kao što su mutacije gena *p53*, također imaju važnu ulogu. Četvrto, tijekom liječenja Smo antagonistima obično se javlja rezistencija na lijek. Zato je kod donošenja odluke o uporabi Smo antagonista u liječenju važno uzeti u obzir i mogućnost razvitka rezistencije kod velikog dijela pacijenata. Redovitim praćenjem terapijskog odgovora pacijenata liječnik može odrediti je li Smo antagonist prikladan lijek za određenog pacijenta. Nadalje, genotipizacijom tumora mogli bi se

identificirati bolesnici s mutacijama koje rezultiraju rezistentnim tumorima i tako izbjeći nepotrebno liječenje Smo inhibitorom. Određene vrste raka, uključujući rak gušterače, mogu pokazivati aberantnu nekanonsku aktivaciju puta. Usprkos tome što je sonidegib moćan HPI, neće biti učinkovit u suzbijanju nekanonske Hh signalizacije jer ovi signalni događaji zaobilaze Smo-ovisnu signalizaciju. Te činjenice utiru put razvoju zajedničkog antagonista Hh signalnog puta, kao što su inhibitori Gli-transkripcijskog faktora.

4.3 Gli inhibitori

Smo inhibitori nedjelotovorni su u tumorima praćenima pretjeranom aktivacijom Gli faktora (157). Iz tog razloga Gli, koji je nizvodno od proteina Smo u signalnoj kaskadi, postaje važan cilj represije aktiviranog Hh signalnog puta. Nekoliko studija dokazuje da su Gli1 i Gli2 primarni transkripcijski efektori uključeni u formiranje tumora (158)(159). Zbog toga Gli1 postaje obećavajuća meta u razvitku protutumorske terapije (160). U skupinu Gli inhibitora spadaju HPI-1, HPI-2, GANT-56, GANT-61 te ATO (engl. Arsenic trioxide). GANT ometa vezanje Gli na promotore gena. HPI-1 djeluje na posttranslacijsku modifikaciju Gli proteina i/ili interakciju između Gli proteina i kofaktora (161). ATO inhibira cilijarnu akumulaciju Gli2 te potiče njegovu degradaciju. Bilo pojedinačno ili u kombinaciji s itrakonazolom inhibira Hh signalni put i rast rezistentnih tumora (156). Međutim, specifičnost Gli inhibitora i njihov potencijal u liječenju BCC-a nije dokazana u kliničkim ispitivanjima (162), a amplifikacijom Gli2 također se može razviti rezistencija tumora na terapiju.

4.4 BET inhibitori

BET proteini (engl. Bromodomain proteins) olakšavaju transkripciju gena vezanjem na specifična mjesta na kromatinu i interakcijom s elongacijskim faktorima i RNA polimerazom II (163). BET inhibitori, kao što je JQ1, reduciraju vijabilnost i proliferaciju stanica te aktivnost Hh signalnog puta u Smo-rezistentnim tumorima. Također, reduciraju rast tumora i povećavaju preživljenje kod životinja s MB-om i BCC-om (164).

4.5 aPKC inhibitori

Kao što je ranije spomenuto aPKC- α/λ promovira rast BCC-a i može biti posrednik u stvaranju rezistencije na Smo inhibitore, zato aPKC inhibitori mogu biti korisni u liječenju rezistentnih BCC-a (68).

4.6 Inhibitori fosfodiesteraza

Inhibitori fosfodiesteraza blokiraju cAMP degradaciju i tako povećavaju aktivnost negativnog regulatora Hh signalnog puta, PKA. U *in vivo* pokusima pokazali su se korisnim u liječenju Smo-rezistentnih MB-a (165).

4.7 Prirodni spojevi

Neki prirodni spojevi također su se pokazali korisnima u liječenju tumora. Tako primjerice deguelin, prirodni spoj koji pripada skupini flavonoida, posjeduje antikarcinogena i antiproliferativna svojstva potičući procese apoptoze, zaustavljanje staničnog ciklusa i anti-angiogeneze (166). Nekoliko je studija već pokazalo njegov izvrstan potencijal u liječenju različitih malignih tumora kao što su karcinom želuca, pluća i dojke te odnedavno i karcinoma gušterače (engl. Pancreatic cancer; PC). Suprimira tumorske stanice kroz niz signalnih putova, uključujući PI3K Akt, HIF1VEGF, IKK I κ B α NF κ B, EMT i AMPK/mTOR (166), a sve više studija govori o deguelinu kao regulatoru Hh signalnog puta. Rezultati studije (167) otkrili su da deguelin inhibira proliferaciju PC stanica suprimirajući Hh signalni put, inducira apoptozu i suzbija migraciju PC stanica. Također posjeduje antimetastatska svojstva (168).

Nadalje, opaženo je da seskviterpeni iz biljke *Siegesbeckia glabrescens* (*S. glabrescens*) potiskuju Gli-posredovanu transkripcijsku aktivnost i suzbijaju proliferaciju ljudskih stanica PC-a. Ekstrakti *S. glabrescens* pokazuju antioksidativne, antialergijske, protuupalne (169) i antitumorske aktivnosti (170).

Nedavne studije ukazuju da vitamin D3, čije izlučivanje može biti olakšano pomoću Ptch1, može inhibirati Hh signalizaciju izravnim putem, vezanjem na Smo. Ovo otkriće otvara mogućnost liječenja BCC-a dodacima prehrani (54).

Tablica 2. Ciljana terapija tumora povezanih s Hh signalnim putem

Skupina	Lijek
Inhibitori Hh liganda	neutralizirajuća antitijela (5E1), robotnikinin
Antagonisti Smo	ciklopamin, saridegib, vismodegib, sonidegib, glasdegib, taladegib, LEQ506, TAK- 441, XL-139 itrakonazol
Gli inhibitori	HPI-1, HPI-2, GANT-56, GANT-61, ATO
BET inhibitori	JQ1
αPKC inhibitori	
Inhibitori fosfodiesteraza	
Prirodni spojevi	deguelin, ekstrakti <i>S. glabrescens</i> , vitamin D3

5. ZAKLJUČAK

Novija istraživanja otkrivaju ulogu Hh signalnog puta u razvoju različitih vrsta tumora. Postoji velika heterogenost između mutacija komponenti Hh signalnog puta i karcinogeneze kao što je primjerice javljanje mutacije ovisno o dobi (kod djece se javljaju mutacije gena *Sufu*, dok odrasle osobe nose mutacije gena *Smo*). Međutim, razumijevanje i daljnje istraživanje uloge Hh signalnog puta u karcinogenezi doprinosi razvoju terapije tumora povezanih s Hh signalizacijom. Smo inhibitori predstavljaju prvi tip ciljane terapije za takve tumore, a u nekim tumorima ti lijekovi mogu izazvati snažan odgovor. Njihovim ulaskom u kliničku primjenu pružena je nada mnogim bolesnicima s terminalnim i kemorezistentnim oblikom BCC-a. Također ispituje se mogućnost njihove uporabe i u drugim vrstama tumora poput karcinoma gušterače ili meduloblastoma. Međutim, izvješća o štetnim događajima sugeriraju kako liječenje sa Smo inhibitorima nije održivo i dugoročno rješenje jer su potencijalno toksični i zahtjevaju oprezan i intenzivan nadzor. Tome doprinose i dokazi o razvitku rezistencije na spomenute lijekove. Inhibitori Hh signalnog puta nizvodno od Smo proteina daju obećavajuće rezultate, ali prije njihove uporabe u široj populaciji i kliničkoj praksi, potrebna su daljnja istraživanja.

Osim toga dokazana je interakcija između drugih signalnih puteva, poput Wnt, i Hh signalnog puta. Buduća istraživanja razjasnit će njihov doprinos u karcinogenezi i stvaranju rezistencije na terapiju što može rezultirati razvitkom novih, potentnijih i djelotvornijih lijekova u liječenju tumora.

6. ZAHVALE

Zahvaljujem se svojoj mentorici, prof. dr. sc. Ljiljani Šerman, dr. med. na podršci, pristupačnosti i ljubaznosti te na konstruktivnim savjetima i korekcijama tijekom pisanja ovog diplomskog rada.

Također, zahvaljujem svojoj obitelji i najbližim prijateljima na razumijevanju i podršci koju su mi pružali tijekom cijelog života, a naročito tijekom studija.

7. LITERATURA

1. Cooper GM, Hausman RE. cooper. In: Stanica. 3. 2004. p. 631–73.
2. Murone M, Rosenthal A, de Sauvage FJ. Hedgehog signal transduction: from flies to vertebrates. *Exp Cell Res.* 1999;253(1):25–33.
3. Varjosalo M, Taipale J. Hedgehog: Functions and mechanisms. *Genes Dev.* 2008;22(18):2454–72.
4. Le H, Kleinerman R, Lerman OZ, Brown D, Galiano R, Gurtner GC, et al. Hedgehog signaling is essential for normal wound healing. *Wound Repair Regen.* 2008;16(6):768–73.
5. Lowry WE, Richter L, Yachechko R, Pyle AD, Tchieu J, Sridharan R, et al. Generation of human induced pluripotent stem cells from dermal fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci.* 2008;105(8):2883–8.
6. Lewis MT, Veltmaat JM. Next top, the twilight zone: Hedgehog network regulation of mammary gland development. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 2004;9(2):165–81.
7. Zhou JX, Jia LW, Liu WM, Miao CL, Liu S, Cao YJ, et al. Role of sonic hedgehog in maintaining a pool of proliferating stem cells in the human fetal epidermis. *Hum Reprod.* 2006;21(7):1698–704.
8. Stecca B, Mas C, Clement V, Zbinden M, Correa R, Piguet V, et al. Melanomas require HEDGEHOG-GLI signaling regulated by interactions between GLI1 and the RAS-MEK/AKT pathways. *Proc Natl Acad Sci.* 2007;104(14):5895–900.
9. Detmer K, Thompson AJ, Garner RE, Walker AN, Gaffield W, Dannawi H. Hedgehog signaling and cell cycle control in differentiating erythroid progenitors. *Blood Cells Mol Dis.* 2005;34(1):60–70.
10. Watkins DN, Berman DM, Burkholder SG, Wang B, Beachy PA, Baylin SB. Hedgehog signalling within airway epithelial progenitors and in small-cell lung cancer. *Nature.* 2003;422(6929):313–7.
11. Beachy P a, Karhadkar SS, Berman DM. Tissue repair and stem cell renewal in

- carcinogenesis. *Nature*. 2004;432(7015):324–31.
12. Karhadkar SS, Bova GS, Abdallah N, Dhara S, Gardner D, Maitra A, et al. Hedgehog signalling in prostate regeneration, neoplasia and metastasis. *Nature*. 2004;431(7009):707–12.
 13. Fendrich V, Esni F, Garay MVR, Jensen JAN, Leach SD, Maitra A. NIH Public Access. *Gastroenterology*. 2009;135(2):621–31.
 14. Silva-Vargas V, Lo Celso C, Giangreco A, Ofstad T, Prowse DM, Braun KM, et al. B-Catenin and Hedgehog Signal Strength Can Specify Number and Location of Hair Follicles in Adult Epidermis Without Recruitment of Bulge Stem Cells. *Dev Cell*. 2005;9(1):121–31.
 15. Manuscript A, Ciliogenesis CC. NIH Public Access. *Cancer*. 2009;68(7):2058–61.
 16. Michaud EJ, Yoder BK. The primary cilium in cell signaling and cancer. *Cancer Res*. 2006;66(13):6463–7.
 17. Taipale J, Beachy PA. The Hedgehog and Wnt signalling pathways in cancer. *Nature* [Internet]. 2001;411(6835):349–54. Available from: [papers3://publication/doi/10.1038/35077219](https://doi.org/10.1038/35077219)
 18. Hahn H, Wicking C, Zaphiropoulos PG, Gailani MR, Shanley S, Chidambaram A, et al. Mutations of the human homolog of drosophila patched in the nevoid basal cell carcinoma syndrome. *Cell*. 1996;85(6):841–51.
 19. Cross SS, Bury JP. The Hedgehog signalling pathways in human pathology. *Curr Diagnostic Pathol*. 2004;10(2):157–68.
 20. Kasper M, Regl G, Frischauf AM, Aberger F. GLI transcription factors: Mediators of oncogenic Hedgehog signalling. *Eur J Cancer*. 2006;42(4):437–45.
 21. Corcoran RB, Scott MP. Oxysterols stimulate Sonic hedgehog signal transduction and proliferation of medulloblastoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(22):8408–13.

22. Pak E, Segal RA. Hedgehog Signal Transduction: Key Players, Oncogenic Drivers, and Cancer Therapy. *Dev Cell*. 2016;38(4):333–44.
23. Manuscript A, Signaling NH. NIH Public Access. 2012;1–15.
24. Manuscript A, Hedgehog T, Transduction S. NIH Public Access. *Sci Signal*. 2013;5(246):1–27.
25. Echelard Y, Epstein DJ, McMahon JA, McMahon AP. Sonic Hedgehog , a Member of a Family of Putative Signaling Molecules , Is Implicated in the Regulation of CNS Polarity. *Cell*. 1993;75:1417–30.
26. Krauss S, Concordet JP, Ingham PW. A functionally conserved homolog of the *Drosophila* segment polarity gene *hh* is expressed in tissues with polarizing activity in zebrafish embryos. *Cell*. 1993;75(7):1431–44.
27. Marigo V, Tabin CJ. Regulation of *patched* by sonic hedgehog in the developing neural tube. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(18):9346–51.
28. Pathi S, Pagan-Westphal S, Baker DP, Garber EA, Rayhorn P, Bumcrot D, et al. Comparative biological responses to human Sonic, Indian, and Desert hedgehog. *Mech Dev*. 2001;106(1–2):107–17.
29. Goodrich L V, Johnson RL, Milenkovic L, McMahon J a. Conservation of the hedgehog ~ patched . s gnaling pathway from flies to mice : reduction of a mouse *patched* gene by Hedgehog. *Genes Dev*. 1996;10:301–12.
30. Bellusci S, Furuta Y, Rush MG, Henderson R, Winnier G, Hogan BLM. Involvement of Sonic hedgehog (Shh) in mouse embryonic lung growth and morphogenesis. *Development*. 1997;124:53–63.
31. Hardcastle Z, Mo R, Hui CC, Sharpe PT. The Shh signalling pathway in tooth development: defects in *Gli2* and *Gli3* mutants. *Development*. 1998;125(15):2803–11.
32. Litingtung Y, Lei L, Westphal H, Chiang C. Sonic hedgehog is essential to foregut development. *Nat Genet*. 1998;20(september):58–61.
33. Vortkamp A, Lee K, Lanske B, Segre G V, Kronenberg HM, Tabint CJ. elat

- elated. 1996;273(August).
34. van den Brink GR, Bleuming SA, Hardwick JCH, Schepman BL, Offerhaus GJ, Keller JJ, et al. Indian Hedgehog is an antagonist of Wnt signaling in colonic epithelial cell differentiation. *Nat Genet.* 2004;36(3):277–82.
 35. Bitgood MJ, Shen L, McMahon P. Sertoli cell signaling by Desert hedgehog regulates the male germline. *Curr Biol.* 1996;6(3):298–304.
 36. Scott P. New players and puzzles in the Ronald L Johnson * and Matthew signaling pathway. :450–6.
 37. Mann RK, Beachy PA. Novel Lipid Modifications of Secreted Protein Signals. *Annu Rev Biochem.* 2004;73(1):891–923.
 38. Buglino JA, Resh MD. What is a palmitoyltransferase with specificity for N-palmitoylation of Sonic Hedgehog. *J Biol Chem.* 2008;283(32):22076–88.
 39. Zaphiropoulos PG, Und??n AB, Rahnema F, Hollingsworth RE, Toftg??rd R. PTCH2, a novel human patched gene, undergoing alternative splicing and up-regulated in basal cell carcinomas. *Cancer Res.* 1999;59(4):787–92.
 40. Gailani MR, Stähle-Bäckdahl M, Leffell DJ, Glynn M, Zaphiropoulos PG, Pressman C, et al. The role of the human homologue of Drosophila patched in sporadic basal cell carcinomas. *Nat Genet.* 1996;14:78–81.
 41. Johnson RL, Rothman AL, Xie J, Goodrich L V, Bare JW, Bonifas JM, et al. Human homolog of patched, a candidate gene for the basal cell nevus syndrome. *Science.* 1996;272(5268):1668–71.
 42. Hahn H, Christiansen J, Wicking C, Zaphiropoulos PG, Chidambaram A, Gerrard B, et al. A mammalian patched homolog is expressed in target tissues of sonic hedgehog and maps to a region associated with developmental abnormalities. *J Biol Chem.* 1996;271(21):12125–8.
 43. Smyth I, Narang MA, Evans T, Heimann C, Nakamura Y, Chenevix-Trench G, et al. Isolation and characterization of human Patched 2 (PTCH2), a putative tumour suppressor gene in basal cell carcinoma and medulloblastoma on chromosome 1p32. *Hum Mol Genet.* 1999;8(2):291–7.

44. Larsson NG, Wang J, Wilhelmsson H, Oldfors A, Rustin P, Lewandoski M, et al. 1998 Nature Publishing Group <http://www.nature.com/naturegenetics>. *Nat Genet.* 1998;18(3):231–6.
45. Ingham PW. Hedgehog signalling: How cholesterol modulates the signal. *Curr Biol.* 2000;10(5):180–3.
46. Chen Y, Struhl G. Dual roles for patched in sequestering and transducing Hedgehog. *Cell.* 1996;87(3):553–63.
47. Incardona JP, Lee JH, Robertson CP, Enga K, Kapur RP, Roelink H. Receptor-mediated endocytosis of soluble and membrane-tethered Sonic hedgehog by Patched-1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97(22):12044–9.
48. Yue S, Tang LY, Tang Y, Tang Y, Shen QH, Ding J, et al. Requirement of Smurf-mediated endocytosis of Patched1 in sonic hedgehog signal reception. *Elife.* 2014;3:1–24.
49. Fan H, Khavari PA. Sonic Hedgehog Opposes Epithelial Cell Cycle Arrest. *J Cell Biol.* 1999;147(1):71–6.
50. Duman-Scheel M, Weng L, Xin S, Du W. Hedgehog regulates cell growth and proliferation by inducing Cyclin D and Cyclin E. *Nature.* 2002;417(6886):299–304.
51. Beachy PA, Hymowitz SG, Lazarus RA, Leahy DJ, Siebold C. Interactions between Hedgehog proteins and their binding partners come into view. *Genes Dev.* 2010;24(18):2001–12.
52. Alcedo J, Ayzenzon M, Von Ohlen T, Noll M, Hooper JE. The *Drosophila* *smoothed* gene encodes a seven-pass membrane protein, a putative receptor for the hedgehog signal. *Cell.* 1996;86(2):221–32.
53. Peart JR, Lu R, Sadanandom A, Malcuit I, Moffett P, Brice DC, et al. Ubiquitin ligase-associated protein SGT1 is required for host and nonhost disease resistance in plants. *Proc Natl Acad Sci.* 2002;99(16):10865–9.
54. Bijlsma MF, Spek CA, Zivkovic D, Van De Water S, Rezaee F, Peppelenbosch MP. Repression of *smoothed* by patched-dependent (pro-)vitamin D3

- secretion. *PLoS Biol.* 2006;4(8):1397–410.
55. Myers BR, Sever N, Chong YC, Kim J, Belani JD, Rychnovsky S, et al. Hedgehog pathway modulation by multiple lipid binding sites on the smoothed effector of signal response. *Dev Cell.* 2013;26(4):346–57.
 56. Khaliullina H, Bilgin M, Sampaio JL, Shevchenko A, Eaton S. Endocannabinoids are conserved inhibitors of the Hedgehog pathway. *Proc Natl Acad Sci.* 2015;112(11):3415–20.
 57. Chen Y, Sasai N, Ma G, Yue T, Jia J, Briscoe J, et al. Sonic Hedgehog dependent Phosphorylation by CK1 α and GRK2 is required for Ciliary Accumulation and Activation of Smoothed. *PLoS Biol.* 2011;9(6).
 58. Ayers KL, Théron PP. Evaluating Smoothed as a G-protein-coupled receptor for Hedgehog signalling. *Trends Cell Biol.* 2010;20(5):287–98.
 59. Kinzler KW, Bigner SH, Bigner DD, Trent JM, Law ML, O'brien SJ, et al. Identification of an Amplified, Highly Expressed Gene in a Human Glioma.
 60. Dai P, Akimaru H, Tanaka Y, Maekawa T, Nakafuku M, Ishii S. Sonic hedgehog-induced activation of the Gli1 promoter is mediated by GLI3. *J Biol Chem.* 1999;274(12):8143–52.
 61. Sasaki H, Hui C, Nakafuku M, Kondoh H. A binding site for Gli proteins is essential for HNF-3 β floor plate enhancer activity in transgenics and can respond to Shh in vitro. *Development.* 1997;124(7):1313–22.
 62. Kinzler KW, Vogelstein B. The GLI gene encodes a nuclear protein which binds specific sequences in the human genome. *Mol Cell Biol.* 1990;10(2):634–42.
 63. Tanimura A, Dan S, Yoshida M. Cloning of Novel Isoforms of the Human Gli2 Oncogene and Their Activities To Enhance Tax-Dependent Transcription of the Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 Genome. *J Virol.* 1998;72(5):3958–64.
 64. Pan Y, Bai CB, Joyner AL, Wang B. Sonic hedgehog Signaling Regulates Gli2 Transcriptional Activity by Suppressing Its Processing and Degradation Sonic hedgehog Signaling Regulates Gli2 Transcriptional Activity by Suppressing Its Processing and Degradation †. *Mol Cell Biol.* 2006;26(9):3365–3377.

65. Pan Y, Wang C, Wang B. Phosphorylation of Gli2 by protein kinase A is required for Gli2 processing and degradation and the Sonic Hedgehog-regulated mouse development. *Dev Biol.* 2009;326(1):177–89.
66. Wang B, Li Y. Evidence for the direct involvement of β TrCP in Gli3 protein processing. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103(1):33–8.
67. Pan Y, Wang B. A novel protein-processing domain in Gli2 and Gli3 differentially blocks complete protein degradation by the proteasome. *J Biol Chem.* 2007;282(15):10846–52.
68. Atwood SX, Li M, Lee A, Tang JY, Oro AE. GLI activation by atypical protein kinase C α regulates the growth of basal cell carcinomas. *Nature.* 2013;494(7438):484–8.
69. Di Magno L, Basile A, Coni S, Manni S, Sdruscia G, D'Amico D, et al. The energy sensor AMPK regulates Hedgehog signaling in human cells through a unique Gli1 metabolic checkpoint. *Oncotarget.* 2016;7(8).
70. Jenkins D. Hedgehog signalling: Emerging evidence for non-canonical pathways. *Cell Signal.* 2009;21(7):1023–34.
71. Pearse R V, Collier LS, Scott MP, Tabin CJ. Vertebrate homologs of *Drosophila* suppressor of fused interact with the gli family of transcriptional regulators. *Dev Biol.* 1999;212(2):323–36.
72. Humke EW, Dorn K V., Milenkovic L, Scott MP, Rohatgi R. The output of Hedgehog signaling is controlled by the dynamic association between Suppressor of Fused and the Gli proteins. *Genes Dev.* 2010;24(7):670–82.
73. Chen M, Wilson CW, Li Y, Ruel L, Thérond PP, King K, et al. Cilium-independent regulation of Gli protein function by Sufu in Hedgehog signaling is evolutionarily conserved. *Cilium-independent regulation of Gli protein function by Sufu in Hedgehog signaling is evolutionarily conserved.* 2009;1910–28.
74. Cheng SY, Bishop JM. Suppressor of Fused represses Gli-mediated transcription by recruiting the SAP18-mSin3 corepressor complex. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(8):5442–7.

75. Cheung HO-L, Zhang X, Ribeiro A, Mo R, Makino S, Puvindran V, et al. The Kinesin Protein Kif7 Is a Critical Regulator of Gli Transcription Factors in Mammalian Hedgehog Signaling. *Sci Signal*. 2009;2(76):ra29-ra29.
76. Endoh-Yamagami S, Evangelista M, Wilson D, Wen X, Theunissen JW, Phamluong K, et al. The Mammalian Cos2 Homolog Kif7 Plays an Essential Role in Modulating Hh Signal Transduction during Development. *Curr Biol*. 2009;19(15):1320–6.
77. Liu YC, Couzens AL, Deshwar AR, McBroom-Cerajewski LD, Zhang X, Puvindran V, et al. The PPF1A1-PP2A protein complex promotes trafficking of Kif7 to the ciliary tip and Hedgehog signaling. *Sci Signal*. 2014;7(355):ra117.
78. He M, Subramanian R, Bangs F, Omelchenko T, Liem Jr KF, Kapoor TM, et al. The kinesin-4 protein Kif7 regulates mammalian Hedgehog signalling by organizing the cilium tip compartment. *Nat Cell Biol*. 2014;16(7):663–72.
79. Chen Y, Yue S, Xie L, Pu XH, Jin T, Cheng SY. Dual phosphorylation of suppressor of fused (Sufu) by PKA and GSK3 β regulates its stability and localization in the primary cilium. *J Biol Chem*. 2011;286(15):13502–11.
80. Eisner A, Pazyra-Murphy MF, Durresi E, Zhou P, Zhao X, Chadwick EC, et al. The Eya1 phosphatase promotes shh signaling during hindbrain development and oncogenesis. *Dev Cell*. 2015;33(1):22–36.
81. Regl G, Neill GW, Eichberger T, Kasper M, Ikram MS, Koller J, et al. Human GLI2 and GLI1 are part of a positive feedback mechanism in Basal Cell Carcinoma. *Oncogene*. 2002;21(36):5529–39.
82. Chuang PT, McMahon AP. Vertebrate Hedgehog signalling modulated by induction of a Hedgehog-binding protein. *Nature*. 1999;397(6720):617–21.
83. Bigelow RLH, Chari NS, Undén AB, Spurgers KB, Lee S, Roop DR, et al. Transcriptional Regulation of bcl-2 Mediated by the Sonic Hedgehog Signaling Pathway through gli-1. *J Biol Chem*. 2004;279(2):1197–205.
84. Oliver TG, Gräsfeder LL, Carroll AL, Kaiser C, Gillingham CL, Lin SM, et al. Transcriptional profiling of the Sonic hedgehog response: A critical role for N-

- myc in proliferation of neuronal precursors. *Proc Natl Acad Sci.* 2003;100(12):7331–6.
85. Zheng W, Thorne N, Mckew JC. *HHS Public Access.* 2015;18(0):1067–73.
 86. Bouldin CM, Harfe BD. Aberrant FGF signaling, independent of ectopic hedgehog signaling, initiates preaxial polydactyly in Dorking chickens. *Dev Biol.* 2009;334(1):133–41.
 87. Morrow D, Cullen JP, Liu W, Guha S, Sweeney C, Birney YA, et al. Sonic hedgehog induces notch target gene expression in vascular smooth muscle cells via VEGF-A. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2009;29(7):1112–8.
 88. Macdonald R, Barth K a, Xu Q, Holder N, Mikkola I, Wilson SW. Midline signalling is required for Pax gene regulation and patterning of the eyes. *Development.* 1995;121(10):3267–78.
 89. Teh M, Wong S, Neill GW, Ghali LR, Philpott MP, Quinn AG. FOXM1 Is a Downstream Target of Gli1 in Basal Cell Carcinomas FOXM1 Is a Downstream Target of Gli1 in Basal Cell Carcinomas 1. In 2002. p. 4773–80.
 90. Mullor JL, Dahmane N, Sun T, Altaba AR. Wnt signals are targets and mediators of Gli function. *Curr Biol.* 2001;11(10):769–73.
 91. Akiyoshi T. Gli1, downregulated in colorectal cancers, inhibits proliferation of colon cancer cells involving Wnt signalling activation. *Gut.* 2006;55(7):991–9.
 92. Katoh M, Katoh M. Notch ligand, JAG1, is evolutionarily conserved target of canonical WNT signaling pathway in progenitor cells. *Int J Mol Med.* 2006;17(4):681–5.
 93. Nozawa YI, Lin C, Chuang PT. Hedgehog signaling from the primary cilium to the nucleus: An emerging picture of ciliary localization, trafficking and transduction. *Curr Opin Genet Dev.* 2013;23(4):429–37.
 94. Goetz SC, Anderson K V. The primary cilium: a signalling centre during vertebrate development. *Nat Rev Genet.* 2010;11(5):331–44.
 95. Pusapati G V., Hughes CE, Dorn K V., Zhang D, Sugianto P, Aravind L, et al.

- EFCAB7 and IQCE Regulate Hedgehog Signaling by Tethering the EVC-EVC2 Complex to the Base of Primary Cilia. *Dev Cell*. 2014;28(5):483–96.
96. Pusapati G V, Rohatgi R. Location, location, and location: compartmentalization of Hedgehog signaling at primary cilia. *EMBO J*. 2014;33(17):1852–4.
 97. Chávez M, Ena S, Van Sande J, de Kerchove d'Exaerde A, Schurmans S, Schiffmann SN. Modulation of Ciliary Phosphoinositide Content Regulates Trafficking and Sonic Hedgehog Signaling Output. *Dev Cell*. 2015;34(3):338–50.
 98. Franco I, Gulluni F, Campa CC, Costa C, Margaria JP, Ciruolo E, et al. PI3K class II α controls spatially restricted endosomal PtdIns3P and Rab11 activation to promote primary cilium function. *Dev Cell*. 2014;28(6):647–58.
 99. Evangelista M, Tian H, De Sauvage FJ. The Hedgehog signaling pathway in cancer. *Clin Cancer Res*. 2006;12(20 PART 1):5924–8.
 100. Rubin LL, de Sauvage FJ. Targeting the Hedgehog pathway in cancer. *Nat Rev Drug Discov*. 2006;5(4):1026–33.
 101. Abidi A. Hedgehog signaling pathway: A novel target for cancer therapy: Vismodegib, a promising therapeutic option in treatment of basal cell carcinomas. 2014.
 102. Reifemberger J, Wolter M, Knobbe CB, Köhler B, Schönicke A, Scharwächter C, et al. Somatic mutations in the PTCH, SMOH, SUFUH and TP53 genes in sporadic basal cell carcinomas. *Br J Dermatol*. 2005;152(1):43–51.
 103. Stone DM, Hynes M, Armanini M, Swanson T a, Gu Q, Johnson RL, et al. The tumour-suppressor gene patched encodes a candidate receptor for Sonic hedgehog. *Nature*. 1996;384(6605):129–34.
 104. Saldanha G. The Hedgehog signalling pathway and cancer. *J Pathol*. 2001;193(4):427–32.
 105. The New England Journal of Medicine Downloaded from nejm.org at NEW YORK UNIVERSITY on March 5, 2013. For personal use only. No other uses

without permission. From the NEJM Archive. Copyright © 2010 Massachusetts Medical Society. All rights reserved. 2010;

106. Xie J, Aszterbaum M, Zhang X, Bonifas JM, Zachary C, Epstein E, et al. A role of PDGFRalpha in basal cell carcinoma proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(16):9255–9.
107. Athar M, Li C, Tang X, Chi S, Zhang X, Kim AL, et al. Inhibition of smoothed signaling prevents ultraviolet B-induced basal cell carcinomas through regulation of fas expression and apoptosis. *Cancer Res*. 2004;64(20):7545–52.
108. Taylor MD, Northcott PA, Korshunov A, Remke M, Cho YJ, Clifford SC, et al. Molecular subgroups of medulloblastoma: The current consensus. *Acta Neuropathol*. 2012;123(4):465–72.
109. Kool M, Jones DTW, Jørgen N, Northcott PA, Pugh TJ, Hovestadt V, et al. Genome sequencing of SHH medulloblastoma predicts genotype-related response to smoothed inhibition. *Cancer Cell*. 2014;25(3):393–405.
110. Wechsler-Reya RJ, Scott MP. Control of neuronal precursor proliferation in the cerebellum by sonic hedgehog. *Neuron*. 1999;22(1):103–14.
111. Hatton BA, Villavicencio EH, Tsuchiya KD, Pritchard JI, Ditzler S, Pullar B, et al. The Smo/Smo model: Hedgehog-induced medulloblastoma with 90% incidence and leptomeningeal spread. *Cancer Res*. 2008;68(6):1768–76.
112. Li ZJ, Mack SC, Mak TH, Angers S, Taylor MD, Hui C-C. Evasion of p53 and G2/M checkpoints are characteristic of Hh-driven basal cell carcinoma. *Oncogene*. 2014;33(20):2674–80.
113. Lee Y, Kawagoe R, Sasai K, Li Y, Russell HR, Curran T, et al. Loss of suppressor-of-fused function promotes tumorigenesis. *Oncogene*. 2007;26(44):6442–7.
114. Bonilla X, Parmentier L, King B, Bezrukov F, Kaya G, Zoete V, et al. Genomic analysis identifies new drivers and progression pathways in skin basal cell carcinoma. *Nat Genet*. 2016;48(4):398–406.
115. He X, Zhang L, Chen Y, Remke M, Shih D, Lu F, et al. The G protein α subunit

- Gas is a tumor suppressor in Sonic hedgehog-driven medulloblastoma. *Nat Med.* 2014;20(9):1035–42.
116. Iglesias-Bartolome R, Torres D, Marone R, Feng X, Martin D, Simaan M, et al. Inactivation of a Gas–PKA tumour suppressor pathway in skin stem cells initiates basal-cell carcinogenesis. *Nat Cell Biol.* 2015;17(6):793–803.
 117. Huh JY, Kwon MJ, Seo KY, Kim MK, Chae KY, Kim SH, et al. Novel nonsense GNAS mutation in a 14-month-old boy with plate-like osteoma cutis and medulloblastoma. *J Dermatol.* 2014;41(4):319–21.
 118. Zhukova N, Ramaswamy V, Remke M, Pfaff E, Shih DJH, Martin DC, et al. Subgroup-specific prognostic implications of TP53 mutation in medulloblastoma. *J Clin Oncol.* 2013;31(23):2927–35.
 119. Vořechovský I, Undén AB, Sandstedt B, Toftgård R, Ståhle-Bäckdahl M. Trichoepitheliomas contain somatic mutations in the overexpressed PTCH gene: Support for a gatekeeper mechanism in skin tumorigenesis. *Cancer Res.* 1997;57(21):4677–81.
 120. Maesawa C, Tamura G, Iwaya T, Ogasawara S, Ishida K, Sato N, et al. Mutations in the human homologue of the Drosophila patched gene in esophageal squamous cell carcinoma. *Genes Chromosomes Cancer.* 1998;21(3):276–9.
 121. McGarvey TW, Maruta Y, Tomaszewski JE, Linnenbach J, Malkowicz SB. PTCH gene mutations in invasive transitional cell carcinoma of the bladder. *Oncogene.* 1998;17(9):1167–72.
 122. Feldmann G, Dhara S, Fendrich V, Bedja D, Beaty R, Mullendore M, et al. Therapy in Solid Cancers. 2011;67(5):2187–96.
 123. Becher OJ, Hambarzumyan D, Fomchenko EI, Momota H, Mainwaring L, Bleau AM, et al. Gli activity correlates with tumor grade in platelet-derived growth factor-induced gliomas. *Cancer Res.* 2008;68(7):2241–9.
 124. Scales SJ, de Sauvage FJ. Mechanisms of Hedgehog pathway activation in cancer and implications for therapy. *Trends Pharmacol Sci.* 2009;30(6):303–

- 12.
125. Bailey JM, Mohr AM, Hollingsworth MA. NIH Public Access. 2010;28(40):3513–25.
126. Ma X, Sheng T, Zhang Y, Zhang X, He J, Huang S, et al. Hedgehog signaling is activated in subsets of esophageal cancers. *Int J Cancer*. 2006;118(1):139–48.
127. Sheng T, Li C, Zhang X, Chi S, He N, Chen K, et al. Activation of the hedgehog pathway in advanced prostate cancer. *Mol Cancer*. 2004;3:29.
128. Monzo M, Moreno I, Artells R, Ibeas R, Navarro A, Moreno J, et al. Sonic hedgehog mRNA expression by real-time quantitative PCR in normal and tumor tissues from colorectal cancer patients. *Cancer Lett*. 2006;233(1):117–23.
129. Douard R, Moutereau S, Pernet P, Chimingqi M, Allory Y, Manivet P, et al. Sonic Hedgehog-dependent proliferation in a series of patients with colorectal cancer. *Surgery*. 2006;139(5):665–70.
130. Berman DM, Karhadkar SS, Maitra A, Montes De Oca R, Gerstenblith MR, Briggs K, et al. Widespread requirement for Hedgehog ligand stimulation in growth of digestive tract tumours. *Nature*. 2003;425(6960):846–51.
131. Yauch RL, Gould SE, Scales SJ, Tang T, Tian H, Ahn CP, et al. A paracrine requirement for hedgehog signalling in cancer. *Nature*. 2008;455(7211):406–10.
132. Hegde G V, Peterson KJ, Emanuel K, Mittal AK, Joshi AD, Dickinson JD, et al. Hedgehog-induced survival of B-cell chronic lymphocytic leukemia cells in a stromal cell microenvironment: a potential new therapeutic target. *Mol Cancer Res*. 2008;6(12):1928–36.
133. Read T, Fogarty MP, Markant SL, Mclendon RE, Wei Z, Ellison DW, et al. NIH Public Access. *Cancer*. 2010;15(2):135–47.
134. Zhao C, Chen A, Jamieson CH, Fereshteh M, Abrahamsson A, Blum J, et al. Hedgehog signalling is essential for maintenance of cancer stem cells in

- myeloid leukaemia. *Nature*. 2009;460(7255):652–652.
135. Nicolis SK. Cancer stem cells and “stemness” genes in neuro-oncology. *Neurobiol Dis*. 2007;25(2):217–29.
 136. Peacock CD, Wang Q, Gesell GS, Corcoran-Schwartz IM, Jones E, Kim J, et al. Hedgehog signaling maintains a tumor stem cell compartment in multiple myeloma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(10):4048–53.
 137. Dembinski JL, Krauss S. Characterization and functional analysis of a slow cycling stem cell-like subpopulation in pancreas adenocarcinoma. *Clin Exp Metastasis*. 2009;26(7):611–23.
 138. Lou H, Dean M. Targeted therapy for cancer stem cells: the patched pathway and ABC transporters. *Oncogene*. 2007;26(9):1357–60.
 139. Cretnik M, Musani V, Oreskovic S, Leovic D, Levanat S. The Patched gene is epigenetically regulated in ovarian dermoids and fibromas, but not in basocellular carcinomas. *Int J Mol Med*. 2007;19(6):875–83.
 140. Wolf I, Bose S, Desmond JC, Lin BT, Williamson EA, Karlan BY, et al. Unmasking of epigenetically silenced genes reveals DNA promoter methylation and reduced expression of PTCH in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2007;105(2):139–55.
 141. Shi X, Zhang Z, Zhan X, Cao M, Satoh T, Akira S, et al. An epigenetic switch induced by Shh signalling regulates gene activation during development and medulloblastoma growth. *Nat Commun*. 2014;5(May):5425.
 142. Huang S, He J, Zhang X, Bian Y, Yang L, Xie G, et al. Activation of the hedgehog pathway in human hepatocellular carcinomas. *Carcinogenesis*. 2006;27(7):1334–40.
 143. Chen JK, Taipale J, Cooper MK, Beachy PA. Inhibition of Hedgehog signaling by direct binding of cyclopamine to Smoothed. *Genes Dev*. 2002;16(21):2743–8.
 144. McFerren MA. Useful plants of dermatology. VIII. The false hellebore (*Veratrum californicum*). *J Am Acad Dermatol*. 2006;54(4):718–20.

145. Yang L, Xie G, Fan Q, Xie J. Activation of the hedgehog-signaling pathway in human cancer and the clinical implications. *Oncogene*. 2010;29(4):469–81.
146. Low JA, De Sauvage FJ. Clinical experience with hedgehog pathway inhibitors. *J Clin Oncol*. 2010;28(36):5321–6.
147. Laouressergues E, Heusler P, Lestienne F, Troulier D, Rauly-Lestienne I, Tourette A, et al. Pharmacological evaluation of a series of smoothed antagonists in signaling pathways and after topical application in a depilated mouse model. *Pharmacol Res Perspect*. 2016;4(2):e00214.
148. Pan S, Wu X, Jiang J, Gao W, Wan Y, Cheng D, et al. Discovery of NVP-LDE225, a potent and selective smoothed antagonist. *ACS Med Chem Lett*. 2010;1(3):130–4.
149. Sharpe HJ, Wang W, Hannoush RN, de Sauvage FJ. Regulation of the oncoprotein Smoothed by small molecules. *Nat Chem Biol*. 2015;11(4):246–55.
150. Wang C, Wu H, Katritch V, Han GW, Huang X-P, Liu W, et al. Structure of the human smoothed receptor bound to an antitumour agent. *Nature* [Internet]. 2013;497(7449):338–43. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nature12167>
151. Danial C, Sarin KY, Oro AE, Chang ALS. An investigator-initiated open-label trial of sonidegib in advanced basal cell carcinoma patients resistant to vismodegib. *Clin Cancer Res*. 2016;22(6):1325–9.
152. Goel V, Hurh E, Stein A, Nedelman J, Zhou J, Chiparus O, et al. Population pharmacokinetics of sonidegib (LDE225), an oral inhibitor of hedgehog pathway signaling, in healthy subjects and in patients with advanced solid tumors. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2016;77(4):745–55.
153. Migden MR, Guminski A, Gutzmer R, Dirix L, Lewis KD, Combemale P, et al. Treatment with two different doses of sonidegib in patients with locally advanced or metastatic basal cell carcinoma (BOLT): A multicentre, randomised, double-blind phase 2 trial. *Lancet Oncol*. 2015;16(6):716–28.

154. Dummer R, Guminski A, Gutzmer R, Dirix L, Lewis KD, Combemale P, et al. The 12-month analysis from Basal Cell Carcinoma Outcomes with LDE225 Treatment (BOLT): A phase II, randomized, double-blind study of sonidegib in patients with advanced basal cell carcinoma. *J Am Acad Dermatol*. 2016;75(1):113–125.e5.
155. Basset-Seguin N, Sharpe HJ, de Sauvage FJ. Efficacy of Hedgehog Pathway Inhibitors in Basal Cell Carcinoma. *Mol Cancer Ther*. 2015;14(3):633–41.
156. Kim J, Aftab B, Tang J, Kim D, Lee A. Itraconazole and arsenic trioxide inhibit Hedgehog pathway activation and tumor growth associated with acquired resistance to smoothened antagonists. *Cancer Cell*. 2013;23(1):23–34.
157. Manuscript A, Nanostructures SPC. NIH Public Access. *Nano*. 2008;6(9):2166–71.
158. Kimura H, Stephen D, Joyner A, Curran T. Gli1 is important for medulloblastoma formation in *Ptc1*^{+/-} mice. *Oncogene*. 2005;24(25):4026–36.
159. Thiyagarajan S, Bhatia N, Reagan-Shaw S, Cozma D, Thomas-Tikhonenko A, Ahmad N, et al. Role of GLI2 transcription factor in growth and tumorigenicity of prostate cells. *Cancer Res*. 2007;67(22):10642–6.
160. Lauth M, Bergstrom A, Shimokawa T, Toftgard R. Inhibition of GLI-mediated transcription and tumor cell growth by small-molecule antagonists. *Proc Natl Acad Sci*. 2007;104(20):8455–60.
161. Hyman JM, Firestone AJ, Heine VM, Zhao Y, Ocasio C a, Han K, et al. Small-molecule inhibitors reveal multiple strategies for Hedgehog pathway blockade. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(33):14132–7.
162. Jain S, Song R, Xie J. Sonidegib : mechanism of action , pharmacology , and clinical utility for advanced basal cell carcinomas. 2017;1645–53.
163. Tang Y, Gholamin S, Schubert S, Willardson MI, Lee A, Bandopadhyay P, et al. Epigenetic targeting of Hedgehog pathway transcriptional output through BET bromodomain inhibition. *Nat Med*. 2014;20(7):732–40.
164. Bandopadhyay P, Bergthold G, Nguyen B, Schubert S, Gholamin S, Tang Y,

- et al. BET bromodomain inhibition of MYC-amplified medulloblastoma. *Clin Cancer Res.* 2014;20(4):912–25.
165. Ge X, Milenkovic L, Suyama K, Hartl T, Purzner T, Winans A, et al. Phosphodiesterase 4D acts downstream of Neuropilin to control Hedgehog signal transduction and the growth of medulloblastoma. *Elife.* 2015;4(September2015):1–20.
166. Mehta R, Katta H, Alimirah F, Patel R, Murillo G, Peng X, et al. Deguelin Action Involves c-Met and EGFR Signaling Pathways in Triple Negative Breast Cancer Cells. *PLoS One.* 2013;8(6).
167. Zheng W, Lu S, Cai H, Kang M, Qin W, Li C, et al. Deguelin inhibits proliferation and migration of human pancreatic cancer cells in vitro targeting hedgehog pathway. *Oncol Lett.* 2016;2761–5.
168. Hu J, Ye H, Fu A, Chen X, Wang Y, Chen X, et al. Deguelin-An inhibitor to tumor lymphangiogenesis and lymphatic metastasis by downregulation of vascular endothelial cell growth factor-D in lung tumor model. *Int J Cancer.* 2010;127(10):2455–66.
169. Li H, Kim JY, Hyeon J, Lee HJ, Ryu JH. In vitro antiinflammatory activity of a new sesquiterpene lactone isolated from *Siegesbeckia glabrescens*. *Phyther Res.* 2011;25(9):1323–7.
170. Cho YR, Choi SW, Seo DW. The in vitro antitumor activity of *Siegesbeckia glabrescens* against ovarian cancer through suppression of receptor tyrosine kinase expression and the signaling pathways. *Oncol Rep.* 2013;30(1):221–6.

8. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 10.12.1992. godine u Zagrebu. Završila sam Osnovnu školu Vladimira Nazora 2007. godine u Zagrebu te Osnovnu glazbenu školu Vatroslava Lisinskog 2006. godine. Maturirala sam 2011. godine u zagrebačkoj XV. Gimnaziji te iste godine upisala Medicinski fakultet u Zagrebu. Član sam Studentske sekcije za neuroznanost i radila sam kao demonstratorica na Katedri za fiziku i biofiziku 2 godine. Govorim engleski i njemački jezik.