

# Uloga proteina obitelji GLI u diferencijaciji stanica trofoblasta

---

Potkonjak, Anamarija

Master's thesis / Diplomski rad

2019

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:105:095106>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-09-26**



Repository / Repozitorij:

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



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Anamarija Potkonjak**

**Uloga proteina obitelji GLI u diferencijaciji  
stanica trofoblasta**

**DIPLOMSKI RAD**



**Zagreb, 2019.**

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Anamarija Potkonjak**

**Uloga proteina obitelji GLI u diferencijaciji  
stanica trofoblasta**

**DIPLOMSKI RAD**



**Zagreb, 2019.**

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 2018./2019.

## POPIS I OBJAŠNJENJE KRATICA

<b>BMP</b>	koštani morfogeni protein (engl. <i>Bone morphogenetic protein</i> )
<b>CCA</b>	koriokarcinom (engl. <i>Choriocarcinoma</i> )
<b>CDH1</b>	kadherin 1 (engl. <i>Cadherin-1</i> )
<b>Ci</b>	lat. <i>Cubitus interruptus</i>
<b>CK1</b>	kazein kinaza 1 (engl. <i>Casein kinase 1</i> )
<b>CSC</b>	matične stanice karcinoma (engl. <i>Cancer stem cells</i> )
<b>Cul1/β-TrCP</b>	engl. <i>Cullin 1/ beta-transducin repeats containing protein</i>
<b>Cul3/Spop</b>	engl. <i>Cullin 3 / speckle-type POZ protein</i>
<b>DHh</b>	engl. <i>Desert hedgehog</i>
<b>DM</b>	šećerna bolest (lat. <i>Diabetes mellitus</i> )
<b>EGFR</b>	receptor epidermalnog faktor rasta (engl. <i>Epidermal growth factor receptor</i> )
<b>EMT</b>	epitelno-mezenhimalna tranzicija (engl. <i>Epithelial-mesenchymal transition</i> )
<b>EOC</b>	epitelni karcinom jajnika (engl. <i>Epithelial ovarian carcinoma</i> )
<b>ETT</b>	epiteloidni trofoblastični tumor (engl. <i>Epitheloid trophoblastic tumour</i> )
<b>EVT</b>	ekstravilozni trofoblast (engl. <i>Extravillous trophoblast</i> )
<b>FGFR</b>	receptor faktora rasta fibroblasta (engl. <i>Fibroblast growth factor receptor</i> )
<b>GCM1</b>	transkripcijski faktor GCM1 (engl. <i>Glial cell missing1</i> )
<b>GCPS</b>	Greigova cefalopolisindiktalija (engl. <i>Greig cephalopolysyndactyly syndrome</i> )
<b>Gli</b>	engl. <i>Glioma-associated oncogene</i>
<b>GliA</b>	Gli aktivacijski oblik (engl. <i>Gli activation form</i> )
<b>GliFL</b>	engl. <i>Full-length Gli</i>
<b>GliR</b>	Gli represorski oblik (engl. <i>Gli repression form</i> )

<b>GSK3<math>\beta</math></b>	glikogen sintaza kinaza -3 beta (engl. <i>Glycogen synthase kinase -3-beta</i> )
<b>GTD</b>	gestacijska trofoblastična boleť (engl. <i>Gestational trophoblastic disease</i> )
<b>hCG</b>	korionski gonadotropin (engl. <i>Korion gonadotropin</i> )
<b>Hh</b>	engl. <i>Hedgehog</i>
<b>HM</b>	hidatidozna mola (engl. <i>Hydatidiform mole</i> )
<b>IHh</b>	engl. <i>Indian hedgehog</i>
<b>IL-6</b>	interleukin 6 (engl. <i>Interleukin-6</i> )
<b>IM</b>	invazivna mola (engl. <i>Invasive mole</i> )
<b>INSL3</b>	inzulinu sličan faktor 3 (engl. <i>Insulin-like factor 3</i> )
<b>Kif7</b>	engl. <i>Kinesine-like protein 7</i>
<b>MAPK</b>	proteinska kinaza aktivirana mitogenom (engl. <i>Mitogen-activated protein kinase</i> )
<b>NPH</b>	nefronoftiza (engl. <i>Nephronophthisis</i> )
<b>PC</b>	primarna cilija (engl. <i>Primary cilium</i> )
<b>PHS</b>	Pallister – Hall sindrom (engl. <i>Pallister-Hall syndrome</i> )
<b>PKA</b>	protein kinaza A (engl. <i>Protein kinase A</i> )
<b>PKD</b>	policistična boleť bubrega (engl. <i>Polycystic kidney disease</i> )
<b>PSST</b>	trofoblastični tumor ležišta posteljice (engl. <i>Placental site trophoblastic tumour</i> )
<b>Ptch</b>	protein Ptch (engl. <i>Patched</i> )
<b>PY</b>	prolin-tirozin (engl. <i>Proline-tyrosine</i> )
<b>Runx2</b>	transkripcijski faktor Runx2 (engl. <i>Runt-related transcription factor 2</i> )
<b>SF1</b>	steroidogeni faktor 1 (engl. <i>Steroidogenic factor 1</i> )
<b>SHh</b>	engl. <i>Sonic hedgehog</i>
<b>Smo</b>	engl. <i>Smoothened</i>

<b>Sox2</b>	gen koji kodira za transkripcijski faktor Sox2 (engl. <i>Sex determining region Y-box 2</i> )
<b>STBs</b>	stanice sinciotrofoblasta (engl. <i>Syncytiotrophoblast cells</i> )
<b>Sufu</b>	supresor fuzijskog proteina (engl. <i>Suppressed fusion protein</i> )
<b>TGFβ</b>	transformirajući faktor rasta betae (engl. <i>Transforming growth factor beta</i> )
<b>TSCs</b>	matične stanice trofoblasta (engl. <i>Trophoblast stem cells</i> )
<b>VT</b>	vilozni trofoblast (engl. <i>Villous trophoblast</i> )
<b>ZF</b>	DNA vezujuća domena s motivom cinkovih prstiju (engl. <i>Zinc-finger domain</i> )
<b>ZPA</b>	zona polarizacijske aktivnosti (engl. <i>Zone of polarizing activity</i> )

## SADRŽAJ

SAŽETAK.....	
SUMMARY .....	
1. GLI proteini kao akteri <i>Hedgehog</i> signalnog puta .....	1
1.1. <i>Hedgehog</i> signalni put .....	1
1.2 Proteini obitelji <i>Hedgehog</i> (Hh) .....	1
1.3 GLI proteini (engl. <i>glioma – associated oncogene</i> ) .....	2
1.4 Uloga obitelji proteina GLI u signalnom putu <i>Hedgehog</i> (Hh).....	6
2. Uloga proteina GLI u diferencijaciji stanica trofoblasta .....	8
2.1 GLI1 i GLI2 kao akteri epitelno-mezenhimalne tranzicije (EMT) .....	9
2.2 Kompleks GLI2-GCMA.....	10
2.3 GLI proteini u embrionalnom razvoju.....	11
3. Bolesti povezane s abnormalnom aktivacijom Gli proteina.....	14
3.1 Greigova cefalopolisindaktilija (GCPS).....	14
3.2 Pallister – Hall sindrom (PHS) .....	15
3.3 Policistična bolest bubrega (PKD) i nefronoftiza.....	16
3.4 Šećerna bolest (DM).....	16
3.5 Kongenitalna hipotireoza.....	16
4. Uloga proteina GLI u reprodukciji.....	17
5. Važnost GLI obitelji u razvoju, ranoj dijagnostici i liječenju reproduktivnih karcinoma ...	18
5.1 Karcinogeneza i GLI .....	18
5.2 Karcinom dojke .....	18
5.3 Karcinom jajnika .....	19
5.4 Inhibitori transkripcijskih faktora .....	20
5.5 Gestacijska trofoblastična bolest (engl. Gestational trophoblastic disease ; GTD).....	21
6. ZAKLJUČAK .....	23
7. ZAHVALE .....	24
8. LITERATURA.....	25
9. ŽIVOTOPIS .....	40



## SAŽETAK

### Uloga proteina obitelji GLI u diferencijaciji stanica trofoblasta

Anamarija Potkonjak

GLI proteini sudionici su evolucijski konzerviranog *Hedgehog* (Hh) signalnog puta koji tijekom embrionalnog razvoja ima ključnu ulogu u proliferaciji i diferencijaciji stanica te morfogenezi određenih tkiva i organa. *Hh* signalni put aktivira se vezanjem Hh liganada za PTCH transmembranski receptor pri čemu se aktivira SMO te dolazi do povećane aktivnosti GLI transkripcijskih faktora koji potiču transkripciju ciljnih gena. Kod ljudi su pronađene tri izoforme GLI proteina GLI1, GLI2 i GLI3 koji zbog razlika u građi nemaju jednaku funkciju.

GLI proteini sudjeluju u diferencijaciji trofoblasta tijekom razvoja posteljice pri čemu se matične pluripotentne stanice trofoblasta diferenciraju u stanice citotrofoblasta koje su ključne u nastanku dvaju slojeva posteljice, nemigrirajućeg viloznog trofoblasta građenog od stanica sinciotrofoblasta i invazivnog ekstraviloznog trofoblasta građenog od stanica citotrofoblasta. Ova dva sloja posteljice razlikuju se po svojim funkcijama. Ako dođe do poremećene aktivacije *Hh* signalnog puta i ometanja normalne signalne kaskade pa samim time i aberantne ekspresije GLI proteina, može doći do poremećaja u diferencijaciji trofoblasta što vodi razvoju raznih bolesti kao što su hidatiformna mola, invazivna mola, koriokarcinom, trofoblastični tumor ležišta posteljice i epiteloidni trofoblastični tumor. Navedene bolesti obilježene su abnormalnom proliferacijom trofoblasta te zajedno čine skup patoloških stanja posteljice zvan gestacijska trofoblastična bolest. Povezanost aberantne ekspresije GLI proteina s razvojem bolesti ukazuje na važnost pravilne regulacije ovih transkripcijskih faktora tijekom diferencijacije trofoblasta i normalnog razvoja posteljice.

**Ključne riječi :** GLI proteini, diferencijacija trofoblasta

## **SUMMARY**

### **The role of GLI protein family of trophoblast cell differentiation**

**Anamarija Potkonjak**

GLI proteins are participants of the evolutionary conserved *Hedgehog (Hh)* signaling pathway, which plays a key role in the proliferation and differentiation of cells and morphogenesis of particular tissues and organs. *Hh* signaling pathways activate by binding of Hh ligands to the PTCH transmembranous receptor. In this process SMO activates and that leads to an increased activity of the GLI transcription factors, which support the transcription of target genes. There are three isoforms of the GLI proteins in people GLI1, GLI2, GLI3, which do not have the same function because of the difference in structure.

GLI proteins participate in the differentiation of trophoblasts in the development of the placenta. The stem cells of the trophoblast differentiate into cytotrophoblast cells (which play a key role in the creation of the two layers of the placenta), non-migratory villous trophoblast (built of syncytiotrophoblast cells) and an invasive extravillous trophoblast (built of cytotrophoblast cells). These two layers of the placenta differentiate in functions. If a disrupted activation of the Hh signaling pathway and disruption of a normal signaling cascade (and therefore even an aberrant expression of GLI proteins) occurs, a disruption in differentiation of the trophoblasts that leads to different diseases (such as hydatidiform mole, invasive mole, choriocarcinoma, placental site trophoblastic tumour and epitheloid trophoblastic tumour) may occur. The mentioned diseases are characterised by abnormal proliferation of trophoblasts and together make up a group of pathological conditions known as gestational trophoblastic diseases. The connection of the aberrant expression of the GLI proteins along with the development of diseases shows the importance of a standard regulation of transcription factors during the differentiation of trophoblasts and a normal development of the placenta.

**Key words :** GLI proteins, differentiation of trophoblasts

## 1. GLI proteini kao akteri *Hedgehog* signalnog puta

### 1.1. *Hedgehog* signalni put

*Hedgehog* (Hh) signalni put otkriven je u drugoj polovici 20. stoljeća, proučavanjem vinske mušice (lat. *Drosophila melanogaster*) (1), a naziva se još i *Hedgehog-Patched* (Hh-Ptch), *Hedgehog-Gli* (Hh-Gli) i *Hedgehog-Patched-Smoothened* (Hh-Ptch-Smo) signalni put (2). Podrijetlo imena signalnog puta *Hedgehog* rezultat je istraživanja ličinke vinske mušice, u koje je mutiran istoimeni gen, te je zbog same mutacije došlo do fenotipskih promjena u vidu kratkih šiljastih izdanaka na kutikuli ličinke koje su podsjećale na ježa (engl. *Hedgehog*) (3, 4, 5, 6).

*Hh* signalni put predstavlja evolucijski visoko očuvanu signalnu kaskadu koja se proteže od stanične membrane do jezgre i koja je iznimno značajna u embrionalnom razvoju, kako beskralježnjaka, tako i kralježnjaka (1). Tijekom embrionalnog razvoja *Hh* signalni put ima ključnu ulogu u morfogenezi organa i kontroli rasta regulacijom stanične diferencijacije, proliferacije i migracije (7,8). U slučaju da tijekom embrionalnog razvoja, dođe do aberantne aktivnosti *Hh* signalnog puta, mogu se razviti intrauterine malformacije ploda (9). U stanicama odraslog organizma signalni put je inaktivan ili slabo aktivan pa njegovu aktivnost možemo zamijetiti samo u somatskim tkivima poput kostiju i kože, gdje utječe na homeostazu i regeneraciju stanica. Aktivacija ovog signalnog puta u stanicama odraslog organizma često može ukazati na razvoj karcinoma (10). U ostalim tkivima, *Hh* signalni put može biti aktivan samo u primarnim cilijama (PC) koje su zaslužne za prijem mehaničkih, termičkih i kemijskih signala (11).

*Hh* signalni put komunicira s još nekoliko signalnih puteva u koje su uključeni proteini poput koštanih morfogenih proteina (engl. *bone morphogenetic proteins*; BMPs) (12), paratirodinih hormona (13) i retinoida (14).

### 1.2 Proteini obitelji *Hedgehog* (Hh)

Proteini obitelji *Hedgehog* pronađeni su u mnogim vrstama od meduze do čovjeka. Dok u vinskoj mušici postoji samo jedan gen *Hh*, u ljudi nalazimo njegova tri homologa : *Sonic Hh* (*SHH*), *Desert Hh* (*DHH*), i *Indian Hh* (*IHH*) .

Od navedenih homolognih gena, u čovjeka je najviše proučavan *SHH* koji je uključen u razvoj različitih organa tijekom embriogeneze. Gen *SHH* kontrolira razvoj središnjeg živčanog sustava (15-17), udova (18), crijeva (19), pluća (20) i folikula dlake (21). *SHH* odnosno njegov proteinski produkt SHH sudjeluje i u regulaciji desno-lijeve asimetrije (22).

S druge strane, protein IHH je eksprimiran u hondrocitima gdje je ključan za morfogenezu kostiju. Također, nužan je i u regulaciji embrionalnog razvoja gastrointestinalnog sustava (23) i mliječne žlijezde (24).

Protein DHH je najčešće izražen u Sertollijevim stanicama testisa gdje je ključan za diferencijaciju spolnih stanica (25). Od svih homolognih gena, *DHH* ima najviše sličnosti s genom *Hh* koji se nalazi u *D. Melanogaster*.

Hh proteini prolaze proces sazrijevanja, posttranslacijskom modifikacijom njihovih perkusora u endoplazmatskom retikulumu, nakon čega Hh proteini djeluju autokrino (na stanice koje su ih izlučile) ili parakrino (na bliže ili udaljenije stanice) (26).

Svi Hh proteini nakon posttranslacijske modifikacije građeni su od N-terminalne "Hedge" domene i C-terminalne "Hog" domene, od kojih je N domena palmitilirana, a C domena kovalentno vezana za kolesterol. Takva dualna lipidacija nužna je za aktivnost Hh proteina, ali i za njihovu hidrofobnost, svojstvo koje im omogućuje zadržavanje u staničnoj membrani (27).

### **1.3 GLI proteini (engl. *glioma – associated oncogene*)**

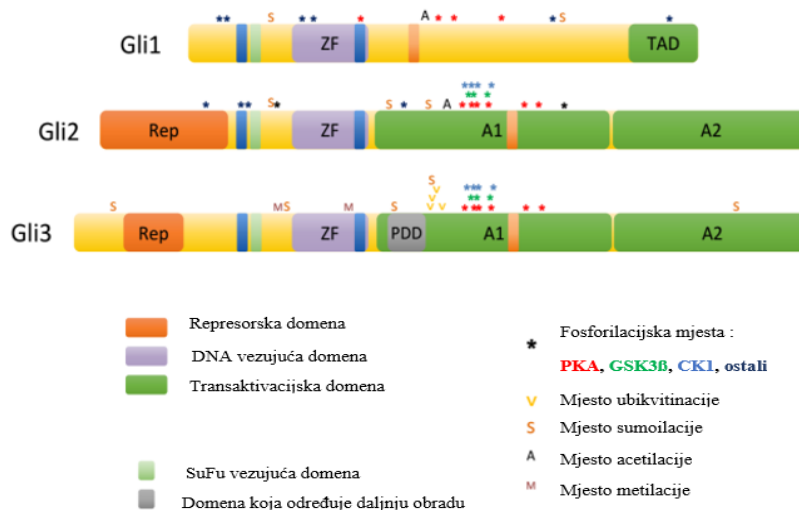
Obitelj GLI proteina pripada obitelji transkripcijskih faktora GLI-*Kruppel*. Proteini GLI obitelji razlikuju se od obitelji proteina *Kruppel* prema tome što sadrže visoko konzervirani slijed motiva C2-H2 cinkovih prstiju između kojih se nalaze sekvence histidin - cistein. S obzirom na to da GLI proteini sudjeluju u *Hh* signalnom putu, važni su za embriogenezu i homeostazu. (28)

Ova skupina proteina naziv je dobila prema glioblastomu, iz kojeg je prvi član obitelji GLI1 prvi put izoliran. Dok u vinskoj mušici postoji samo jedan transkripcijski faktor *Cubitus interruptus* (kodiran genom *Ci*) koji djeluje i kao aktivator i kao represor, u kralježnjaka pa tako i u čovjeka nalazimo tri transkripcijska faktora GLI1, GLI2 i GLI3 koji se razlikuju prema svojim funkcijama. (28)

Kako je već navedeno, GLI proteini pripadaju obitelji transkripcijskih faktora *GLI-Kruppel* koji imaju motiv cinkovih prstiju (engl. *Zing-finger domain*; ZF) C2-H2 kojim se vežu na molekulu DNA.

ZF domena GLI1/2/3 prepoznaje DNA sekvencu GACCACCCA u promotorima ciljanih gena. Nalazi se u središnjem dijelu GLI proteina, dok je N- terminalni kraj uzvodno, a C-terminalni kraj nizvodno od same ZF domene. GLI proteini, iako međusobno slično građeni, razlikuju se prema svojim biokemijskim svojstvima i imaju različite funkcije. Budući da je ZF domena visoko evolucijski konzervirana, funkcija pojedinog GLI proteina ovisi o duljini i građi njihovih N- terminalnih i C- terminalnih domena (29) (Slika 1).

1.



**Slika 1.** Prikaz građe GLI1/2/3 proteina. ZF domena nalazi se u središnjem dijelu, dok je N-terminalni kraj uzvodno, a C-terminalni kraj nizvodno od ZF domene. Preuzeto iz (29).

GLI2 i GLI3 sadrže N-terminalnu represorsku domenu. Nizvodno od te represorske domene, sva tri GLI proteina imaju visoko konzerviranu, prolin-tirozin (PY) domenu, koja je dio nuklearnog lokalizacijskog signala, a ujedno vezno mjesto za protein SuFu i fosforilaciju (30). Nizvodni dio proteina prema C-terminalnom kraju ima domenu koja određuje smjer daljnje obrade (engl. *processing determinant domain*; PDD) (31).

Sastav PDD određuje hoće li u proteosomu doći do proteolitičkog procesa GLI proteina u okrnjene represore (GLI3) ili potpune razgradnje (GLI1, GLI2). Fosforilacijski klaster koji sadrži konzervirana fosforilacijska mjesta (P1-6 kod GLI2 i GLI3, djelomično konzervirana u Gli1) (32) i fosforilacijska mjesta za GSK3 $\beta$  (engl. *Glycogen synthase kinase 3 beta*) i CK1 (engl. *Casein kinase 1*) nalazi se nizvodno od PDD. Fosforilacija navedenog klastera negativno djeluje na transkripcijsku aktivnost proteina GLI1 i GLI2, a potiče stvaranje GLI3 represora (GLI3R) kroz proteolitičke procese u proteosomu. Područje proteina koje je sastavljeno od PDD i fosforilacijskog klastera nazivamo domenom A1 i ona je ključna za poticanje transkripcijske aktivnosti. No, A1 domena ne može samostalno potaknuti transkripciju, već to postiže zajedno s domenom A2 koja se nalazi nizvodno. Obje domene su visoko konzervirane u GLI2 i GLI3 proteinima (33).

Sastav i redoslijed domena GLI proteina određuje njihovu funkciju. Budući da GLI1 protein ne sadrži represorsku domenu, djeluje samo kao transkripcijski aktivator. GLI3 sadrži aktivnu PDD i zato dolazi do razgradnje njegovog C-terminalnog kraja i nastaje okrnjeni GLI3R kojemu nedostaje aktivacijska domena sastavljena od A1 i A2, a posjeduje samo represorsku domenu zbog čega djeluje kao transkripcijski represor. GLI2 sadrži i represorsku i aktivacijsku domenu, ali u većini slučajeva dovodi do transkripcijske aktivnosti ciljanih gena jer je prelazak iz GLI2 u GLI2R neefikasan, budući da se većina GLI2R u potpunosti razgradi u proteosomu, što nije slučaj s GLI3R koji se u proteosomu ne razgrađuju potpuno, već nastaju djelomično okrnjeni GLI3R proteini (34).

Bitno je naglasiti da GLI1 većinom nije izražen, već je njegova aktivnost posljedica stimulacije *Hh* signalnog puta preko GLI2 i GLI3. Stoga je u kanonskom *Hh* signalnom putu transkripcijska aktivnost određena balansom između GLI2 aktivatora (GLI2A) i GLI3 represora (GLI3R). Međutim, GLI1 može biti potaknut i nekanonskim putevima preko ostalih signalnih puteva koji ne uključuju *Hh* signalni put. Takva stimulacija se često događa u patološkim stanjima, primjerice kod karcinogeneze (34).

Put prijenosa GLI proteina u stanici, njihova aktivnost i u konačnici aktivnost samog *Hh* signalnog puta čiji su akteri GLI1/2/3 proteini ovisi o postranslacijskim modifikacijama GLI proteina, a to su: fosforilacija, ubikvitinacija/proteosomalna razgradnja, acetilacija, sumoilacija, metilacija i O-GlcNAcilacija.

### ***Fosforilacija***

U odsutnosti liganada *Hh* signalnog puta, fosforilacija predstavlja ključnu inhibitornu posttranslacijsku modifikaciju Gli proteina. Odvija se fosforilacijom P1-6 mjesta fosforilacije unutar fosforilacijskog klastera (35).

Nakon što protein kinaza A (PKA) fosforilira klaster proteina GLI2 i GLI3, slijedi fosforilacija enzimima CK1 i GSK3- $\beta$  (36). Navedene fosforilacije ključne su za formiranje GLIR proteina poticanjem ubikvitinacije u proteosomu putem Cul1/ $\beta$ -TrCP proteina (engl. Cullin 1/ beta-transducin repeats containing proteins). Tijekom proteosomske ubikvitinacije, u slučaju fosforiliranog GLI2R dolazi do potpune razgradnje, dok u slučaju fosforiliranog GLI3R dolazi do djelomične razgradnje i nastanka aktivnog represorskog oblika (37).

S druge strane, kada dođe do vezanja liganada i posljedično do aktivnosti *Hh* signalnog puta, dolazi do defosforilacije GLI proteina, odnosno do povećanja koncentracije GLI2A i pojačane transkripcijske aktivnosti. Uzimajući u obzir navedeno, može se zaključiti da GLI2 većinom djeluje kao aktivator, a ne represor (38). GLI1 također posjeduje mjesta podložna fosforilaciji ( S544 i S560 ) enzimom PKA koja sastavom nalikuju P1-2 sekvenci fosforilacijskog klastera GLI2 i GLI3, međutim GLI1 ne podliježe o PKA ovisnoj konverziji u GLI1R (39).

Dakle, enzim PKA sudjeluje u skraćivanju GLI1, GLI2 i GLI3 proteina pune duljine te pripremi GLI2 i GLI3 za ubikvitinaciju i stvaranje GLIR oblika.

### ***Ubikvitinacija***

Ključnu ulogu u razgradnji punog oblika proteina GLIA u formiranju GLIR ima ubikvitinacija u proteosomu. Kompleksi E3 ligaza zaslužni za ubikvitinaciju su : Cul1/ $\beta$ -TrCP i Cul3/Spop (engl. *Cullin 3/speckle-type POZ protein*).

Kompleks Cul1/ $\beta$ -TrCP reagira s GLI2 i GLI3 nakon njihove fosforilacije koja je rezultat djelovanja enzima PKA, GSK3 $\beta$  i CK1.

Tijekom ubikvitinacije fosforiliranog GLI3, dolazi do njegove djelomične razgradnje i nastanka Gli3R. Što se tiče GLI1 i GLI2, oni su najčešće potpuno razgrađeni. Tako je održana negativna aktivnost Hh signalnog puta ako nema vezanih liganada (40).

S druge strane, E3 kompleks Cul3/Spop je zaslužan za razgradnju aktivnog oblika proteina GLI (GLIA). Cul3/Spop reagira s GLI1A, GLI2A i GLI3R, tako da snizuje razinu GLI1A i GLI2A te istovremeno povisuje razine GLI3R (41).

#### **1.4 Uloga obitelji proteina GLI u signalnom putu *Hedgehog* (Hh)**

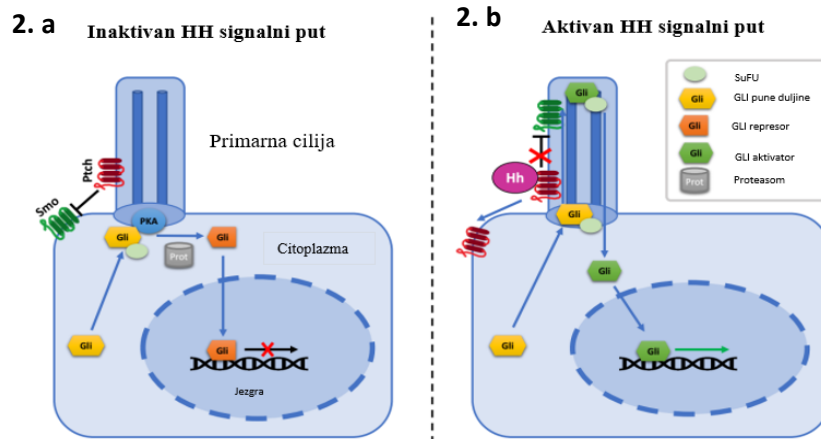
U *Hh* signalnom putu, dva transmembranska proteina ključna su za prijenos signala, a to su protein *Patched* (PTCH1) i protein *Smoothed* (SMO) (42). SMO potiče transkripcijsku aktivnost GLI proteina ako ga PTCH1 ne inhibira. Kako je već rečeno, GLI1 djeluje kao aktivator i potiče transkripciju promotora ciljnih gena, dok GLI2 i GLI3 djeluju podjednako kao aktivatori i represori (43).

U neaktivnoj fazi *Hh* signalnog puta, PTCH1 inhibira aktivnost proteina SMO te posljedično dovodi do djelomičnog ili potpunog okrnjenja GLI2 i GLI3 u proteosomu i stvaranja GLI2R i GLI3R koji djeluju kao represori ciljnih gena. U ovoj fazi, pored stvaranja GLI2R i GLI3R, ključan je supresor fuzijskog proteina (SuFu) koji povezuje protein SMO i GLI transkripcijske faktore. SuFu zadržava GLIFL inaktivnim sekvestracijom (odvajanjem od ostatka citoplazme) te tako sprječava njegovu nuklearnu translokaciju. S druge SuFu potiče fosforilaciju i preradu GLIFL u GLIR te na taj način održava aktivnost transkripcijskih korepresora (44). Pored djelovanja SuFu u citoplazmi, ovaj protein djeluje i u jezgri gdje koči aktivnost GLIA te posljedično transkripciju ciljnih gena (45).

Ukoliko dođe do vezanja *Hh* proteina za PTCH1, potonji više ne inhibira SMO koji sada blokira proteolitičku razgradnju Gli proteina u proteosomu i potiče njihovu disocijaciju od SuFu. GLIFL podliježu posttranslacijskim modifikacijama čime dolazi do stvaranja GLIA koji se zatim translociraju u jezgri gdje potiče transkripciju ciljnih gena (46) (Slika 2.) .



Glavne komponente *Hh* signalnog puta u stanicama sisavaca, smještene su u primarnoj ciliji (PC) organeli građenoj od mikrotubula. PTCH1 i SMO smještene su na membrani PC-a. Nakon vezanja *Hh* proteina, PTCH1 izlazi iz baze PC-a, dok se SMO nakuplja u ciliji. Nakupljanje SMO omogućava ulazak proteina SuFu i GLI u PC (47). PC je važna kako za uzvodni dio *Hh* signalnog puta preko PTCH1 i SMO, tako i za nizvodni dio *Hh* signalnog puta gdje sudjeluje u preradi GLI proteina bilo u GLIA ili GLIR.



**Slika 2.** Prikaz aktivacije *Hh* signalnog puta. (a) U neaktivnoj fazi *Hh* signalnog puta, PTCH1 inhibira aktivnost proteina SMO te posljedično dovodi do djelomičnog ili potpunog okrnjenja GLI2 i GLI3 u proteosomu i stvaranja GLI2R i GLI3R koji djeluju kao represori ciljnih gena. U ovoj fazi, pored stvaranja GLIR i GLI3R, ključan je supresor fuzijskog proteina (SuFu) koji povezuje protein SMO i GLI transkripcijske faktore. (b) Ako dođe do vezanja *Hh* proteina za PTCH1, potonji više ne inhibira SMO koji sada blokira proteolitičku razgradnju Gli proteina u proteosomu i potiče njihovu disocijaciju od SuFu. GLIFL podliježu posttranslacijskim modifikacijama čime dolazi do stvaranja GLIA koji se zatim translociraju u jezgru gdje potiče transkripciju ciljanih gena. PTCH1 (engl. *Patched1*), SMO (engl. *Smoothened*), SuFu (supresor fuzijskog proteina, engl. *Suppressed fusion protein*), GLIFL (engl. *Full-length Gli*), GLIA (GLI aktivacijski oblik, engl. *Gli activation form*), GLIR (Gli represorski oblik, engl. *Gli repression form*). Preuzeto iz (46).

## 2. Uloga proteina GLI u diferencijaciji stanica trofoblasta

Placenta ima vrlo važnu ulogu u trudnoći i ključna je za normalan fetalan rast i razvoj. Po strukturi je hemokorionska, što znači da je trofoblast u izravnom kontaktu s majčinom krvi. Pored uloge prijenosnika, placenta izlučuje i hormone nužne za održavanje trudnoće. Pri kraju prvog tjedna intrauterinog razvoja nastaje blastocista koja se sastoji od dviju različitih vrsta stanica : trofoblasta (vanjske epitelne stijenke blastociste) iz kojeg će se razviti fetalni dio placente i embrioblasta (unutrašnje nakupine stanica) iz kojega će se razviti embrionalne strukture i ekstraembrionalne ovojnice. Nakon što se šestog dana razvoja blastocista embrionalnim polom priljubi uz epitel endometrija kako bi se implantirala, sedmog dana dolazi do diferencijacije trofoblasta (48).

Prilikom diferencijacije trofoblasta, iz matičnih pluripotentnih stanica trofoblasta (TSCs) diferenciraju se stanice citotrofoblasta (CTB) koje su ključne u nastanku dvaju slojeva posteljice, a to su : nemigrirajući vilozni trofoblast (VT) građen od stanica sinciciotrofoblasta i invazivni ekstravilozni trofoblast (EVT) koji je građen od stanica citotrofoblasta. Ova dva sloja posteljice razlikuju se prema svojim funkcijama (49).

Zadaća stanica EVT-a je prodiranje i implantacija u stromu maternice, dok je zadaća stanica VT-a sudjelovanje u izmjeni tvari i proizvodnji hormona (50). Ekstravilozni trofoblast zbog svoje invazivne funkcije dalje se diferencira u intersticijski trofoblast i endovaskularni trofoblast odgovoran za invaziju u spiralne arterije majke (152).

## 2.1 GLI1 i GLI2 kao akteri epitelno-mezenhimalne tranzicije (EMT)

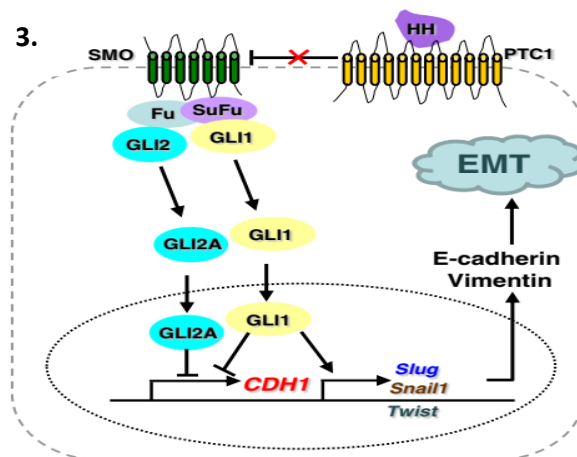
Epitelno-mezenhimalna tranzicija (EMT) predstavlja preobrazbu epitelnih stanica u stanice mezenhimalnog fenotipa pri čemu gube svojstva polarnosti i adhezivnosti, a poprimaju svojstvo povećane mobilnosti. Ovakva preobrazba stanica odvija se u različitim tkivima i organima, pa tako i u trofoblastu tijekom embrionalnog razvoja (51).

Tijekom placentacije, EVT invadira endometriju gdje dolazi u interakciju s decidualnim i imunokompetentnim stanicama endometrija. Prilikom invazije endometrija, endovaskularni EVT prodire u stijenke spiralnih arterija endometrija te ih pretvara u vrećaste tvorbe neosjetljive na vazoaktivne utjecaje. Prilikom stvaranja endovaskularnog trofoblasta, dolazi do tranzicije epitelnih stanica u stanice mezenhimalnog fenotipa. Sukladno tome, može se zaključiti da je EMT ključna za diferencijaciju trofoblasta i placentaciju (52).

*Hh* signalni put ključni je regulator EMT-a što je dokazano proučavanjem mnogih patoloških stanja poput karcinoma gušterače, hepatocelularnog karcinoma, gastrointestinalnih neuroendokrinih tumora, karcinoma pluća i bubrežne fibroze (53,54).

*Hh* signalni put ključni je regulator EMT-a što je dokazano proučavajući mnoga patološka stanja poput karcinoma gušterače, hepatocelularnog karcinoma, gastrointestinalnih neuroendokrinih tumora, karcinoma pluća i bubrežne fibroze (53,54).

Prema istraživanju Tanga i suradnika dokazano je da *Hh* signalni put sudjeluje u EMT-u aktivacijom proteina GLI1 i GLI2. GLI1 i GLI2 zajedno sudjeluju u inhibiciji transkripcije gena *CDH1* (engl. *Cadherin-1*) koji kodira za E-kadherin, dok GLI1 sudjeluje kao aktivator transkripcije ključnih EMT regulatora uključujući: *SNAIL1*, *SLUG* i gena za TWIST proteine. Sukladno tome, *Hh* signalni put putem GLI1 i GLI2 djeluje kao ključni regulator EMT-a tijekom diferencijacije trofoblasta i na taj način podržava fiziološku funkciju placente (55) (Slika 3.) .



**Slika 3.** Prikaz modela EMT u trofoblastu pod utjecajem *Hh* signalnog puta. *Hh* signalni put sudjeluje u EMT-u aktivacijom proteina GLI1 i GLI2. GLI1 i GLI2 zajedno sudjeluju u inhibiciji transkripcije gena *CDH1* (engl. *Cadherin-1*) koji kodira za E-kadherin, dok GLI1 sudjeluje kao aktivator transkripcije ključnih EMT regulatora uključujući: *SNAIL1*, *SLUG* i gena za TWIST proteine. Preuzeto iz (55).

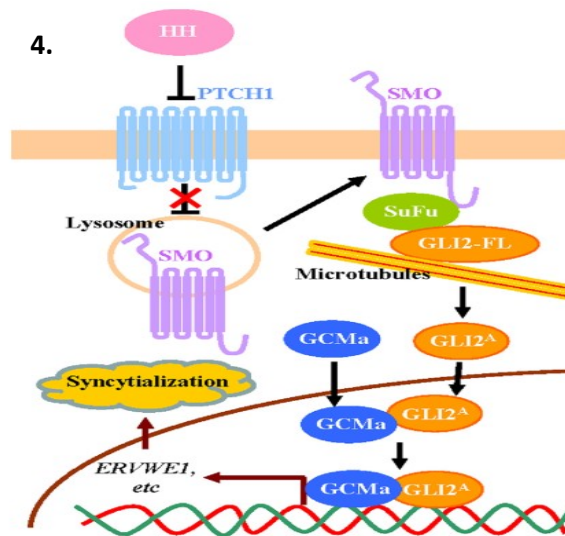
## 2.2 Kompleks GLI2-GCMA

Stanična fuzija ključna je kako za razvoj novog organizma, tako i za stvaranje multinuklearnih stanica koje sadrže različiti organi. U placenti do stanične fuzije dolazi prilikom stvaranja stanica sinciotrofoblasta (STBs) i taj proces se naziva sincicijalna fuzija. Sincicijalna fuzija ključni je faktor u pravilnoj morfogenezi i funkciji posteljice (56).

Primarni STBs nastaje intercelularnom fuzijom tijekom preimplantacije, dok sekundarni STBs nastaje kontinuiranom fuzijom podležećeg citotrofoblasta otprilike 1-2 tjedna nakon implantacije i traje sve do porođaja. Multinuklearni STBs odgovoran je za uspješnu implantaciju, komunikaciju s majčinom krvlju te produkciju s trudnoćom povezanih hormona poput korionskog gonadotropina (hCG), estradiola i progesterona (57).

Sincicijalnu fuziju kontroliraju različiti hormoni, faktori rasta i transkripcijski faktori. Dokazano je da je transkripcijski faktor Gcm1 (engl. *glial cell missing1*), uključen u sincicijalnu fuziju stanica trofoblasta koji formiraju mišju placentu te da mišje mutante za ovaj gen nemaju fuziju trofoblasta. Homolog mišjeg proteina GCMA pronađen je u ljudskoj placenti gdje je eksprimiran u STBs te zaslužan za aktivaciju fuzogena (npr. syncytin-1) i formiranje korionskih resica (58).

U istraživanju Chao Tang i suradnika pokazalo se da *Hh* signalni put ima veliku ulogu u sincicijalnoj fuziji trofoblasta putem proteina GLI2. Naime, aktivacijom *Hh* signalnog puta i posljedičnom aktivacijom GLI2 proteina, došlo je tijekom istraživanja do stabilizacije GCMA i stvaranja transkripcijskih dimera GLI2A-GCMA. Transkripcijski dimeri GLI2A-GCMA doveli su do aktivacije fuzogena koji su zaslužni za regulaciju sincicijalne fuzije. Prema ovome, može se zaključiti da *Hh* signalni put, zajedno s GLI2 djeluje je kao kritični faktor kako razvoja tako i fiziološke funkcije placente (59) (Slika 4.) .



**Slika 4.** Prikaz stvaranja transkripcijskog dimera GLI2A-GCMA. Aktivacijom *Hh* signalnog puta i posljedičnom aktivacijom GLI2 proteina, dolazi do stabilizacije GCMA i stvaranja transkripcijskih dimera GLI2A-GCMA. Transkripcijski dimeri GLI2A-GCMA dovode do aktivacije fuzogena koji su zaslužni za regulaciju sincicijalne fuzije. Preuzeto iz (59).

### 2.3 GLI proteini u embrionalnom razvoju

Embrionalni razvoj kralježnjaka posljedica je proliferacije i diferencijacije pluripotentnih matičnih stanica, a ključnu ulogu u tim procesima ima *Hh* signalni put i njemu pridruženi GLI proteini koji djeluju kao aktivatori i represori istog. Prilikom razvoja određenog tkiva, ne moraju biti uključena sva tri GLI proteina. GLI1 specifičan je za normalan razvoj kralježnjaka, dok važnost i uloga GLI2 i GLI3 u razvoju varira od tkiva do tkiva (60, 61).

Istraživanja su pokazala da su miševi kod koji je bio inaktivan ili aberantno aktivan protein Gli2 umrli intrauterino s defektima različitih tkiva uključujući: središnji živčani sustav (CNS), kosti i pluća. Međutim, pokazano je da ukoliko dođe do ekspresije Gli1 na mjestu gdje je trebao biti izražen Gli2 lokus, Gli1 može zamijeniti Gli2 u većini razvojnih procesa. Sukladno tome, može se zaključiti da je Gli2 stvarni aktivator tijekom razvoja (62). Što se tiče Gli3 proteina, istraživanja su pokazala da miševi kod kojih je gen *Gli3* aberantno aktivan ili inaktiviran, umiru perinatalno uz teške kraniofacijalne defekte, malformacije CNS-a i malformacije udova poput primjerice polidaktilije (63).

Proteini GLI2 i GLI3 su uključeni u proces neurulacije. Prilikom razvoja neuralne cijevi, visoke koncentracije SHH izlučene iz notokorda potiču stvaranje GLIA i inhibiraju stvaranje GLI3R. GLI2A i GLI3A usmjeravaju neuralne progenitore prema razvoju ventralnih stanica („floor plate“, V3 interneuroni), suprimirajući pri tome dorzalne markere u kralježničnoj moždini. Dok je GLI2 ključan za razvoj ventralnih stanica („floor plate“, V3 interneuroni) u kaudalnom dijelu kralježnične moždine, GLI3 je ključan za razvoj ventralnih stanica u kranijalnim dijelovima kralježnične moždine. Razvoj intermedijarnih stanica (V0,V1,V2 interneuroni) pod kontrolom je balansa između SHH liganda i GLI3R. Istraživanja su pokazala da u slučaju izostanka aktivacije *Hh* signalnog puta SHH ligandom, dolazi do represije razvoja V0-V2 pod utjecajem GLI3R. Za razvoj motornih neurona važna je aktivnost kako GLIA, tako i GLIR. S druge strane, razvoj telencefalona ne ovisi o aktivaciji *Hh* signalnog puta, niti o represivnoj ulozi GLI3R (64).

Uloga *Hh* signalnog puta i GLI proteina najbolje je istražena u razvoju udova. Gornji i donji ekstremiteti tijekom embriogeneze razvijaju se iz male nakupine mezodermalnih stanica koje se nazivaju pupoljak udova. Udovi se razvijaju u tri osi : anteriorno-posteriorna os (AP), proksimalno-distalna os (PD) i dorzalno-ventralna os (DV). U posteriornom dijelu pupoljka nalazi se zona polarizacijske aktivnosti (ZPA) koja određuje morfološke i anatomske značajke udova u AP osi (65).

SHH ligand *Hh* signalnog puta eksprimiran je u zoni polarizacijske aktivnosti (ZPA) i potiče gradijent GLIA i GLIR tijekom razvoja AP osi udova. Broj i morfologija prstiju udova određena je međudjelovanjem GLIA i GLIR. GLI3R predstavlja najvažniju odrednicu u morfološkim i anatomske značajkama prstiju udova anteriorne osi, a GLI2A i GLI3A određuju morfologiju i anatomiju prstiju udova posteriorne osi (66).

*Hh* signalni put također je iznimno važan za normalan razvoj kostiju. Za razliku od razvoja udova, gdje glavnu ulogu ima SHH protein, pri razvoju skeletalnog sustava dolazi do ekspresije IHH proteina. Razvoj kostiju pod kontrolom je sva tri GLI proteina. Prilikom embrionalnog razvoja kostiju dolazi do dvaju procesa, a to su : enhondralna osifikacija (duge kosti) i intramembranozna osifikacija (plosnate kosti i klavikula). Uloga *Hh* signalnog puta i GLI proteina dokazana je tijekom enhondralne osifikacije (67).

GLI1 predstavlja marker ranih progenitora osteoblasta tijekom embrionalnog razvoja. Abnormalnost GLI2 proteina dovodi do defekata u kraniofacijalnim kostima, kralježnici, dugim kostima udova i prsnoj kosti . Također GLI2 protein potiče vaskularizaciju hrskavice što je ključan korak u konverziji nezrele hrskavične kosti u zrele mineraliziranu kost (67).

Inhibicija GLI3R dovodi do proliferacije i hipertrofije hondrocita, dok s druge strane aktivacija GLI2A i inhibicija GLI3R uzrokuje diferencijaciju osteoblasta od strane osteoblast-specifičnog transkripcijskog faktora Runx2 (engl. *Runt-related transcription factor 2*). Također prilikom aktivacije GLI2A i inhibicije GLI3R dolazi do ektopične osifikacije u zglobovima (67).

**Tablica 1.** Ostala tkiva i organi u kojima sudjeluju GLI proteini

Tkivo/Organ	Vrsta Gli proteina	(Ref.)
Bubreg	GLI3R, GLI2A	(153-155)
Sklerotom	GLI2A, GLI3A, GLI2R, Gli3R	(156)
Pluća	GLI2A, GLI3A	(157)
Placenta	GLI2A, GLI3A	(158)
Mliječna žlijezda	GLI3R	(159)
Mliječni duktusi	GLI2A	(160)
Leydigove stanice testisa	GLI1A, GLI2A	(161)
T-stanice timusa	GLI1A, GLI2A, GLI3A	(162-164)
Hipofiza	GLI1A, GLI2A	(165)
Folikul dlake	GLI2A	(166)

### 3. Bolesti povezane s abnormalnom aktivacijom Gli proteina

#### 3.1 Greigova cefalopolisindaktilija (GCPS)

Greigova cefalopolisindaktilija (GCPS) rijetka je pleiotropna kongenitalna malformacija karakterizirana trijadom simptoma: polisindaktilija, makrocefalija i hipertelorizam. Malformacija je dobila naziv prema Davidu M. Greigu zbog opisa 1926 pacijenata s tim sindromom (68). Klinička slika može varirati od blage do vrlo izražene. Polisindaktilija se prezentira na bilo kojem ekstremitetu, a u većini slučajeva je preaksijalna, no može biti i postaksijalna. Neki pacijenti razvijaju kutanu polisindaktiliju. Kraniofacijalne malformacije također variraju u svojoj ekspresiji zbog čega pacijenti mogu imati sve ili samo neke od slijedećih simptoma : hipertelorizam, telekantus, makrocefaliju i kraniosintoze. Ostali simptomi pored prethodno navedenih koji se mogu javiti uz GCPS su : mentalna retardacija, ageneza corpora callosa, umbilikalne i dijafragmalne hernije (69) (Slika 5.) . Zabilježeni su slučajevi gdje su pacijenti s GCPS razvili patološka stanja poput leukemije i glioma (70).



Slika 5. Prikaz pacijenta s GCPS. (a) Hipertelorizam i makrocefalija. (b) Kutana polisindaktilija prstiju šake. (c) Kutana polisindaktilija prstiju stopala. Preuzeto iz (69).

Dijagnoza GCPS postavlja se na temelju kliničkih simptoma (trijade simptoma: polisindaktilija, hipertelorizam i makrocefalija) i molekularnih analiza koje su potvrdile mutaciju u genu koji kodira za *GLI3* protein. Naime, kod više od 75 % klinički prepoznatih pacijenata s GCPS-om, molekularnim analizama utvrđena je mutacija *GLI3* (71).

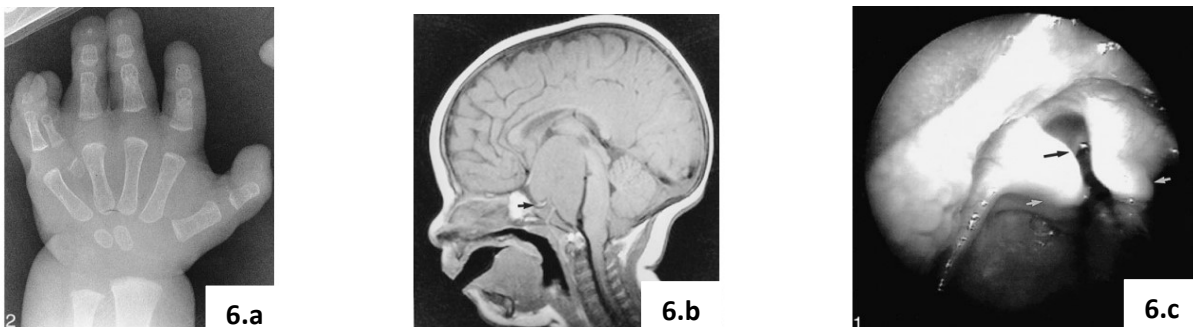


Do mutacija dolazi u dijelu gena koji kodira za C-terminalnu transaktivacijsku domenu, što rezultira reduciranom funkcijom GLI3 proteina i GCPS-om (72).

### 3.2 Pallister – Hall sindrom (PHS)

Pallister – Hall sindrom (PHS) rijedak je autosomno-dominantni poremećaj koji je prvi puta opisan 80-tih godina XX stoljeća (73). Klinička slika je varijabilna i obuhvaća veliki broj organa i tkiva. Karakteristični simptomi PHS-a su kongenitalni hipotalamički hamartom i postaksijalna polidaktilija, dok od ostalih simptoma pacijenti s PHS-om mogu imati: displastične nokte, rascjep epiglotisa, perforaciju anusa, displaziju hipofize, hipopituitarizam, skeletalne anomalije, kongenitalne malformacije srca (VSD, perzistentni ductus Botalli, aortalna koarktacija) i defekte pluća (74) ( Slika 6.).

Zbog razvoja hipotalamičkog hamartoma, posljedično može doći do ometanja razvoja hipofize te razvoja panhipopituitarizma što može dovesti i do akutne adrenalne insuficijencije. Od ostalih endokrinoloških simptoma koji se mogu javiti u pojedinih pacijenata s PHS-om zapaženi su hipotireoza i kriptorhizam. Razvoj hamartoma sekundarno dovodi do kraniofacijalnih malformacija uključujući : kratak i malen nos, nisko položene uške, rascjep nepaca, epiglotisa i larinksa (75).



Slika 6. MR Prikaz kliničkih simptoma pacijenta s PHS. (a) Polisindaktilija prstiju šake. (b) Hipotalamički hamartom. (c) Rascjep epiglotisa. Preuzeto iz (74).

Konačna dijagnoza u pacijenata čija klinička slika (hipotalamični hamartom i polisindaktilija) upućuje na PHS je dokaz mutacije gena *GLI3*. Mutacija u slučaju PSH-a smještena je u dijelu gena koji kodira za sredinu samog proteina te uzrokuje okrnjenje proteina u proteosomu i stvaranje represorskih oblika *GLI3* koji su ključni u nastanku sindroma i razvoju kliničke slike (72).

### 3.3 Policistična bolest bubrega (PKD) i nefronoftiza

Policistična bolest bubrega (PKD) nasljedno je stvaranje mnogobrojnih cisti u bubrežnim glomerulima i tubulima koje dovodi do uvećanja bubrega i u konačnici do mogućeg zatajenja njegove funkcije. Češći oblik PKD-a je autosomno-dominantni koji nastaje mutacijom u genima *PKD1* i *PKD2* koji kodiraju proteine policistin 1 i 2 (76). Autosomno-recesivni PKD, rjeđi je oblik i rezultat je mutacije u genu *PKHD1* koji kodira protein poliduktin/fibrocin (77).

Razvoj PKD-a povezan je s poremećajem funkcije primarne cilije i pridruženog proteina GLI3. Naime, dokazano je da su miševi s mutacijom gena *Gli3* razvili PKD. Također, dokazano je da je građa primarne cilije normalna u miševima kod kojih je *Gli3* protein mutiran što govori u prilog tome da *Gli3* nije ključan za razvoj primarne cilije, ali je povezan sa signalnim putem koji se odvija u samoj primarnoj ciliji. Pored toga, dokazano je da u razvoju PKD-a dolazi do poremećaja u staničnoj funkciji i u polarnosti stanica do kojih dolazi zbog *Gli3* mutacija (78).

Nefronoftiza (NPH) je autosomno-recesivna bolest koja se prezentira kliničkom slikom kroničnog tubulointersticijskog nefritisa i posljedično dovodi do kroničnog bubrežnog zatajenja. Postoji infantilni, juvenilni i adolescentni oblik NPH-a, od kojih je juvenilni oblik najčešći (81). Simptomi NPH-a u sva tri oblika su: tubularna atrofija, fibroza i stvaranje glomerularnih cisti. Do razvoja NPH, kako je potvrđeno u recentnim studijama, dolazi zbog gubitka ili mutacije gena koji kodira za sintezu GLI2 proteina (82).

### 3.4 Šećerna bolest (DM)

Šećerna bolest metabolički je poremećaj kod kojeg zbog smanjenog lučenja inzulina dolazi do hiperglikemije. Postoje dvije osnovne vrste šećerne bolesti, a to su DM tip 1 i DM tip 2. Patogeneza oba tipa DM je disfunkcija  $\beta$ -stanica gušterače čija je osnovna uloga održavanje homeostaze glukoze putem izlučivanja primjerenih količina inzulina (79). Dokazana je uloga GLI3 proteina u regulaciji transkripcije gena za inzulin u oba tipa DM (80).

### 3.5 Kongenitalna hipotireoza

Kongenitalna hipotireoza označava niske razine T3 i T4 prilikom rođenja, uz povišene razine TSH do čega dolazi zbog poremećaja u razvoju štitnjače. Ovo patološko stanje uočeno je u pacijenata koji su zbog mutacije *Gli3* razvili DM tip1 ili tip 2 i PKD što ukazuje na moguću povezanost mutacije *Gli3* i kongenitalne hipotireoze (83).

#### 4. Uloga proteina GLI u reprodukciji

Razvoj reproduktivnog sustava sisavaca odvija se u tri faze. Prva faza započinje fertilizacijom kod koje dolazi do fuzije Y ili X kromosoma spermija s X kromosomom jajne stanice što uzrokuje spolnu determinaciju nakon čega slijedi morfogeneza(84). Kod embrija muškog spola dolazi do ekspresije gena *SRY* koji potiče razvoj testisa (85). Zbog odsustva gena *SRY* u zamecima ženskog spola dolazi do razvoja jajnika. Embrionalni razvoj reproduktivnog sustava završava razvojem reproduktivnih kanala i vanjskih spolnih organa specifičnih za spol. U početku se u oba spola razvijaju perkusori reproduktivnih kanala, odnosno Mullerov i Wolffov kanal (86). Testisi muškog embrija luče Anti – Mullerov hormon (AMH) i testosteron koji dovode do diferencijacije Wolffovog kanala i nestanka Mullerovog kanala pri čemu se razvijaju epididimis, sjemeni mjehurići i *ductus deferens*. Kod zametaka ženskog spola zbog nedostatka AMH i testosterona Wolffov kanal nestaje, a diferencira se Mullerov kanal pri čemu nastaju jajovod, maternica, vrat maternice i gornja polovica vagine. Embrionalni razvoj reproduktivnog sustava pod utjecajem je endokrinološkog sustava i lokalnih signalnih puteva, među kojima je Hh signalni put i GLI proteini (87). Istraživanjem miševa s aberantnom ekspresijom proteina *Dhh*, zapazila se uloga *Dhh* i *Gli* proteina, izraženih u intersticijskim stanicama testisa, u razvoju poremećaja spermatogeneze (88). Pored ekspresije u intersticijskim stanicama testisa, neka su istraživanja dokazala prisustvo *Dhh* i *Gli* proteina i u spolnim stanicama (89,90). Osim toga, mutacije gena *Gli1* dovode do blokiranja spermatogeneze na razini primarne spermatocite (90).

Mutacije gena *Dhh* u miševima dovele su do smanjenja broja fetalnih Leydigovih stanica (91). Leydigove stanice izlučuju androgene i inzulinu sličan faktor 3 (engl. *insulin-like factor 3*; INSL3) koji su odgovorni za embrionalni razvoj muškog reproduktivnog sustava, razvoj vanjskih genitalija i spuštanje testisa (92,93). Defekt Leydigovih stanica uzrokovan je pored mutacije *Dhh* i gubitkom minimalno jedne kopije steroidogenog faktora 1 (engl. *steroidogenic factor 1*; SF1) (94).

Dokazano je da fetalnom ovariju miša nema ekspresije gena *Ptch1* i *Gli1* te da je Hh signalni put inaktivan. Aktivacija Hh signalnog puta u jajniku dovela bi do razvoja Leydigovih stanica koje se normalno nalaze u testisu (95).

Proteini *Dhh* i *Ihh* izraženi su u jajniku odraslog miša, a luče ih granulosa stanice. S druge strane, *Ptch1*, *Smo* i *Gli1* su također izraženi, a luče ih teka stanice (96). Gubitak Hh signalnog puta ne utječe na folikulogenezu, ali ektopična aktivacija dovodi do poremećaja iste (97).

## 5. Važnost GLI obitelji u razvoju, ranoj dijagnostici i liječenju reproduktivnih karcinoma

### 5.1 Karcinogeneza i GLI

Poremećaji *Hh* signalnog puta mogu potaknuti karcinogenezu ili ubrzati rast i širenje već postojećeg karcinoma. Do aberantne aktivacije signalnog puta *Hh* dolazi zbog mutacija (*missense/nonsense/frameshift*), prekomjernog ili smanjenog izlučivanja i posttranskripcijskih modifikacija njegovih komponenti. Pored genetskih i epigenetskih promjena kanonskog *Hh* signalnog puta, do karcinogeneze dolazi i nekanonskom aktivacijom GLI proteina ostalim signalnim putevima koje pokreću: MAPK (engl. *Mitogen-activated kinases*), TGF $\beta$  (engl. *Transforming growth factor beta*), EGFR (engl. *Epidermal growth factor receptor*) i FGFR (engl. *Fibroblast growth factor receptor*) (110, 111,112).

GLI proteini reguliraju transkripciju različitih protumorskih faktora i na taj način sudjeluju u karcinogenezi. Stanična proliferacija karcinoma potaknuta je GLI ovisnim ciklinima D1 i D2 (113). Samoobnova matičnih stanica karcinoma regulirana je GLI proteinima koji aktiviraju ekspresiju gena *Sox2* (engl. *Sex determining region Y-box 2*) (114). Do razvoja metastaza dolazi zbog aktivacije proteina GLI i njihove regulacije tumorske angiogeneze, apoptoze i invazije imunološkog sustava. Aktivnost GLI proteina većinom je izražena u promijenjenim tumorskim stanicama i stromi koja se nalazi oko samih stanica (115).

### 5.2 Karcinom dojke

Karcinom dojke predstavlja jedan od najčešćih tumora ženske populacije, a liječi se ovisno o stadiju kirurški, kemoterapijom, radijacijom i ciljanom hormonskom terapijom. Navedeni načini liječenja karcinoma pokazali su se nedovoljno uspješnim u prevenciji razvoja metastaza i relapsa bolesti. Matične stanice karcinoma (engl. *Cancer stem cells*; CSC) CD44+/CD24- posjeduju svojstvo invazivnosti i slabog odgovora na terapiju (116). Terapijskim ciljanjem CSC može se spriječiti razvoj metastaza i relaps bolesti (117).

*Hh* signalni put i njegove komponente SHH, SMO, PTCH1 i GLI uključeni su u razvoj, invazivnost i širenje karcinoma dojke. SHH, SMO, PTCH1 i GLI potencijalni su biomarkeri relapsa bolesti (118), dok su serumski SHH i interleukin-6 (IL-6) potencijalni biomarkeri invazivnosti (119,120).

*Shh* signalni put određuje hoće li se razviti neinvazivni ili invazivni karcinom dojke, ovisno o GLI1 nukleranoj translokaciji. Povišene razine GLI1 i GLI2 povezane su s lošijom prognozom i slabijim terapijskim odgovorom (121,122). GLI1 potiče epitelno-mezenhimalnu tranziciju (EMT) koja dovodi do invazije karcinoma dojke(123).

Kemoterapija doksorubicinom i cisplatinom aktivira *Shh* signalni put i GLI proteine, dok su CSC rezistentne na kemoterapiju. Iz tog razloga, *Shh* signalni put i njegove komponente potencijalne su terapijske mete karcinoma dojke (124).

Dokazano je djelovanje dvaju antagonista GLI u inhibiciji *Shh* signalnog puta različitih karcinoma, a to su GANT58 i HPI-1. U karcinomu prostate GANT58 remeti transkripciju GLI1 i GLI2 te na taj način onemogućava rast karcinoma (125). GANT58 potiče apoptozu T stanica u leukemiji (126). Djelovanje HPI-1 dokazano je u hepatocelularnom karcinomu i karcinomu gušterače, gdje anatagonisti dovode do ometanja aktivnosti, stabilnosti i funkcije GLI proteina (127).

Iako trenutno nije razjašnjen mehanizam djelovanja GLI antagonista u primarnom karcinomu dojke postoje rezultati koji ukazuju da terapijsko ciljanje GLI proteina može dovesti do supresije rasta stanica ovoga karcinoma. Naime, Kuo-Shyang Jeng je sa suradnicima usporedio djelovanje GANT58 i HPI-1 na stanične linije karcinoma dojke s visokom ekspresijom *Hh* signalnog puta (linija T2) i linije karcinoma dojke MDA-MB-231. Dokazali su da GANT58 i HPI-1 mogu smanjiti staničnu proliferaciju, potaknuti apoptozu i smanjiti invazivnost u stanicama karcinoma dojke. (128).

### **5.3 Karcinom jajnika**

Epitelni karcinom jajnika ( engl. *Epithelial ovarian carcinoma*; EOC) najčešće se dijagnosticira u uznapredovaloj fazi zbog slabo izraženih simptoma, kliničkih znakova i neefikasnih metoda probira. EOC je visoko invazivan i vrlo brzo razvija rezistenciju na liječenje. To je razlog što ima lošu prognozu i preživljenje (129).

Prepoznata je uloga *Hh* signalnog puta i GLI proteina u razvoju i potencijalnom terapijskom učinku EOC-a. U matičnim stanicama jajnika vinske mušice dokazana je njihova uloga u regeneraciji epitela nakon ruptur folikula za vrijeme ovulacije.

Aberacije *Hh* signalnog puta dovode do diferencijacije matičnih stanica u stanice karcinoma te na taj način omogućavaju rast i razvoj karcinoma (130).

Različite studije ukazale su na ulogu aberantnog *Hh* signalnog puta u karcinomu jajnika koji potencijalno može potaknuti staničnu proliferaciju i inhibirati apoptozu karcinomskih stanica. Liao X i suradnici dokazali su prekomjerno lučenje GLI1 proteina u karcinomu jajnika i njegovu ulogu u lošijem ishodu (131). S druge strane Yang L. i suradnici pokazali su da je *Hh* signalni put eksprimiran u manjem broju karcinoma i zbog toga pretpostavili da ne dovodi do razvoja karcinoma (132). Schmid S. i suradnici pronašli su pojačanu ekspresiju proteina GLI2 u stanicama karcinoma i potvrdili povezanost *Hh* signalnog puta i karcinoma jajnika (133). Prethodno navedene studije se ne podudaraju, što navodi na ulogu nekanonske signalizacije u razvoju karcinoma jajnika.

Terapijsko ciljanje komponenti *Hh* signalnog puta ima potencijal u liječenju i sprječavanju progresije karcinoma jajnika. Primjena ciklopamina (inhibitora SMO) u kulturi staničnih linija karcinoma jajnika, dovela je do blokiranja staničnog ciklusa u G1 fazi i poticanja apoptoze (134). McCann i suradnici koristili su derivat ciklopamina i time spriječili rast tumora u ksenograftu (135). Do danas, dokazana je samo uloga SMO inhibitora u smanjenju rasta i progresiji karcinoma jajnika. Terapijska uloga inhibitora ostalih komponenti signalnog puta nije pronađena.

#### **5.4 Inhibitori transkripcijskih faktora**

GANT58 i GANT61 blokiraju vezanje GLI proteina na molekulu DNA pa time onemogućavajući njihovu transkripcijsku aktivnost (136). Prethodno navedeni inhibitori, blokiraju tumorsku proliferaciju *in vitro* i tumorski rast *in vivo*. Antitumorsko djelovanje GANT61 dokazano je u karcinomu pluća (137), karcinomu dojke (138), karcinomu gušterače (139) i neuroblastomu (140).

ATO (engl. *Arsenic trioxide*) inhibira ekspresiju gena reguliranih GLI transkripcijskim faktorima. Smanjuje stabilnost GLI2 koji ima ulogu u različitim protumorskim signalnim putevima (141).

Pirfenidon je antifibrotički lijek koji posjeduje protuupalna, antioksidativna i antitrombotička svojstva. Dovodi do destabilizacije GLI2 i blokiranja aberantnog *Hh* signalnog puta za vrijeme karcinogeneze (142). Miura i suradnici dokazali su smanjenu incidenciju karcinoma pluća kod pacijenata koji su koristili pirfenidon u liječenju idiopatske plućne fibroze (143).

HPI djeluju nizvodno od SMO na način da destabiliziraju GLI proteine i onemogućuju njihovu transkripcijsku aktivnost. Ostali antagonisti GLI proteina su : pirvinium, imikvimod i nanokvinakrin (144).

**Tablica 2.** Inhibitori GLI i njihovi učinci

Naziv lijeka	Učinak	(Ref.)
GANT58,GANT61	blokiranje vezanja GLI i DNA	(145)
ATO	destabilizacija GLI2	(146)
Pirfenidon	destabilizacija GLI2	(147)
HPI 1-4	destabilizacija GLI2	(148)
Pirvinium	poticanje proteosomalne razgradnje GLI	(149)
Imikvimod	poticanje proteosomalne razgradnje GLI	(150)
Nanokvinarin	destabilizacija kompleksa GLI1-DNA	(151)

### 5.5 Gestacijska trofoblastična bolest (engl. *Gestational trophoblastic disease ; GTD*)

Gestacijska trofoblastična bolest (engl. *Gestational trophoblastic disease; GTD*) skup je patoloških stanja posteljice, a prezentira se abnormalnom proliferacijom trofoblata. Prema histološkim i kliničkim karakteristikama, GTD se dijeli u : hidatidoznu molu (engl. *Hydatidiform mole; HM*), invazivnu molu (engl. *Invasive mole; IM*), koriokarcinom (engl. *Choriocarcinoma; CCA*), trofoblastični tumor ležišta posteljice (engl. *Placental site trophoblastic tumour ; PSST*) i epiteloidni trofoblastični tumor (engl. *Epitheloid trophoblastic tumour ; ETT*). Od navedenih patoloških stanja, jedino je HM benigne prirode (167).

Iako je većina HM benigne naravi, 30 % HM maligno alterira pri čemu se najčešće razvija CCA. CCA može nastati *de novo* nakon uredne trudnoće, spontanog pobačaja ili ektopične trudnoće. Dok se benigna HM liječi evakuacijom, CCA zahtijeva liječenje kemoterapijom (168).

Do sada nisu otkriveni prediktori maligne tranzicije HM u CCA, ali pretpostavlja se da su u patogenezi tranzicije uključene aberantne matične stanice (169). Hh signalni put uključen je u regulaciju normalne diferencijacije matičnih stanica i razvoj tkiva. Poremećaji signalnog puta mogu dovesti do razvoja različitih karcinoma, uključujući i CCA (170).

Studija Joanna Ho i suradnika usporedila je razine proteina GLI1, GLI2 i GLI3 u HM, CCA, terminskoj posteljici i posteljici iz prvog trimestra. Dokazali su snižene razine proteina GLI1 i GLI2 u sve četiri proučavane posteljice i snižene razine proteina GLI3 u posteljici iz prvog trimestra i terminskoj posteljici. Dok su snižene razine GLI proteina pronađene u gotovo svim promatranim tkivima, Kif7 (engl. *Kinesine-like protein 7*) snižen je samo u CCA (171). Može se zaključiti da je Hh signalni put poremećen u GTD-u. Do aberacija u signalnom putu i razvoja karcinogeneze najčešće dolazi zbog prekomjernog lučenja proteina GLI, mutacija *PTCH* i *SMO* te posttranskripcijskih modifikacija komponenti *Hh* signalnog puta (172). Joanna Ho i suradnici ukazali su na Kif7 i njegovu ulogu u disregulaciji *Hh* signalnog puta i razvoju CCA. Kif7 suprimira migraciju, invaziju i stanični rast stanica CCA. Budući da je Kif7 snižen u CCA, mogao bi imati ključnu ulogu u poremećenoj aktivaciji *Hh* signalnog puta i karcinogenezi trofoblasta (171).

Može se zaključiti da bi Kif7 mogao imati glavnu ulogu u tranziciji HM u CCA i progresiji CCA, te bi na taj način mogao biti dobar biomarker za rano otkrivanje bolesti.



## 6. ZAKLJUČAK

Novija istraživanja dokazuju ulogu GLI proteina u diferencijaciji trofoblasta. Prilikom diferencijacije trofoblasta dolazi do razvoja nemigrirajućeg viloznog trofoblasta (VT) građenog od sinciotrofoblasta i migrirajućeg ekstraviloznog trofoblasta (EVT) građenog od citotrofoblasta. Epitelno-mezenhimalna tranzicija (EMT), koja je pod kontrolom GLI proteina, ključna je u diferencijaciji trofoblasta. Dokazana je uloga GLI1 i GLI2 proteina u inhibiciji gena *CDH1* (engl. *Cadherin-1*) koji kodira E-kadherin čija je uloga inhibicija EMT. S druge strane GLI1 potiče transkripciju ključnih EMT regulatora *SNAIL1*, *SLUG* i gena za TWIST proteine. Pored EMT, u diferencijaciji trofoblasta od velikog je značaja i uloga sincicijalne fuzije. Istraživanja su potvrdila da je sincicijalna fuzija pod kontrolom GLI2 transkripcijskog faktora. Sve navedeno ukazuje da su GLI proteini iznimno važni u diferencijaciji trofoblasta te da poremećajem u njihovom funkcioniranju može doći do patoloških stanja u razvoju posteljice. Trenutno nije dokazano na koji način GLI proteini dovode do gestacijske trofoblastične bolesti (engl. *Gestational trophoblastic disease* ; GTD), no pretpostavlja se da u tome sudjeluje Kif7 (engl. *Kinesine-like protein 7*). Kif7 regulator je GLI proteina koji sudjeluje u diferencijaciji i razvoju normalne posteljice. Dokazano je da smanjene razine Kif7 dovode do razvoja koriokarcinoma. Sukladno tome, može se zaključiti da poremećaji Kif7 dovode do loše regulacije aktivnosti GLI proteina i posljedično razvoja koriokarcinoma.

GLI proteini nužni su u normalnoj diferencijaciji trofoblasta i razvoju posteljice. Buduća istraživanja razjasnit će njihov mehanizam djelovanja u patološkim stanjima razvoja posteljice što može rezultirati korištenjem GLI proteina kao potencijalnih biomarkera i ciljnih mjesta terapije. To će dovesti do ranijeg otkrivanja i uspješnijeg liječenja GTD.

## **7. ZAHVALE**

Zahvaljujem se svojoj mentorici, prof. dr. dc. Ljiljani Šerman, dr. med. na ljubaznosti, strpljenju i podršci te konstruktivnim savjetima i velikoj pomoći tijekom pisanja ovog diplomskog rada.

Također, zahvaljujem se svojim roditeljima, sestri, tetki i najbližim prijateljima na razumijevanju, potpori i ljubavi koju su mi pružali tijekom cijelog studija.

## 8. LITERATURA

1. Nüsslein-Volhard C, Wieschaus E. Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature*. 1980;287(5785): 795–801
2. 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.
3. Lee, J.J., von Kessler, D.P., Parks, S., and Beachy, P.A. 1992. Secretion and localized transcription suggest a role in positional signaling for products of the segmentation gene hedgehog. *Cell* 71: 33–50
4. Mohler, J. and Vani, K. 1992. Molecular organization and embryonic expression of the hedgehog gene involved in cell–cell communication in segmental patterning of *Drosophila*. *Development* 115: 957–971
5. Tabata, T., Eaton, S., and Kornberg, T.B. 1992. The *Drosophila* hedgehog gene is expressed specifically in posterior compartment cells and is a target of engrailed regulation. *Genes&Dev*. 6: 2635–2645.
6. Tashiro, S., Michiue, T., Higashijima, S., Zenno, S., Ishimaru, S., Takahashi, F., Orihara, M., Kojima, T., and Saigo, K. 1993. Structure and expression of hedgehog, a *Drosophila* segment-polarity gene required for cell–cell communication. *Gene* 124: 183–189
7. Ingham P W 2001 Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles. *Genes Dev* 15(23): 3059–87
8. Ingham P W, Nakono Y, Seger C 2011 Mechanisms and functions of Hedgehog signalling across the metazoa. *Nat Rev Genet* 12(6): 393–406
9. Chen J K, Taipale J, Cooper M K, Beachy P A 2002 Inhibition of Hedgehog signaling by direct binding of cyclopamine to Smoothened. *Genes Dev* 16(21): 2743–8
10. Briscoe J, Théron P P 2013 The mechanisms of Hedgehog signalling and its roles in development and disease. *Nat Rev MolCell Biol* 14(7): 418–31
11. Manuscript A, Ciliogenesis CC. NIH Public Access. *Cancer*. 2009;68(7):2058–61.
12. Bastida MF, Sheth R, Ros MA. A BMP-Shh negative-feedback loop restricts Shh expression during limb development. *Development*. 2009; 136:3779–89.
13. Deschaseaux F, Sensebe L, Heymann D. Mechanisms of bone repair and regeneration. *Trends MolMed*. 2009; 15:417–29.

14. Bertrand N, Dahmane N. Sonic hedgehog signaling in forebrain development and its interactions with pathways that modify its effects. *Trends Cell Biol.* 2006; 16:597–605.
15. Echelard, Y., Epstein, D. J., St-Jacques, B., Shen, L., Mohler, J., McMahon, J. A., and McMahon, A. P. (1993). Sonic hedgehog, a member of a family of putative signaling molecules, is implicated in the regulation of CNS polarity. *Cell* 75, 1417–1430
16. Riddle, R. D., Johnson, R. L., Laufer, E., and Tabin, C. (1993). Sonic hedgehog mediates the polarizing activity of the ZPA. *Cell* 75, 1401–1416
17. Hynes, M., Porter, J. A., Chiang, C., Chang, D., Tessier-Lavigne, M., Beachy, P. A., and Rosenthal, A. (1995). Induction of midbrain dopaminergic neurons by Sonic hedgehog. *Neuron* 15, 35–44
18. Laufer, E., Nelson, C. E., Johnson, R. L., Morgan, B. A., and Tabin, C. (1994). Sonic hedgehog and Fgf-4 act through a signaling cascade and feedback loop to integrate growth and patterning of the developing limb bud. *Cell* 79, 993–1003
19. Roberts, D. J., Johnson, R. L., Burke, A. C., Nelson, C. E., Morgan, B. A., and Tabin, C. (1995). Sonic hedgehog is an endodermal signal inducing Bmp-4 and Hox genes during induction and regionalization of the chick hindgut. *Development* 121, 3163–3174
20. Bellusci, S., Furuta, Y., Rush, M., Henderson, R., Winnier, G., and Hogan, B. (1997). Involvement of Sonic hedgehog (Shh) in mouse embryonic lung growth and morphogenesis. *Dev. Suppl.* 124, 53–63.
21. Oro, A. E., and Scott, M. P. (1998). Splitting hairs: Dissecting roles of signaling systems in epidermal development. *Cell* 95, 575–578
22. Ramsdell, A. F., and Yost, H. J. (1998). Molecular mechanisms of vertebrate left-right development. *Trends Genet.* 14, 459–465.
23. 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.
24. 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.
25. Bitgood, M. J., Shen, L., and McMahon, A. P. (1996). Sertoli cell signaling by Desert hedgehog regulates the male germline. *Curr. Biol.* 6, 298–304
26. Ingham PW, McMahon AP. Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles. *Genes Dev.* 2001; 15(23):3059–3087.
27. Ingham, P. W., Nakano, Y. and Seger, C. (2011). Mechanisms and functions of Hedgehog signalling across the metazoa. *Nat. Rev. Genet.* 12, 393–406.

28. Kinzler KW, Ruppert JM, Bigner SH, Vogelstein B (1988) The GLI gene is a member of the Kruppel family of zinc finger proteins. *Nature* 332:371–374
29. Kinzler, K.W.; Vogelstein, B. The GLI gene encodes a nuclear protein which binds specific sequences in the human genome. *Mol. Cell. Biol.* 1990, *10*, 634–642.
30. Niewiadomski, P.; Kong, J.H.; Ahrends, R.; Ma, Y.; Humke, E.W.; Khan, S.; Teruel, M.N.; Novitch, B.G.; Rohatgi, R. Gli protein activity is controlled by multisite phosphorylation in vertebrate Hedgehog signaling. *Cell Rep.* 2014, *6*, 168–181.
31. 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*, 10846–10852.
32. Tempe, D.; Casas, M.; Karaz, S.; Blanchet-Tournier, M.-F.; Concordet, J.-P. Multisite Protein Kinase A and Glycogen Synthase Kinase 3 Phosphorylation Leads to Gli3 Ubiquitination by SCF TrCP. *Mol. Cell. Biol.* 2006, *26*, 4316–4326.
33. Sasaki, H.; Nishizaki, Y.; Hui, C.; Nakafuku, M.; Kondoh, H. Regulation of Gli2 and Gli3 activities by an amino-terminal repression domain: Implication of Gli2 and Gli3 as primary mediators of Shh signaling. *Development* 1999, *126*, 3915–3924.
34. 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*, 10846–10852.
35. Niewiadomski, P.; Kong, J.H.; Ahrends, R.; Ma, Y.; Humke, E.W.; Khan, S.; Teruel, M.N.; Novitch, B.G.; Rohatgi, R. Gli protein activity is controlled by multisite phosphorylation in vertebrate Hedgehog signaling. *Cell Rep.* 2014, *6*, 168–181.
36. Tempe, D.; Casas, M.; Karaz, S.; Blanchet-Tournier, M.-F.; Concordet, J.-P. Multisite Protein Kinase A and Glycogen Synthase Kinase 3 Phosphorylation Leads to Gli3 Ubiquitination by SCF TrCP. *Mol. Cell. Biol.* 2006, *26*, 4316–4326.
37. 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.
38. 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.

39. Marks, S.A.; Kalderon, D. Regulation of mammalian Gli proteins by Costal 2 and PKA in *Drosophila* reveals Hedgehog pathway conservation. *Development* 2011, *138*, 2533-2542.
40. 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*, 10846–10852.
41. Wang, C.; Pan, Y.; Wang, B. Suppressor of fused and Spop regulate the stability, processing and function of Gli2 and Gli3 full-length activators but not their repressors. *Development* 2010, *137*, 2001–2009.
42. Arensdorf, A.M.; Marada, S.; Ogden, S.K. Smoothened Regulation: A Tale of Two Signals. *Trends Pharmacol. Sci.* 2016, *37*, 62–72.
43. Kinzler, K.W.; Ruppert, J.M.; Bigner, S.H.; Vogelstein, B. The GLI gene is a member of the Kruppel family of zinc finger
44. Chen, M.-H.; Wilson, C.W.; Li, Y.-J.; Law, K.K.L.; Lu, C.-S.; Gacayan, R.; Zhang, X.; Hui, C.; Chuang, P.-T. Cilium-independent regulation of Gli protein function by Sufu in Hedgehog signaling is evolutionarily conserved. *Genes Dev.* 2009, *23*, 1910–1928.
45. Cheng SY, Bishop JM. Suppressor of Fused represses Gli-mediated transcription by recruiting the SAP18-mSin3 corepressor complex. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2002;99(8):5442–7.
46. Robbins, D.J.; Fei, D.L.; Riobo, N.A. The Hedgehog Signal Transduction Network. *Sci. Signal.* 2012.
47. Corbit, K.C.; Aanstad, P.; Singla, V.; Norman, A.R.; Stainier, D.Y.R.; Reiter, J.F. Vertebrate Smoothened functions at the primary cilium. *Nature* 2005, *437*, 1018–1021.
48. Đelmiš J., Orešković S. i suradnici. *Fetalna medicina i opstetricija : Razvoj i građa posteljice.* Zagreb : Medicinska naklada ; 2014. 62-5
49. Hamilton WJ, Boyd JD. Development of the human placenta in the first three months of gestation. *J Anat* 1960; *94*:297-328.
50. Lunghi L, Ferretti ME, Medici S, Biondi C, Vesce F. Control of human trophoblast function. *Reprod Biol Endocrinol* 2007;5:6.
51. A. Puisieux, T. Brabletz, J. Caramel, Oncogenic roles of EMT-inducing transcription factors, *Nat. Cell Biol.* 16 (6) (2014) 488–494.
52. T.M. Mayhew, Turnover of human villous trophoblast in normal pregnancy: what do we know and what do we need to know? *Placenta* 35 (4) (2014) 229–240

53. K.D. Marini, B.J. Payne, D.N. Watkins, L.G. Martelotto, Mechanisms of Hedgehog signalling in cancer, *Growth Factors* 29 (6) (2011) 221–234.
54. H. Ding, D. Zhou, S. Hao, L. Zhou, W. He, J. Nie, F.F. Hou, Y. Liu, Sonic hedgehog signaling mediates epithelial–mesenchymal communication and promotes renal fibrosis, *J. Am. Soc. Nephrol.* 23 (5) (2012) 801–813.
55. Chao Tang, Liu Mei, Liyu Pan, Wenyi Xiong, Haibin Zhu, Hongfeng Ruan, Chaochun Zou, Lanfang Tang, Takuma Iguchi, Ximei Wu. Hedgehog signaling through GLI1 and GLI2 is required for epithelial–mesenchymal transition in human trophoblasts. *Biochimica et Biophysica Acta.* (2015) 1438-1448.
56. Guttmacher, A. E., Maddox, Y. T., and Spong, C. Y. (2014) The Human Placenta Project: placental structure, development, and function in real time. *Placenta* 35, 303–304
57. Morrish, D. W., Dakour, J., and Li, H. (1998) Functional regulation of human trophoblast differentiation. *J. Reprod. Immunol.* 39, 179–195
58. Hughes, M., Dobric, N., Scott, I. C., Su, L., Starovic, M., St-Pierre, B., Egan, S. E., Kingdom, J. C., and Cross, J. C. (2004) The Hand1, Stra13 and Gcm1 transcription factors override FGF signaling to promote terminal differentiation of trophoblast stem cells. *Dev. Biol.* 271, 26–37
59. Chao T, Lanfang T, Xiaokai W, Wenyi X et al. Glioma-associated Oncogene 2 Is Essential for Trophoblastic Fusion by Forming a Transcriptional Complex with Glial Cell Missing-a. *JBC Papers in Press.* (2014) 5620-21
60. Bai, C.B.; Auerbach, W.; Lee, J.S.; Stephen, D.; Joyner, A.L. Gli2, but not Gli1, is required for initial Shh signaling and ectopic activation of the Shh pathway. *Development* 2002, 129, 4753–4761.
61. Mo, R.; Freer, A.M.; Zinyk, D.L.; Crackower, M.A.; Michaud, J.; Heng, H.H.; Chik, K.W.; Shi, X.M.; Tsui, L.C.; Cheng, S.H.; et al. Specific and redundant functions of Gli2 and Gli3 zinc finger genes in skeletal patterning and development. *Development* 1997, 124, 113–123.
62. Ding, Q.; Motoyama, J.; Gasca, S.; Mo, R.; Sasaki, H.; Rossant, J.; Hui, C.C. Diminished Sonic hedgehog signaling and lack of floor plate differentiation in Gli2 mutant mice. *Development* 1998, 125, 2533–2543.
63. Hui, C.C.; Joyner, A.L. A mouse model of greig cephalopolysyndactyly syndrome: The extra-toes J mutation contains an intragenic deletion of the Gli3 gene. *Nat. Genet.* 1993, 3, 241–246.

64. Stamatakis, D. A gradient of Gli activity mediates graded Sonic Hedgehog signaling in the neural tube. *Genes Dev.* 2005, *19*, 626–641.
65. Saunders, J. W. Jr & Gasseling, M. T. 1968. Ectodermal-mesenchymal interactions in the origin of limb symmetry. In: *Epithelial-Mesenchymal Interactions* (eds R. Fleischmajer & R. E. Billingham), pp. 78–97, Williams & Wilkins, Baltimore.
66. Litingtung, Y.; Dahn, R.D.; Li, Y.; Fallon, J.F.; Chiang, C. Shh and Gli3 are dispensable for limb skeleton formation but regulate digit number and identity. *Nature* 2002, *418*, 979–983.
67. Mo, R.; Freer, A.M.; Zinyk, D.L.; Crackower, M.A.; Michaud, J.; Heng, H.H.; Chik, K.W.; Shi, X.M.; Tsui, L.C.; Cheng, S.H.; et al. Specific and redundant functions of Gli2 and Gli3 zinc finger genes in skeletal patterning and development. *Development* 1997, *124*, 113–123.
68. Greig DM: Oxycephaly. *Edinb Med J* 1926, *33*:189-218
69. Duncan PA, Klein RM, Wilmot PL, Shapiro LR: Greig cephalopolysyndactyly syndrome. *Am J Dis Child* 1979, *133*:818-821.
70. Mendoza-Londono R, Kashork CD, Shaffer LG, Krance R, Plon SE: Acute lymphoblastic leukemia in a patient with Greig cephalopolysyndactyly and interstitial deletion of chromosome 7 del(7)(p11.2 p14) involving the GLI3 and ZNFN1A1 genes. *Genes Chromosomes Cancer* 2005, *42*:82-86.
71. Johnston JJ, Olivos-Glander I, Killoran C, Elson E, Turner JT, Peters KF, Abbott MH, Aughton DJ, Aylsworth AS, Bamshad MJ, et al.: Molecular and clinical analyses of Greig cephalopolysyndactyly and Pallister-Hall syndromes: Robust phenotype prediction from the type and position of GLI3 mutations. *Am J HumGenet* 2005, *76*:609-622.
72. Johnston JJ, Olivos-Glander I, Killoran C et al. (2005) Molecular and clinical analyses of Greig cephalopolysyndactyly and Pallister–Hall syndromes: robust phenotype prediction from the type and position of GLI3 mutations. *American Journal of Human Genetics* *76*(4): 609–622.
73. Hall, J. G. et al. Congenital hypothalamic hamartoblastoma, hypopituitarism, imperforate anus, and postaxial polydactyly—a new syndrome? Part I: clinical, causal, and pathogenetic considerations. *Am. J. Med. Genet.* *7*, 47–74 (1980).
74. Kang S, Allen J, Graham JM Jr., et al. Linkage mapping and phenotypic analysis of autosomal dominant Pallister-Hall syndrome. *J Med Genet* 1997;*34*:441–446
75. Biesecker LG, Graham JM Jr. Pallister-Hall syndrome. *J Med Genet* 1996;*33*:585–589



76. Gallagher AR, Germino GG, Somlo S. Molecular advances in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Adv Chronic Kidney Dis.* 2010; 17:118–130.
77. Al-Bhalal L, Akhtar M. Molecular basis of autosomal recessive polycystic kidney disease (ARPKD). *Adv Anat Pathol.* 2008; 15:54–58.
78. Gallagher AR, Germino GG, Somlo S. Molecular advances in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Adv Chronic Kidney Dis.* 2010; 17:118–130. [PubMed: 20219615]
79. Senee V, Chelala C, Duchatelet S et al (2006) Mutations in GLIS3 are responsible for a rare syndrome with neonatal diabetes mellitus and congenital hypothyroidism. *Nat Genet* 38:682–687
80. Nogueira TC, Paula FM, Villate O et al (2013) GLIS3, a susceptibility gene for type 1 and type 2 diabetes, modulates pancreatic beta cell apoptosis via regulation of a splice variant of the BH3-only protein Bim. *PLoS Genet* 9:e1003532
81. Saunier S, Salomon R, Antignac C (2005) Nephronophthisis. *Curr Opin Genet Dev* 15:324–331
82. Hildebrandt F, Zhou W. Nephronophthisis-associated ciliopathies. *J Am Soc Nephrol.* 2007; 18:1855–1871.
83. Dimitri P, Warner JT, Minton JA, Patch AM, Ellard S, Hattersley AT, Barr S, Hawkes D, Wales JK, Gregory JW. Novel GLIS3 mutations demonstrate an extended multisystem phenotype. *Eur J Endocrinol.* 2011; 164:437–443. [PubMed: 21139041]
84. Welshons WJ, Russell LB (1959) The Y-chromosome as the bearer of male determining factors in the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 45:560–566
85. Koopman P, Gubbay J, Vivian N, Goodfellow P, Lovell-Badge R (1991) Male development of chromosomally female mice transgenic for Sry. *Nature* 351:117–121
86. Kobayashi A, Behringer RR (2003) Developmental genetics of the female reproductive tract in mammals. *Nat Rev Genet* 4:969–980
87. Sex and hedgehog: roles of genes in the hedgehog signaling pathway in mammalian sexual differentiation Heather L. Franco & Humphrey H.-C. Yao ??
88. Barsoum I, Yao HHC (2011) Redundant and differential roles of transcription factors Gli1 and Gli2 in the development of mouse fetal Leydig cells. *Biol Reprod* 84:894–899
89. Fan J, Akabane H, Zheng X, Zhou X, Zhang L, Liu Q, Zhang YL, Yang J, Zhu GZ (2007) Male germ cell-specific expression of a novel Patched-domain containing gene Ptchd3. *Biochem Biophys Res Commun* 363:757–761

90. Kroft TL, Patterson J, Won Yoon J, Doglio L, Walterhouse DO, Iannaccone PM, Goldberg E (2001) GLI1 localization in the germinal epithelial cells alternates between cytoplasm and nucleus: upregulation in transgenic mice blocks spermatogenesis in pachytene. *Biol Reprod* 65:1663–1671
91. Clark AM, Garland KK, Russell LD (2000) Desert hedgehog (Dhh) gene is required in the mouse testis for formation of adult-type Leydig cells and normal development of peritubular cells and seminiferous tubules. *Biol Reprod* 63:1825–1838
92. Pierucci-Alves F, Clark AM, Russell LD (2001) A developmental study of the Desert hedgehog-null mouse testis. *Biol Reprod* 65:1392–1402
93. Clark AM, Garland KK, Russell LD (2000) Desert hedgehog (Dhh) gene is required in the mouse testis for formation of adult-type Leydig cells and normal development of peritubular cells and seminiferous tubules. *Biol Reprod* 63:1825–1838
94. Park SY, Tong M, Jameson JL (2007) Distinct roles for steroidogenic factor 1 and desert hedgehog pathways in fetal and adult Leydig cell development. *Endocrinology* 148:3704–3710
95. Barsoum IB, Bingham NC, Parker KL, Jorgensen JS, Yao HHC (2009) Activation of the hedgehog pathway in the mouse fetal ovary leads to ectopic appearance of fetal Leydig cells and female pseudohermaphroditism. *Dev Biol* 329:96–103
96. Russell MC, Cowan RG, Harman RM, Walker AL, Quirk SM (2007) The hedgehog signaling pathway in the mouse ovary. *Biol Reprod* 77:226–236
97. Spicer LJ, Sudo S, Aad PY, Wang LS, Chun SY, Ben-Shlomo I, Klein C, Hsueh AJ (2009) The hedgehog-patched signaling pathway and function in the mammalian ovary: a novel role for hedgehog proteins in stimulating proliferation and steroidogenesis of theca cells. *Reproduction* 138:329–339
98. Zhao, H.; Feng, J.; Seidel, K.; Shi, S.; Klein, O.; Sharpe, P.; Chai, Y. Secretion of shh by a neurovascular bundle niche supports mesenchymal stem cell homeostasis in the adult mouse incisor. *Cell Stem Cell* 2014, 14, 160–173.
99. Kusano, K.F.; Pola, R.; Murayama, T.; Curry, C.; Kawamoto, A.; Iwakura, A.; Shintani, S.; Ii, M.; Asai, J.; Tkebuchava, T.; et al. Sonic hedgehog myocardial gene therapy: Tissue repair through transient reconstitution of embryonic signaling. *Nat. Med.* 2005, 11, 1197–1204.
100. Bonifas, J.M.; Pennypacker, S.; Chuang, P.T.; McMahan, A.P.; Williams, M.; Rosenthal, A.; De Sauvage, F.J.; Epstein, E.H., Jr. Activation of expression of hedgehog target genes in basal cell carcinomas. *J. Investig. Dermatol.* 2001, 116, 739–742.

101. Ehtesham, M.; Sarangi, A.; Valadez, J.G.; Chanthaphaychith, S.; Becher, M.W.; Abel, T.W.; Thompson, R.C.; Cooper, M.K. Ligand-dependent activation of the hedgehog pathway in Glioma progenitor cells. *Oncogene* 2007, 26, 5752–5761.
102. Giroux Leprieur, E.; Vieira, T.; Antoine, M.; Rozensztajn, N.; Rabbe, N.; Ruppert, A.M.; Lavole, A.; Cadranet, J.; Wislez, M. Sonic Hedgehog Pathway Activation Is Associated With Resistance to Platinum-Based Chemotherapy in Advanced Non-Small-Cell Lung Carcinoma. *Clin. Lung Cancer* 2016, 17, 301–308.
103. Ji, Z.; Mei, F.C.; Xie, J.; Cheng, X. Oncogenic KRAS activates hedgehog signaling pathway in pancreatic cancer cells. *J. Biol. Chem.* 2007, 282, 14048–14055.
104. Noman, A.S.; Uddin, M.; Rahman, M.Z.; Nayeem, M.J.; Alam, S.S.; Khatun, Z.; Wahiduzzaman, M.; Sultana, A.; Rahman, M.L.; Ali, M.Y.; et al. Overexpression of sonic hedgehog in the triple negative breast cancer: Clinicopathological characteristics of high burden breast cancer patients from Bangladesh. *Sci. Rep.* 2016, 6, 18830.
105. Rudin, C.M.; Hann, C.L.; Laterra, J.; Yauch, R.L.; Callahan, C.A.; Fu, L.; Holcomb, T.; Stinson, J.; Gould, S.E.; Coleman, B.; et al. Treatment of medulloblastoma with hedgehog pathway inhibitor GDC-0449. *N. Engl. J. Med.* 2009, 361, 1173–1178.
106. Trnski, D.; Sabol, M.; Gojevic, A.; Martinic, M.; Ozretic, P.; Musani, V.; Ramic, S.; Levanat, S. GSK3 $\beta$  and Gli3 play a role in activation of Hedgehog-Gli pathway in human colon cancer—Targeting GSK3 $\beta$  downregulates the signaling pathway and reduces cell proliferation. *Biochim. Biophys. Acta* 2015, 1852, 2574–2584.
107. Shaw, A.; Gipp, J.; Bushman, W. The Sonic Hedgehog pathway stimulates prostate tumor growth by paracrine signaling and recapitulates embryonic gene expression in tumor myofibroblasts. *Oncogene* 2009, 28, 4480–4490.
108. Lo, H.W.; Zhu, H.; Cao, X.; Aldrich, A.; Ali-Osman, F. A novel splice variant of GLI1 that promotes glioblastoma cell migration and invasion. *Cancer Res.* 2009, 69, 6790–6798.
109. Katoh, Y.; Katoh, M. Hedgehog target genes: Mechanisms of carcinogenesis induced by aberrant hedgehog signaling activation. *Curr. Mol. Med.* 2009, 9, 873–886.
110. Aberger, F.; Kern, D.; Greil, R.; Hartmann, T.N. Canonical and Noncanonical Hedgehog/GLI Signaling in Hematological Malignancies. In *Vitamins & Hormones*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2012; Volume 88, pp. 25–54, ISBN 978-0-12-394622-5.

111. Brennan, D.; Chen, X.; Cheng, L.; Mahoney, M.; Riobo, N.A. Noncanonical Hedgehog Signaling. In *Vitamins & Hormones*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2012; Volume 88, pp. 55–72, ISBN 978-0-12-394622-5.
112. Gu, D.; Xie, J. Non-Canonical Hh Signaling in Cancer—Current Understanding and Future Directions. *Cancers* 2015, 7, 1684–1698.
113. Bermudez, O.; Hennen, E.; Koch, I.; Lindner, M.; Eickelberg, O. Gli1 mediates lung cancer cell proliferation and Sonic Hedgehog-dependent mesenchymal cell activation. *PLoS ONE* 2013, 8, e63226.
114. Bora-Singhal, N.; Perumal, D.; Nguyen, J.; Chellappan, S. Gli1-Mediated Regulation of Sox2 Facilitates Self-Renewal of Stem-Like Cells and Confers Resistance to EGFR Inhibitors in Non-Small Cell Lung Cancer. *Neoplasia* 2015, 17, 538–551.
115. Fan, L.; Pepicelli, C.V.; Dibble, C.C.; Catbagan, W.; Zarycki, J.L.; Laciak, R.; Gipp, J.; Shaw, A.; Lamm, M.L.G.; Munoz, A.; et al. Hedgehog signaling promotes prostate xenograft tumor growth. *Endocrinology* 2004, 145, 3961–3970.
116. Sheridan, C.; Kishimoto, H.; Fuchs, R.K.; Mehrotra, S.; Bhat-Nakshatri, P.; Turner, C.H.; Goulet, R., Jr.; Badve, S.; Nakshatri, H. CD44+/CD24- breast cancer cells exhibit enhanced invasive properties: An early step necessary for metastasis. *Breast Cancer Res. BCR* 2006, 8, R59.
117. Tanaka, H.; Nakamura, M.; Kameda, C.; Kubo, M.; Sato, N.; Kuroki, S.; Tanaka, M.; Katano, M. The Hedgehog signaling pathway plays an essential role in maintaining the CD44+CD24-/low subpopulation and the side population of breast cancer cells. *Anticancer Res.* 2009, 29, 2147–2157.
118. Jeng, K.S.; Sheen, I.S.; Jeng, W.J.; Yu, M.C.; Hsiau, H.I.; Chang, F.Y. High expression of Sonic Hedgehog signaling pathway genes indicates a risk of recurrence of breast carcinoma. *OncoTargets Ther.* 2013, 7, 79–86.
119. Noman, A.S.; Uddin, M.; Chowdhury, A.A.; Nayeem, M.J.; Raihan, Z.; Rashid, M.I.; Azad, A.K.; Rahman, M.L.; Barua, D.; Sultana, A.; et al. Serum sonic hedgehog (SHH) and interleukin-(IL-6) as dual prognostic biomarkers in progressive metastatic breast cancer. *Sci. Rep.* 2017, 7, 1796.
120. Ge, X.; Lyu, P.; Gu, Y.; Li, L.; Li, J.; Wang, Y.; Zhang, L.; Fu, C.; Cao, Z. Sonic hedgehog stimulates glycolysis and proliferation of breast cancer cells: Modulation of PFKFB3 activation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2015, 464, 862–868.
121. Ten Haaf, A.; Bektas, N.; von Serenyi, S.; Losen, I.; Arweiler, E.C.; Hartmann, A.; Knuchel, R.; Dahl, E. Expression of the glioma-associated oncogene homolog (GLI)

- 1 in human breast cancer is associated with unfavourable overall survival. *BMC Cancer* 2009, 9, 298.
122. Im, S.; Choi, H.J.; Yoo, C.; Jung, J.H.; Jeon, Y.W.; Suh, Y.J.; Kang, C.S. Hedgehog related protein expression in breast cancer: Gli-2 is associated with poor overall survival. *Korean J. Pathol.* 2013, 47, 116–123.
  123. Lei, J.; Fan, L.; Wei, G.; Chen, X.; Duan, W.; Xu, Q.; Sheng, W.; Wang, K.; Li, X. Gli-1 is crucial for hypoxia-induced epithelial-mesenchymal transition and invasion of breast cancer. *Tumour Biol. J. Int. Soc. Oncodev. Biol. Med.* 2015, 36, 3119–3126.
  124. Abdullah, L.N.; Chow, E.K. Mechanisms of chemoresistance in cancer stem cells. *Clin. Transl. Med.* 2013, 2, 3.
  125. 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. USA* 2007, 104, 8455–8460.
  126. Hou, X.; Chen, X.; Zhang, P.; Fan, Y.; Ma, A.; Pang, T.; Song, Z.; Jin, Y.; Hao, W.; Liu, F.; et al. Inhibition of hedgehog signaling by GANT58 induces apoptosis and shows synergistic antitumor activity with AKT inhibitor in acute T cell leukemia cells. *Biochimie* 2014, 101, 50–59.
  127. Hyman, J.M.; Firestone, A.J.; Heine, V.M.; Zhao, Y.; Ocasio, C.A.; Han, K.; Sun, M.; Rack, P.G.; Sinha, S.; Wu, J.J.; et al. Small-molecule inhibitors reveal multiple strategies for Hedgehog pathway blockade. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2009, 106, 14132–14137.
  128. Kuo-Shyang J, Chi-Juei J, I-Shyan S, Szu-Hua W et al. Glioma-Associated Oncogene Homolog Inhibitors Have the Potential of Suppressing Cancer Stem Cells of Breast Cancer .*International Journal of Molecular Sciences* (2018)
  129. Rosen DG, Yang G, Liu G, et al. Ovarian cancer: pathology, biology, and disease models. *Front Biosci* 2009;14:2089-102.
  130. B Cao L, Shao M, Schilder J, et al. Tissue transglutaminase links TGF- $\beta$ , epithelial to mesenchymal transition and a stem cell phenotype in ovarian cancer. *Oncogene* 2012;31:2521-34.
  131. Liao X, Siu MK, Au CW, et al. Aberrant activation of hedgehog signaling pathway in ovarian cancers: effect on prognosis, cell invasion and differentiation. *Carcinogenesis* 2009;30:131-40.
  132. Yang L, He J, Huang S, et al. Activation of hedgehog signaling is not a frequent event in ovarian cancers. *Mol Cancer* 2009;8:112.

133. Schmid S, Bieber M, Zhang F, et al. Wnt and hedgehog gene pathway expression in serous ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer* 2011;21:975-80.
134. Chen X, Horiuchi A, Kikuchi N, et al. Hedgehog signal pathway is activated in ovarian carcinomas, correlating with cell proliferation: its inhibition leads to growth suppression and apoptosis. *Cancer Sci* 2007;98:68-76.
135. McCann CK, Growdon WB, Kulkarni-Datar K, et al. Inhibition of Hedgehog signaling antagonizes serous ovarian cancer growth in a primary xenograft model. *PLoS One* 2011;6:e28077.
136. 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. USA* 2007, 104, 8455–8460.
137. Huang, L.; Walter, V.; Hayes, D.N.; Onaitis, M. Hedgehog-GLI signaling inhibition suppresses tumor growth in squamous lung cancer. *Clin. Cancer Res.* 2014, 20, 1566–1575.
138. Benvenuto, M.; Masuelli, L.; De Smaele, E.; Fantini, M.; Mattera, R.; Cucchi, D.; Bonanno, E.; Di Stefano, E.; Frajese, G.V.; Orlandi, A.; et al. In vitro and in vivo inhibition of breast cancer cell growth by targeting the Hedgehog/GLI pathway with SMO (GDC-0449) or GLI (GANT-61) inhibitors. *Oncotarget* 2016, 7, 9250–9270
139. 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. USA* 2007, 104, 8455–8460.
140. Wickstrom, M.; Dyberg, C.; Shimokawa, T.; Milosevic, J.; Baryawno, N.; Fuskevag, O.M.; Larsson, R.; Kogner, P.; Zaphiropoulos, P.G.; Johnsen, J.I. Targeting the hedgehog signal transduction pathway at the level of GLI inhibits neuroblastoma cell growth in vitro and in vivo. *Int. J. Cancer* 2013, 132, 1516–1524.
141. Kim, J.; Lee, J.J.; Kim, J.; Gardner, D.; Beachy, P.A. Arsenic antagonizes the Hedgehog pathway by preventing ciliary accumulation and reducing stability of the Gli2 transcriptional effector. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2010, 107, 13432–13437.
142. Didiasova, M.; Singh, R.; Wilhelm, J.; Kwapiszewska, G.; Wujak, L.; Zakrzewicz, D.; Schaefer, L.; Markart, P.; Seeger, W.; Lauth, M.; et al. Pirfenidone exerts antifibrotic effects through inhibition of GLI transcription factors. *FASEB J.* 2017, 31, 1916–1928.
143. Miura, Y.; Saito, T.; Tanaka, T.; Takoi, H.; Yatagai, Y.; Inomata, M.; Nei, T.; Saito, Y.; Gemma, A.; Azuma, A. Reduced incidence of lung cancer in patients with

- idiopathic pulmonary fibrosis treated with pirfenidone. *Respir. Investig.* 2018, 56, 72–79.
144. Hyman, J.M.; Firestone, A.J.; Heine, V.M.; Zhao, Y.; Ocasio, C.A.; Han, K.; Sun, M.; Rack, P.G.; Sinha, S.; Wu, J.J.; et al. Small-molecule inhibitors reveal multiple strategies for Hedgehog pathway blockade. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2009, 106, 14132–14137.
145. 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. USA* 2007, 104, 8455–8460.
146. Infante, P.; Mori, M.; Alfonsi, R.; Ghirga, F.; Aiello, F.; Toscano, S.; Ingallina, C.; Siler, M.; Cucchi, D.; Po, A.; et al. Gli1/DNA interaction is a druggable target for Hedgehog-dependent tumors. *EMBO J.* 2015, 34, 200–217.
147. Didiasova, M.; Singh, R.; Wilhelm, J.; Kwapiszewska, G.; Wujak, L.; Zakrzewicz, D.; Schaefer, L.; Markart, P.; Seeger, W.; Lauth, M.; et al. Pirfenidone exerts antifibrotic effects through inhibition of GLI transcription factors. *FASEB J.* 2017, 31, 1916–1928.
148. Hyman, J.M.; Firestone, A.J.; Heine, V.M.; Zhao, Y.; Ocasio, C.A.; Han, K.; Sun, M.; Rack, P.G.; Sinha, S.; Wu, J.J.; et al. Small-molecule inhibitors reveal multiple strategies for Hedgehog pathway blockade. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2009, 106, 14132–14137.
149. Li, B.; Fei, D.L.; Flaveny, C.A.; Dahmane, N.; Baubet, V.; Wang, Z.; Bai, F.; Pei, X.H.; Rodriguez-Blanco, J.; Hang, B.; et al. Pyrvinium attenuates Hedgehog signaling downstream of smoothened. *Cancer Res.* 2014, 74, 4811–4821.
150. Wolff, F.; Loipetzberger, A.; Gruber, W.; Esterbauer, H.; Aberger, F.; Frischauf, A.M. Imiquimod directly inhibits Hedgehog signalling by stimulating adenosine receptor/protein kinase A-mediated GLI phosphorylation. *Oncogene* 2013, 32, 5574–5581.
151. Nayak, A.; Satapathy, S.R.; Das, D.; Siddharth, S.; Tripathi, N.; Bharatam, P.V.; Kundu, C. Nanoquinacrine induced apoptosis in cervical cancer stem cells through the inhibition of hedgehog-GLI1 cascade: Role of GLI-1. *Sci. Rep.* 2016, 6, 20600.
152. *Front Biosci (Elite Ed)*. 2011 Jan 1;3:233-9. Development of placenta in a rodent-model for human placentation. Serman A1, Serman L.

153. Cain, J.E.; Islam, E.; Haxho, F.; Blake, J.; Rosenblum, N.D. GLI3 repressor controls functional development of the mouse ureter. *J. Clin. Invest.* 2011, 121, 1199–1206.
154. Cain, J.E.; Islam, E.; Haxho, F.; Chen, L.; Bridgewater, D.; Nieuwenhuis, E.; Hui, C.-C.; Rosenblum, N.D. GLI3 repressor controls nephron number via regulation of Wnt11 and Ret in ureteric tip cells. *PLoS ONE* 2009, 4, e7313.
155. Hu, M.C.; Mo, R.; Bhella, S.; Wilson, C.W.; Chuang, P.-T.; Hui, C.-C.; Rosenblum, N.D. GLI3-dependent transcriptional repression of Gli1, Gli2 and kidney patterning genes disrupts renal morphogenesis. *Development* 2006, 133, 569–578.
156. Buttitta, L. Interplays of Gli2 and Gli3 and their requirement in mediating Shh-dependent sclerotome induction. *Development* 2003, 130, 6233–6243.
157. Motoyama, J.; Liu, J.; Mo, R.; Ding, Q.; Post, M.; Hui, C.C. Essential function of Gli2 and Gli3 in the formation of lung, trachea and oesophagus. *Nat. Genet.* 1998, 20, 54–57.
158. Pan, Y.B.; Gong, Y.; Ruan, H.F.; Pan, L.Y.; Wu, X.K.; Tang, C.; Wang, C.J.; Zhu, H.B.; Zhang, Z.M.; Tang, L.F.; et al. Sonic hedgehog through Gli2 and Gli3 is required for the proper development of placental labyrinth. *Cell Death Dis.* 2015, 6, e1653.
159. Hatsell, S.J.; Cowin, P. Gli3-mediated repression of Hedgehog targets is required for normal mammary development. *Development* 2006, 133, 3661–3670.
160. Lewis, M.T.; Ross, S.; Strickland, P.A.; Sugnet, C.W.; Jimenez, E.; Hui, C.; Daniel, C.W. The Gli2 transcription factor is required for normal mouse mammary gland development. *Dev. Biol.* 2001, 238, 133–144.
161. Barsoum, I.; Yao, H.H.C. Redundant and Differential Roles of Transcription Factors Gli1 and Gli2 in the Development of Mouse Fetal Leydig Cells. *Biol. Reprod.* 2011, 84, 894–899.
162. Hager-Theodorides, A.L.; Dessens, J.T.; Outram, S.V.; Crompton, T. The transcription factor Gli3 regulates differentiation of fetal CD4- CD8- double-negative thymocytes. *Blood* 2005, 106, 1296–1304.
163. Rowbotham, N.J.; Hager-Theodorides, A.L.; Furmanski, A.L.; Ross, S.E.; Outram, S.V.; Dessens, J.T.; Crompton, T. Sonic hedgehog negatively regulates pre-TCR-induced differentiation by a Gli2-dependent mechanism. *Blood* 2009, 113, 5144–5156.



164. Solanki, A.; Yanez, D.C.; Ross, S.; Lau, C.-I.; Papaioannou, E.; Li, J.; Saldaña, J.I.; Crompton, T. Gli3 in fetal thymic epithelial cells promotes thymocyte positive selection and differentiation by repression of Shh. *Development* 2018, 145.
165. Park, H.L.; Bai, C.; Platt, K.A.; Matisse, M.P.; Beeghly, A.; Hui, C.C.; Nakashima, M.; Joyner, A.L. Mouse Gli1 mutants are viable but have defects in SHH signaling in combination with a Gli2 mutation. *Development* 2000, 127, 1593–1605.
166. Mill, P.; Mo, R.; Fu, H.; Grachtchouk, M.; Kim, P.C.W.; Dlugosz, A.A.; Hui, C. Sonic hedgehog-dependent activation of Gli2 is essential for embryonic hair follicle development. *Genes Dev.* 2003, 17, 282–294.
167. Paradinas FJ, Elston CW (2003) Gestational trophoblastic disease. In: H Fox and M Wells, editors. *Haines and Taylor: obstetrical and gynaecological pathology*. Edinburgh: Churchill Livingstone. 1359–1430.
168. Lewis JL Jr (1993) Diagnosis and management of gestational trophoblastic disease. *Cancer* 71: 1639–1647.
169. Shih Ie M, Kuo KT (2008) Power of the eternal youth: Nanog expression in the gestational choriocarcinoma. *Am J Pathol* 173: 911–914.
170. Ruiz i Altaba A, Sanchez P, Dahmane N (2002) Gli and hedgehog in cancer: tumours, embryos and stem cells. *Nat Rev Cancer* 2: 361–372.
171. Downregulation of the Gli Transcription Factors Regulator Kif7 Facilitates Cell Survival and Migration of Choriocarcinoma Cells Joanna Ho<sup>1</sup>, Yanan Du<sup>1</sup>, Oscar Gee-Wan Wong<sup>1</sup>, Michelle K. Y. Siu<sup>2</sup>, Karen K. L. Chan<sup>2</sup>, Annie N. Y. Cheung<sup>1,3\*</sup>
172. Pasca di Magliano M, Hebrok M (2003) Hedgehog signalling in cancer formation and maintenance. *Nat Rev Cancer* 3: 903–911.

## 9. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 11.01.1995. godine u Zagrebu. Završila sam Osnovnu školu Grgura Karlovčana 2010. godine u Đurđevcu. Iste godine završila sam Osnovnu glazbenu školu Alberta Štrige u Križevcima. Maturirala sam 2013. godine u Gimnaziji Dr. Ivana Kranjčeva u Đurđevcu te iste godine upisala Medicinski fakultet u Zagrebu. Treniram streljaštvo te sam četiri puta osvojila prvo mjesto na Sveučilišnom natjecanju u Zagrebu. Zajedno s dvoje kolega vodim Studentsku sekciju za otorinolaringologiju i kirurgiju glave i vrata. Govorim engleski, njemački i talijanski. U osmom mjesecu odradit ću stručnu praksu u Izmiru na odjelu plastične kirurgije.