

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku  
Institut Ruđer Bošković, Zagreb  
Sveučilište u Dubrovniku  
Sveučilišni poslijediplomski interdisciplinarni doktorski studij  
Molekularne bioznanosti

Zvonimir Užarević

**Aktivnost signalnog puta Hh-Gli u estrogen ovisnim (MCF-7) i  
estrogen neovisnim (Sk-Br-3) staničnim linijama tumora dojke**

Doktorski rad

Osijek, 2011.

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku  
Institut Ruđer Bošković, Zagreb  
Sveučilište u Dubrovniku  
Sveučilišni poslijediplomski interdisciplinarni doktorski studij  
Molekularne bioznanosti

Zvonimir Užarević

**Aktivnost signalnog puta Hh-Gli u estrogen ovisnim (MCF-7) i  
estrogen neovisnim (Sk-Br-3) staničnim linijama tumora dojke**

Doktorski rad predložen  
Sveučilišnome Vijeću za poslijediplomske interdisciplinarne  
doktorske studije zbog stjecanja akademskoga stupnja  
doktora prirodnih znanosti-polje biologija

Osijek, 2011.

# SADRŽAJ

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA .....	VI
BASIC DOCUMENTATION CARD .....	VII
1. UVOD .....	1
1.1. Signalni put Hedgehog-Gli (Hh-Gli) .....	1
1.1.1. Povijesni pregled otkrića signalnog puta Hh-Gli .....	1
1.1.2. Glavne komponente signalnog puta Hh-Gli .....	4
1.1.2.1. Hedgehog gen/protein .....	4
1.1.2.2. Patched gen/protein .....	7
1.1.2.3. Smoothened gen/protein .....	8
1.1.2.4. Gli gen/protein .....	9
1.1.2.5. Ciljni geni signalnog puta Hh-Gli .....	10
1.2. Uloga signalnog puta Hh-Gli u embrionalnom razvoju sisavaca .....	11
1.3. Uloga signalnog puta Hh-Gli u odraslom organizmu .....	12
1.4. Uloga signalnog puta Hh-Gli u karcinogenezi .....	13
1.5. Ciklopamin .....	14
1.6. Estrogeni i estrogeni receptori .....	16
1.6.1. Estrogeni .....	16
1.6.2. Estrogeni receptori .....	17
1.7. Tamoksifen .....	20
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA .....	23
3. MATERIJALI I METODE .....	24
3.1. Materijali .....	24
3.2. Metode .....	24
3.2.1. Rad sa staničnim kulturama .....	24
3.2.1.1. Odmrzavanje stanica .....	24
3.2.1.2. Održavanje i presađivanje stanica u kulturi .....	25
3.2.1.3. Zamrzavanje stanica .....	25
3.2.2. Tretmani staničnih linija sa ciklopaminom, tomatidinom ili ligandom Shh .....	26
3.2.3. Tretmani staničnih linija sa ciklopaminom i tamoksifenom .....	26
3.2.4. Izdvajanje RNA iz stanica .....	27
3.2.5. Mjerenje koncentracija RNA .....	28

3.2.6. Izdvajanje proteina iz stanica .....	28
3.2.7. Mjerenje koncentracije proteina .....	29
3.2.8. Reverzna transkripcija .....	30
3.2.9. Kvantitativni real-time PCR .....	31
3.2.10. Transfekcija ubacivanjem pcDNA4nlSMtGLI1 plazmida .....	34
3.2.11. Western blot analiza .....	35
3.2.12. MTT test .....	38
4. REZULTATI .....	41
4.1. Bazalna aktivnost signalnog puta Hh-Gli u estrogen-ovisnim (MCF-7) i estrogen-neovisnim (Sk-Br-3) staničnim linijama tumora dojke .....	41
4.1.1. Bazalna ekspresija gena signalnog puta Hh-Gli .....	41
4.1.2. Bazalna ekspresija proteina signalnog puta Hh-Gli .....	42
4.2. Odgovor estrogen-ovisnih (MCF-7) i estrogen-neovisnih (Sk-Br-3) staničnih linija tumora dojke na inhibiciju i aktivaciju signalnog puta Hh-Gli .....	43
4.2.1. Praćenje rasta i vijabilnosti stanica .....	43
4.2.2. Inhibicija i aktivacija signalnog puta Hh-Gli na razini mRNA .....	44
4.2.3. Inhibicija i aktivacija signalnog puta Hh-Gli na razini proteina .....	46
4.3. Aktivacija Hh-Gli signalnog puta u estrogen-ovisnim (MCF-7) i estrogen-neovisnim (Sk-Br-3) staničnim linijama tumora dojke sa pcDNA4nlSMtGLI1 plazmidom .....	49
4.4. Odgovor estrogen-ovisne (MCF-7) i estrogen-neovisne (Sk-Br-3) stanične linije tumora dojke na tamoksifen .....	52
4.4.1. Praćenje rasta i vijabilnosti stanica .....	52
4.4.2. Ekspresija signalnog puta Hh-Gli na razini mRNA .....	54
4.4.3. Ekspresija signalnog puta Hh-Gli na razini proteina .....	56
4.5. Odgovor estrogen-ovisnih (MCF-7) i estrogen-neovisnih (Sk-Br-3) staničnih linija tumora dojke na kombinirane tretmane .....	59
4.5.1. Praćenje rasta i vijabilnosti stanica .....	59
4.5.2. Ekspresija signalnog puta Hh-Gli na razini mRNA .....	62
4.5.3. Ekspresija signalnog puta Hh-Gli na razini proteina .....	65
4.6. Odgovor estrogen-ovisnih (MCF-7) i estrogen-neovisnih (Sk-Br-3) staničnih linija tumora dojke na dodavanja ciklopamina i tamoksifena .....	67
4.6.1. Praćenje rasta i vijabilnosti stanica .....	67

4.6.2. Ekspresija signalnog puta Hh-Gli na razini mRNA .....	69
4.6.3. Ekspresija signalnog puta Hh-Gli na razini proteina .....	72
4.7. Zbirni prikaz rezultata .....	74
5. RASPRAVA .....	76
6. ZAKLJUČCI .....	82
7. LITERATURA .....	83
8. ŽIVOTOPIS I POPIS PUBLIKACIJA .....	99

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

---

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku  
Institut Ruđer Bošković, Zagreb  
Sveučilište u Dubrovniku  
Sveučilišni poslijediplomski interdisciplinarni  
doktorski studij Molekularne bioznanosti

Doktorski rad

Znanstveno područje: Prirodne znanosti  
Znanstveno polje: Biologija

### Aktivnost signalnog puta Hh-Gli u estrogen ovisnim (MCF-7) i estrogen neovisnim (Sk-Br-3) staničnim linijama tumora dojke

*Zvonimir Užarević*

Rad je izrađen na Institutu Ruđer Bošković, Zagreb

Mentori: dr. sc. *Sonja Levnat*, red.prof.  
dr. sc. *Lidija Beketić-Orešković*, dr. med., red. prof.

#### Sažetak

Tamoksifen je inhibitor estrogenskog receptora i koristi se u terapiji estrogen-ovisnih tumora dojke. Ciklopamin je inhibitor signalnog puta Hh-Gli koji je aktivan u tumorima dojke. Utvrđeno je da je signalni put Hh-Gli aktivan u obje stanične linije, estrogen-ovisnoj (MCF-7) i estrogen-neovisnoj (Sk-Br-3): na razini i ekspresije gena i proteina te da se odvija različitim mehanizmima. U estrogen-ovisnoj liniji signalni put Hh-Gli odvija se autokrino, stanica sama proizvodi ligand Shh. U estrogen-neovisnoj liniji signalni put se odvija parakrino. Hh-Gli signalni put može se pokrenuti u obje linije egzogeno, ligandom Shh, te endogeno, pri čemu u autokrinoj liniji dolazi do autostimulacije a u parakrinoj tek nakon dodatka liganda Shh. Tamoksifen ima zapaženo djelovanje u puno većoj dozi u estrogen-neovisnoj liniji. Također kombinacijom tretmana ciklopaminom i tamoksifenom kratkoročno se aktivira Hh-Gli put. Kombinirani tretman ciklopaminom i tamoksifenom, unatoč dobrim učincima svakog spoja zasebno, može imati neočekivane posljedice pri istovremenoj primjeni, jer omogućava preživljenje stanica ako se spojevi primjenjuju istovremeno. To je vrlo važno zapaženje za primjene u klinici.

**Broj stranica:** 102

**Broj slika:** 41

**Broj tablica:** 7

**Broj literaturnih navoda:** 206

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Ključne riječi:** signalni put Hh-Gli, estrogeni receptor, tamoksifen, ciklopamin, ekspresija

**Datum obrane:**

**Stručno povjerenstvo za obranu:** 25. listopada 2011.

- 1.
- 2.
- 3.

**Rad je pohranjen u:**

Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici u Zagrebu, Hrvatske bratske zajednice bb, Zagreb  
Sveučilištu u Zagrebu, Trg maršala Tita 14, Zagreb  
Sveučilištu u Rijeci, Riječke rezolucije 7, Rijeka  
Sveučilištu u Splitu, Livanjska 5, Split  
Sveučilištu Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Trg Sv. Trojstva 3, Osijek

## BASIC DOCUMENTATION CARD

---

University Josip Juraj Strossmayer Osijek  
Institute Ruder Bošković, Zagreb  
University of Dubrovnik  
University Postgraduate Interdisciplinary  
Doctoral Study Molecular biosciences

PhD thesis

Scientific Area: Natural sciences  
Scientific Field: Biology

### The Hh-Gli signaling pathway activity in estrogen dependent (MCF-7) and estrogen independent (Sk-Br-3) breast cancer cell lines

*Zvonimir Užarević*

Thesis performed at Institute Ruder Bošković, Zagreb

Supervisors: *Sonja Levnat, PhD, professor*  
*Lidija Beketić-Orešković, PhD, MD, professor*

#### Abstract

Tamoxifen is the inhibitor of estrogen receptor used in estrogen dependent breast cancer treatment. Cyclopamine is the inhibitor of the Hh-Gli signaling pathway active in breast cancer. It is determined that the Hh-Gli signaling pathway is active in both cell lines, estrogen dependent (MCF-7) and estrogen independent (Sk-Br-3), at the gene and protein expression level, but through different mechanisms. In estrogen dependent cell lines the Hh-Gli signaling pathway is autocrine, the cell produces Shh ligand by itself. In estrogen independent cell lines the pathway is paracrine. The Hh-Gli signaling pathway in both cell lines can be activated externally with Shh ligand and internally by autostimulation in autocrine line, whereas in paracrine line activation is possible only after Shh ligand is added. Tamoxifen in a greater dose has a notable effect in estrogen independent cell lines. Additionally, the Hh-Gli signaling pathway was shortly active after the treatment which combined cyclopamine and tamoxifen. Despite the good effects of each agents separately, a combination treatment including cyclopamine and tamoxifen can have unexpected consequences when used simultaneously, because cell viability is allowed when agents are applied at the same time. This is a very important implication for clinic application.

**Number of pages:** 102

**Number of figures:** 41

**Number of tables:** 7

**Number of references:** 206

**Original in:** Croatian

**Key words:** Hh-Gli signaling pathway, estrogen receptor, tamoxifen, cyclopamine, expression

**Date of the thesis defense:** 25. october 2011.

#### Reviewers:

- 1.
- 2.
- 3.

#### Thesis deposited in:

National and University Library, Hrvatske bratske zajednice bb, Zagreb  
University of Zagreb, Trg maršala Tita 14, Zagreb  
University of Rijeka, Riječke rezolucije 7, Rijeka  
University of Split, Livanjska 5, Split  
University Josip Juraj Strossmayer Osijek, Trg Sv. Trojstva 3, Osijek

Ovaj doktorski rad izrađen je u Laboratoriju za nasljedni rak Zavoda za molekularnu medicinu Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu pod vodstvom prof. dr. sc. Sonje Levanat i prof. dr. sc. Lidije Beketić-Orešković u sklopu projekta Ministarstva znanosti, obrazovanja i športa Republike Hrvatske „Prijenos signala u tumorima: Hh-Gli put, interakcije i potencijalne terapije“ kojega je voditelj prof. dr. sc. Sonja Levanat.

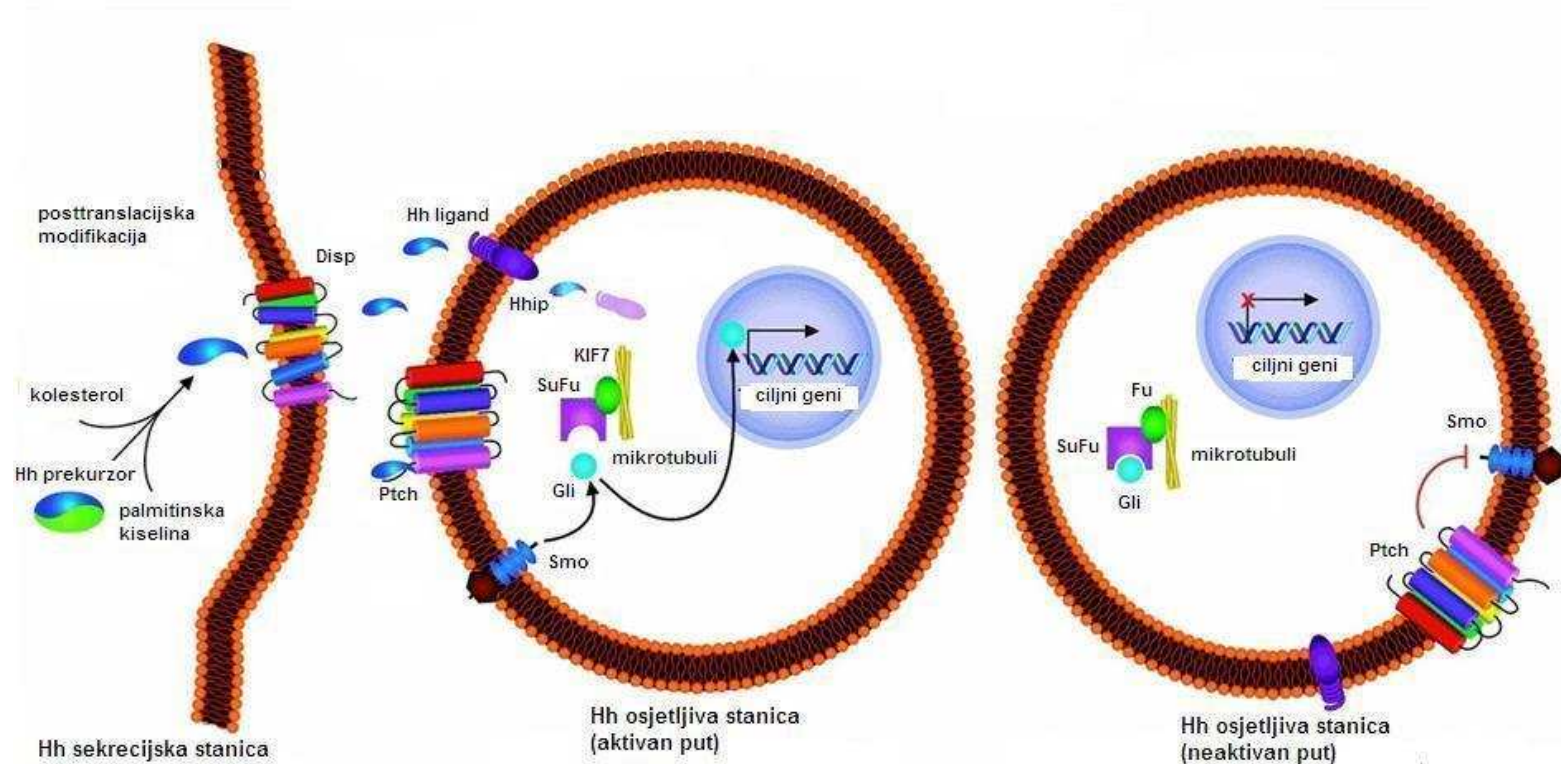


## 1.1. Signalni put Hedgehog-Gli (Hh-Gli)

### 1.1.1. Povijesni pregled otkrića signalnog puta Hh-Gli

Zadnjih desetak godina prošlog milenija većina tumor supresora otkrivena je zahvaljujući nasljednim oboljenjima koja sadrže rak u svojoj patogenezi. Tako je novi tumor supresor kloniran 1996. godine koji je uključen u razvoj nasljednog oboljenja pod nazivom Gorlinov sindrom. Tada se pokazalo da se radi o genu Patched (PTCH), ljudskom homologu gena već poznatog iz genetike vinske mušice *Drosophila melanogaster* (Johnson i sur, 1996). Iste godine pokazano je da je upravo protein kojeg kodira gen PTCH receptor za protein Hedgehog (Hh) (Stone i sur, 1996) te je ustanovljena povezanost između glavnih komponenti signalnog puta Hh-Gli: proteina Hh, Ptch i Smoothened (Smo) (Marigo i sur, 1996). Budući da je razvojna biologija imala veliku ulogu u otkrivanju spomenutih proteina, i kako se većina gena otkrila u vinskoj mušici na temelju razvojnih nepravilnosti, upravo su te nepravilnosti dovele do zanimljivih naziva ovih gena odnosno proteina. Gen HH (eng. hedgehog=jež) dobio je ime prema mutantima ličinke vinske mušice koja je imala „bodlje“ na leđnoj strani, a PTC i SMO prema izgledu žila u krilima vinske mušice (eng. patched=zakrpan; smoothened=izgladen). Godine 1987. ustanovljeno je da je ekspresija jednog proteina do 50 puta povećana u glioblastomima, te je otkriveni protein nazvan Gli (Kinzler i sur, 1987). Godinu dana kasnije otkriveni su i proteini Gli2 i Gli3 (Ruppert i sur, 1988). Ubrzo nakon otkrića navedenih proteina ustanovljeno je da su proteini Gli zapravo transkripcijski faktori (Kinzler i sur, 1988). Pavletich i Pabo (1993) razjašnjavaju kristalnu strukturu proteina Gli i njegovog vezanja na DNA. Kristalna struktura Sonic Hedgehog (Shh) razjašnjena je 1995. godine (Tanaka Hall i sur, 1995) dok kristalne strukture proteina Ptch i Smo još nisu razrješene. Cohen Jr. (2003) navodi da signalni put Hh-Gli nije u cijelosti razjašnjen i da se gotovo svakodnevno otkrivaju nove komponente ovog signalnog puta. Osim što je signalni put Hh-Gli primarno vezan uz embrionalni razvoj gdje ima važnu ulogu pri razvoju mnogih tkiva i organa, sve se više prepoznaje njegova uloga u razvoju tumora, te u održavanju somatskih i tumorskih matičnih stanica (Taipale i Beachy, 2001). Budući da je ovaj rad rađen

na humanim staničnim linijama tumorskih stanica dojke odnosno na stanicama sisavaca, usredotočiti ću se na građu i funkciju signalnog puta Hh-Gli kod sisavaca (slika 1.1.).



**Slika 1.1.** Pregled signalnog puta Hh-Gli kod sisavaca. U Hh sekrecijskoj stanici se posttranslacijski modificira Hh prekursor dodavanjem kolesterola i palmitata iz palmitinske kiseline. Protein Disp (eng. Dispatched) omogućava otpuštanje proteina Hh iz stanica u kojima nastaje. Vežanjem Hh liganda na svoj receptor Ptch, otpušta se represija Smo, što dovodi do otpuštanja Gli sa SuFu i translokacije Gli u jezgru, gdje on potiče transkripciju ciljnih gena. Dok nema stimulacije ligandom Hh, protein Ptch drži protein Smo reprimiranim, te ne dolazi do daljnjeg prijenosa signala i nema transkripcije ciljnih gena. U takvom slučaju Gli se zadržava u citoplazmi vezan za SuFu. Protein Hhip (eng. Hedgehog interacting protein) može vezati Hh protein i na taj način odvlačiti Hh protein od svojeg pravog receptora, te tako spriječiti aktivaciju signalnog puta Hh-Gli. (slika preuzeta i preuređena iz: Vamsidhar i Ramaswamy, 2007)

## 1.1.2. Glavne komponente signalnog puta Hh-Gli

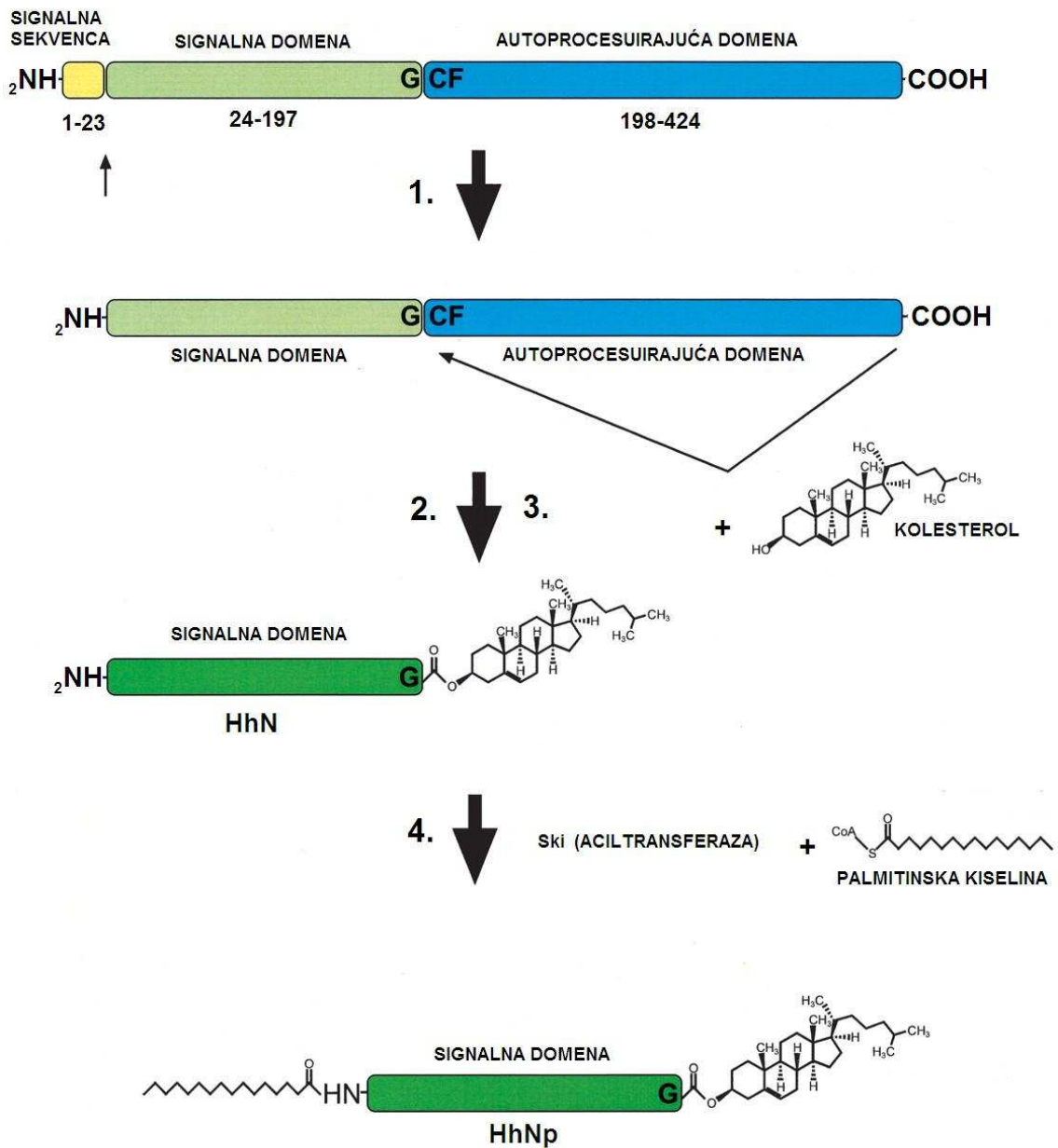
### 1.1.2.1. Hedgehog gen/protein

Gen Hedgehog (HH) je otkriven pri genetskim istraživanjima kojima je cilj bio razumijevanje pravilne segmentacije tijela vinske mušice (Nüsslein-Volhard i Wieschaus, 1980). Ovaj je gen visoko konzerviran od vinske mušice do čovjeka i danas se na njega gleda kao na ključni regulator pri embrionalnom razvoju (Varjosalo i Taipale, 2008). U kralješnjaka su otkrivena tri njegova homologa, a nazvani su: Sonic hedgehog (SHH), Indian hedgehog (IHH) i Desert hedgehog (DHH) (Echelard i sur, 1993; Krauss i sur, 1993; Riddle i sur, 1993; Marigo i sur, 1995). Sva tri produkta ekspresije ovih gena mogu se vezati za Ptch1 i aktivirati signalni put Hh-Gli (Pathi i sur, 2001). Shh je naširoko eksprimiran Hh protein i uključen je u razvoj različitih organa tijekom razvoja. Eksprimiran je pri razvoju središnjeg živčanog sustava, ekstremiteta, crijeva, pluća, zubi i folikula dlaka (Ingham i McMahon, 2001). Dhh i Ihh prvenstveno sudjeluju u razvoju kosti i sjemenika (Bitgood i sur, 1996; Day i Yang, 2008; Cool i Capel, 2009). Ihh također ima ulogu pri razvoju hrskavice, crijeva i mliječnih žlijezdi (Vortkamp i sur, 1996; St-Jacques i sur, 1999; van den Brink, 2007; Lewis i Veltmaat, 2004). Najčešći i najbolje okarakteriziran je produkt gena SHH odnosno protein Shh (slika 1.2.) (Murone i sur, 1999). Shh protein pokazuje najjaču aktivnost i najširi raspon u tkivima (Pathi i sur, 2001).



**Slika 1.2.** Kristalna struktura proteina Shh (slika preuzeta iz: Tanaka Hall i sur, 1995).

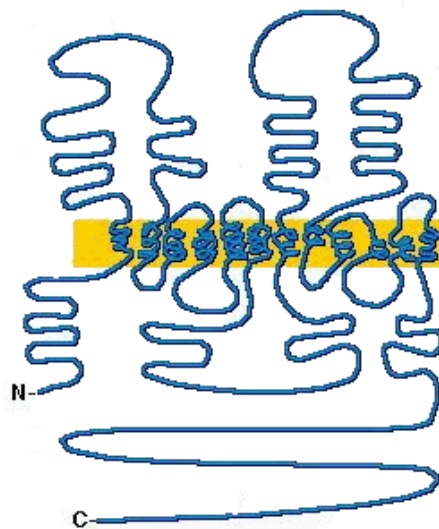
Hh proteini prolaze procese sazrijevanja prije nego se otpuste njihovi aktivni oblici iz stanica i potom mogu aktivirati Hh signalizaciju (slika 1.3.). Nakon translacije, prvo se uklanja N-terminalna signalna sekvenca sa polipeptida veličine oko 45 kDa koji se potom autokatalitički cijepa između glicina i cisteina pri čemu nastaje N-terminalni fragment. Na N-terminalni fragment se potom na njegovom C-kraju na glicin veže kolesterol pri čemu nastaje fragment veličine oko 19 kDa koji je povezan sa nizom poznatih signalizirajućih aktivnosti (Mann i Beachy, 2004). Nakon toga se za cistein na N-terminalnom kraju uz pomoć enzima Skinny (Ski) hedgehog aciltransferaze veže palmitoilna skupina palmitinske kiseline pri čemu nastaje aktivni Hh protein (Buglino i Resh, 2008). Takav aktivni Hh protein veže se na svoj transmembranski receptor Ptch, koji se pri tome aktivira i internalizira (Incardona i sur, 2000). Veliku ulogu ima i protein Dispatched (Disp), koji omogućava otpuštanje proteina Hh iz stanica u kojima nastaje (Burke i sur, 1999). Također, protein Hhip (eng. Hedgehog interacting protein) može vezati Hh protein i na taj način odvlačiti Hh od svojeg pravog receptora, te tako spriječiti aktivaciju signalnog puta (Vogt i sur, 2004).



**Slika 1.3.** Proces sazrijevanja Hh proteina: 1 - signalna sekvenca se odcijepi; 2, 3 - C-terminalna domena (autopocesuirajuća domena) Hh polipeptida potiče reakciju vezanja kolesterola za glicin pri čemu nastaje N-terminalna Hh signalna domena (HhN) koja je izmijenjena kolesterolom na C-terminalnom kraju. Vezani kolesterol na C-terminalnom kraju uzrokuje spajanje HhN sa membranom. 4 - dodavanje palmitoilne skupine palmitinske kiseline pomoću Skinny (Ski) hedgehog aciltransferaze na N-terminalni kraj rezultira nastanak dvostruko izmijenjene Hh signalne domene (HhNp). G-glicin, C-cistein, F-fenilalanin. (slika preuzeta i preuređena iz: Varjosalo i Taipale, 2008)

### 1.1.2.2. Patched gen/protein

Dva su homologa proteina Patched (Ptch1 i Ptch2) izolirana u kralješnjaka (Zaphiropoulous i sur, 1999). Oni vezuju Shh, Ihh i Dhh sličnim afinitetom i oba mogu oblikovati kompleks sa proteinom Smoothened (Smo) (Hooper i Scott, 1989; Stone i sur, 1996). Ptch1 je prvenstveno eksprimiran u mezenhimskim stanicama koje primaju Shh, dok je Ptch2 eksprimiran u epitelnim stanicama u kojima se proizvodi Shh protein (Motoyama i sur, 1998). Ptch1 je eksprimiran u svim glavnim Shh ciljnim tkivima, dok je raspodjela Ptch2 opažena gotovo isključivo u koži i sjemenicima (Hahn i sur, 1996; Motoyama i sur, 1998). Ljudski gen PTCH1 obuhvaća 34 kb, smješten je na kromosomu 9q22.3 i sadrži 23 eksona (Hahn i sur, 1996). Ptch1 je transmembranski protein koji ima 12 transmembranskih domena (slika 1.4.), dvije velike vanstanične petlje gdje se veže protein Hh i dvije velike unutarstanične petlje (Marigo i sur, 1996).



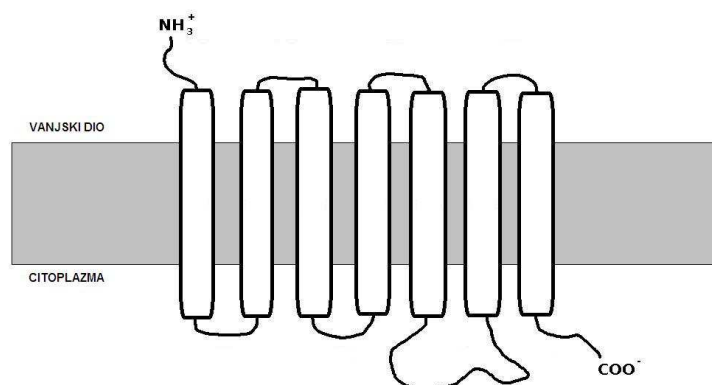
**Slika 1.4.** Shematski prikaz proteina Ptch. Žuto je označena stanična membrana kroz koju prolazi 12 transmembranskih domena.

Poznato je da se u strukturi proteina Ptch nalazi domena osjetljiva na sterole (SSD; eng. sterol sensing domain), za koju se pretpostavlja da stupa u interakciju sa kolesterolom vezanim na Hh proteinu (Ingham, 2000). Također, protein Ptch građom podsjeća na membranske transportere, čija je funkcija prijenos malih molekula kroz membranu, no njegova funkcija

kao transportera još nije dokazana. Protein Ptch, u kombinaciji sa proteinom Hh, regulira i stanični ciklus (Fan i Khavari, 1999), i to na dva načina. Prvo, Ptch bez svog liganda može vezati faktor koji promovira M-fazu (MPF, eng. M-phase promoting factor), koji se sastoji od ciklina B1 i kinaze CDK-1, te ga time zadržava u citoplazmi i sprječava njegovu aktivnost. Kada dođe do vezanja proteina Hh na Ptch, dolazi do otpuštanja vezanog ciklina B1 i progresije kroz stanični ciklus (Barnes i sur, 2001; Cross i Bury, 2004). Drugo, prijenos signala ovim signalnim putem dovodi do transkripcije ciklina D i ciklina E, čime se opet potiče progresija kroz stanični ciklus kada je signalni put aktivan (Duman-Scheel i sur, 2002). Protein Ptch djeluje kao negativni regulator signalnog puta jer u nedostatku vezanja Hh blokira daljnji prijenos signala time što blokira svoj koreceptor Smo. Kada se protein Hh veže na Ptch, on otpušta svoju blokadu proteina Smo, i signal se prenosi dalje. Krajnji produkt prijenosa signala je transkripcija ciljanih gena, u koje spada i sam PTCH1. Ekspresija gena PTCH1 smatra se univerzalnim markerom aktivnosti signalnog puta Hh-Gli (Murone i sur, 1999).

### 1.1.2.3. Smoothened gen/protein

Protein Smoothened (Smo) je već spomenuti koreceptor signalnog puta Hh-Gli. On se smatra pozitivnim regulatorom signalnog puta, jer je u odsustvu inhibirajućeg Ptch konstitutivno aktivan i potiče prijenos signala ovim signalnim putem (Murone i sur, 1999). Također je transmembranski protein, sa 7 transmembranskih domena (Alcedo i sur, 1996). Blizu svog C-terminusa sadrži vezna mjesta za protein kinazu A (slika 1.5.).



**Slika 1.5.** Shematski prikaz proteina Smo. Prikazan je njegov položaj u membrani sa svojih 7 transmembranskih domena.



Ptch se u neaktivnom obliku obično nalazi na staničnoj membrani, dok je Smo unutar stanice, vjerojatno na membranama vezikula. Nakon aktivacije signalnog puta dolazi do internalizacije proteina Ptch, i transporta proteina Smo na vanjsku membranu stanice (Incardona i sur, 2002). Nakon aktivacije proteina Smo dolazi do niza fosforilacijskih događaja u citoplazmi u koje je uključeno više kinaza, od kojih je jedna kinaza vezana uz G protein vezane receptore (GRK; eng. G protein-coupled receptor kinase) (Philipp i sur, 2008). U konačnici to dovodi do fosforilacije proteina Gli, koji se premješta iz citoplazme u jezgru i počinje djelovati kao transkripcijski faktor.

#### **1.1.2.4. Gli gen/protein**

Protein Gli (slika 1.6.) kod sisavaca je prisutan u tri različite izoforme, Gli1, Gli2 i Gli3. Sve tri izoforme imaju djelomično preklapajuće funkcije, ali se ipak mogu okarakterizirati kao isključivo aktivator (Gli1), aktivator/represor (Gli2) i represor (Gli3) (Sasaki i sur, 1999). N-terminalna domena proteina Gli sadrži dominantnu/represorsku aktivnost, a C-terminalna regija aktivacijsku domenu i domenu za smještaj u citoplazmi. Gli1 protein ima skraćenu N-terminalnu domenu, čime se kod njega izgubila represorska aktivnost pa protein djeluje isključivo kao aktivator (Dai i sur, 1999). Gli2 i Gli3 mogu djelovati i kao aktivator i kao represor, s time da je Gli2 primarno aktivator, dok je Gli3 primarno represor. Aktivnost je regulirana fosforilacijom putem PKA, nakon koje se Gli2 i Gli3 proteini cijepaju na dva fragmenta, od kojih N-terminalni fragment posjeduje represorsku aktivnost. Gli1 i Gli2 imaju uglavnom preklapajuću aktivnost, iako može doći do različite ekspresije pojedinih ciljnih gena, primjerice nekih proteaza, inhibitora proteaza, metaloproteaza te gena uključenih u razvoj folikula dlake (Eichberger i sur, 2006).



**Slika 1.6.** Kristalna struktura proteina Gli1 vezanog na DNA.

Protein Gli1 je u neaktivnom obliku smješten u citoplazmi, gdje je vezan uz protein Suppressor of Fused (SuFu), a možda i još neke proteine (Dunaeva i sur, 2003). Kompleks nije još u potpunosti okarakteriziran kod sisavaca, ali se zna da je SuFu negativni regulator signalnog puta te da mijenja lokalizaciju proteina Gli1 unutar stanice (Kogerman i sur, 1999; Ding i sur, 1999). Nakon aktivacije signalnog puta SuFu se ubikvitinira i prosljeđuje na razgradnju u proteasom (Yue i sur, 2009). Također, postoji teorija da Ptch može direktno djelovati na Gli, što znači da prijenos signala može biti neovisan o Smo i SuFu. Točan mehanizam još nije razjašnjen ali poznato je da u interakciji sudjeluju aminokiseline 180-786 i 1058-1210 na proteinu Ptch (Rahnama i sur, 2006). Također, vezanje Shh potiče ekspresiju Gli1, a koči ekspresiju Gli3. S druge strane, Gli3 može direktno utjecati na aktivnost promotora gena GLI1 (Dai i sur, 1999). Prema najnovijim saznanjima, aktivacija proteina Gli ne mora ići isključivo kanoničkim putem. Gli se može aktivirati preko različitih signalnih puteva, što je do sada pokazano za signalne puteve EGFR, koji aktivira Akt (Omi i sur 2005), TGF $\beta$  (Dennler i sur, 2007) i Ras/Raf (Ji i sur, 2007). Za ektopičku aktivaciju se najzaslužnijim smatra upravo protein Gli2, a ne Gli1 (Bai i sur, 2002).

#### **1.1.2.5. Ciljni geni signalnog puta Hh-Gli**

Svi Gli proteini se vezuju na DNA pomoću pet domena cinkovog prsta koje prepoznaju konsenzus Gli selektivnu sekvencu 5'-TGGGTGGTC-3' i na taj način aktiviraju ili reprimiraju specifične ciljne gene (Kinzler i Vogelstein, 1990). Glavni ciljni geni za signalni put Hh-Gli uključuju PTCH1, PTCH2 (Rahnama i sur, 2004) i GLI1 (Lee i sur, 1997; Dai i sur, 1999)

gene koji u odgovoru na aktivirani signalni put pokazuju povišenu razinu mRNA i proteina (Dai i sur, 1999; Ikram i sur, 2004). Povećane ekspresije PTCH1, PTCH2 i GLI1 su vrlo pouzdani pokazatelji aktiviranog signalnog puta i osiguravaju negativnu i pozitivnu „feedback“ regulaciju Hh signalizacije. Ostali ciljni geni uključuju Hip (Chuang i McMahon, 1999), regulatore staničnog ciklusa (ciklin D2 i ciklin E) (Duman-Scheel i sur, 2002) i apoptoze (Regl i sur, 2004), članove signalnog puta Wnt (Mullor i sur, 2001; Li i sur, 2007), N-Myc (Oliver i sur, 2003), Ptch (Cross i Bury, 2004), ceruloplazmin, Inter- $\alpha$ -tripsin inhibitor teški lanac 3 (ITIH3) (Kato i sur, 2001), bcl-2 (Bigelow i sur, 2004), FOXM1 (Teh i sur, 2002) i mnoge druge. Aktiviranje i deaktiviranje ovih gena su mehanizmi kojima Hh može doprinijeti normalnom razvoju tkiva i organa ali također i nastanku tumora.

## **1.2. Uloga signalnog puta Hh-Gli u embrionalnom razvoju sisavaca**

Signalni put Hh-Gli uključen je u niz različitih procesa tijekom embriogeneze, i visoko je očuvan kroz evoluciju (Huangfu i Anderson, 2006). Signalni put Hh-Gli izuzetno je značajan kod embrionalnog razvoja sisavaca. U prilog tome govori činjenica da knock-out miševi iz kojih je izbačen gen za PTCH1 ili SHH umiru vrlo rano tijekom embrionalnog razvoja. Proteini Hh mogu djelovati kao mitogeni, morfogeni i diferencijacijski čimbenici tijekom različitih faza razvoja na različitim mjestima, na većim ili manjim udaljenostima (Cross i Bury, 2004). Shh kontrolira oblikovanje neuralne cijevi, udova, probavnog sustava, pluća i folikula dlake te simetriju lijeve i desne strane tijela (Jia i Jiang, 2006). Ihh se eksprimira u crijevima i prehipertrofnim hondrocitima u hrskavici, gdje regulira morfogenezu kosti (Jia i Jiang, 2006). Dhh se eksprimira pretežito, ali ne isključivo, u Sertolijevim stanicama sjemenika. Tu ima ključnu ulogu u diferencijaciji spolnih stanica (Murone i sur, 1999). Pod utjecajem signalnog puta Hh-Gli razvijaju se i gušterača (Hebrok, 2003), diferenciraju stanice kosti (Nakamura i sur, 1997), pluća i hrskavica (Miller i sur, 2004), sazrijevaju retinoblasti i diferenciraju ganglijske stanice (Masai i sur, 2005). Hh-Gli signalni put također održava proliferirajuće matične stanice u fetalnoj koži (Zhou i sur, 2006). Svaka deregulacija ovog signalnog puta može dovesti do ozbiljnih poremećaja tijekom razvoja i rezultirati različitim malformacijama. Najbolji primjer za to je ciklopija kod ovaca, zahvaljujući kojoj je otkriven prvi poznati inhibitor signalnog puta Hh-Gli. Ovce koje su se hranile planinskim ljiljanom, *Veratrum californicum*, mnogo su češće janjile malformiranu janjad nego ovce koje se njime nisu hranile. Biokemijskom analizom biljke utvrđeno je da je za malformacije zaslužan jedan alkaloid iz te biljke, koji je dobio ime ciklopamin (Taipale i sur, 2000). Kasnije je otkriven niz

drugih spojeva koji mogu na Hh-Gli signalni put djelovati kao antagonisti ili kao agonisti. Kasnije je detektiran i niz drugih poremećaja vezanih uz poremećaje u ovom signalnom putu. Gubitak proteina Gli2 povezan je sa nastankom holoprosencefalije (Belloni i sur, 1996; Roessler i sur, 1996) i ciklopije (Chiang i sur, 1996). Promjene u Gli3 dovode do sindaktilije (Litingtung i sur, 2002), polidaktilije tipa A (Radhakrishna i sur, 1999) i Pallister-Hall sindroma (Kang i sur, 1997). Gorlinov sindrom zahvaljujući kojem je ovaj signalni put pronađen kod sisavaca, karakterizira niz malformacija: holoprosencefalija, ciklopija, malformacije šaka i stopala, malformacije kralješnice, rasjepljeno nepce i usne (Levanat i sur, 1996). Kako je Gorlinov sindrom uzrokovan mutacijom u genu PTCH1, sve ove malformacije su direktna posljedica poremećenog prijenosa signala signalnim putem Hh-Gli.

### **1.3. Uloga signalnog puta Hh-Gli u odraslom organizmu**

U odraslom organizmu signalni put Hh-Gli je većinom inaktiviran ili slabo aktivan, ali se po potrebi može aktivirati. Takva aktivacija se javlja primjerice kod zacjeljivanja rana, gdje je čini se signalni put Hh-Gli jedan od ključnih signala (Le i sur, 2008). Signalni put Hh-Gli je uključen u održavanje somatskih matičnih stanica u odraslom organizmu. Somatske matične stanice su pluripotentne stanice koje se sporo dijele, ali iz njih mogu nastati pojedini tipovi tkiva, te su važne u obnavljanju tog tipa tkiva (Lowry i Richter, 2007). Najpoznatije matične stanice su krvotvorne matične stanice, iz kojih mogu nastati različite krvne stanice, ali takve stanice se mogu naći i u svim ostalim tkivima. Do sada je signalni put Hh-Gli impliciran u nizu takvih somatskih matičnih stanica, primjerice dojke (Kalirai i Clarke, 2006), živčanih stanica (Stecca i Ruiz i Altaba, 2005; Shi i sur, 2008), pluća (Watkins i sur, 2003), kože (Zhou i sur, 2006), eritropoetskih stanica (Detmer i sur, 2004). Važnu ulogu ima u oblikovanju i normalnoj funkciji folikula dlake (Silva-Vargas i sur, 2005). Osim u matičnim stanicama, u ostalim tkivima signalni put Hh-Gli prisutan je samo u primarnim cilijama. Primarne cilije su nepomične strukture na površini stanica, građene su od mikrotubula a sudjeluju u primanju signala iz okoliša. Mogu se naći na mnogim stromalnim stanicama u tijelu sisavaca. Prema najnovijim saznanjima, primarna cilija je neophodna za funkciju signalnog puta Hh-Gli (Michaud i Yoder, 2006).

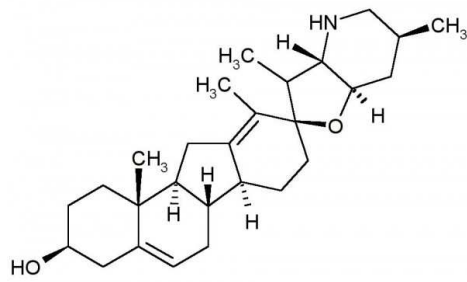
#### 1.4. Uloga signalnog puta Hh-Gli u karcinogenezi

Osim održavanja normalnih matičnih stanica, u zadnje vrijeme je popularan novi model razvoja tumora koji uključuje matične stanice tumora. Taj model govori da unutar svakog tumora postoji set stanica koje se ponašaju kao matične stanice: sporo se dijele, ali u slučaju potrebe mogu vrlo brzo proliferirati i stvoriti novu populaciju tumorskih stanica (Nicolis, 2007). Često su karakterizirane upravo aktiviranim signalnim putevima uključenim u rast, preživljenje, migraciju, proliferaciju i otpornost na lijekove. Jedan od tih signalnih puteva je upravo Hh-Gli (Mimeault i sur, 2007; Peacock i sur, 2007). Upravo se na njih pokušavaju usmjeriti nove generacije antitumorskih lijekova, koje bi ciljano blokirale ovakve signalne puteve (Lou i Dean, 2007). Matične stanice nekih tumora su već okarakterizirane, te je potvrđeno da u njihovom održavanju ulogu igra signalni put Hh-Gli, primjerice u multiplim mijelomima (Peacock i sur, 2007) ili adenokarcinomu gušterače (Dembinski i Krauss, 2009). Već spomenuti Gorlinov sindrom osim navedenih malformacija karakteriziraju i razni tumori. Sam sindrom je poznati i pod drugim nazivima, kao što su Sindrom nevusa bazalnih stanica (NBCS; eng. nevus basal cell sndrome) ili NBCCS (eng. nevoid basal cell carcinoma sndrome). Samo ime govori da se u ovome sindromu vrlo često javljaju tumori bazalnih stanica, tzv. bazeocelularni karcinomi (BCC; eng. basocellular carcinoma) (Bale i Yu, 2001). Osim njih, u sindromu su česti i meduloblastomi, rabdomiosarkomi, fibromi srca i jajnika, meningiomi i ciste čeljusti (Levanat i sur, 1996). Dakle, nastanak spomenutih tumora povezan je sa poremećenom funkcijom signalnog puta Hh-Gli. Također, glioblastomi, po kojima su proteini Gli dobili ime, također nastaju kao direktna posljedica poremetnje ovog signalnog puta (Kinzler i sur, 1987). Pokazalo se da je razvoj sporadičnih BCC-a, koji nisu vezani uz Gorlinov sindrom, također posljedica poremetnje ovog signalnog puta (Booth, 1999). Slični podaci dobiveni su i za fibrome jajnika (Levanat i sur, 2004), ciste čeljusti (Levanat i sur, 2000) i meduloblastome (Pietsch i sur, 1997; di Marcotullio i sur, 2004). Osim očite veze navedenih tumora sa signalnim putem Hh-Gli, u zadnje vrijeme nalazi se sve više i više različitih tipova tumora u kojima je ovaj signalni put na neki način poremećen. Do sada je to pokazano za: melanome (Stecca i sur, 2007; Bar-Eli i sur, 2007), trihoepiteliome (Vořechovský i sur, 1997), rabdomiome i rabdomiosarkome (Tostar i sur, 2006; Zhan i Helman, 1998), tumore probavnog trakta (Qualthrough i sur, 2004), tumore prostate (Karhadkar i sur, 2004), rak malih stanica pluća (Watkins i sur, 2003), skvamozni karcinom pluća (Fujita i sur, 1997), rak gušterače (Thayer i sur, 2003), rak mokraćnog mjehura (Aboukassim i sur, 2003; Thievensen i sur, 2005), adenome hipofize (Vila i sur, 2005), rak

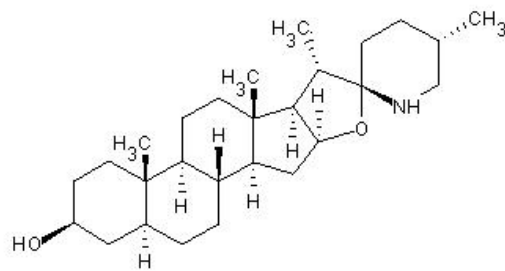
dojke (Katano, 2005), rak jajnika (Chen i sur, 2007; Liao i sur, 2009) te kroničnu mijeloidnu leukemiju (Sengupta i sur, 2007). Polimorfizmi u genu PTCH1 mogu djelovati na način da povećavaju sklonost organizma da razvije određeni tip tumora u određenim uvjetima, primjerice BCC-a (Strange i sur, 2004) ili raka dojke u kombinaciji sa oralnom kontracepcijom (Chang-Claude i sur, 2003). Najnoviji rezultati pokazuju da se osim mutacijama, ovaj signalni put može poremetiti i epigenetski, točnije metilacijom promotora gena. Do sada je pokazano da je metilacija promotora gena PTCH1 povećana u dermoidima i fibromima jajnika (Čretnik i sur, 2007) i raku dojke (Wolf i sur, 2007), dok u drugim tumorima nema utjecaja, primjerice kod BCC-a (Čretnik i sur, 2007), tumori endometrija i jajnika (Löf-Öhlin i sur, 2010) i meduloblastomi (Pritchard i Olson, 2008).

## 1.5. Ciklopamin

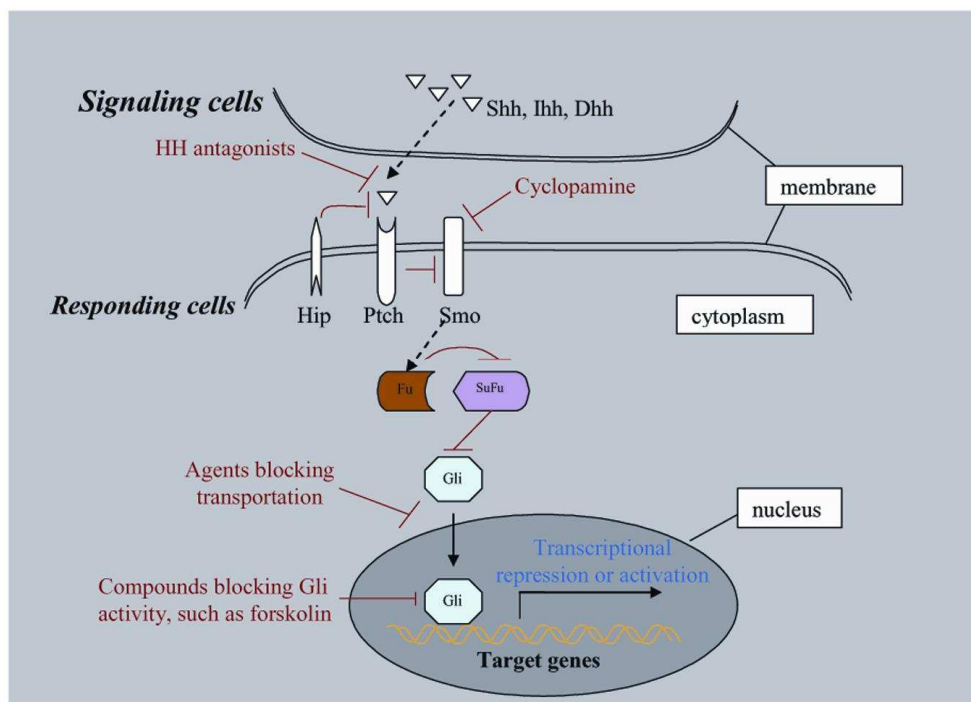
Prvi i najpoznatiji spoj, koji se još uvijek najviše koristi za modulaciju ovog signalnog puta je ciklopamin (slika 1.7.), alkaloid izoliran iz biljke planinskog ljiljana, *Veratrum californicum* (McFerren, 2006). Ciklopamin inhibira aktivnost signalnog puta na način da blokira prijenos signala nizvodno od proteina Smo. Veže se na Smo na još nepoznatom mjestu, te onemogućava njegovu aktivaciju i daljnji prijenos signala (Beachy i sur, 1997). Nedugo nakon otkrića ciklopamina pronađen je i njegov strukturni analog tomatidin (slika 1.8.) koji je bez inhibicijske aktivnosti (Thayer i sur, 2003). Ciklopamin i tomatidin vrlo se često koriste paralelno u pokusima budući da je tretman tomatidinom dobra negativna kontrola. Ostali spojevi koji modificiraju aktivnost signalnog puta Hh-Gli djeluju na različitim razinama prijenosa signala (slika 1.9.). Na najvišoj razini djeluje antitijelo 5E1, koje inhibira vezanje proteina Hh na Ptch. Na razini proteina Smo djeluje ciklopamin, a i kasnije razvijene modifikacije ciklopamina, kao što su KAAD-ciklopamin (koji ima još jači učinak nego sam ciklopamin) ili bodipy-ciklopamin (koji je obilježen tako da fluorescira zeleno). Posljednjih godina se radi na ispitivanju niza različitih kemijskih spojeva u svrhu pronalazjenja novih modulatora signalnog puta Hh-Gli koji bi imali poboljšanu aktivnost i manju toksičnost, te bi se mogli primjenjivati u terapiji, primjerice GDC0449 (Yauch i sur, 2008). Oksisteroli stimuliraju signalni put Hh-Gli na način da poništavaju inhibirajuće djelovanje inhibitora sinteze kolesterola. Inhibitori sinteze kolesterola snižavaju ekspresiju ciljnih gena signalnog puta Hh-Gli, a dodatak oksisterola taj učinak poništava (Corcoran i Scott, 2006).



**Slika 1.7.** Struktura ciklopamina.



**Slika 1.8.** Struktura tomatidina.



**Slika 1.9.** Prikaz različitih načina inhibicije signalnog puta Hh-Gli. Ligandi Shh, Ihh i Dhh izlučuju se iz sekrecijskih stanica i vežu na transmembranski receptor Ptch u Hh osjetljivoj stanici. U odsustvu Hh liganda Ptch je vezan za Smo i blokira funkciju proteina Smo. Kada je ligand prisutan, Smo pokreće signalizirajuću kaskadu koja rezultira otpuštanjem transkripcijskog faktora Gli sa proteina Fused (Fu) i proteina Supresor of Fused (SuFu). Dok je blokirana funkcija Smo, SuFu sprječava translokaciju Gli u jezgru. Kada je ligand Hh prisutan, Fu inhibira SuFu i Gli se otpušta. Otpušteni Gli se tada translocira u jezgru i kontrolira transkripciju ciljnih gena. Crvene linije i spojevi napisani crveno pokazuju inhibitore ovoga signalnog puta koji imaju potencijalno terapijsko djelovanje. Ova slika se odnosi na vinsku mušicu, ali vrijedi i za prijenos signala u sisavaca sa izuzetkom proteina Fu. (slika preuzeta iz: Liu i sur, 2005)

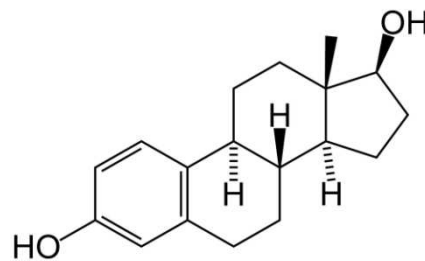
## 1.6. Estrogeni i estrogeni receptori

### 1.6.1. Estrogeni

Estrogeni su skupina steroidnih spolnih hormona koji pokazuju važne biološke funkcije. Tri su glavna estrogena koja se prirodno nalaze u ljudskom organizmu: estradiol, estriol i estron. Estradiol je najvažniji estrogen u ljudskom tijelu (slika 1.10.). Estrogeni su regulatori za rast i diferencijaciju različitih tkiva uključujući reproduktivni sustav, dojke odnosno mliječne žlijezde, središnji živčani i potporni sustav (Couse i Korach, 1999; Pettersson i Gustafsson, 2001). Između ovih tkiva, rast mliječnih žlijezda i endometrija maternice tijekom trudnoće i



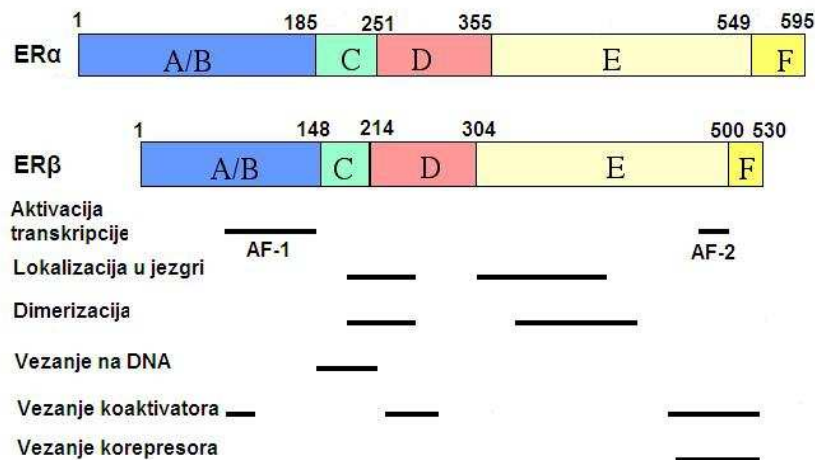
menstruacijskog ciklusa ovise o estrogenu. Također je poznato da je estrogen uključen u mnoge patološke procese kao što su tumori dojke i endometrija maternice (Henderson i sur, 1988) te osteoporoza (Horowitz, 1993). Uz proliferacijski učinak na normalne stanice, estrogen se smatra stimulansom za inicijaciju i poticanje tumora. Epidemiološke studije su pokazale da dugotrajno izlaganje estrogenu kod rane menarhe, kasne menopauze, i kod nadomjesne terapije estrogenom mogu biti rizični faktor za nastanak raka dojke i maternice (Rose, 1996; Clemons i Goss, 2001). Eksperimenti provedeni *in vitro* pokazali su da su stanice izvedene iz tumora dojke i maternice sposobne rasti pri tretmanu estrogenom. Opravdano je smatrati da stimulativni učinak estrogena na proliferaciju stanica također pridonosi rastu malignih tumora (Holinka i sur, 1986; Foster i sur, 2001).



Slika 1.10. Struktura estradiola.

### 1.6.2. Estrogeni receptori

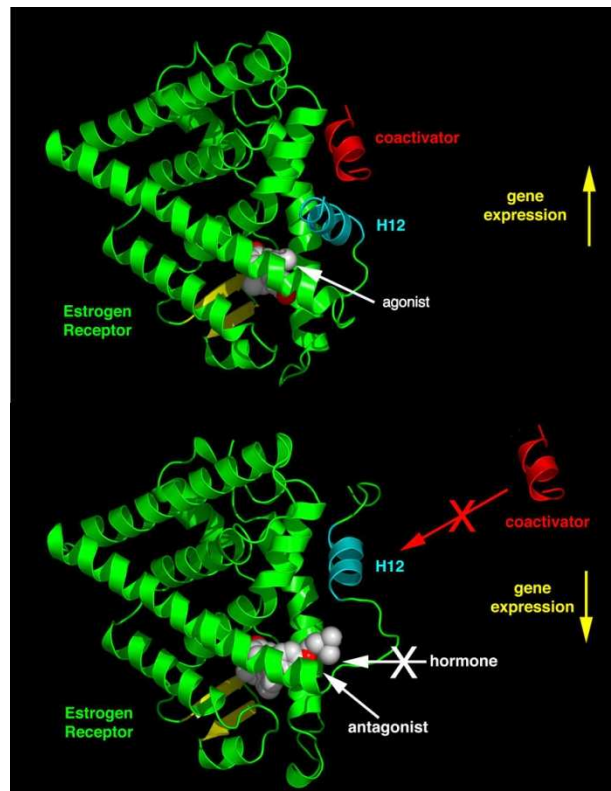
Estrogene receptore (ER) prvi je opisao ranih šezdesetih godina Elwood Jensen i njegov suradnik (Jensen 1962; Jensen i Jacobson, 1962). Estrogeni receptori su članovi obitelji jezgrinih receptora slične strukture i načina djelovanja, a djeluju kao transkripcijski faktori. Dva su tipa estrogenih receptora kod ljudi, ER $\alpha$  i ER $\beta$ . ER $\alpha$  je protein građen od 595 aminokiselina i molekularne težine od 66 kDa dok je ER $\beta$  kraći i lakši, građen je od 530 aminokiselina i ima molekularnu težinu oko 60 kDa. Oba estrogena receptora su građena od pet domena (slika 1.11.).



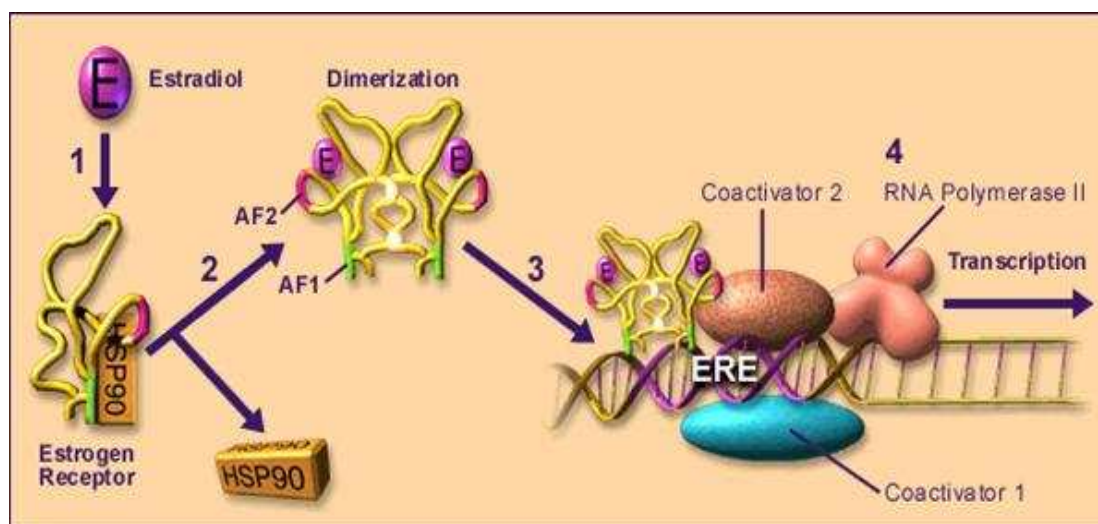
**Slika 1.11.** Prikaz građe estrogenih receptora (ER $\alpha$  i ER $\beta$ ). A/B je N- terminalna regulatorna domena koja sadrži aktivacijsku funkciju 1 (AF-1) čija je aktivnost neovisna o prisustvu liganda. Transkripcijska aktivacija AF-1 je obično vrlo slaba ali zajedno sa AF-2 u E-domeni pokazuje mnogo jasniju pojačanu regulaciju ekspresije gena. A/B domena je vrlo varijabilna u sekvencama između ova dva estrogena receptora. C je DNA-vezujuća domena (DBD; eng. DNA-binding domain) koja je visoko konzervirana domena i sadrži dva cinkova prsta kojima se vezuje na specifične sekvence DNA koje nazivamo ERE (eng. Estrogen Response Elements). D je savitljiva domena koja povezuje DBD sa ligand vezujućom domenom (LBD; eng. Ligand binding domain). E je ligand vezujuća domena, umjereno je konzervirana u sekvencama a visoko konzervirana u strukturi između ova dva estrogena receptora. LBD sadrži aktivacijsku funkciju 2 (AF-2) čija je aktivnost ovisna o prisustvu liganda. F je C-terminalna domena, razlikuje se u sekvencama između ova dva estrogena receptora. (slika preuzeta i preuređena iz: Klinge, 2000)

Regulatorna domena (A/B) ima ulogu regije za interakciju sa koregulatorima i najmanje je konzervirana. Niska homologija A/B domene je razlog za različitu funkciju ova dva receptora što rezultira razlikama u njihovoj aktivaciji (Charitidi i sur, 2009). DNA vezujuća (C) i ligand vezujuća (E) domena su najviše konzervirane (Mosselman i sur, 1996). C domena ima veliki afinitet za povezivanje sa estrogen odgovornim elementima (ERE; eng. Estrogen Response Elements), a to su specifične DNA sekvence ciljnih gena čiju transkripciju vezanjem na ERE ta domena potiče (Melvin i sur, 2004). E domena je odgovorna za specifično vezanje za ligande kao što su estradiol ili selektivni modulatori estrogenih receptora (SERM; eng. selective estrogen receptor modulator). D domena je uključena u lokalizaciju receptora u

jezgri te u modulaciju koaktivatora i posttranslacijske modifikacije (Sentis i sur, 2005). F domena se nalazi na karboksilnom kraju receptora, dugo joj je funkcija bila nepoznata a u zadnje vrijeme pokazalo se da modificira vezanje liganda (Skafar i Zhao, 2008). Mehanizam molekularnog djelovanja ER (slike 1.12. i 1.13.) teče na način da se ER na koje su vezani estrogene vežu kao homodimeri ( $ER\alpha ER\alpha$ ,  $ER\beta ER\beta$ ) ili kao heterodimeri ( $ER\alpha ER\beta$ ) na ERE pomoću svoje DNA vezujuće domene i reguliraju transkripciju ciljnih gena. ER imaju dvije neovisne transkripcijske aktivacijske funkcije (AF) koje zajedno sa aktivatorima potiču aktivnost RNA polimeraze II. N-terminalna A/B domena posjeduje ligand-neovisnu AF-1, dok E domena posjeduje ligand-ovisnu AF-2 aktivacijsku funkciju (Delaunay i sur, 2000; Wärnmark i sur, 2003).



**Slika 1.12.** Mehanizam aktivacije i deaktivacije estrogenih receptora. Strukture na slici prikazuju ligand vezujuću domenu estrogenog receptora (zeleno) kompleksiranu sa agonistom (estrogenom) ili antagonistom (npr. tamoksifenom). Kada se agonist veže za estrogene receptor, C-terminalni kraj ligand-vezujuće domene (H12, svjetlo plavo) je pozicioniran tako da se koaktivator (crveno) može vezati za ligand-vezujuću domenu. Vezani antagonist ispunjava isto ligand-vezujuće udubljenje estrogenog receptora. Antagonist ima dodatak koji sterički istisne H12 koji tada zauzima otprilike isto mjesto u prostoru gdje se inače veže koaktivator i na taj način blokira vezanje koaktivatora za ligand vezujuću domenu. (slika preuzeta iz: Brzozowski i sur, 1997; Shiao i sur, 1998)

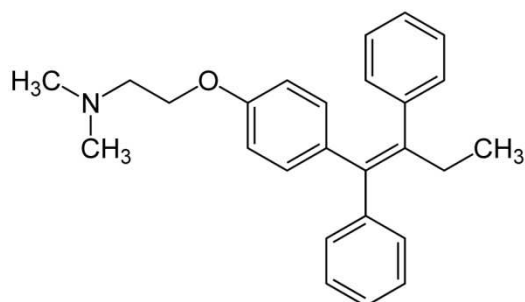


**Slika 1.13.** Shematski prikaz molekularnog djelovanja estradiola: 1 - estradiol (E) se veže velikim afinitetom za estrogeni receptor (ER) pri čemu dolazi do disocijacije proteina HSP90 (eng. Heat Shock Protein 90); 2 - E-ER kompleksi se dimeriziraju i lokaliziraju u jezgri stanice; 3 - E-ER dimer se veže za DNA sekvencu na ERE u promotorskoj regiji estrogen-osjetljivih gena; 4 - aktivacija transkripcije pomoću E-ER dimera uključuje interakciju transkripcijskih aktivacijskih funkcija (AF-1 i AF-2) sa transkripcijskim koaktivatorima koji potiču aktivnost RNA polimeraze II. (slika preuzeta iz: Howell i sur, 2000)

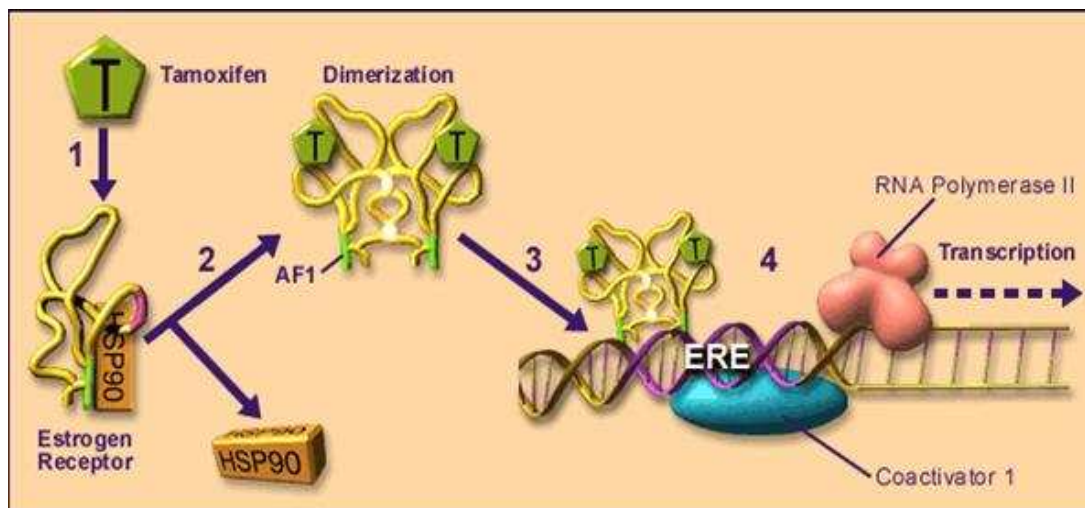
## 1.7. Tamoksifen

Tamoksifen (slika 1.14.) je nesteroidni selektivni modulator estrogenih receptora (SERM; eng. Selective Estrogen Receptor Modulator) koji se često koristi u kemoterapiji za tretman estrogen-ovisnih tumora dojke (Fisher i sur, 1998; McKeon, 1999; Radmacher i Simon, 2000; de Médina i sur, 2004). Kada se daje kao adjuvantna terapija djelotvoran je pri liječenju pacijenata sa metastatskim rakom dojke pri čemu smanjuje opasnost od recidiva i smrti od raka dojke (Love, 1989). Korištenje tamoksifena je posebno indicirano kod žena u postmenopauzi koje imaju estrogen receptor-ovisne tumore dojke. Također se koristi i kao kemopreventivno sredstvo kod žena koje imaju visoki rizik za razvoj tumora dojke (Marshall, 1998). Tamoksifen djeluje primarno preko estrogenih receptora tako da modulira ekspresiju gena (slika 1.15.). Dok tamoksifen u nižim koncentracijama (0,1-1  $\mu\text{M}$ ) uzrokuje zastoj staničnog ciklusa (Otto i sur, 1996), farmakološke koncentracije (više od 5  $\mu\text{M}$ ) tamoksifena uzrokuju apoptozu stanica tumora dojke (Perry i sur, 1995). Pored genomskih učinaka posredstvom estrogenih receptora, farmakološke koncentracije tamoksifena pokazuju da imaju estrogen receptor-neovisne negenomske učinke na različite vrste stanica (Ferlini i sur,

1999; Kim i sur, 1999; Zhang i sur, 2000). Tamoksifen također pokazuje proapoptičke učinke na estrogen receptor-neovisne stanice tumora dojke i na neke druge tipove stanica kojima nedostaju estrogeni receptori kao što su stanice malignih glioma, tumora gušterače, tumora jajnika, te melanoma (Couldwell i sur, 1994; Gelmann, 1997; Heerd i Borgen, 1999; Lehenkari i sur, 2003). Tamoksifen u farmakološkim koncentracijama ima ionoforični učinak na stanične membrane koji je povezan sa naglim promjenama propusnosti membrana i unutarstaničnog pH, što dovodi do smanjene vijabilnosti i smrti stanica (Lehenkari i sur, 2003). Promjene protoka kroz membranu i izmjene unutarstaničnog protoka kalcija (Zhang i sur, 2000; Custodio i sur, 1998) te porast oksidativnog stresa i poremećena funkcija mitohondrija povezani su sa staničnom smrću koju uzrokuje tamoksifen (Cardoso i sur, 2001; Dietze i sur, 2001; Cardoso i sur, 2003). Tamoksifen pokazuje brzu inhibiciju estrogen-ovisne protein kinaze C u MCF-7 stanicama i hondrocitima (Schwartz i sur, 2002; Boyan i sur, 2003), a uzrokuje i brzu smrt mitohondrija u estrogen-ovisnih i estrogen-neovisnih staničnih linija tumora dojke (Kallio i sur, 2005).



**Slika 1.14.** Struktura tamoksifena.



**Slika 1.15.** Shematski prikaz molekularnog djelovanja tamoksifena: 1 - tamoksifen (T) se veže nižim afinitetom u usporedbi sa estradiolom za estrogenu receptor (ER) pri čemu dolazi do disocijacije proteina HSP90 (eng. *heat shock protein 90*); 2 - T-ER kompleksi se dimeriziraju; 3 - T-ER dimer se translocira u jezgru stanice pri čemu je aktivacijska funkcija AF-1 aktivna dok je AF-2 inaktivna; T-ER dimer se veže za DNA sekvencu na ERE u promotorskoj regiji estrogen osjetljivih gena; 4 - transkripcija estrogen osjetljivih gena je smanjena zbog inaktivne aktivacijske funkcije AF-2 jer ne dolazi do vezanja koaktivatora za T-ER dimer; djelomična aktivnost koja je prisutna posljedica je učinka AF-1 koja nakon vezanja tamoksifena za ER ostaje aktivna u T-ER dimeru. (slika preuzeta iz: Howell i sur, 2000)

Kompeticija tamoksifena sa estrogenom glavni je mehanizam u efikasnim terapijama estrogen-ovisnih i estrogen neovisnih tumora dojke.

## 2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

---

Ciljevi ovih istraživanja bili su ispitati aktivnost gena signalnog puta Hh-Gli u staničnim linijama tumora dojke kao i moguće mehanizme regulacije. Naime, signalni put Hh-Gli aktivan je u embrionalnom i ranom razvoju i sudjeluje u formiranju organa, a poremetnje u njegovom funkcioniranju odražavaju se u malformacijama ploda. U odraslom organizmu signalni put je neaktivan, a u nekim se tumorima pokazala njegova povećana ili promijenjena aktivnost. U posljednjih nekoliko godina otkrivene su promjene u aktivnostima nekih od gena tog signalnog puta koje bi mogle imati ulogu u patogenezi mnogih tumora kao što su tumori pluća, prostate, dojke, probavnog trakta i drugima. Prema procjenama signalni put Hh-Gli sudjeluje u jednoj trećini svih smrtonosnih tumora i stoga ovaj signalni put postaje značajnom metom potencijalnih terapija raka.

Ovim radom smo željeli utvrditi značaj signalnog puta Hh-Gli u raku dojke u uvjetima kada se radi o estrogen-ovisnim ili estrogen-neovisnim uvjetima. U tu svrhu koristili smo dvije stanične linije: estrogen-ovisne i estrogen-neovisne.

Glavni ciljevi ovog rada bili su:

- istražiti i upoznati mehanizme djelovanja signalnog puta Hh-Gli i mogućih inhibitora kao novih terapeutika tumora dojke
- istražiti mehanizme djelovanja signalnog puta Hh-Gli i eventualne interakcije sa estrogenim receptorima u tumorima dojke
- utvrditi da li inhibitori signalnog puta Hh-Gli mogu djelovati kao terapeutici u tumorima dojke ovisnima ili neovisnima o estrogenim receptorima
- ispitati radi li se o kanonijskom signalnom putu Hh-Gli
- utvrditi da li ima elemenata autokrine regulacije Hh-Gli signalnog puta
- doprinijeti novim putevima u terapijama raka dojke budući da se koristi novi signalni put još neopterećen rezistencijom na poznate lijekove
- ispitati mogućnost korištenja ciklopamina i tamoksifena u kombiniranoj terapiji tumora dojke

## 3. MATERIJALI I METODE

---

### 3.1. Materijali

U ovom radu su korištene dvije trajne stanične linije tumora dojke, MCF-7 i Sk-Br-3. MCF-7 je estrogen-ovisna stanična linija tumora dojke dok je Sk-Br-3 estrogen-neovisna stanična linija tumora dojke koje rastu zalijepljene na podlogu u mediju DMEM (Dulbeccov minimalni esencijalni medij; eng. Dulbecco's Minimal Essential Medium, SIGMA) sa 10% fetalnog govedeg seruma, FBS (eng. Fetal Bovine Serum, GIBCO).

### 3.2. Metode

#### 3.2.1. Rad sa staničnim kulturama

Rad sa staničnim kulturama odvijao se u sterilnim uvjetima, uključivo sav laboratorijski pribor, otopine, puferi i hranjivi mediji. Rukovanje svime što je vezano uz stanične kulture odvijalo se u kabinetu za rad u sterilnim uvjetima sa laminarnim protokom zraka, čija se radna površina dezinficira 70% etanolom prije i nakon svake uporabe, te sterilizira UV svjetlom. Za potrebe ovog rada koriste se petrijeve zdjelice promjera 10 cm.

##### 3.2.1.1. Odmrzavanje stanica

Stanice su pohranjene u mediju za zamrzavanje (50% serum, 40% medij, 10% DMSO) u krioampulama na temperaturi od  $-80^{\circ}\text{C}$ . Prilikom odmrzavanja stanica bitno je stanice odlediti što brže. U sterilnu staklenu epruvetu se odpipetira 5 ml hranjivog medija (DMEM sa 10% FBS). Krioampula sa zamrznutim stanicama se malo zagrije u ruci, toliko dugo da se zaleđena smjesa odvoji od stijenke krioampule pazeći pri tome da većina sadržaja ostane zaleđena. Sadržaj se brzo prelije u sterilnu staklenu epruvetu sa hranjivim medijem, a zatim centrifugira na 1200 rpm (HARRIER 18/80, Sanyo,  $r=10$  cm) 5 minuta, da bi se stanice isprale od krioprotektanta DMSO. Odmah nakon centrifugiranja supernatant se odlije, a talog stanica se resuspendira u 10 ml hranjivog medija i prenese u petrijevku promjera 10 cm. Petrijevka se



potom lagano protrese da se sadržaj sa stanicama jednoliko rasporedi po dnu petrijevke, a potom se pohrani u inkubator (37°C, 5% CO<sub>2</sub>).

### **3.2.1.2. Održavanje i presađivanje stanica u kulturi**

Stanicama u kulturi poželjno je mijenjati hranjivi medij svaka dva do tri dana. Kada stanice narastu toliko da gotovo potpuno prekriju podlogu petrijevke treba ih presađiti. Prvo se pipetom ukloni sav hranjivi medij sa stanica. Zatim se na stanice nalije 5 ml fosfatnog pufera (PBS bez Ca i Mg, eng. Phosphate Buffer Saline) (1,7 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 136 mM NaCl, 1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,2), petrijevka se potom kratko protrese da bi se sadržaj promiješao i nakon toga se PBS ukloni pipetom i baci. Na taj način se stanice isperu od zaostalog seruma iz hranjivog medija, a to je potrebno učiniti jer bi zaostali serum iz hranjivog medija mogao inaktivirati djelovanje tripsina. Zatim se na stanice doda oko 1 ml tripsina (0,05% w/v) te ostavi da djeluje na priljepljene stanice oko 5 minuta odnosno toliko vremena dok se stanice ne odvoje od podloge. Kada se stanice odvoje od podloge, na njih se doda 5 ml kompletiranog hranjivog medija i cijeli sadržaj u petrijevki dobro se resuspendira propuhivanjem nekoliko puta kroz pipetu. Od cijelog volumena otopine 1 ml otopine se nasadi u čistu petrijevku i dopuni do 10 ml kompletiranim hranjivim medijem.

### **3.2.1.3. Zamrzavanje stanica**

Za dugotrajno pohranjivanje i čuvanje stanica stanice je potrebno zamrznuti. Stanice se zamrzavaju kada je njihova gustoća optimalna odnosno kada su od 80% do 90% konfluentne. Postupak zamrzavanja počinje slično kao postupak presađivanja. Sa stanica se prvo ukloni hranjivi medij, a zatim se stanice isperu PBS-om bez Ca i Mg i potom tripsiniziraju. Tripsinizirane stanice se resuspendiraju u 5 ml hranjivog medija i prenesu u sterilnu staklenu epruvetu, te ostave na hladnom mjestu (u frižideru na +4°C ili na usitnjenom ledu) pola sata do sat da se polako ohlade. Nakon toga se stanice centrifugiraju na 1200 rpm 5 min u centrifugi koja je ohlađena na +4°C. Nakon centrifugiranja sa stanica se odmah odlije supernatant, a talog se resuspendira u 1 ml hladnog medija za zamrzavanje (50% serum, 40% medij, 10% DMSO) i zatim odmah prebaci u krioampulu. Krioampula se odmah pohrani u frižider na -80°C, gdje treba stajati od 1 do 2 dana (može i do nekoliko mjeseci). Za dulje pohranjivanje i čuvanje stanica krioampule se pohranjuju i čuvaju u tekućem dušiku.

### **3.2.2. Tretmani staničnih linija sa ciklopaminom, tomatidinom ili ligandom Shh**

Stanice su nasadene u 7 petrijevki (6 tretmana i 1 kontrola) sa po 10 ml medija. Nakon 24 sata koliko je stanicama dovoljno da se uhvate, u hranjivi medij su dodani ciklopamin ((3 $\beta$ ,23 $R$ )-17,23-epoksiveratraman-3-ol,  $M_r=411,62$ , Toronto Research Chemicals, konačna koncentracija 2,5  $\mu$ M), tomatidin ((22 $S$ ,25 $S$ )-5 $\alpha$ -spirosolan-3 $\beta$ -ol,  $M_r=452,10$ , Sigma, konačna koncentracija 2,2  $\mu$ M) ili Shh protein (poklon dr. A. Kenney, konačna koncentracija 3 ng/ml). Stanice su potom sa odgovarajućim spojem inkubirane kroz 24 ili 48 sati u inkubatoru, a zatim su iz njih izolirani RNA i proteini. Ciklopamin je blokator signalnog puta Hh-Gli i ovdje je korišten u svrhu inhibicije puta Hh-Gli, tomatidin je strukturni analog ciklopamina ali nema biološki učinak blokiranja puta Hh-Gli te je korišten kao negativna kontrola, dok je ligand Shh pokretač puta Hh-Gli i ovdje je korišten u svrhu aktivacije ovog signalnog puta.

### **3.2.3. Tretmani staničnih linija sa ciklopaminom i tamoksifenom**

Stanice su nasadene u 7 petrijevki (6 tretmana i 1 kontrola) sa po 10 ml medija. Nakon 24 sata koliko je stanicama dovoljno da se uhvate, u hranjivi medij su dodani ciklopamin (konačna koncentracija 2,5  $\mu$ M), tamoksifen (2-[4-(1,2-difenilbut-1-enil)fenoksi]-*N,N*-dimetil-etanamine,  $M_r=371,51$ , TORONTO RESEARCH CHEMICALS, konačna koncentracija 2,5  $\mu$ M za MCF-7 i 10  $\mu$ M za Sk-Br-3), te kombinacije ciklopamina i tamoksifena. Primjenjene koncentracije pojedinih spojeva prikazane su u tablici 3.1. Stanice su potom sa odgovarajućim spojem ili spojevima inkubirane kroz 48 ili 96 sati u inkubatoru, a zatim su iz njih izolirani RNA i proteini.

**Tablica 3.1.** Primjenjene koncentracije ciklopamina i tamoksifena te njihovih kombinacija.

Primjenjeni spoj:	Primjenjena koncentracija:
ciklopamin (cyc)	2,5 $\mu$ M (za MCF-7 i Sk-Br-3)
tamoksifen (tam)	2,5 $\mu$ M (za MCF-7)
	10 $\mu$ M (za Sk-Br-3)
ciklopamin kroz 48 sati zatim tamoksifen kroz 48 sati (cyc-tam)	2,5 $\mu$ M - 2,5 $\mu$ M (za MCF-7)
	2,5 $\mu$ M - 10 $\mu$ M (za Sk-Br-3)
tamoksifen kroz 48 sati zatim ciklopamin kroz 48 sati (tam-cyc)	2,5 $\mu$ M - 2,5 $\mu$ M (za MCF-7)
	10 $\mu$ M - 2,5 $\mu$ M (za Sk-Br-3)
ciklopamin + tamoksifen kroz 48 sati (cyc+tam)	2,5 $\mu$ M + 2,5 $\mu$ M (za MCF-7)
	2,5 $\mu$ M + 10 $\mu$ M (za Sk-Br-3)
ciklopamin + tamoksifen kroz 96 sati (cyc+tam)	2,5 $\mu$ M + 2,5 $\mu$ M (za MCF-7)
	2,5 $\mu$ M + 10 $\mu$ M (za Sk-Br-3)

### 3.2.4. Izdvajanje RNA iz stanica

Svi koraci izdvajanja RNA iz stanica odvijaju se na ledu, kako bi RNA očuvala svoj integritet. Također, svi koraci centrifugiranja se odvijaju u centrifugi ohlađenoj na +4°C. Stanice u petrijevkama se stave na led, sa njih se pipetom ukloni hranjivi medij i doda im se 5 ml PBS-a bez Ca i Mg. Stanice se odvoje od podloge koristeći strugač za stanice, suspenzija stanica u PBS-u se potom prenese u epruvetu i zatim centrifugira na 1200 rpm 5 min u centrifugi ohlađenoj na +4°C. Odmah nakon centrifugiranja sa stanica se odlije supernatant, a talog sa stanicama se resuspendira u 1,5 ml TRIzola (TRIZOL Reagent, Invitrogen) i prebaci u čistu mikroeprevetu. Ovdje treba provjeriti da li je sve dobro homogenizirano jer suprotno bi moglo rezultirati degradacijom izolirane RNA. Resuspendirani talog se inkubira 10 min na sobnoj temperaturi a potom se u smjesu stanica i TRIzola pipetom doda 300  $\mu$ l kloroforma (Kemika), sadržaj u mikroepreveti se rukom protrese kroz 20 sekundi (ne vorteksirati) i ostavi se inkubirati 10 min na sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije na sobnoj temperaturi sadržaj u mikroepreveti se centrifugira na maksimalnoj brzini (13200 rpm) 15 min u centrifugi (Eppendorf Centrifuge 5415R) ohlađenoj na +4°C. Nakon centrifugiranja gornji vodeni sloj se prebaci u čistu mikroeprevetu pri čemu pipetirati treba pažljivo da se izbjegne kontaminacija proteinima koji su prisutni u srednjem i donjem sloju. Na odijeljeni vodeni sloj pipetom se

doda 750  $\mu$ l izopropanola (Kemika), rukom se protrese kroz 10 sekundi i odloži na precipitaciju kroz 15 min na sobnoj temperaturi. Nakon precipitacije na sobnoj temperaturi sadržaj u mikroepreveti se centrifugira na maksimalnoj brzini 15 min u centrifugi ohlađenoj na +4°C. Nakon centrifugiranja na dnu mikroeprevete vidi se bijeli talog precipitirane RNA. Sa bijelog taloga se pažljivo odlije supernatant i na talog doda 1,5 ml 80% etanola (Kemika) a zatim centrifugira na maksimalnoj brzini 10 min u centrifugi ohlađenoj na +4°C. Nakon centrifugiranja se ukloni supernatant i ostavimo mikroeprevetu s talogom da se kratko osuši na zraku. Nakon sušenja na zraku talog otopimo u 50  $\mu$ l destilirane vode. Izdvojena RNA se pohranjuje u frižider na -20°C.

### 3.2.5. Mjerenje koncentracija RNA

Koncentracija RNA se mjeri na spektrofotometru (CECIL CE 2040), korištenjem valnih duljina apsorbancije 260 nm i 280 nm ujedno se određuje i kvaliteta RNA. RNA se razrijedi 100 puta u destiliranoj vodi (1  $\mu$ l RNA + 99  $\mu$ l vode). Spektrofotometar se kalibrira tako da voda korištena za razrjeđivanje bude vrijednost 0. Tada se uzorak nanese u kivetu i mjeri apsorbancija pri 260 nm i 280 nm. Koncentracija se izračuna prema sljedećoj formuli:

$$C = A_{260} \times 40 \times R$$

gdje je C koncentracija,  $A_{260}$  vrijednost apsorbancije pri valnoj duljini od 260 nm, a R faktor razrjeđenja (u ovom slučaju 100), 40 - je faktor za određivanje koncentracije RNA. Također, provjeravajući omjer  $A_{260}/A_{280}$  može se provjeriti i čistoća izdvojene RNA, naime što je RNA čišća taj omjer je bliži 2.

### 3.2.6. Izdvajanje proteina iz stanica

Proteini se iz stanica izdvajaju koristeći pufer za lizu, koji se sastoji od RIPA pufera (25 mM Tris-HCl, 1% Na-deoksiholat, 1% Nonidet P-40, 150 mM NaCl, 0,1% SDS) i inhibitora proteaza. Inhibitori se dodaju u obliku tablete (Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail Tablets, Roche), jedna tableta na 10 ml RIPA pufera. Stanice u petrijevkaama se stave na led, sa njih se ukloni hranjivi medij i doda im se 5 ml PBS-a bez Ca i Mg. Stanice se odvoje od podloge koristeći strugač za stanice, suspenzija stanica u PBS-u se potom prenese u epruvetu i zatim centrifugira na 1200 rpm 5 min u centrifugi ohlađenoj na +4°C. Supernatant se zatim

odlije, a talog stanica se resuspendira u 50  $\mu$ l pufera za lizu i ostavi stajati na ledu sat vremena. Nakon sat vremena doda se još 50  $\mu$ l pufera za lizu i ostavi stajati na ledu još sat vremena. Nakon toga se centrifugira pri 13000 rpm 20 minuta u centrifugi ohlađenoj na +4°C. Nakon centrifugiranja supernatant koji sadrži izdvojene proteine sakupi se i prebaci u čistu mikropruvetu. Izdvojeni proteini se pohranjuju u frižider na -20°C.

### **3.2.7. Mjerenje koncentracije proteina**

Koncentracija proteina određuje se metodom po Bradfordu (Bradford, 1976), koristeći komercijalnu otopinu (Bio-Rad Protein Assay). Mjerenje se zasniva na svojstvu Coomassie Brilliant Blue boje da promijeni boju prilikom vezanja na bazične i aromatske aminokiseline u proteinima. Mjerenjem apsorbancije na 595 nm, te usporedbom sa standardnom krivuljom poznatih koncentracija proteina vrlo se jednostavno može odrediti koncentracija uzorka. Na početku se napravi niz serijskih razrjeđenja poznatog standarda proteina, obično se koristi 1 mg/ml BSA (goveđi albumin iz seruma, eng. Bovine Serum Albumin). Razrjeđenja se rade u konačnom volumenu od 25  $\mu$ l. Razrjeđenja koja se prirede su: 1 mg/ml, 0,8 mg/ml, 0,6 mg/ml, 0,4 mg/ml, 0,2 mg/ml, 0 mg/ml. Nakon pripreme razrjeđenja proteinskog standarda pripreme se i razrjeđenja proteina koja se žele izmjeriti. Protein kojemu se mjeri koncentracija obično se pet puta razrijedi (5  $\mu$ l proteina + 20  $\mu$ l destilirane vode). Zatim se napravi radna otopina za bojanje, na način da se razrijedi sa destiliranom vodom pet puta. Radna otopina se nanese u pločicu sa 96 bunarića, za svaki uzorak koji se mjeri po dva bunarića i po dva bunarića za svaki u nizu serijskih razrjeđenja. Za svaki uzorak u kojem mjerimo koncentraciju proteina nanesimo u bunarić po 190  $\mu$ l radne otopine za bojanje. Iz svakog razrjeđenja standarda i uzoraka uzima se po 10  $\mu$ l i nanosi u 190  $\mu$ l radne otopine za bojanje. Pločica se tada stavi na tresilicu kroz 10 min da se otopine dobro pomiješaju. Očitavanje se radi na čitaču za pločice Labsystem Multiskan MS pri apsorbanciji od 595 nm. Dobivene vrijednosti se unesu u računalo, prema vrijednostima standarda nacrtana se standardna krivulja na temelju koje izračunamo koncentraciju proteina u ispitivanim uzorcima.

### 3.2.8. Reverzna transkripcija

Za analizu ekspresije gena potrebno je napraviti kvantitativni real-time PCR (qRT-PCR). Budući da je RNA vrlo osjetljiva molekula, potrebno ju je prvo prevesti u cDNA koja je znatno stabilnija. Prevođenje se izvrši uz pomoć enzima reverzna transkriptaza koja transkribira RNA u sebi komplementarnu cDNA. Reakcija reverzne transkripcije provodi se sa poznatom količinom RNA, najčešće je 1 µg. U ukupni volumen od 50 µl ulazi 30,75 µl reakcijske smjese (10x pufer (10% v/v), 5,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM dNTP, 1,25 µM nasumičnih heksamera, 1,25 µM oligo dT početnica, 20 U inhibitora Rnaza te 62,5 U reverzne transkriptaze), 1 µg RNA te se nadopuni destiliranom vodom do konačnog volumena (tablica 3.2).

**Tablica 3.2.** Sastav reakcijske smjese za reverznu transkripciju.

Komponenta:	Početna koncentracija:	Konačna koncentracija:	Volumen (za reakciju od 50µl):
10x pufer	10 x	1 x	5 µl
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	5,5 mM	11 µl
dNTP	10 mM	2 mM	10 µl
oligo dT	50 µM	1,25 µM	1,25 µl
nasumični heksameri	50 µM	1,25 µM	1,25 µl
inhibitor Rnaze	20 U/µl	20 U	1 µl
reverzna transkriptaza	50 U/µl	62,5 U	1,25 µl

Reakcija se odvija u PCR mašini (Applied Biosystems GeneAmp<sup>®</sup> PCR System 2700) na sljedećem programu:

25°C 10:00 min

37°C 60:00 min

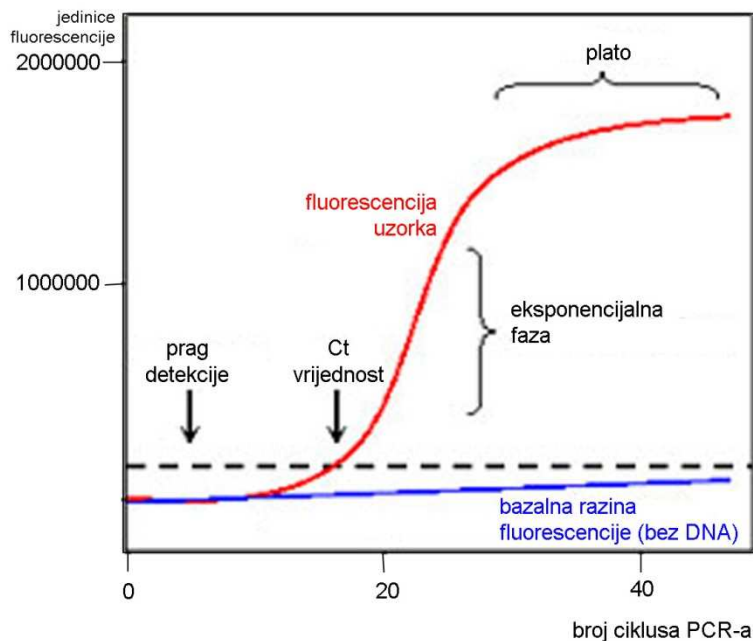
95°C 5:00 min

4°C ∞

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

### 3.2.9. Kvantitativni real-time PCR

Kvantitativni real-time PCR zasniva se na svojstvu da se tijekom PCR reakcije količina DNA udvostruči u svakom ciklusu. Svakim ciklusom eksponencijalno se povećava količina DNA u uzorku, što se prati fluorescentnom bojom koja se interkalira u novostvorene lance cDNA. Fluorescencija se povećava svakim ciklusom, a metodom se mjeri u kojem ciklusu ima dovoljno cDNA da bi fluorescencija porasla iznad praga detekcije (Ct vrijednost) (slika 3.1.). Što neke cDNA u uzorku ima više, ranije će se umnožiti dovoljno da prijeđe prag detekcije, odnosno Ct vrijednost će biti niža, dok će uzorak s manje cDNA kasnije preći prag detekcije i stoga će imati višu Ct vrijednost. Kako bi se ispravile eventualne razlike u početnoj koncentraciji uzorka koristi se i tzv. „housekeeping“ gen kao kontrolni gen. Sve Ct vrijednosti normaliziraju se prema vrijednosti „housekeeping“ gena odnosno kontrolnog gena, jer je njegova karakteristika da mu je ekspresija vrlo stabilna te ga u svim tkivima u bilo kojem trenutku ima podjednaka količina.



**Slika 3.1.** Izgled krivulje fluorescencije kod kvantitativnog real-time PCR-a. Vrijednost fluorescencije eksponencijalno raste svakim ciklusom, sve dok ne dosegne plato, gdje dolazi do zasićenja reakcije. Ct vrijednost označava broj ciklusa u kojem vrijednost fluorescencije prelazi prag detekcije. Bazalna razina fluorescencije predstavlja fluorescenciju boje koja nije vezana na DNA.

Kvantitativni real-time PCR se radi u pojedinačnim mikroeprijetama ili pločicama sa 96 bunarića za real-time PCR aparat. Ovdje je opisan postupak sa pločicama sa 96 bunarića iako se sam postupak za jedan ili drugi tip ne razlikuje. Za svaki od uzoraka se analiziralo 8 različitih gena: PTCH1, SMO, GLI1, SHH, SUFU, p16, c-Myc,  $\beta$ -katenin, te referentni gen ARP (gen za kiseli ribosomalni protein, eng. Acidic Ribosomal Protein). Prvo se napravi reakcijska mješavina za svaki gen odvojeno. U reakcijsku mješavinu se dodaje redom: IQ SYBR Green Supermix 2x (50% v/v), početnica F (0,3 mM), početnica R (0,3 mM) te voda do ukupnog volumena od 9  $\mu$ l po uzorku. Mješavina se obično radi za veći broj uzoraka i tada razdijeli po 9  $\mu$ l u odgovarajuće bunariće. Real-time PCR je napravljen u duplikatu za svaki istraživani uzorak. Svaki je od uzoraka imao prateću reakciju sa ARP genom. Za reakcijsku mješavinu za svaki gen napravljena je i jedna dodatna negativna kontrola u koju se nije dodavala cDNA. Nukleotidne sekvence korištenih početnica navedene su u tablici 3.3.

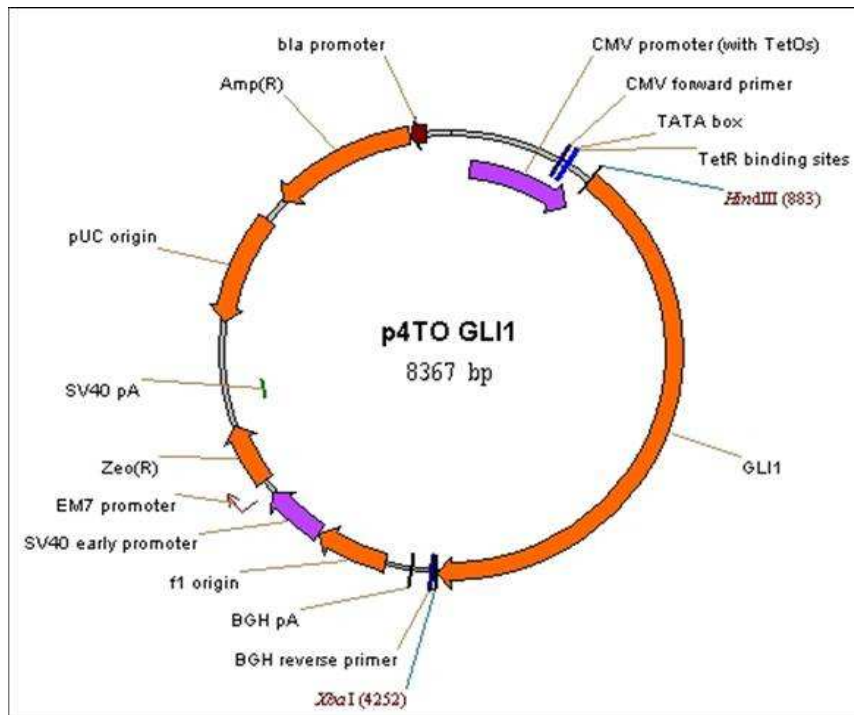


**Tablica 3.3.** Slijedovi početnica korišteni u kvantitativnim real-time PCR eksperimentima. Oznaka F označava „forward“ odnosno 5'→3' smjer sekvence gena, dok oznaka R označava „reverse“, odnosno 3'→5' smjer sekvence gena.

Naziv početnice:	Nukleotidni slijed početnice:	Referenca:
Arp F	5' GGCACCATTGAAATCCTGAGTGATGTG 3'	Eichberger i sur, 2006
Arp R	5' TTGCGGACACCCTCCAGGAAGC 3'	Eichberger i sur, 2006
Ptch F	5' TCCTCGTGTGCGCTGTCTTCCTTC 3'	Regl i sur, 2002
Ptch R	5' CGTCAGAAAGGCCAAAGCAACGTGA 3'	Regl i sur, 2002
Smo F	5' CTGGTACGAGGACGTGGAGG 3'	Kallassy i sur, 1997
Smo R	5' AGGGTGAAGAGCGTGCAGAG 3'	Kallassy i sur, 1997
Gli1 F	5' GCCGTGTAAAGCTCCAGTGAACACA 3'	Regl i sur, 2002
Gli1 R	5' TCCCACCTTTGAGAGGCCCATAGCAAG 3'	Regl i sur, 2002
Shh F	5' GAAAGCAGAGAACTCGGTGG 3'	Kallassy i sur, 1997
Shh R	5' GGTAAGTGAGGAAGTCGCTG 3'	Kallassy i sur, 1997
SuFu F	5' AACAGCAAACCTGTCCTTCC 3'	Koch i sur, 2004
SuFu R	5' TCAGATGTACGCTCTCAAGC 3'	Koch i sur, 2004
c-Myc F	5' TTCTAAGAGAAATGTCCTGAGCAATC 3'	Ponchel i sur, 2003
c-Myc R	5' TCAAGACTCAGCCAAGGTTGTG 3'	Ponchel i sur, 2003
p16 F	5' CAACGCACCGAATAGTTACG 3'	Bocker i sur, 2008
p16 R	5' AGCACCACCAGCGTGTC 3'	Bocker i sur, 2008
β-CAT F	5'-GCGTGGACAATGGCTACTCA-3'	Wong i sur, 2004
β-CAT R	5'-CCGCTTTTCTGTCTGGTTCC-3'	Wong i sur, 2004

### **3.2.10. Transfekcija ubacivanjem pcDNA4nlSMtGLI1 plazmida**

U stanične linije MCF-7 i Sk-Br-3 transfekcijom je ubačen plazmid pcDNA4nlSMtGLI1 (slika 3.2.) sa fragmentom GLI1, poklon prof. Fritz Aberger, Salzburg. Transfekcija je provedena uz pomoć lipofektamina (INVITROGEN). Stanice su nasadene u pločice sa šest jažica u kojima su rasle 24 sata. Nakon toga na stanice se doda smjesa DNA i lipofektamina koja se pripremi na način da se prvo pomiješa 12 µg DNA (0,5 µg DNA po jažici) i 6 ml DMEM hranjivog medija bez FBS-a, a odvojeno 80 µl lipofektamina i 6 ml DMEM hranjivog medija bez FBS-a, obje smjese ostavimo stajati 15 min na sobnoj temperaturi. Nakon toga pomiješaju se smjese DNA i lipofektamina u DMEM hranjivom mediju bez FBS-a, a dobivena smjesa se ostavi stajati sljedećih 15 min na sobnoj temperaturi. Prije dodavanja smjese DNA i lipofektamina na stanice, stanice se isperu 3 puta DMEM hranjivim medijem bez FBS-a. Poslije stajanja od 15 min u smjesu DNA i lipofektamina doda se 40 ml DMEM hranjivog medija bez FBS-a, promiješa se i razdijeli u svaki bunarić po 2 ml osim u bunariće gdje su nasadene stanice za kontrolu. Nakon što se na stanice doda smjesa DNA i lipofektamina ostave se u inkubatoru na 37°C pri 5% CO<sub>2</sub> na 5 sati. Nakon 5 sati sa stanica se ukloni smjesa DNA i lipofektamina, isperu se 3 puta sa PBS-om, a potom se na stanice doda po 2 ml DMEM hranjivog medija sa 20% FBS-a. Potom se stanice ostave u inkubatoru na 37°C pri 5% CO<sub>2</sub> do sljedećeg dana. Sljedeći dan (ujutro) na dio transfeciranih stanica dodan je 1 µl „stock“ otopine proteina Shh (konačna koncentracija 1,5 ng/ml), a potom je sve ponovo ostavljeno u inkubatoru na 37°C pri 5% CO<sub>2</sub> do sljedećeg dana. Sljedeći dan (ujutro) se izdvajaju RNA i proteini.



**Slika 3.2.** Plazmid p4TO GLI1. Puna cDNA gena GLI1 nalazi se između 883. i 4252. nukleotida na sekvenci plazmida, iza jakog CMV promotora. Na plazmidu se osim toga nalaze i geni za rezistenciju na ampicilin i zeocin (poklon od dr. Aberger, Austrija).

### 3.2.11. Western blot analiza

Western blotom se proteini u određenom uzorku, nakon što se razdvoje u elektroforetskom polju, detektiraju specifičnim antitijelima. Na taj način možemo saznati kako je protein eksprimiran, i uspoređivati različito tretirane stanice međusobno. Western blot analizom prvo se proteini pod utjecajem istosmjerne električne struje razdvoje u gelu u denaturirajućim uvjetima na temelju molekulske mase. SDS djeluje denaturirajuće na proteine i prekriva ih negativnim nabojem što omogućava putovanje prema pozitivnom polu pod utjecajem električne struje pri čemu veći proteini putuju sporije, a manji brže. Nakon razdvajanja na gelu, sa gela se vrši prijenos na membranu koji se također odvija pod utjecajem istosmjerne električne struje. Proteini koji se vežu na membranu detektiraju se specifičnim antitijelima.

Prvi korak kod western blot analize je razdvajanje proteina na SDS-poliakrilamidnom (PAA) gelu. Gel se izlijeva između vertikalnih staklenih ploča. Prvo se izlijeva gel za razdvajanje, u našem slučaju to je 8%-tni gel. Sastav gela je sljedeći: voda 46%, 30%-tna akrilamidna mješavina 27%, 1,5 M Tris-HCl pH 8,8 25%, SDS 0,1%, 10%-tni amonij-persulfat 1%,

TEMED 0,06%. Prvo se napravi mješavina bez amonij-persulfata i TEMED-a, oni se dodaju neposredno prije izlivanja gela između stakala. Gel za razdvajanje se ne puni do vrha stakala jer treba ostaviti mjesta za izlivanje gela za sabijanje a to je nešto malo više nego što je dubina češlja koji će se staviti u gel za sabijanje. Gel se nadsvodi sa izopropanolom, i ostavi da polimerizira otprilike pola sata. Potom se priprema gel za sabijanje prema sljedećem receptu: voda 68%, 30%-tna akrilamidna mješavina 17%, 1 M Tris-HCl pH 6,8 12,5%, SDS 0,1%, 10%-tni amonij-persulfat 1%, TEMED 0,01%. Isto kao i kod gela za razdvajanje, u gel za sabijanje amonij-persulfat i TEMED dodajemo neposredno prije izlivanja gela. Prije izlivanja gela za sabijanje treba ukloniti izopropanol uz pomoć vakuum sisaljke. Gel za sabijanje se nalijeva do vrha stakala, a potom se u njega umetne češljic pazeći da ne zaostanu mjehurići zraka. Gelu za sabijanje također treba oko pola sata da polimerizira. 30 µg proteina se odpipetira u čistu mikropruvetu i u njega se doda jedna četvrtina konačnog volumena LB 4x pufera za nanošenje (sastav LB 4x pufera: 0,2 M Tris-HCl pH 6,8, 0,4 M DTT, 8% SDS, 40% glicerol, 0,001% bromfenol blue). Uzorak pomiješan sa LB 4x puferom se zagrije na 95°C 5 minuta, a zatim centrifugira kroz 1 min pri 13000 rpm (Eppendorf Centrifuge 5415R). Ovako denaturirani uzorci proteina su sada spremni za nanošenje na gel. Nakon što je gel polimerizirao izvadi se češljic i stakla sa gelom se postave u sustav za vertikalnu elektroforezu sa puferom za elektroforezu (sastav pufera za elektroforezu: 1 M glicin, 50 mM Tris, 1% SDS). Tada se u jažice nanese proteinski marker (BioRad Precision Plus Protein Dual Color Standard) i redom pripremljeni uzorci proteina. Elektroforeza se odvija pri konstantnom naponu oko 1 h pri 100 V. Nakon što je elektroforeza završila odnosno kada je fronta boje iz LB 4x pufera stigla do donjeg ruba gela, elektroforeza se prekida i gel se vadi iz sustava za vertikalnu elektroforezu. Pažljivo se razdvoje stakla pazeći na orijentaciju gela, a zatim se slaže tzv. sendvič za prijenos razdvojenih proteina na nitroceluloznu membranu. U plastični nosač slažu se redom na prozirnu stranu nosača: spužvica, dva komada filter papira, nitrocelulozna membrana (sa odrezanim gornjim lijevim uglom radi označavanja orijentacije gela), zatim gel tako da je prvi uzorak na lijevoj strani gela, i potom dva komada filter papira i na kraju opet spužvica, te se sve zatvori sa crnom stranom nosača prema gore. Bitno je kod slaganja paziti da gel uvijek bude bliže crnoj strani nosača, dok je nitrocelulozna membrana bliže bijeloj strani nosača (zbog naboja crne i bijele strane nosača). Nosač se postavi u sustav za prijenos na nitroceluloznu membranu u pufer za prijenos (sastav pufera za prijenos: 200 mM Tris, 1,5 M glicin, svježe se dodaje još 10-20% metanola) i to crnom stranom nosača prema crnoj strani sustava za prijenos. Prijenos se odvija pri konstantnoj jakosti struje od 200 mA kroz 1 sat. Nakon što prijenos završi nitrocelulozna membrana se izvadi i stavi u kutijicu

za bojanje. Prvo se cijela membrana oboji Naphtol Blue bojom (10% metanol, 2% octena kiselina, 0,1% Naphtol Blue Black) kroz nekoliko sekundi. Zatim se membrana odbojava otopinom za odbojavanje (50% metanol, 7% octena kiselina u vodi) dok sama membrana ne bude bijela, a pruge proteina ostanu plave (od 20 min do pola sata). Na taj način se brzo može provjeriti količina nanesenih proteina prije detekcije antitijelima, a i proteini se malo bolje fiksiraju na membrani. Membrana se nakon toga treba isprati u TBS puferu (50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7,5) 3 puta po 5 min na tresilici. Na membrani se prema proteinskom markeru označe veličine, a potom se membrana izreže na trakice prema označenim veličinama. Na navedeni način se na istoj membrani u isto vrijeme može detektirati više proteina različitih veličina. Izrezane trakice se potom blokiraju u 5% otopini mlijeka u prahu u TBS puferu pola sata na sobnoj temperaturi na tresilici. Otopina primarnih antitijela se pripremi u 1% mlijeku u TBS puferu. Razrjeđenja korištenih primarnih antitijela navedena su u tablici 3.4. Aktin se koristi kao kontrola količine nanesenih proteina nakon detekcije antitijelima. Trakice membrana se upakiraju u paketiće u plastičnu foliju sa otopinom primarnih antitijela, a paketići se zavare kako tekućina ne bi iscurila van, te se inkubiraju preko noći na +4°C na roteksu kako bi se primarna antitijela cijelo vrijeme miješala.

**Tablica 3.4.** Antitijela korištena za Western blot analizu. Sva navedena antitijela su poliklonalna. Sekundarna antitijela su konjugirana sa peroksidazom (HRP).

Primarno antitijelo:	Razrjeđenje:	Sekundarno antitijelo:	Razrjeđenje:
goat anti-Actin IgG (Santa Cruz, sc-1616)	1:500	bovine anti-goat IgG-HRP (Santa Cruz, sc-2350)	1:2000
goat anti-Ptch IgG (Santa Cruz, sc-6147)	1:500		
rabbit anti-Smo IgG (Santa Cruz, sc-13934)	1:250	bovine anti-rabbit IgG-HRP (Santa Cruz, sc-2370)	1:3000
rabbit anti-Gli1 IgG (Santa Cruz, sc-20678)	1:250		
rabbit anti-Shh IgG (Santa Cruz, sc-9024)	1:250		

Sljedeći dan (jutro) trakice se ispiru 3x5 min u TBST puferu (TBS pufer sa 0,05% Tween20). Zatim se napravi otopina sekundarnih antitijela odgovarajuće koncentracije (tablica 3.4.) u 5%-tnoj otopini mlijeka u TBS-u. Trakice se inkubiraju u sekundarnim antitijelima sat vremena na sobnoj temperaturi na njihalici. Nakon inkubacije potrebno je dobro isprati antitijela, što se radi sa barem tri do četiri ispiranja po 5 min u TBST puferu. Poslije ispiranja membrana učinjena je detekcija dvokomponentnim kemiluminiscentnim reagensom (Super Signal West Pico:Femto = 3:1, Pierce). Kemiluminiscentni reagens se pomiješa prema uputama proizvođača neposredno prije nanošenja na membranu. Trakice membrana stave se između dvije prozirne folije, a potom se na njih nakapa kemiluminiscentni reagens i ostavi stajati 5 min. Nakon 5 min reagens se sa membrana ukloni pomoću papirnatog ubrusa, zatim se ponovo prekriju prozирnom folijom kako bi ostale vlažne, a potom se poslikaju pri različitom vremenu pomoću aparata za slikanje (ALLIANCE 4.7, UVITEC CAMBRIDGE).

### **3.2.12. MTT test**

MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolij bromid) je žuti spoj koji se reducira u ljubičasti formazan u živim stanicama. Koristi se za mjerenje preživljenja stanica, osobito je pogodan za ispitivanje učinaka na proliferaciju nakon tretmana kemijskim spojevima. U ovom radu MTT test korišten je za praćenje rasta i preživljenja stanica nakon tretmana ciklopaminom, Shh proteinom i tamoksifenom. Stanice se nasade u pločicu sa 96 bunarića gustoće  $10^5$  stanica/ml u ukupni volumen 180  $\mu$ l medija po bunariću. Stanice su nasađivane u četiriplikatima. Uz to se na dodatnu pločicu sa 96 bunarića nasade stanice u još 4 bunarića za kontrolno očitavanje, tzv. „0. dan“. 24 sata nakon nasađivanja kada se stanice uhvate za podlogu bunarića na stanice se doda po 20  $\mu$ l kemijskih spojeva koje testiramo u određenim koncentracijama. U tablici 3.5. prikazane su primjenjene koncentracije ispitanih kemijskih spojeva u kojima su uzgajane stanice.

**Tablica 3.5.** Primjenjene koncentracije ciklopamina, Shh proteina i tamoksifena na stanične linije tumora dojke MCF-7 i Sk-Br-3.

Primjenjeni spoj:	Primjenjena koncentracija:
Ciklopamin (cyc)	0 $\mu\text{M}$
	0,5 $\mu\text{M}$
	2,5 $\mu\text{M}$
	5,0 $\mu\text{M}$
	7,5 $\mu\text{M}$
Shh protein (Shh)	0 ng/ml
	0,5 ng/ml
	1 ng/ml
	2 ng/ml
	3 ng/ml
Tamoksifen (tam)	0 $\mu\text{M}$
	1 $\mu\text{M}$
	5 $\mu\text{M}$
	10 $\mu\text{M}$
	15 $\mu\text{M}$
Ciklopamin + Tamoksifen kroz 48 sati (cyc+tam)	0 $\mu\text{M}$ + 0 $\mu\text{M}$
	0,5 $\mu\text{M}$ + 1 $\mu\text{M}$
	2,5 $\mu\text{M}$ + 5 $\mu\text{M}$
	5,0 $\mu\text{M}$ + 10 $\mu\text{M}$
	7,5 $\mu\text{M}$ + 15 $\mu\text{M}$
Shh protein + Tamoksifen kroz 48 sati (Shh+tam)	0 ng/ml + 0 $\mu\text{M}$
	0,5 ng/ml + 1 $\mu\text{M}$
	1 ng/ml + 5 $\mu\text{M}$
	2 ng/ml + 10 $\mu\text{M}$
	3 ng/ml + 15 $\mu\text{M}$
Ciklopamin + Tamoksifen kroz 96 sati (cyc+tam)	0 $\mu\text{M}$ + 0 $\mu\text{M}$
	0,5 $\mu\text{M}$ + 1 $\mu\text{M}$
	2,5 $\mu\text{M}$ + 5 $\mu\text{M}$
	5,0 $\mu\text{M}$ + 10 $\mu\text{M}$
	7,5 $\mu\text{M}$ + 15 $\mu\text{M}$
Ciklopamin kroz 48 sati zatim Tamoksifen kroz 48 sati (cyc-tam)	0 $\mu\text{M}$ - 0 $\mu\text{M}$
	0,5 $\mu\text{M}$ - 1 $\mu\text{M}$
	2,5 $\mu\text{M}$ - 5 $\mu\text{M}$
	5,0 $\mu\text{M}$ - 10 $\mu\text{M}$
	7,5 $\mu\text{M}$ - 15 $\mu\text{M}$

Tamoksifen kroz 48 sati zatim Ciklopamin kroz 48 sati (tam-cyc)	0 $\mu$ M - 0 $\mu$ M
	1 $\mu$ M - 0,5 $\mu$ M
	5 $\mu$ M - 2,5 $\mu$ M
	10 $\mu$ M - 5,0 $\mu$ M
	15 $\mu$ M - 7,5 $\mu$ M

Isti taj dan stanice nasadene za „0. dan“ se tretiraju sa otopinom MTT na način da se prvo ukloni medij sa stanica a zatim te se na njih doda 40  $\mu$ l MTT otopine koncentracije 1 mg/ml. Pločica se potom zamota u aluminijsku foliju kako bi se zaštitila od svjetla i inkubira 5 sati u inkubatoru na 37°C pri 5% CO<sub>2</sub>. Osim na stanice, čisti MTT se doda i u 4 prazna bunarića kako bi se izmjerila osnovna obojenost MTT otopine za normalizaciju. Nakon 5 sati na stanice sa MTT otopinom doda se po 160  $\mu$ l DMSO i zatim se pločica stavi na tresilicu 10 min kako bi se kristalići formazana dobro otopili. Što je intenzitet otopine ljubičastiji to je više vijabilnih stanica, dok se sadržaj u bunarićima sa mrtvim stanicama oboji žuto. Obojenost otopine mjeri se fluorimetrijski na aparatu Labsystems Multiskan MS pri apsorbciji od 570 nm. Isti postupak očitavanja učini se i u pločicama koje su tretirane različitim kemijskim spojevima 48, 72 ili 96 sati nakon tretmana stanica. Sve vrijednosti se unesu u Excel program te izračuna postotak preživljenja stanica pri svakoj primjenjenoj koncentraciji određenog kemijskog spoja u odnosu na netretirane kontrolne stanice (0. dan).



## 4. REZULTATI

---

### 4.1. Bazalna aktivnost signalnog puta Hh-Gli u estrogen-ovisnim (MCF-7) i estrogen-neovisnim (Sk-Br-3) staničnim linijama tumora dojke

Bazalna aktivnost signalnog puta Hh-Gli u estrogen-ovisnoj staničnoj liniji MCF-7 i estrogen-neovisnoj staničnoj liniji Sk-Br-3 predstavlja vrijednosti dobivene u uvjetima normalnog rasta (kompletni DMEM medij, 10% FBS) kada stanice nisu tretirane dodatnim agensima.

#### 4.1.1. Bazalna ekspresija gena signalnog puta Hh-Gli

Ekspresija gena je praćena za gene PTCH1, SMO, GLI1, SHH, SUFU, p16, c-Myc i  $\beta$ -katenin. Tablica 4.1. prikazuje zbirni pregled rezultata bazalne ekspresije gena u istraživanim staničnim linijama tumora dojke. Bazalna ekspresija gena je izražena kao  $\Delta$ Ct. Kao referentni gen korišten je gen ARP (Eichberger i sur, 2004).

**Tablica 4.1.** Bazalna ekspresija gena signalnog puta Hh-Gli u estrogen-ovisnim (MCF-7) i estrogen-neovisnim (Sk-Br-3) staničnim linijama tumora dojke izražena kao  $\Delta$ Ct.

Stanična linija:	PTCH1	SMO	GLI1	SHH	SUFU	p16	c-Myc	$\beta$ -katenin
MCF-7	12,56	11,01	21,52	6,51	9,50	-	4,39	6,96
Sk-Br-3	8,15	15,78	22,70	21,16	7,71	8,54	2,96	4,08

Ekspresija gena signalnog puta Hh-Gli u estrogen-ovisnoj MCF-7 i u estrogen-neovisnoj staničnoj liniji Sk-Br-3 tumora dojke izražena je kao  $\Delta$ Ct u tablici 4.1., pokazuje broj ciklusa u kojem se detektira određeni gen u odnosu na referentni gen ARP. Za očekivati je da su vrijednosti za c-Myc niske, odnosno da se pojavljuje prvi jer je on odraz proliferacije. U stanica MCF-7 prvi se, nakon c-Myc pojavljuje ligand SHH, naprotiv, u Sk-Br-3 tek na kraju. Nema ekspresije p16 u stanicama MCF-7, naprotiv u Sk-Br-3 se relativno rano pojavljuje kao i sam PTCH. Čak i  $\beta$ -katenin se pojavljuje relativno rano u obje stanične linije, ukazujući da je i Wnt signalni put aktivan. U staničnoj liniji MCF-7 za SHH ligand se javlja rano, ali u Sk-Br-3 vrlo kasno. Vidljivo je da je Hh-Gli put aktivan u obje stanične linije ali vjerojatno se

odvija različitim mehanizmima. U staničnoj liniji Sk-Br-3 svi istraživani geni su eksprimirani pri čemu je ekspresija SMO, GLI1 i SHH gena na granici detekcije (javlja se kasna ekspresija).

#### 4.1.2. Bazalna ekspresija proteina signalnog puta Hh-Gli

Estrogen ovisne (MCF-7) i estrogen neovisne (Sk-Br-3) stanične linije tumora dojke analizirane su Western blot-om na prisutnost proteina signalnog puta Hh-Gli. Stanične linije tumora dojke su testirane pri normalnim uvjetima rasta (kompletni DMEM medij, 10% FBS). Tablica 4.2. prikazuje zbirni pregled rezultata detekcije bazalne ekspresije proteina Western blot-om u istraživanim staničnim linijama tumora dojke. Kao kontrola nanošenja korišten je protein Aktin.

**Tablica 4.2.** Bazalna ekspresija proteina signalnog puta Hh-Gli u estrogen ovisnim (MCF-7) i estrogen neovisnim (Sk-Br-3) staničnim linijama tumora dojke (oznaka + prikazuje da je detektiran određeni protein).

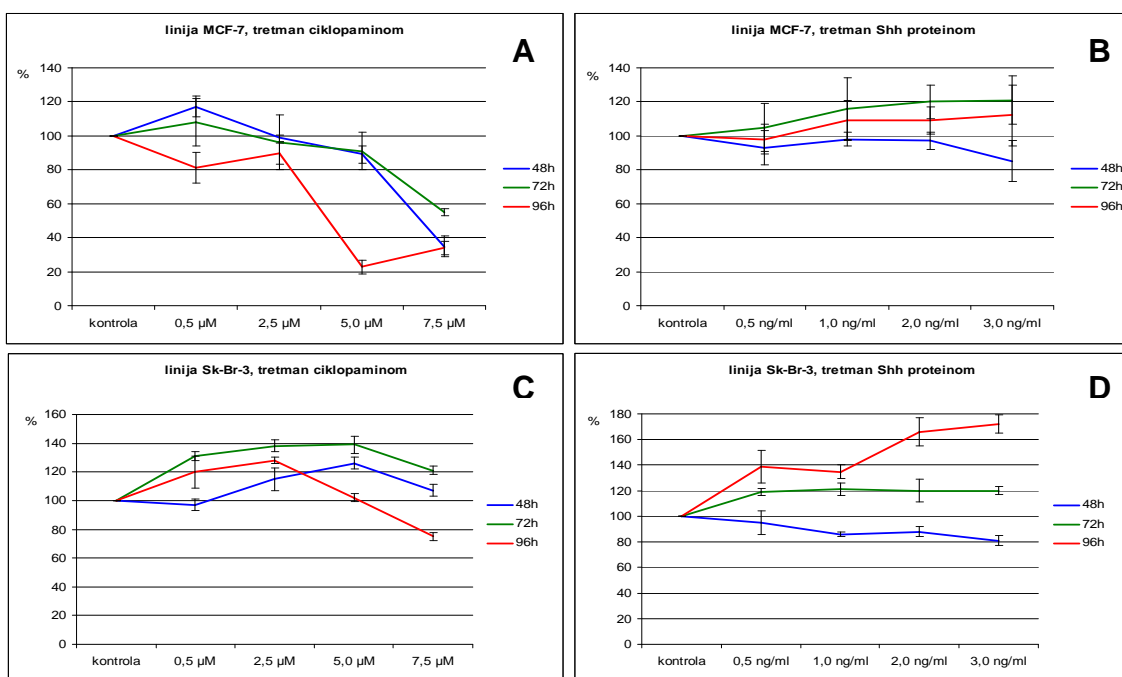
Stanična linija:	Ptch	Smo	Gli1	Shh
MCF-7	+	+	+	+
Sk-Br-3	+	+	+	+

Proteini Ptch, Smo, Gli1 i Shh detektirani su u obje istraživane stanične linije tumora dojke, međutim intenzitet bojanja slabiji je u Sk-Br-3 u odnosu na MCF-7 staničnu liniju.

## 4.2. Odgovor estrogen-ovisnih (MCF-7) i estrogen-neovisnih (Sk-Br-3) staničnih linija tumora dojke na inhibiciju i aktivaciju signalnog puta Hh-Gli

### 4.2.1. Praćenje rasta i vijabilnosti stanica

Obje istraživane stanične linije tumora dojke tretirane su s nekoliko koncentracija ciklopamina ili proteina Shh te je MTT testom praćen njihov rast i vijabilnost. Doze su odabrane na temelju literaturnih podataka.



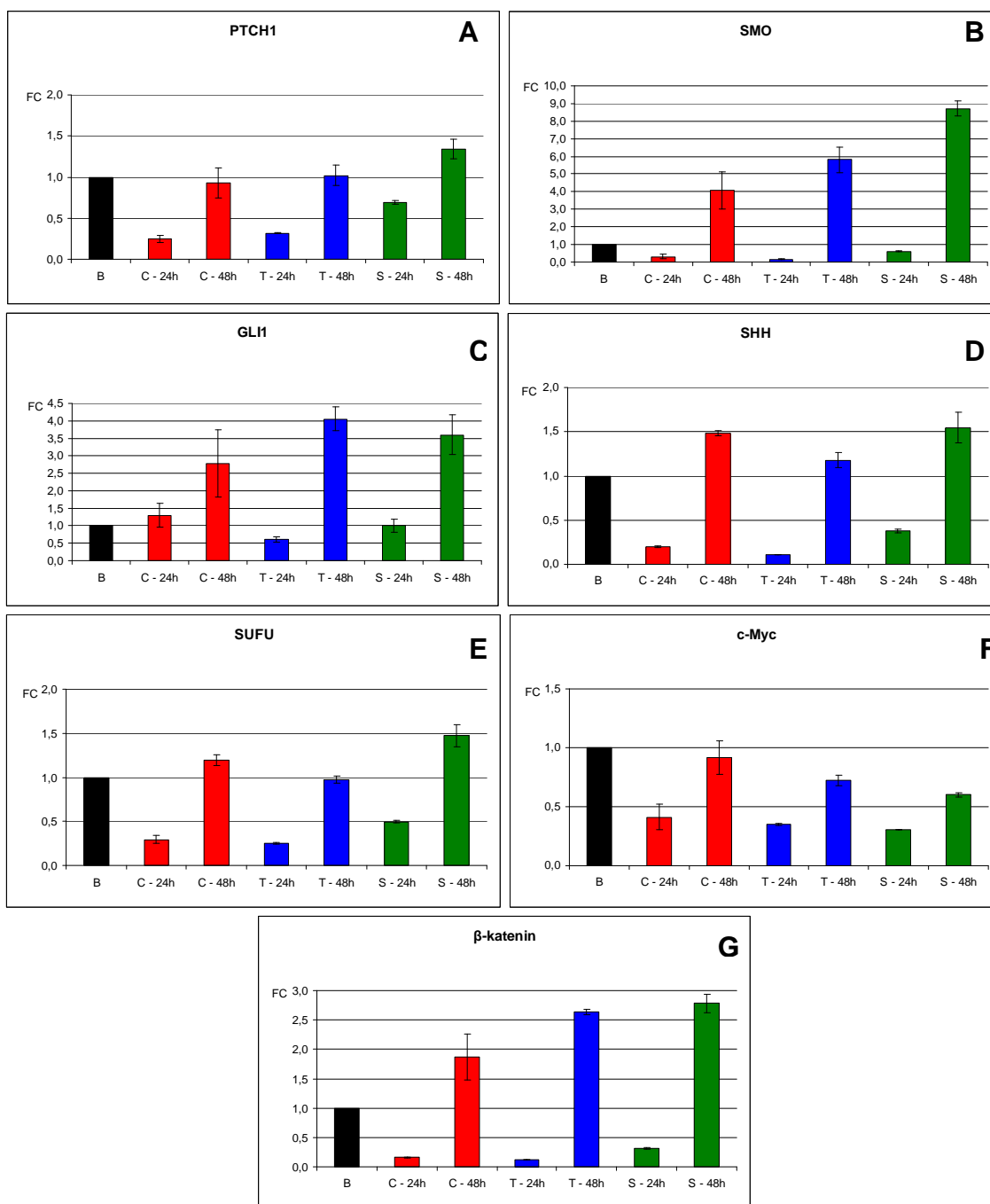
**Slika 4.1.** Rezultati MTT testa na estrogen-ovisnoj (MCF-7) i estrogen-neovisnoj (Sk-Br-3) staničnoj liniji tumora dojke nakon tretmana ciklopaminom (grafikoni A i C) ili Shh proteinom (grafikoni B i D) nakon 48h (plavo), 72h (zeleno) i 96h (crveno). Na apscisi su izražene koncentracije primjenjenih spojeva, a na ordinati postotak rasta stanica.

MTT test pokazao je djelovanje primjenjenih spojeva na stanice obje istraživane stanične linije tumora dojke. Učinak ciklopamina je izraženiji na staničnoj liniji MCF-7 u odnosu na Sk-Br-3, vidljivo je da je u svim promatranim vremenima pad krivulje veći što je doza ciklopamina veća. Vidljivo je da je doza od 0,5  $\mu\text{M}$  preniska te da je inhibicija proliferacije zamjetnija tek od 2,5  $\mu\text{M}$  a postaje značajnija tek od 5  $\mu\text{M}$ . Za drugu staničnu liniju bila bi potrebna puno veća doza i tek nakon 96 sati bi se inhibicija proliferacije mogla uočiti, što ukazuje da ciklopamin za Sk-Br-3 stanice nema inhibirajuće djelovanje (slike 4.1. A i 4.1. C).

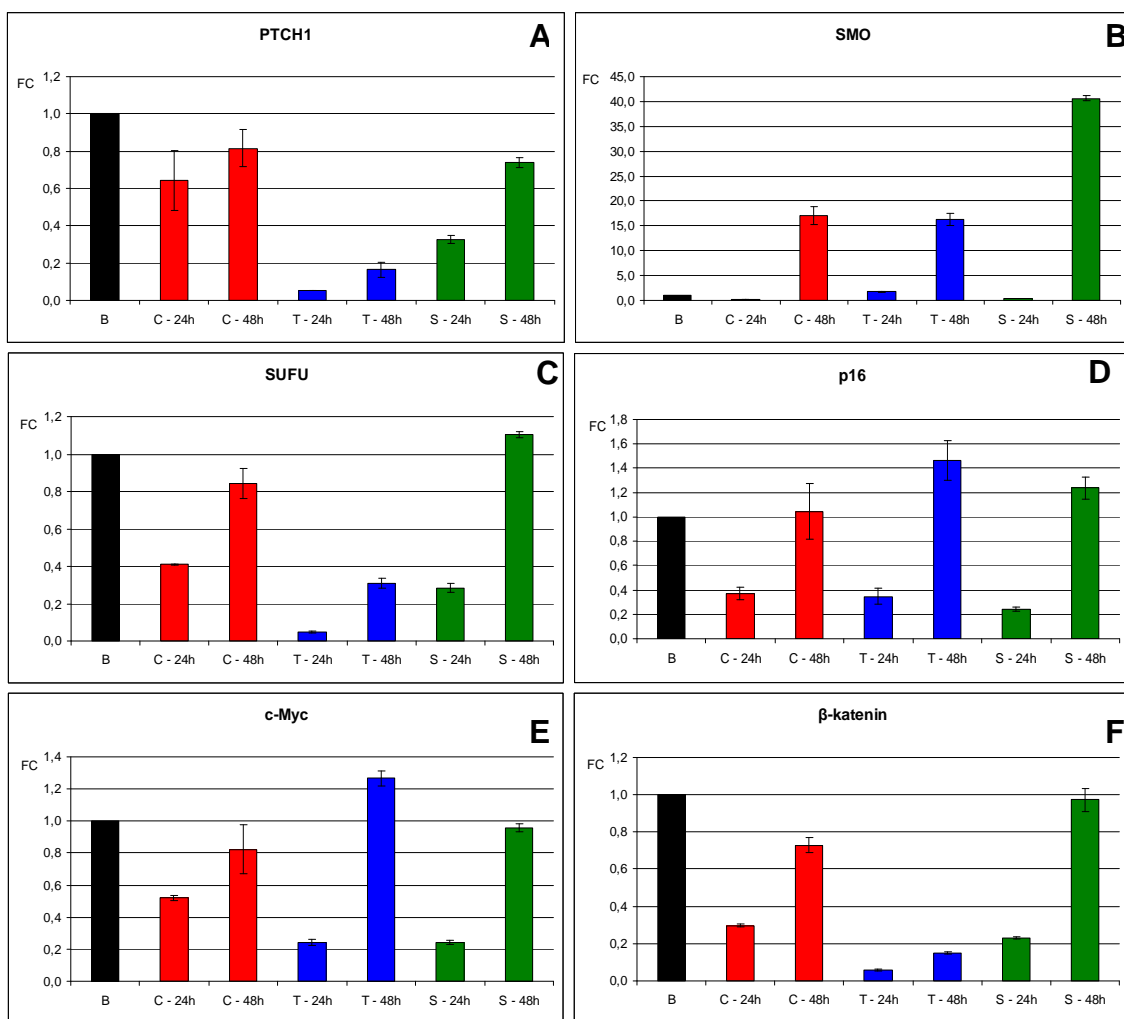
Protein Shh potiče rast stanica u obje stanične linije ali proliferacija stanica ovisna je o trajanju izloženosti Shh proteinu (48, 72 ili 96 sati) i o primjenjenoj koncentraciji Shh proteina (slika 4.1. B i 4.1. D). Duža izloženost i veće doze potrebne su za obje linije, osobito za MCF-7.

#### **4.2.2. Inhibicija i aktivacija signalnog puta Hh-Gli na razini mRNA**

Rezultati na slikama 4.2. i 4.3. daju vrijednosti promjene ekspresije (FC, eng. fold change) u odnosu na referentni gen ARP. Objе stanične linije, MCF-7 i Sk-Br-3, pokazuju različitu ekspresiju gena signalnog puta Hh-Gli ovisno o tretmanu sa ciklopaminom, tomatidinom ili proteinom Shh. Također, postoje razlike u reaktivnosti stanica ovisno o trajanju izloženosti (24 ili 48 sati) ciklopaminu, tomatidinu ili proteinu Shh. Dodatak ciklopamina na staničnu liniju MCF-7 pri tretmanu od 24 sata izaziva pad ekspresije PTCH1, SMO, SHH, SUFU, c-Myc i  $\beta$ -katenina. Duže izlaganje ciklopaminu (kroz 48 sati) uvjetuje povratak prema normalnim vrijednostima za gene PTCH1, SUFU i c-Myc, a čak poticajni učinak ima za SMO, GLI1, SHH i  $\beta$ -katenin. Također su slične vrijednosti ekspresije pri tretmanu stanica MCF-7 tomatidinom (kroz 24 i 48 sati), koji ovdje pokazuje da nije podesna kontrola, u literaturi se čak nailaze oprečne tvrdnje o njegovoj strukturnoj a nefunkcionalnoj analogiji (Lipinski i sur, 2007). Protein Shh tek nakon tretmana od 48 sati izaziva povećanje aktivnosti svih promatranih gena osim c-Myc gena u MCF-7 stanicama. Neovisno o primjenjenom spoju na staničnu liniju MCF-7 tijekom praćenja ekspresije gena nije registrirana ekspresija gena p16. Djelovanje ciklopamina na Sk-Br-3 pokazuje sličan učinak kao na MCF-7 liniju, gdje pri kratkotrajnom tretmanu (24h) dolazi do smanjenja ekspresije svih testiranih gena koja se nakon duljeg vremena polako vraća prema normalnim vrijednostima. Tretman Shh proteinom kroz 48 sati dovodi do povećanja ekspresije SMO, SUFU i p16 gena u Sk-Br-3 stanicama dok neovisno o primjenjenom spoju nije registrirana ekspresija GLI1 i SHH gena. Ovaj nedostatak detekcije vjerojatno je posljedica niske ekspresije ta dva gena, te ih pri 40 ciklusa qRT-PCR ne zamjećujemo.



**Slika 4.2.** Rezultati kvantitativnog real-time PCR-a na estrogen-ovisnoj (MCF-7) staničnoj liniji tumora dojke. Primjenjene koncentracije spojeva iznosile su: ciklopamin (2,5  $\mu$ M), tomatidin (2,2  $\mu$ M) i protein Shh (3 ng/ml). Na apscisama su prikazane oznake primjenjenih spojeva i duljine tretmana: ciklopamin kroz 24 ili 48 sati (oznake C - 24h i C - 48h, crveni stupići), tomatidin kroz 24 ili 48 sati (oznake T - 24h i T - 48h, plavi stupići), protein Shh kroz 24 ili 48 sati (oznake S - 24h i S - 48h, zeleni stupići) i netretirane stanice (oznake B, crni stupići). Na ordinati je izražena promjena ekspresije u odnosu na gen ARP. Svaki grafikon (A-G) prikazuje relativnu ekspresiju pojedinog gena.

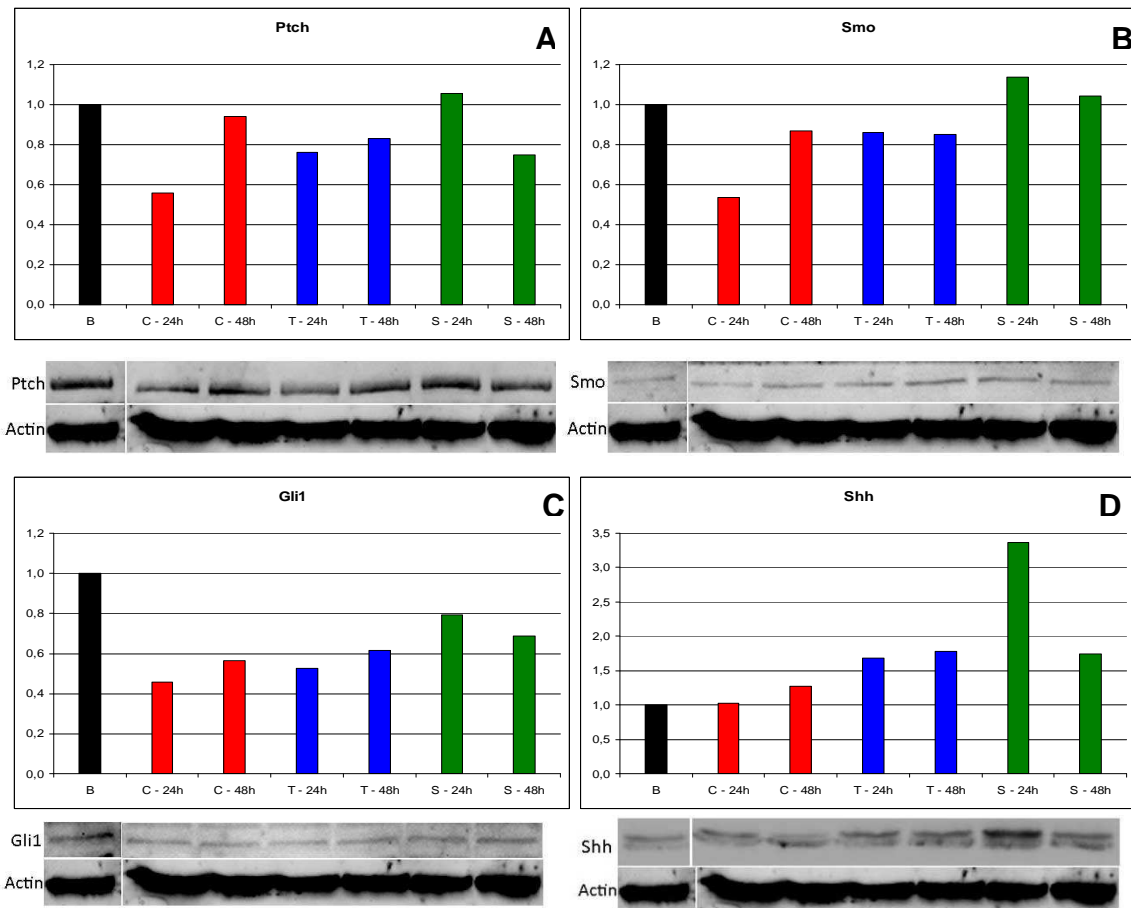


**Slika 4.3.** Rezultati kvantitativnog real-time PCR-a na estrogen-neovisnoj (Sk-Br-3) staničnoj liniji tumora dojke. Primjenjene koncentracije spojeva iznosile su: ciklopamin (2,5  $\mu$ M), tomatidin (2,2  $\mu$ M) i protein Shh (3 ng/ml). Na apscisama su prikazane oznake primjenjenih spojeva i duljine tretmana: ciklopamin kroz 24 ili 48 sati (oznake C - 24h i C - 48h, crveni stupići), tomatidin kroz 24 ili 48 sati (oznake T - 24h i T - 48h, plavi stupići), protein Shh kroz 24 ili 48 sati (oznake S - 24h i S - 48h, zeleni stupići) i netretirane stanice (oznake B, crni stupići). Na ordinati je izražena promjena ekspresije u odnosu na gen ARP. Svaki grafikon (A-F) prikazuje relativnu ekspresiju pojedinog gena.

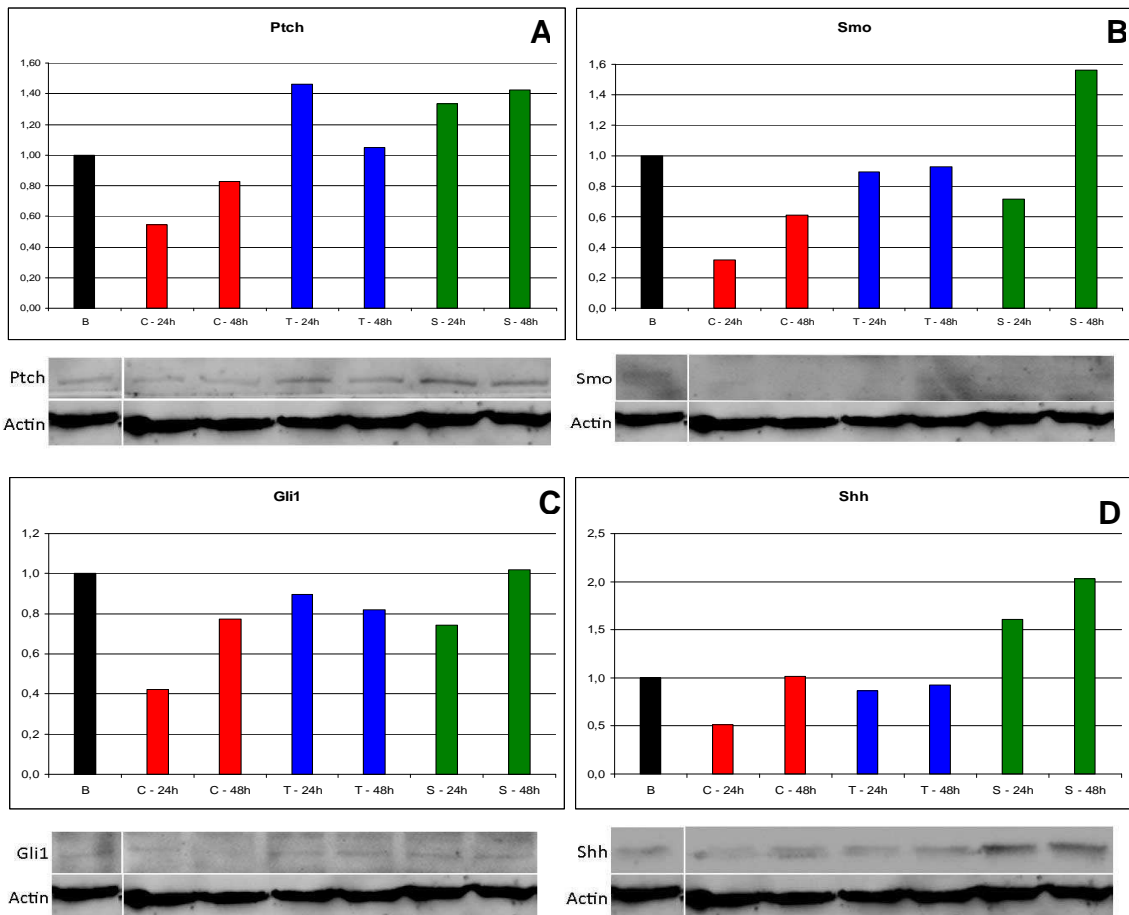
#### 4.2.3. Inhibicija i aktivacija signalnog puta Hh-Gli na razini proteina

Stanične linije tumora dojke, MCF-7 i Sk-Br-3, tretirane ciklopaminom, tomatidinom, proteinom Shh, te kontrolne netretirane stanice analizirane su na razini proteina. Proteini signalnog puta Hh-Gli detektirani su u obje istraživane stanične linije tumora dojke. Dodatak ciklopamina na staničnu liniju MCF-7 dovodi do pada ekspresije Ptch, Smo i Gli1 u prvih 24

sata, a dodatak Shh proteina ima poticajni učinak u prvih 24 sata na SMO i SHH, a nakon 48 sati primjećuje se lagani pad ekspresije Ptch, Gli1 i Shh proteina (slika 4.4. A-D). Dodatak ciklopamina na staničnu liniju Sk-Br-3 dovodi do smanjenja ekspresije proteina Ptch, Smo, Gli1 i Shh. Kod tretmana stanične linije Sk-Br-3 proteinom Shh dolazi do povećanja ekspresije Ptch, Smo i Shh proteina (slika 4.5. A-D).



**Slika 4.4.** Rezultati Western blot analize na estrogen-ovisnoj (MCF-7) staničnoj liniji tumora dojke nakon tretmana ciklopaminom kroz 24 i 48 sati (oznake C - 24h i C - 48h, crveni stupići), tomatidinom kroz 24 i 48 sati (oznake T - 24h i T - 48h, plavi stupići) i proteinom Shh kroz 24 i 48 sati (oznake S - 24h i S - 48h, zeleni stupići). Netretirane stanice (oznake B, crni stupići). Testirani su proteini Ptch (A), Smo (B), Gli1 (C) i Shh (D), a kao kontrola korišten je protein Aktin.



**Slika 4.5.** Rezultati Western blot analize na estrogen-neovisnoj (Sk-Br-3) staničnoj liniji tumora dojke nakon tretmana ciklopaminom kroz 24 i 48 sati (oznake C - 24h i C - 48h, crveni stupići), tomatidinom kroz 24 i 48 sati (oznake T - 24h i T - 48h, plavi stupići) i proteinom Shh kroz 24 i 48 sati (oznake S - 24h i S - 48h, zeleni stupići). Netretirane stanice (oznake B, crni stupići). Testirani su proteini Ptch (A), Smo (B), Gli1 (C) i Shh (D), a kao kontrola korišten je protein Aktin.

Iz slike 4.5. vidljivo je da kod Sk-Br-3 stanica ciklopamin djeluje prvih 24 sata inhibicijski za proteine Ptch, Smo, Gli1 i Shh, dok nakon dužeg tretmana, dolazi do laganog vraćanja u razinu netretiranih stanica, osim kod Shh čija se razina vraća na normalnu vrijednost nakon tretmana od 48 sati. Shh protein djeluje poticajno za neke proteine u prvih 24 sata jer se povećava razina proteina Ptch i samog Shh, dok nakon sljedeća 24 sata dolazi do vraćanja na normalnu razine Ptch, Gli1 i samog Shh proteina ali ne i Smo.

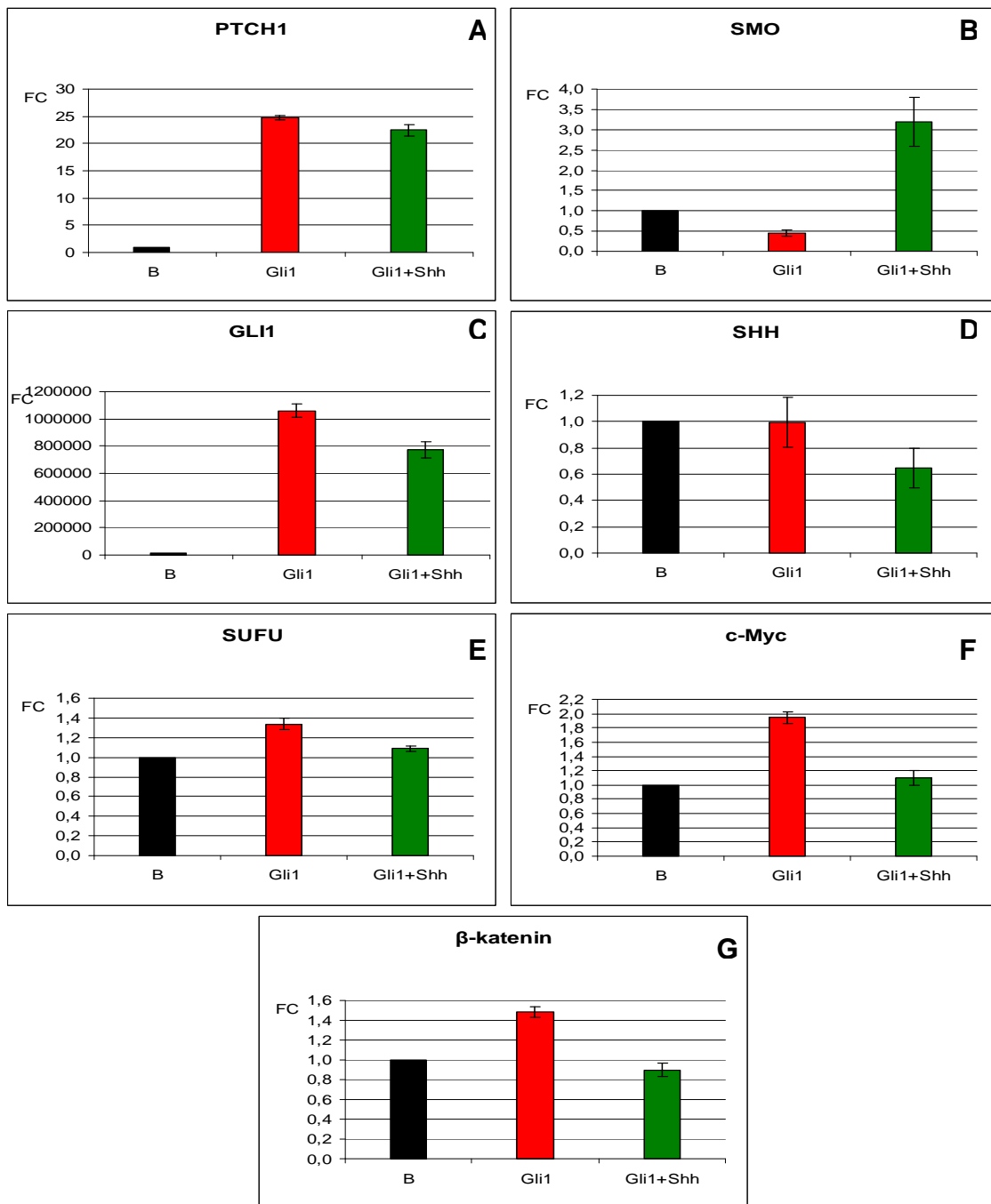


### **4.3. Aktivacija Hh-Gli signalnog puta u estrogen-ovisnim (MCF-7) i estrogen-neovisnim (Sk-Br-3) staničnim linijama tumora dojke sa pcDNA4nlSMtGLI1 plazmidom**

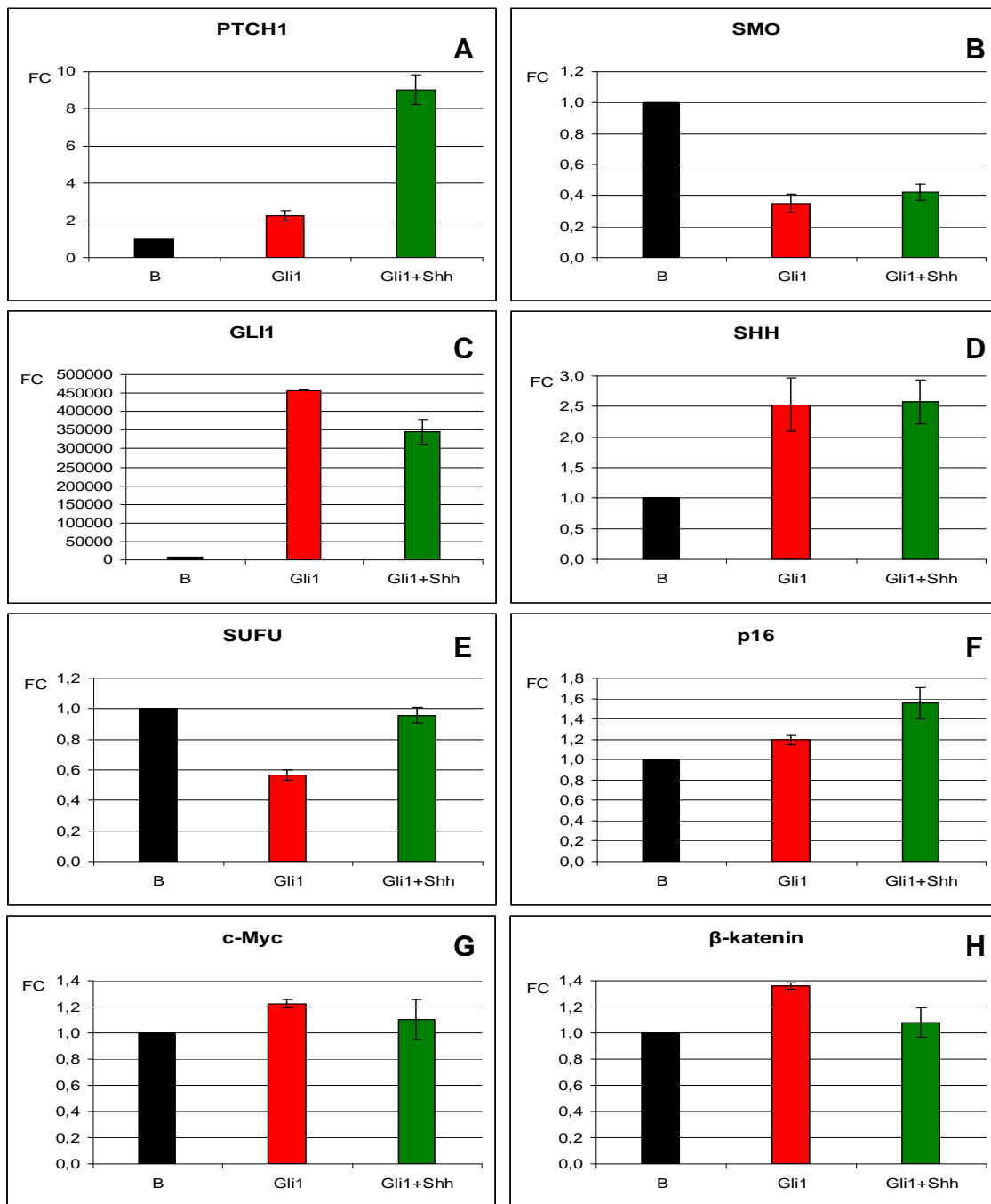
Poticanje puta Hh-Gli ubacivanjem Gli1 plazmida dovela je do različite aktivacije odnosno pokazala je aktivacija signalnog puta Hh-Gli u istraživanim staničnim linijama tumora dojke, MCF-7 i Sk-Br-3.

Transfekcija stanične linije MCF-7 Gli1 plazmidom dovodi do povećanja ekspresije PTCH1, GLI1, SUFU, c-Myc i  $\beta$ -katenin gena, do pada ekspresije SMO gena, dok se ekspresija SHH gena ne mijenja u odnosu na kontrolne netransfecirane MCF-7 stanice. Dodatak proteina Shh na MCF-7 stanice nakon transfekcije Gli1 plazmidom dovodi do povećanja ekspresije PTCH1, SMO, GLI1, SUFU i c-Myc gena, dok je ekspresija SHH i  $\beta$ -katenin gena smanjena (slika 4.6. A-G). Nakon transfekcije i u ovim uvjetima nije registrirana ekspresija p16 gena kao niti nakon dodatka proteina Shh, dok su svi ostali promatrani geni eksprimirani.

Stanična linija Sk-Br-3 nakon transfekcije Gli1 plazmidom te nakon dodatka Shh proteina pokazuje povećanu ekspresiju PTCH1, GLI1, SHH, p16, c-Myc i  $\beta$ -katenin gena, dok je ekspresija SMO i SUFU smanjena za oba slučaja (slika 4.7. A-H). Pošto MCF-7 stanice eksprimiraju relativno visoke razine Shh, vjerojatno je da se transfecirane stanice aktiviraju autokrinom stimulacijom te dodatno dodavanje Shh nema veliki učinak. Sk-Br-3 imaju početno nisku razinu Shh, te vanjski dodatak Shh nakon transfekcije uzrokuje dodatnu aktivaciju signalnog puta.



**Slika 4.6.** Rezultati kvantitativnog real-time PCR-a na estrogen-ovisnoj (MCF-7) staničnoj liniji tumora dojke nakon aktivacije signalnog puta Hh-Gli sa Gli1 plazmidom. Na apscisama su prikazane oznake primjenjenih tretmana: Gli1 plazmid (oznake Gli1, crveni stupići), Gli1 plazmid potom protein Shh (oznake Gli1 + Shh, zeleni stupići). Netretirane stanice (oznake B, crni stupići). Na ordinati je izražena promjena ekspresije u odnosu na gen ARP. Svaki grafikon (A-G) prikazuje relativnu ekspresiju pojedinog gena.

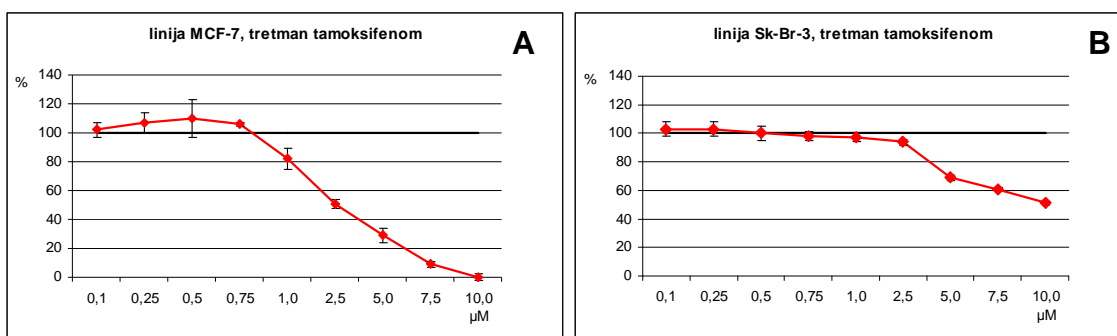


**Slika 4.7.** Rezultati kvantitativnog real-time PCR-a na estrogen-neovisnoj (Sk-Br-3) staničnoj liniji tumora dojke nakon aktivacije signalnog puta Hh-Gli sa Gli1 plazmidom. Na apscisama su prikazane oznake primjenjenih tretmana: Gli1 plazmid (oznake Gli1, crveni stupići), Gli1 plazmid potom protein Shh (oznake Gli1 + Shh, zeleni stupići). Netretirane stanice (oznake B, crni stupići). Na ordinati je izražena promjena ekspresije u odnosu na gen ARP. Svaki grafikon (A-H) prikazuje relativnu ekspresiju pojedinog gena.

#### 4.4. Odgovor estrogen-ovisne (MCF-7) i estrogen-neovisne (Sk-Br-3) stanične linije tumora dojke na tamoksifen

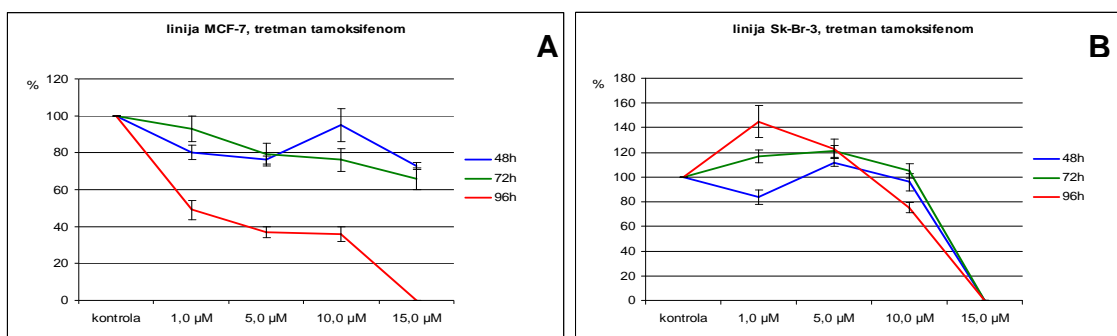
##### 4.4.1. Praćenje rasta i vijabilnosti stanica

U svrhu utvrđivanja koncentracija tamoksifena koje uzrokuju približno 50% odnosno približno 80% preživljenja istraživanih staničnih linija, MCF-7 i Sk-Br-3, praćen je rast i vijabilnost stanica uz pomoć MTT testa u uvjetima različitih primjenjenih koncentracija tamoksifena kroz 72 sata. Nakon učinjenog MTT testa potvrđeno je da su MCF-7 stanice osjetljivije na tamoksifen u odnosu na Sk-Br-3 stanice što je očekivani rezultat budući da su MCF-7 stanice estrogen-ovisna stanična linija.



**Slika 4.8.** Rezultati MTT testa na estrogen-ovisnoj (MCF-7, A) i estrogen-neovisnoj (Sk-Br-3, B) staničnoj liniji tumora dojke nakon tretmana različitim koncentracijama tamoksifena kroz 72h (crveno), u odnosu na netretirane stanice (crno). Na apscisi su izražene primjenjene koncentracije tamoksifena, a na ordinati postotak preživljenja stanica.

Iz slike 4.8. A) vidljivo je da kod stanične linije MCF-7 koncentracija tamoksifena od 2,5 µM uzrokuje preživljenje od oko 50%, dok koncentracija tamoksifena od 1,0 µM uzrokuje preživljenje od oko 80%. Nadalje, na slici 4.8. B) vidljivo je da koncentracija tamoksifena od 10,0 µM uzrokuje preživljenje od oko 50%, dok koncentracija tamoksifena od 5,0 µM uzrokuje preživljenje od oko 80% za staničnu liniju Sk-Br-3.



**Slika 4.9.** Rezultati MTT testa na estrogen-ovisnoj (MCF-7, A) i estrogen-neovisnoj (Sk-Br-3, B) staničnoj liniji tumora dojke nakon tretmana tamoksifenom nakon 48h (plavo), 72h (zeleno) i 96h (crveno). Na apscisi su izražene primjenjene koncentracije tamoksifena, a na ordinati postotak rasta stanica.

Slika 4.9. prikazuje rast i vijabilnost stanica ovisno o primjenjenim koncentracijama tamoksifena kroz 48, 72 i 96 sati. Primjenjene koncentracije tamoksifena na staničnoj liniji MCF-7 (slika 4.9. A) pokazuju podjednaki učinak tamoksifena u tretmanima koji su trajali 48 i 72 sata (66-95% preživljenja), dok u tretmanu koji je trajao 96 sati tamoksifen pokazuje jači učinak na stanice što se očituje značajno slabijim rastom i vijabilnošću stanica. Koncentracija tamoksifena od 15,0 μM u tretmanu koji je trajao 96 sati uzrokuje smrt stanica odnosno obara preživljenje na 0%. Sk-Br-3 stanice ovisno o trajanju tretmana tamoksifenom pokazuju drugačiji odgovor u odnosu na MCF-7 stanice (slika 4.9. B). Kod njih je uočeno da stanice neovisno o trajanju tretmana postižu preživljenje više od 75% kod koncentracija tamoksifena od 1,0, 5,0 i 10,0 μM, dok samo najviša primjenjena koncentracija tamoksifena u iznosu od 15,0 μM uzrokuje smrt stanica odnosno obara preživljenje na 0% i to za sve duljine tretmana.

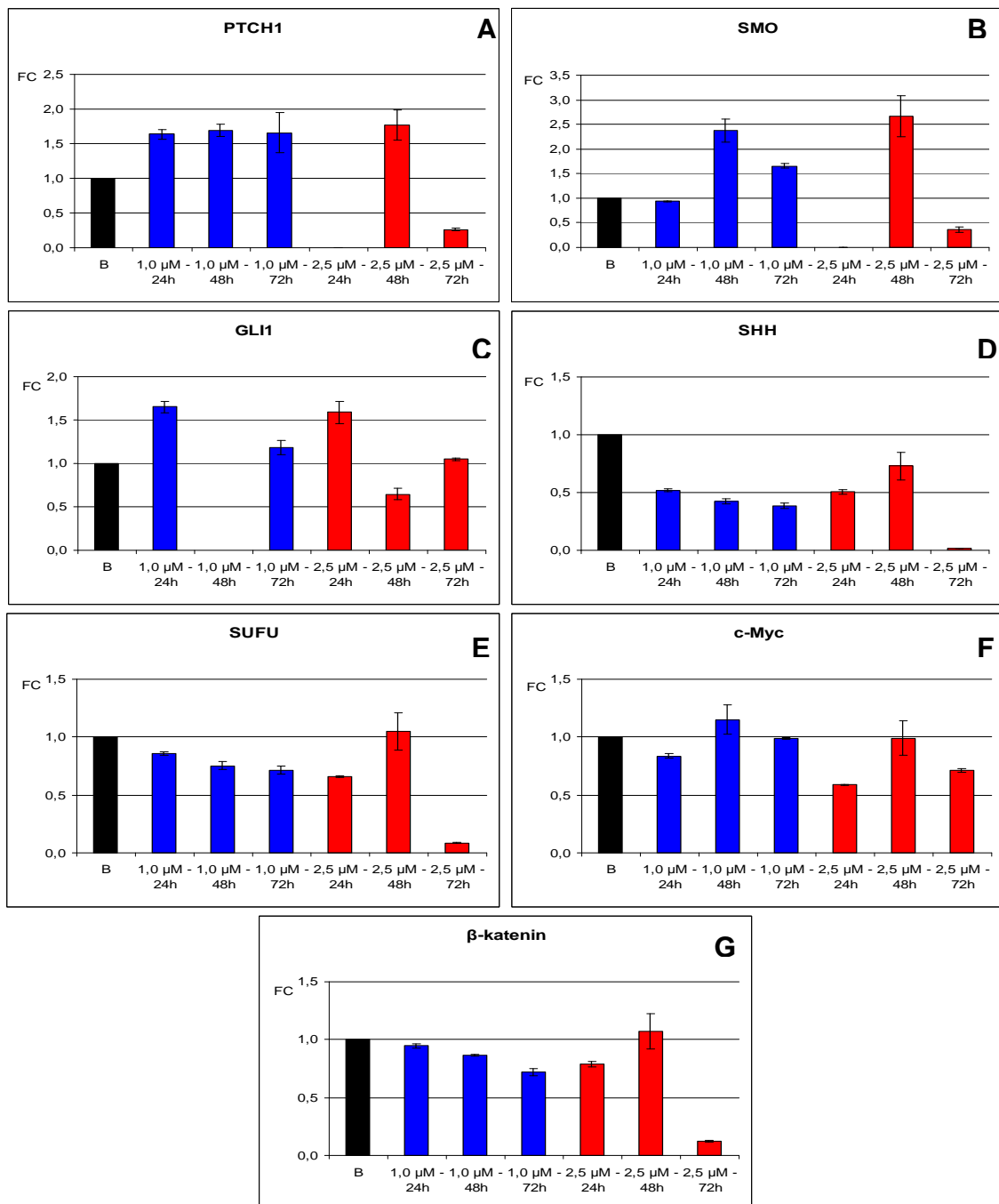
#### 4.4.2. Ekspresija signalnog puta Hh-Gli na razini mRNA

Rezultati na slikama 4.10. i 4.11. daju vrijednosti promjene ekspresije (FC, eng. fold change) u odnosu na referentni gen ARP. Obje stanične linije, MCF-7 i Sk-Br-3, pokazuju različitu ekspresiju gena signalnog puta Hh-Gli ovisno o primjenjenoj koncentraciji tamoksifena. Također, postoje razlike u reaktivnosti stanica ovisno o trajanju izloženosti (24, 48 ili 72 sata) tamoksifenu.

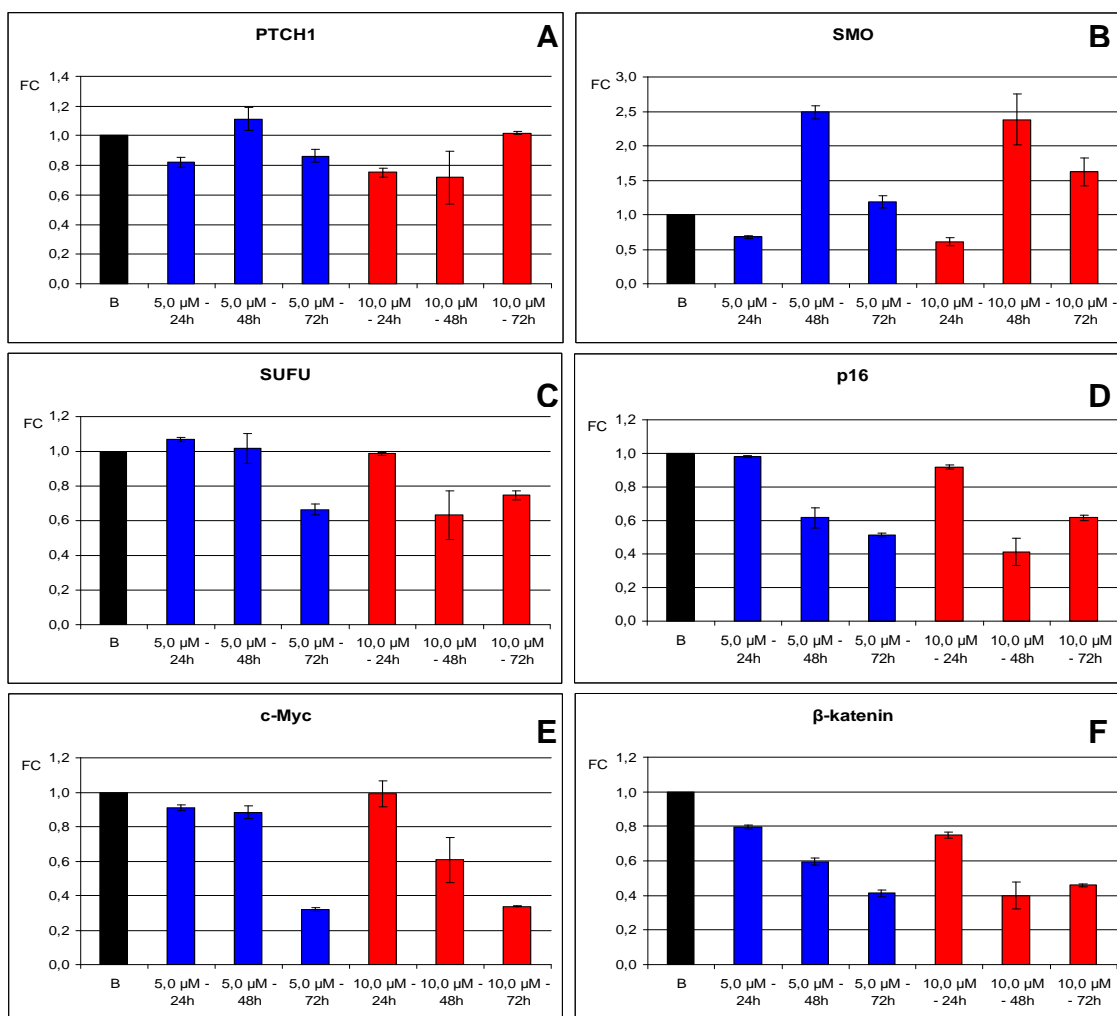
Dodatak tamoksifena u koncentraciji od 1,0  $\mu\text{M}$  kroz 24 sata na MCF-7 stanice dovodi do povećanja ekspresije PTCH1 i GLI1, pada ekspresije SHH, SUFU i c-Myc. Pri 2,5  $\mu\text{M}$  dozi ekspresija PTCH1 i SMO gena nije detektirana te je došlo do smanjenja ekspresije svih testiranih gena osim GLI1 (slika 4.10.). Tretman 1,0  $\mu\text{M}$  tamoksifenom kroz 48 sati zadržava povećanu ekspresiju PTCH1, te povećava razinu SMO i c-Myc, dok i dalje padaju ekspresije SHH, SUFU i  $\beta$ -katenina, a ekspresija GLI1 gena nije registrirana. Pri tretmanu 2,5  $\mu\text{M}$  tamoksifenom kroz 48 sati dolazi do povećane ekspresije PTCH1 i SMO, pada ekspresije GLI1 i SHH, dok je ekspresija c-Myc, SUFU i  $\beta$ -katenin gena na razini vrijednosti izmjerene u kontrolnim netretiranim stanicama. Izloženost stanica 1,0  $\mu\text{M}$  tamoksifenu u trajanju od 72 sata zadržava povećanu ekspresiju PTCH1, nešto manje SMO i GLI1, pad ekspresije SHH, SUFU i  $\beta$ -katenina, dok je ekspresija c-Myc gena na razini vrijednosti izmjerene u kontrolnim netretiranim stanicama. Nakon izloženosti stanica 2,5  $\mu\text{M}$  tamoksifenu kroz 72 sata ekspresija gena PTCH1, SMO, SUFU i SHH je izrazito smanjena dok su GLI1 i SUFU u razini kontrole. Kod svih tretmana neovisno o trajanju izloženosti tamoksifenu MCF-7 stanice nisu pokazale ekspresiju p16 gena (slika 4.10.).

Stanična linija Sk-Br-3 pri tretmanu 5,0 ili 10,0  $\mu\text{M}$  tamoksifenom neovisno o trajanju tretmana nije pokazala ekspresiju GLI1 i SHH gena. Tretman 5,0  $\mu\text{M}$  tamoksifenom kroz 24 sata izaziva blago povećanu ekspresiju samo gena SUFU, blago smanjenu ekspresiju SMO i  $\beta$ -katenina, a ekspresija ostalih gena je na razini vrijednosti izmjerene u kontrolnim netretiranim stanicama. Dodatak 10,0  $\mu\text{M}$  tamoksifena kroz 24 sata dovodi do pada ekspresije svih registriranih gena osim za gene SUFU, p16 i c-Myc čija je izmjerena ekspresija na razini ekspresije koja je izmjerena u kontrolnim netretiranim stanicama. Pri izloženosti 5,0  $\mu\text{M}$  tamoksifenu u trajanju od 48 sati dolazi do blago povećane ekspresije PTCH1 i jako povećane ekspresije SMO, pada ekspresije p16, c-Myc i  $\beta$ -katenina, dok je ekspresija SUFU gena na razini vrijednosti izmjerene u kontrolnim netretiranim stanicama. Nakon izloženosti stanica 10,0  $\mu\text{M}$  tamoksifenu kroz 48 sati te 5,0 i 10,0  $\mu\text{M}$  tamoksifenu kroz 72 sata izmjerena je povećana ekspresija samo gena SMO, dok je ekspresija svih ostalih gena smanjena.

Ekspresija gena PTCH1 je na razini vrijednosti izmjerene u kontrolnim netretiranim stanicama samo kod tretmana tamoksifenom u koncentraciji od 10,0  $\mu\text{M}$  kroz 72 sata.



**Slika 4.10.** Rezultati kvantitativnog real-time PCR-a na estrogen-ovisnoj (MCF-7) staničnoj liniji tumora dojke. Na apscisama su prikazane primjenjene koncentracije tamoksifena kroz 24, 48 i 72 sata. Stanična linija MCF-7 je tretirana tamoksifenom u koncentraciji od 1  $\mu\text{M}$  (80% preživljenja) (oznake 1  $\mu\text{M}$  - 24h, 1  $\mu\text{M}$  - 48h i 1  $\mu\text{M}$  - 72h, plavi stupići) i 2,5  $\mu\text{M}$  (50% preživljenja) (oznake 2,5  $\mu\text{M}$  - 24h, 2,5  $\mu\text{M}$  - 48h i 2,5  $\mu\text{M}$  - 72h, crveni stupići). Netretirane stanice (oznake B, crni stupići). Na ordinati je izražena promjena ekspresije u odnosu na gen ARP. Svaki grafikon (A-G) prikazuje relativnu ekspresiju pojedinog gena.



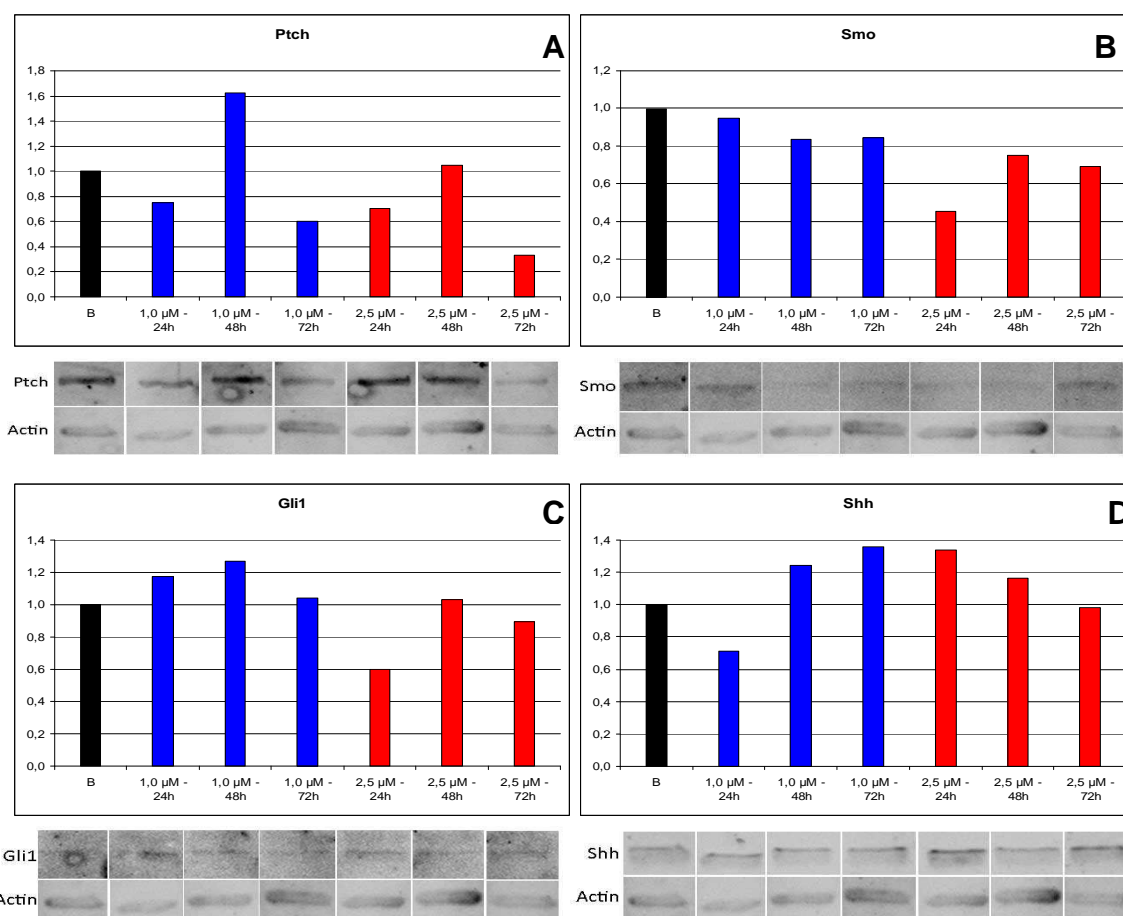
**Slika 4.11.** Rezultati kvantitativnog real-time PCR-a na estrogen-neovisnoj (Sk-Br-3) staničnoj liniji tumora dojke. Na apscisama su prikazane primjenjene koncentracije tamoksifena kroz 24, 48 i 72 sata. Stanična linija Sk-Br-3 je tretirana tamoksifenom u koncentraciji od 5 μM (80% preživljenja) (oznake 5 μM - 24h, 5 μM - 48h i 5 μM - 72h, plavi stupići) i 10 μM (50% preživljenja) (oznake 10 μM - 24h, 10 μM - 48h i 10 μM - 72h, crveni stupići). Netretirane stanice (oznake B, crni stupići). Na ordinati je izražena promjena ekspresije u odnosu na gen ARP. Svaki grafikon (A-F) prikazuje relativnu ekspresiju pojedinog gena.

#### 4.4.3. Ekspresija signalnog puta Hh-Gli na razini proteina

Nakon tretmana staničnih linija tumora dojke, MCF-7 i Sk-Br-3, koncentracijama tamoksifena koje izazivaju 80% i 50% preživljenja stanica, proteini signalnog puta Hh-Gli detektirani su u obje istraživane stanične linije tumora dojke pri čemu postoje razlike u reaktivnosti stanica ovisno o trajanju izloženosti (24, 48 ili 72 sata) tamoksifenu. Rezultati na



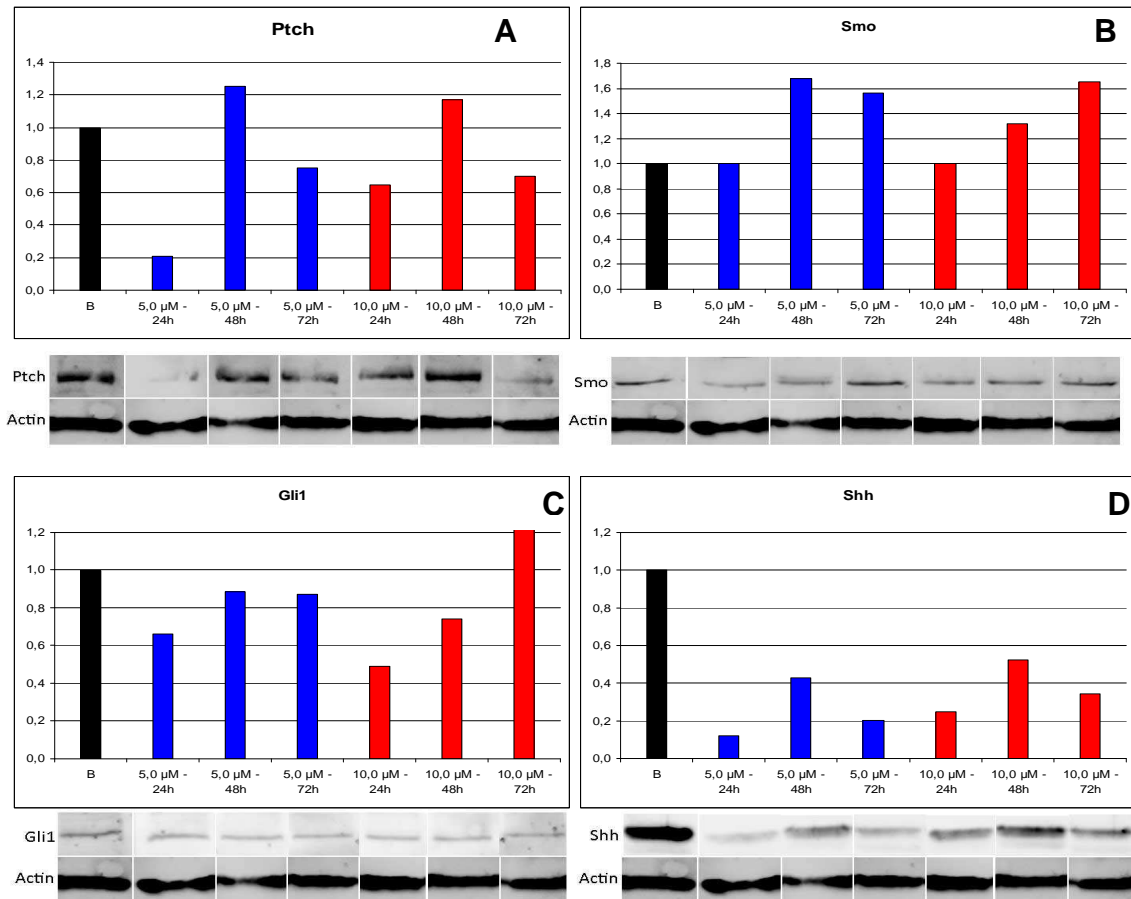
slici 4.12. daju vrijednosti ekspresije promatranih proteina (Ptch, Smo, Gli1 i Shh) za staničnu liniju MCF-7.



**Slika 4.12.** Rezultati Western blot analize na estrogen-ovisnoj (MCF-7) staničnoj liniji tumora dojke nakon tretmana tamoksifenom. Na apscisama su prikazane primjenjene koncentracije tamoksifena kroz 24, 48 i 72 sata. Stanična linija MCF-7 je tretirana tamoksifenom u koncentraciji od 1  $\mu$ M (80% preživljenja) (oznake 1  $\mu$ M - 24h, 1  $\mu$ M - 48h i 1  $\mu$ M - 72h, plavi stupići) i 2,5  $\mu$ M (50% preživljenja) (oznake 2,5  $\mu$ M - 24h, 2,5  $\mu$ M - 48h i 2,5  $\mu$ M - 72h, crveni stupići). Netretirane stanice (oznake B, crni stupići). Testirani su proteini Ptch (A), Smo (B), Gli1 (C) i Shh (D), a kao kontrola je korišten Aktin.

Dodatak tamoksifena u koncentraciji od 1,0  $\mu$ M kroz 24 sata na staničnu liniju MCF-7 dovodi do blagog povećanja ekspresije Gli1 i pada ekspresije Ptch i Shh proteina dok je Smo na sličnoj razini kao netretirane stanice. Tretman 1  $\mu$ M tamoksifenom kroz 48 sati povećava ekspresiju Ptch, Gli1 i Shh proteina te blago smanjuje ekspresiju proteina Smo, dok tretman kroz 72 sata zadržava povećanje ekspresije Gli1 i Shh, zadržava blago smanjenje Smo, i smanjuje ekspresiju Ptch. Nakon tretmana tamoksifenom u koncentraciji od 2,5  $\mu$ M kroz 24

sata povećana je ekspresija Shh a smanjena ekspresija Ptch, Smo i Gli1 proteina, dok je kod tretmana kroz 48 sati povećana ekspresija Shh, Ptch i Gli1 su u razini netretiranih stanica te je smanjena ekspresija Smo proteina. Tretman 2,5  $\mu\text{M}$  tamoksifenom u trajanju od 72 sata dovodi do pada razine ekspresije svih promatranih proteina.



**Slika 4.13.** Rezultati Western blot analize na estrogen-neovisnoj (Sk-Br-3) staničnoj liniji tumora dojke nakon tretmana tamoksifenom. Stanična linija Sk-Br-3 je tretirana tamoksifenom u koncentraciji od 5  $\mu\text{M}$  (80% preživljenja) (oznake 5  $\mu\text{M}$  - 24h, 5  $\mu\text{M}$  - 48h i 5  $\mu\text{M}$  - 72h, plavi stupići) i 10  $\mu\text{M}$  (50% preživljenja) (oznake 10  $\mu\text{M}$  - 24h, 10  $\mu\text{M}$  - 48h i 10  $\mu\text{M}$  - 72h, crveni stupići). Netretirane stanice (oznake B, crni stupići). Testirani su proteini Ptch (A), Smo (B), Gli1 (C) i Shh (D), a kao kontrola je korišten Aktin.

Iz slike 4.13. vidljivo je da dodatak tamoksifena u koncentraciji od 5,0  $\mu\text{M}$  kroz 24 sata na staničnu liniju Sk-Br-3 dovodi do pada razine ekspresije proteina Ptch, Gli1 i Shh dok je razina ekspresije proteina Smo na razini ekspresije u kontrolnim netretiranim stanicama. Kod tretmana kroz sljedeća 24 sata poraste razina ekspresije proteina Ptch i Smo, dok se Shh

održava na sniženoj razini. Nakon tretmana kroz 72 sata razina ekspresije Ptch ponovo opada dok razina Smo proteina ostaje i dalje povećana, kao i Gli1. Shh razina je i pri ovom tretmanu smanjena. Tamoksifen u koncentraciji od 10,0  $\mu\text{M}$  pri tretmanu u trajanju od 24 sata uzrokuje smanjenje ekspresije Ptch, Gli1 i Shh, dok Smo ostaje na razini kontrole. Nakon izloženosti Sk-Br-3 stanica 48 satnom tretmanu 10,0  $\mu\text{M}$  tamoksifenom povećavaju se razine ekspresije Ptch i Smo proteina, dok Gli1 i Shh ostaju smanjene. Pri tretmanu koji je trajao 72 sata razina ekspresije proteina Ptch ponovo opada, dok se razina ekspresije proteina Smo i Gli1 povećava, a Shh ostaje smanjen kao i kod svih prethodnih tretmana.

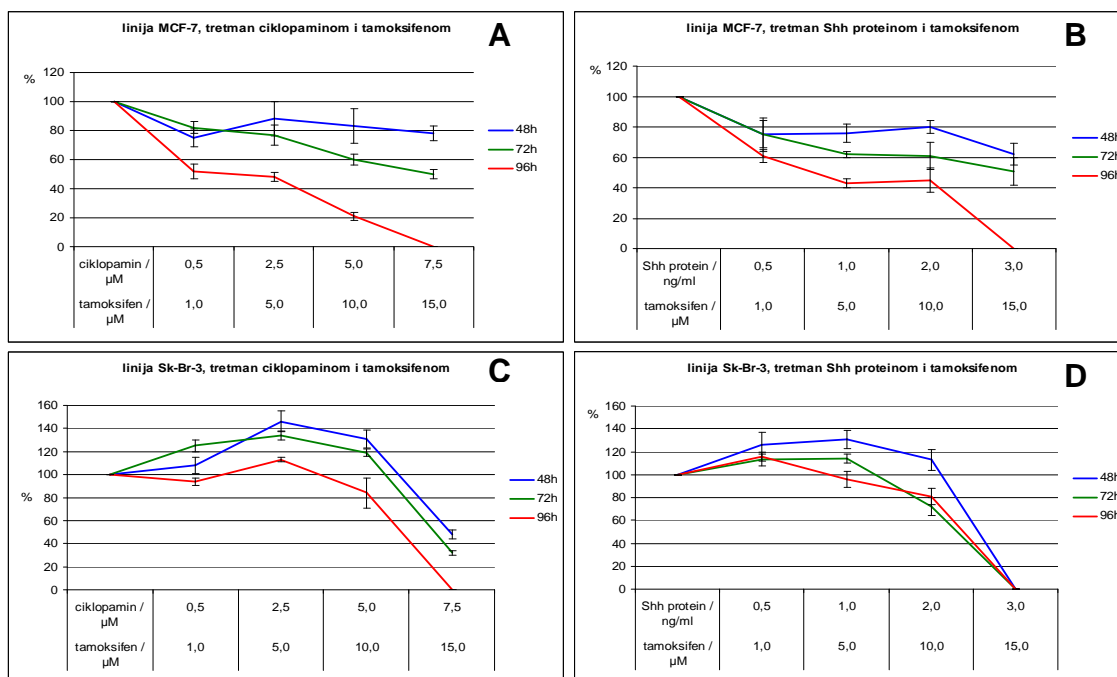
#### **4.5. Odgovor estrogen-ovisnih (MCF-7) i estrogen-neovisnih (Sk-Br-3) staničnih linija tumora dojke na kombinirane tretmane**

##### **4.5.1. Praćenje rasta i vijabilnosti stanica**

Slika 4.14. prikazuje rast i vijabilnost stanica ovisno o primjenjenim koncentracijama ciklopamina, proteina Shh i tamoksifena kroz 48, 72 i 96 sati pri kombiniranim tretmanima ciklopaminom i tamoksifenom te proteinom Shh i tamoksifenom.

Primjenjene kombinacije ciklopamina i tamoksifena na staničnoj liniji MCF-7 (slika 4.14. A) pokazuju podjednaki učinak (50-88% preživljenja) u tretmanima kroz 48 i 72 sata dok pri tretmanu od 96 sati preživljenje stanica je oko 52% ili niže pri čemu kombinacija od 7,5  $\mu\text{M}$  ciklopamina i 15,0  $\mu\text{M}$  tamoksifena uzrokuje smrt stanica odnosno obara preživljenje na 0%. Stanična linija Sk-Br-3 pokazuje drugačiji odgovor u odnosu na MCF-7 stanice (slika 4.14. C). Primjenjene kombinacije ciklopamina i tamoksifena također pokazuju podjednaki učinak ali sa slabijim učinkom na stanice, koji se očituje boljim rastom i vijabilnošću stanica s preživljenjem višim od 80% neovisno o duljini trajanja tretmana osim za najviše primjenjene koncentracije koje uzrokuju preživljenje niže od 50% za tretmane kroz 48 i 72 sata dok tretman u trajanju od 96 sati uzrokuje smrt stanica odnosno obara preživljenje na 0% jednako kao i kod MCF-7 stanica.

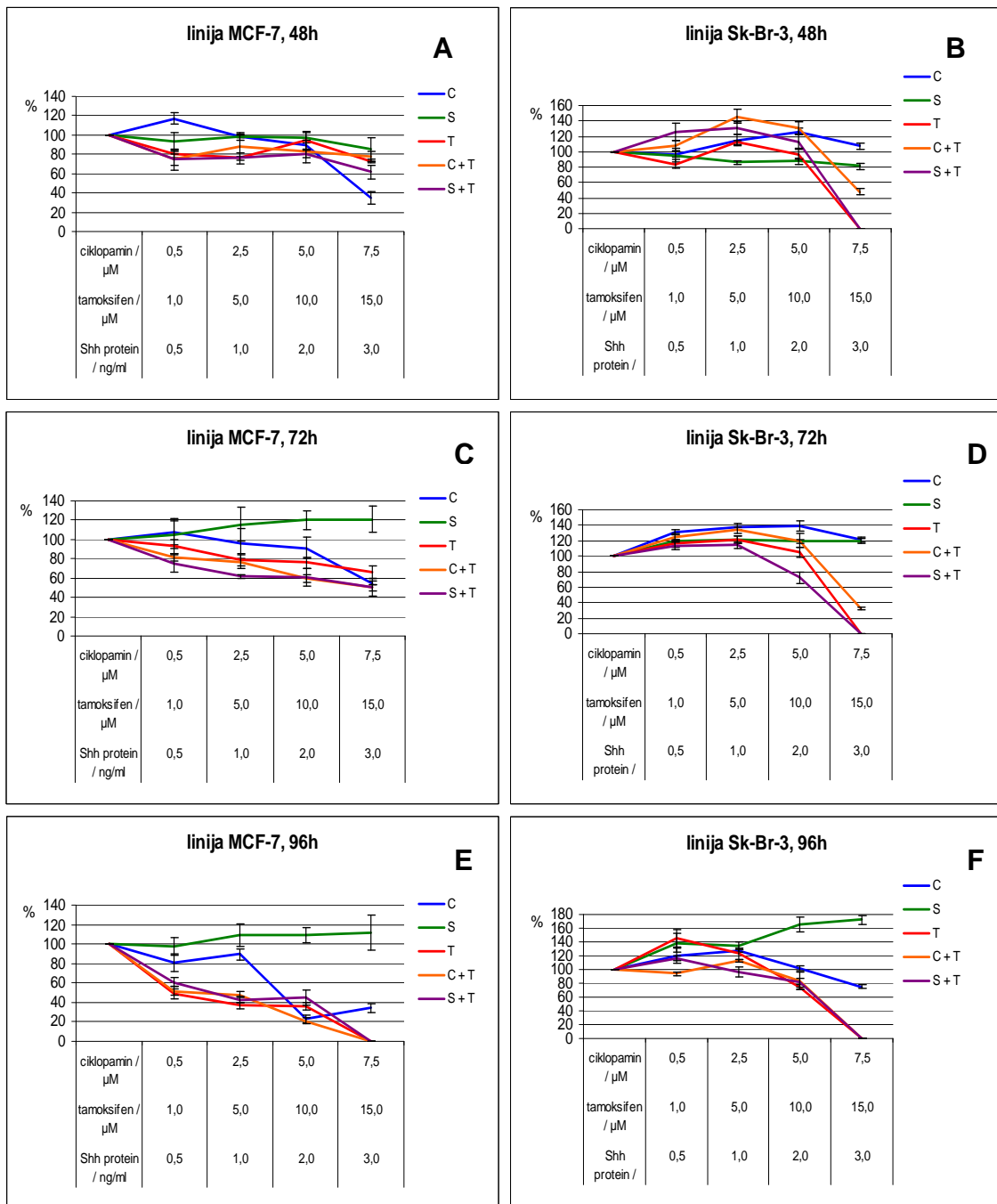
Tretmani kombinacijama proteina Shh i tamoksifena na staničnim linijama MCF-7 i Sk-Br-3 (slika 4.14. B i D) pokazuju sličan odgovor stanica kao i kod tretmana kombinacijama ciklopamina i tamoksifena, osim kod tretmana Sk-Br-3 stanica najvišim primjenjenim koncentracijama proteina Shh i tamoksifena koje uzrokuju smrt stanica neovisno o duljini tretmana.



**Slika 4.14.** Rezultati MTT testa na estrogen-ovisnoj (MCF-7) i estrogen-neovisnoj (Sk-Br-3) staničnoj liniji tumora dojke nakon kombiniranih tretmana ciklopaminom i tamoksifenom (A i C) ili Shh proteinom i tamoksifenom (B i D) nakon 48h (plavo), 72h (zeleno) i 96h (crveno). Na apscisi su izražene koncentracije primjenjenih spojeva, a na ordinati postotak rasta stanica.

Shh djeluje uvijek povećanom proliferacijom ali u kombinaciji sa tamoksifenom taj se učinak potpuno gubi i jednak je samom tamoksifenu ili tamoksifenu u kombinaciji sa ciklopaminom. Ciklopamin ima manje inhibirajući učinak u SK-Br-3 stanicama u odnosu na MCF-7 stanice. Kombinirani tretmani uspoređeni su i sa pojedinačnim tretmanima kako bi se usporedio njihov učinak. Rezultati su prikazani na slici 4.15. U MCF-7 staničnoj liniji nakon kratkotrajne izloženosti (48h) ciklopaminu ima čak izraženiji učinak na staničnu smrt od tretmana tamoksifenom ili kombinacijom ciklopamina i tamoksifena. Duljom izloženosti (72h i 96h) vidljiv je proliferacijski učinak Shh, ali on se u potpunosti blokira u kombinaciji s tamoksifenom. Tamoksifen i kombinacija tamoksifena i ciklopamina sada pokazuju jači učinak od ciklopamina, ali nema bitne razlike između tretmana tamoksifenom i kombinacijom tamoksifena i ciklopamina. U Sk-Br-3 liniji je proliferacijski učinak Shh vidljiv nakon duljeg tretmana (72-96h), te također ne mijenja osjetljivost na tamoksifen. Ciklopamin pokazuje općenito slabiji učinak nego tamoksifen, međutim kombinirani tretman ciklopaminom i

tamoksifenom ublažava učinak tamoksifena pri kraćim vremenima (48 i 72 sata) te se izjednačava sa tamoksifenom tek pri dugom tretmanu (96h).

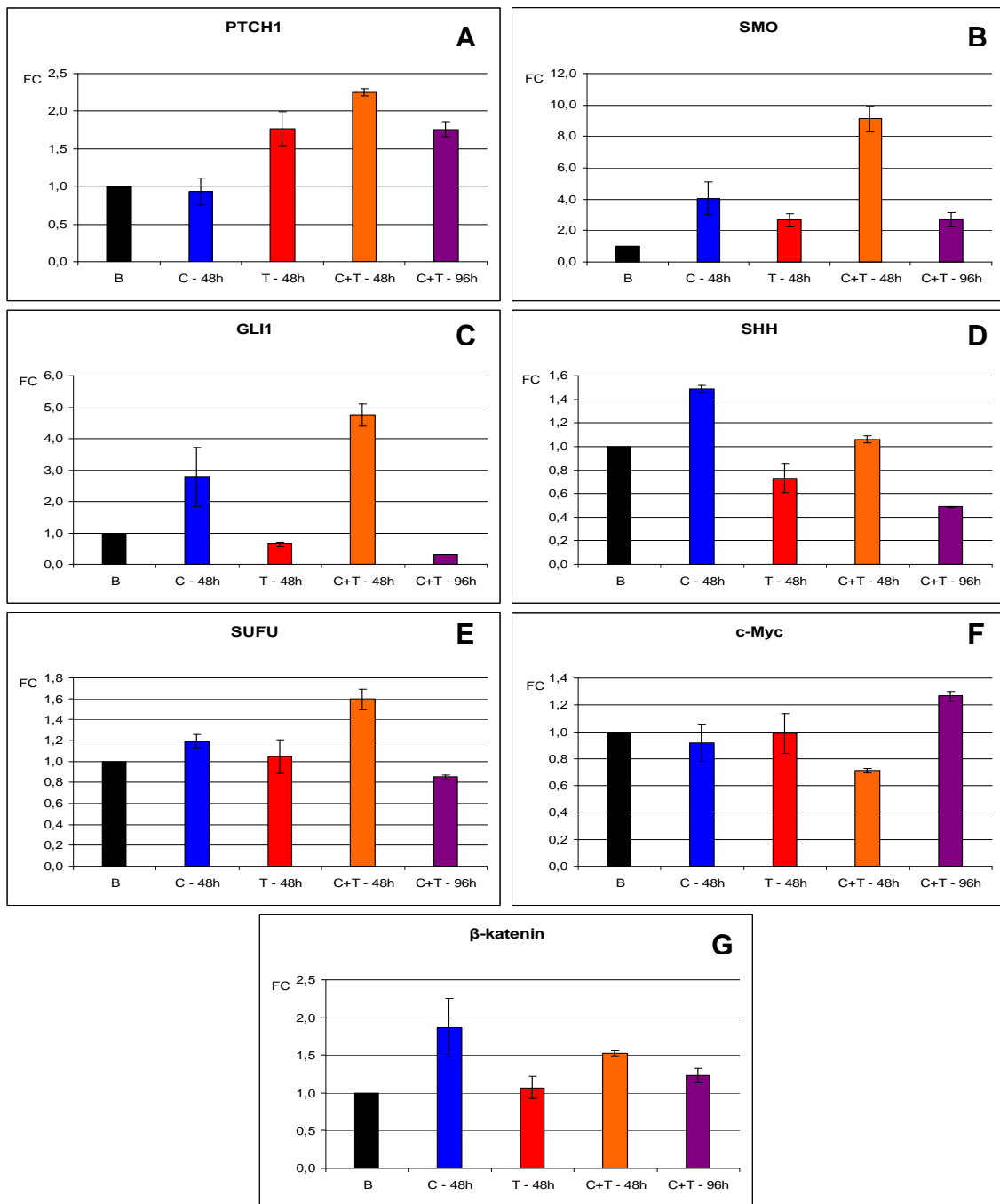


**Slika 4.15.** Rezultati MTT testa na estrogen-ovisnoj (MCF-7) i estrogen-neovisnoj (Sk-Br-3) staničnoj liniji tumora dojke nakon tretmana ciklopaminom (C, plavo), tamoksifenom (T, crveno), Shh proteinom (S, zeleno), kombinacijom ciklopamina i tamoksifena (C + T, narančasto) te kombinacijom Shh proteina i tamoksifena (S + T, ljubičasto) nakon 48h (A i B), 72h (C i D) i 96h (E i F). Na apscisi su izražene koncentracije primjenjenih spojeva, a na ordinati postotak rasta stanica.

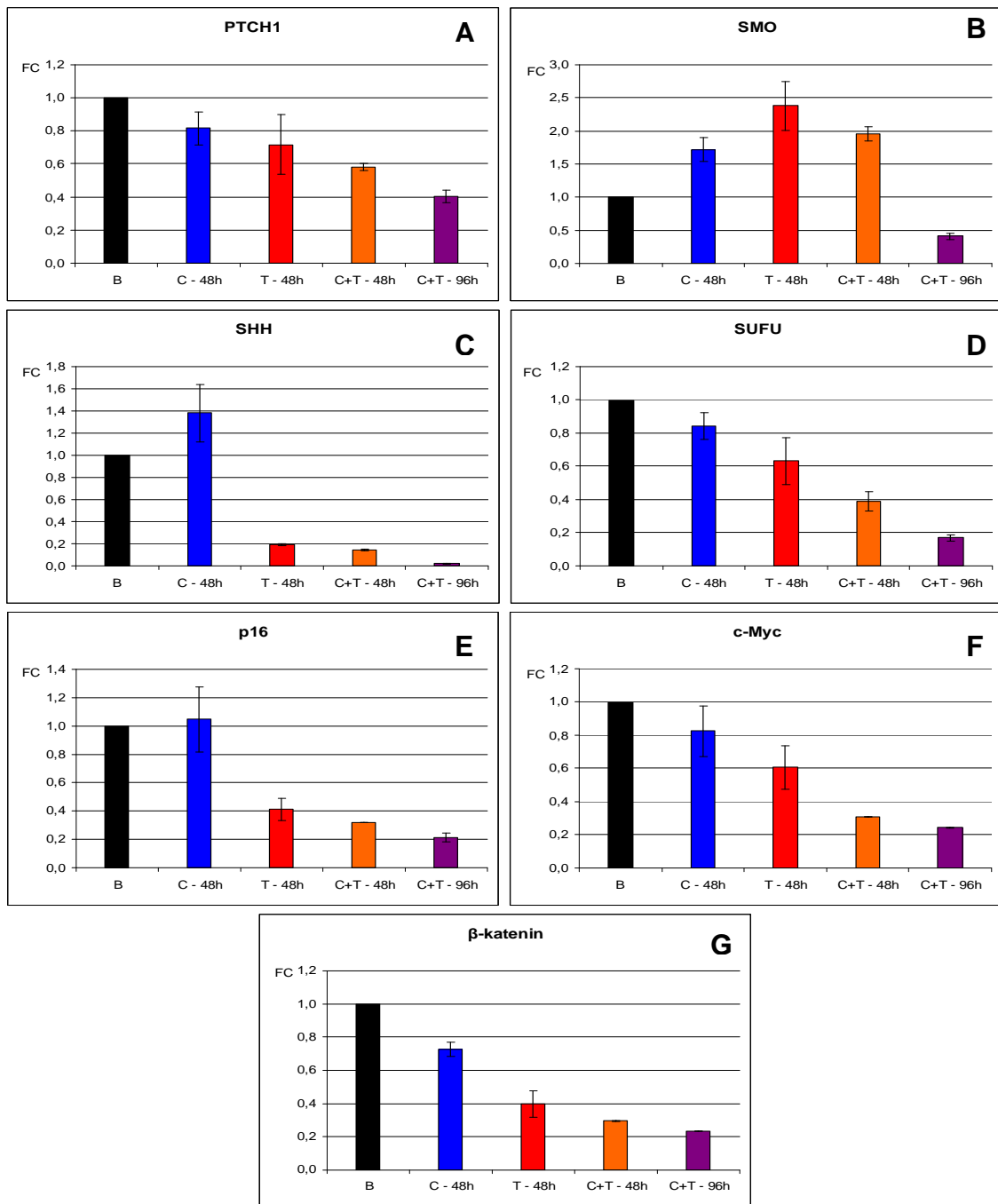
#### **4.5.2. Ekspresija signalnog puta Hh-Gli na razini mRNA**

Rezultati na slikama 4.16. i 4.17. daju vrijednosti promjene ekspresije u odnosu na referentni gen ARP. Stanične linije MCF-7 i Sk-Br-3 pokazuju različitu ekspresiju gena signalnog puta Hh-Gli ovisno o primjenjenom tretmanu ciklopaminom, tamoksifenom ili kombinacijom ciklopamina i tamoksifena. Također, postoje razlike u reaktivnosti stanica ovisno o trajanju izloženosti (48 ili 96 sati) kombiniranom tretmanu ciklopaminom i tamoksifenom.

Tretman tamoksifenom MCF-7 stanica kroz 48 sati izaziva povećanu ekspresiju PTCH1 i SMO, pad ekspresije gena GLI1 i SHH, dok je ekspresija c-Myc, SUFU i  $\beta$ -katenina na razini ekspresije izmjerene u netretiranim kontrolnim stanicama. Kod kombiniranog tretmana ciklopaminom i tamoksifenom kroz 48 sati registrirana je povećana ekspresija PTCH1, SMO, GLI1, SHH, SUFU i  $\beta$ -katenina te smanjena ekspresija gena c-Myc. Nadalje, kombinirani tretman kroz 96 sati dovodi do povećanja ekspresije PTCH1, SMO, c-Myc i  $\beta$ -katenina dok je ekspresija gena GLI1 i SHH smanjena u odnosu na netretirane kontrolne stanice (slika 4.16.). Naprotiv Sk-Br-3 tretman tamoksifenom kroz 48 sati izaziva povećanu ekspresiju samo gena SMO, a ekspresija gena GLI1 nije detektirana (slika 4.17.). Ekspresija ostalih testiranih gena smanjena je pri ovom tretmanu. Dodatak kombinacije ciklopamina i tamoksifena kroz 48, 72 i 96 sati dovodi do smanjene ekspresije svih registriranih gena osim za gen SMO, čija je izmjerena ekspresija povećana kod 48-satnog kombiniranog tretmana ciklopaminom i tamoksifenom (slika 4.17.). Neovisno o trajanju izloženosti primjenjenim spojevima nije detektirana ekspresija gena GLI1.



**Slika 4.16.** Rezultati kvantitativnog real-time PCR-a na estrogen-ovisnoj (MCF-7) staničnoj liniji tumora dojke. Na apscisama su prikazane oznake primjenjenih spojeva i duljine tretmana: ciklopamin kroz 48 sati (oznake C - 48h, plavi stupići), tamoksifen kroz 48 sati (oznake T - 48h, crveni stupići), kombinacija ciklopamina i tamoksifena kroz 48 sati (oznake C + T - 48h, narančasti stupići), te kombinacija ciklopamina i tamoksifena kroz 96 sati (oznake C + T - 96h, ljubičasti stupići). Primjenjena koncentracija ciklopamina iznosila je 2,5  $\mu\text{M}$  dok je primjenjena koncentracija tamoksifena iznosila 2,5  $\mu\text{M}$ . Netretirane stanice (oznake B, crni stupići). Na ordinati je izražena promjena ekspresije u odnosu na gen ARP svaki grafikon (A-G) prikazuje relativnu ekspresiju pojednog gena.

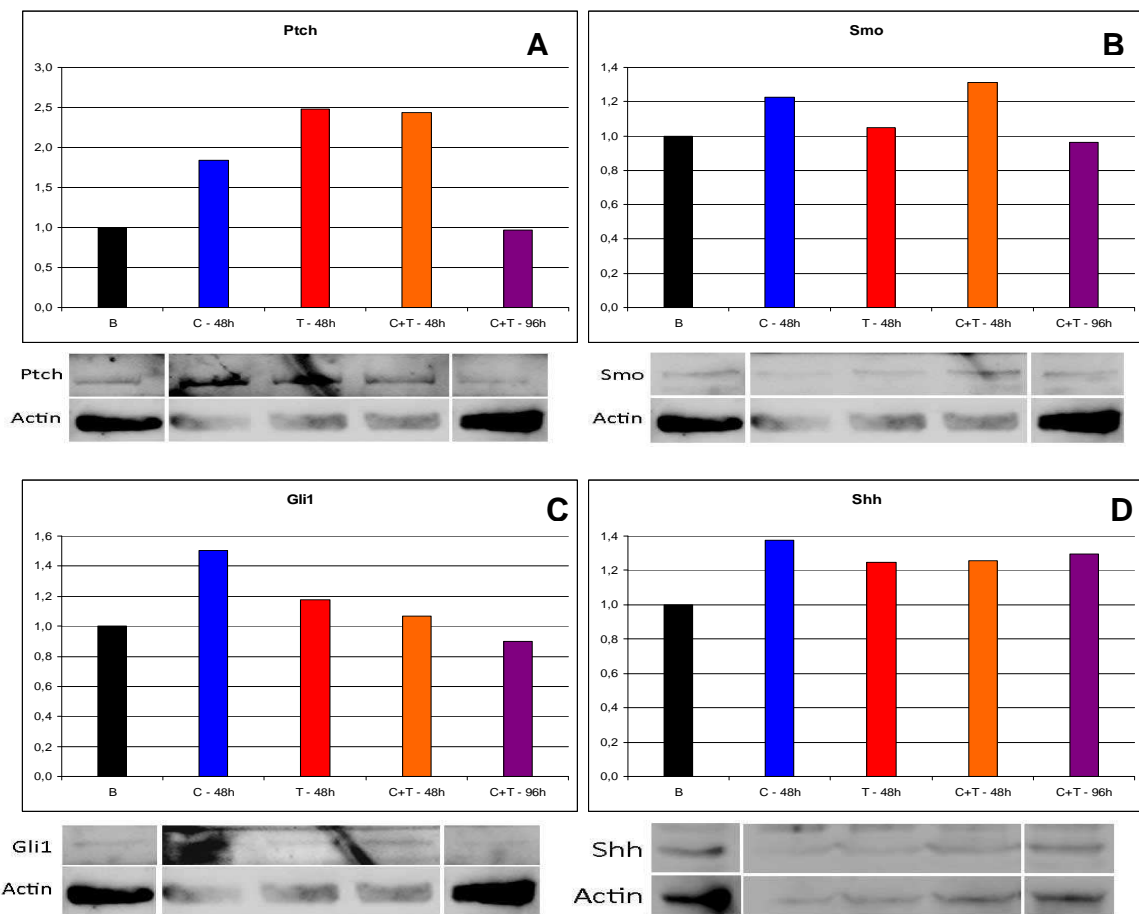


**Slika 4.17.** Rezultati kvantitativnog real-time PCR-a na estrogen-neovisnoj (Sk-Br-3) staničnoj liniji tumora dojke nakon tretmana ciklopaminom i tamoksifenom. Na apscisama su prikazane oznake primjenjenih spojeva i duljine tretmana: ciklopamin kroz 48 sati (oznake C - 48h, plavi stupići), tamoksifen kroz 48 sati (oznake T - 48h, crveni stupići), kombinacija ciklopamina i tamoksifena kroz 48 sati (oznake C + T - 48h, narančasti stupići), te kombinacija ciklopamina i tamoksifena kroz 96 sati (oznake C + T - 96h, ljubičasti stupići). Primjenjena koncentracija ciklopamina iznosila je 2,5  $\mu\text{M}$  dok je primjenjena koncentracija tamoksifena iznosila 10  $\mu\text{M}$ . Netretirane stanice (oznake B, crni stupići). Na ordinati je izražena promjena ekspresije u odnosu na gen ARP. Svaki grafikon (A-G) prikazuje relativnu ekspresiju jednog gena.



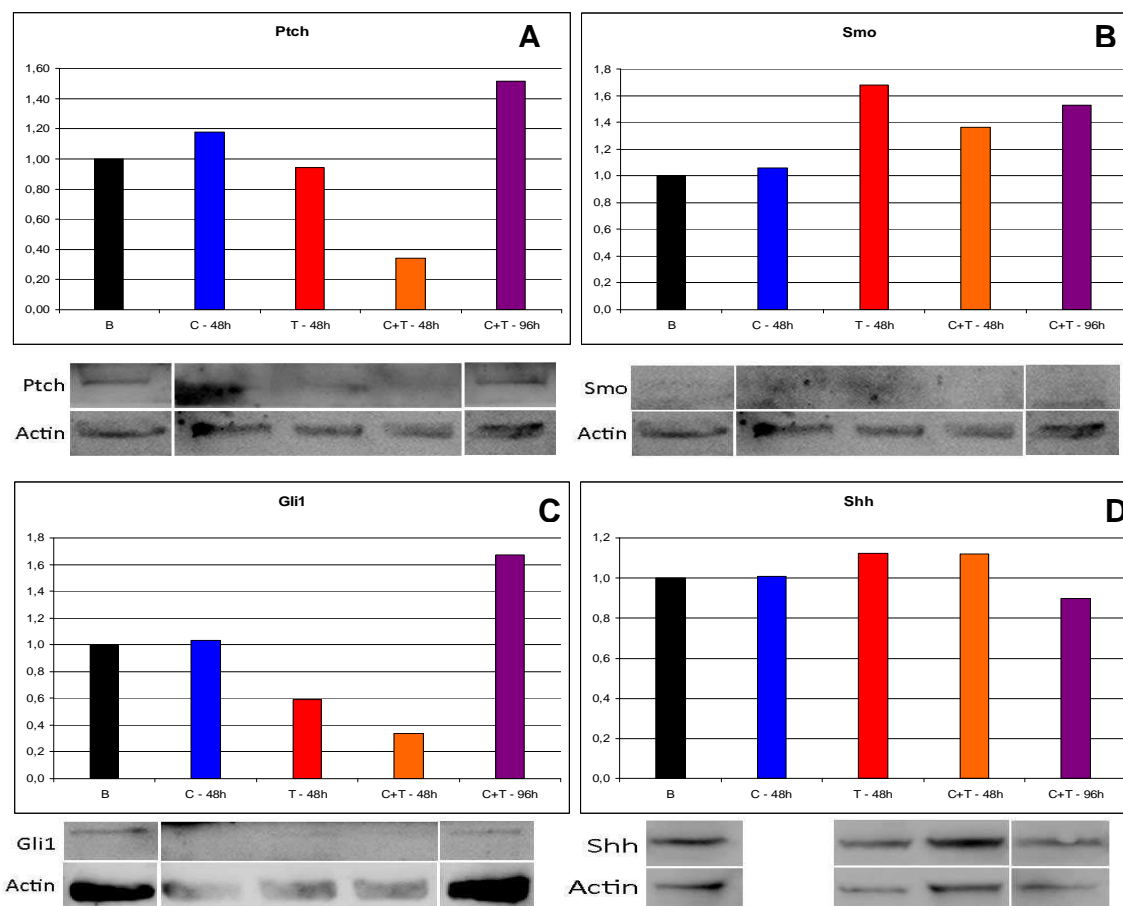
### 4.5.3. Ekspresija signalnog puta Hh-Gli na razini proteina

Nakon tretmana istraživanih staničnih linija tumora dojke ciklopaminom, tamoksifenom i kombinacijom ciklopamina i tamoksifena proteini signalnog puta Hh-Gli detektirani su u obje stanične linije pri čemu su utvrđene razlike u reaktivnosti stanica ovisno o primjenjenom spoju/spojevima i trajanju izloženosti (48 ili 96 sati) stanica određenom spoju/spojevima. Rezultati na slici 4.18. daju vrijednosti ekspresije promatranih proteina (Ptch, Smo, Gli1 i Shh) za staničnu liniju MCF-7.



**Slika 4.18.** Rezultati Western blot analize na estrogen-ovisnoj (MCF-7) staničnoj liniji tumora dojke nakon tretmana ciklopaminom, tamoksifenom te kombinacijom ciklopamina i tamoksifena. Na apcisama su prikazane oznake primjenjenih spojeva i duljine tretmana: ciklopamin kroz 48 sati (oznake C - 48h, plavi stupići), tamoksifen kroz 48 sati (oznake T - 48h, crveni stupići), kombinacija ciklopamina i tamoksifena kroz 48 sati (oznake C + T - 48h, narančasti stupići), te kombinacija ciklopamina i tamoksifena kroz 96 sati (oznake C + T - 96h, ljubičasti stupići). Primjenjena koncentracija ciklopamina iznosila je 2,5  $\mu$ M dok je primjenjena koncentracija tamoksifena iznosila 2,5  $\mu$ M. Netretirane stanice (oznake B, crni stupići). Testirani su proteini Ptch (A), Smo (B), Gli1 (C) i Shh (D), a kao kontrola je korišten Aktin.

Iz slike 4.18. vidljivo je da tretmani MCF-7 stanica ciklopaminom, tamoksifenom, te kombinacijom ciklopamina i tamoksifena kroz 48 sati dovode do povećane ekspresije svih promatranih proteina, dok izlaganje stanica kombiniranom tretmanu ciklopaminom i tamoksifenom kroz 96 sati uzrokuje povećanu ekspresiju samo proteina Shh pri čemu je registriran pad razine ekspresije proteina Ptch, Smo i Gli1. Rezultati na slici 4.19. daju vrijednosti ekspresije promatranih proteina (Ptch, Smo, Gli1 i Shh) za staničnu liniju Sk-Br-3.



**Slika 4.19.** Rezultati Western blot analize na estrogen-neovisnoj (Sk-Br-3) staničnoj liniji tumora dojke nakon tretmana ciklopaminom, tamoksifenom te kombinacijom ciklopamina i tamoksifena. Na apscisama su prikazane oznake primjenjenih spojeva i duljine tretmana: ciklopamin kroz 48 sati (oznake C - 48h, plavi stupići), tamoksifen kroz 48 sati (oznake T - 48h, crveni stupići), kombinacija ciklopamina i tamoksifena kroz 48 sati (oznake C + T - 48h, narančasti stupići), te kombinacija ciklopamina i tamoksifena kroz 96 sati (oznake C + T - 96h, ljubičasti stupići). Primjenjena koncentracija ciklopamina iznosila je 2,5  $\mu\text{M}$  dok je primjenjena koncentracija tamoksifena iznosila 10  $\mu\text{M}$ . Netretirane stanice (oznake B, crni stupići). Testirani su proteini Ptch (A), Smo (B), Gli1 (C) i Shh (D), a kao kontrola je korišten Aktin.

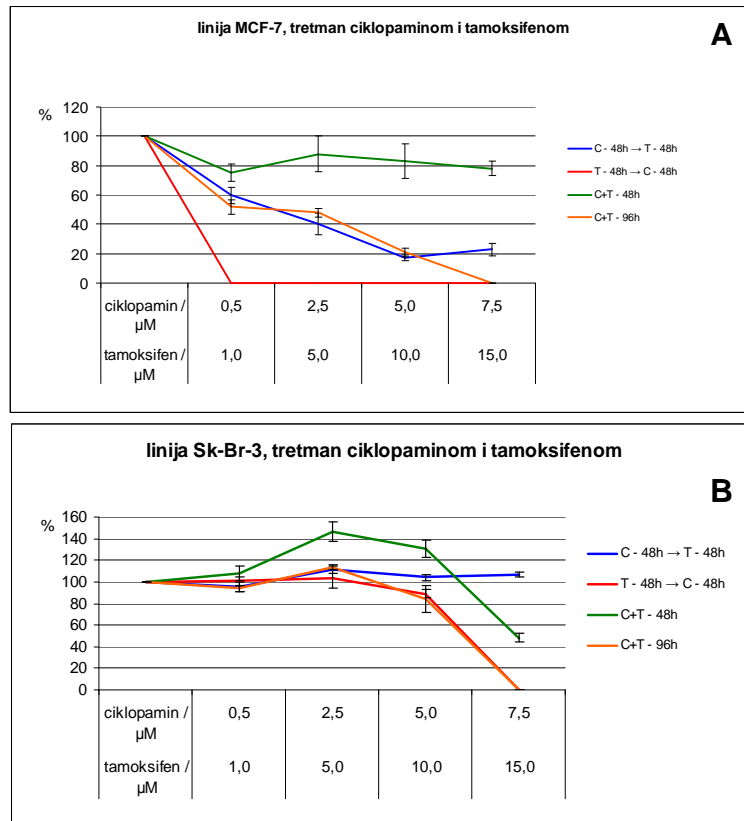
Iz slike 4.19. vidljivo je da dodatak ciklopamina kroz 48 sata na staničnu liniju Sk-Br-3 većinom ne uzrokuje promjene u razini ekspresije promatranih proteina. Kod tretmana tamoksifenom te kombiniranim tretmanom ciklopaminom i tamoksifenom kroz 48 sati blago je povećana razina ekspresije proteina Smo i Shh dok je razina ekspresije proteina Ptch i Gli1 proteina smanjena. Kombinirani tretman ciklopaminom i tamoksifenom kroz 96 sati uzrokuje povećanu razinu ekspresije Ptch, Smo i Gli1 proteina te pad razine ekspresije Shh proteina u odnosu na netretirane kontrolne stanice.

#### **4.6. Odgovor estrogen-ovisnih (MCF-7) i estrogen-neovisnih (Sk-Br-3) staničnih linija tumora dojke na dodavanja ciklopamina i tamoksifena**

##### **4.6.1. Praćenje rasta i vijabilnosti stanica**

Slika 4.20. prikazuje rast i vijabilnost stanica ovisno o primjenjenim koncentracijama ciklopamina i tamoksifena kroz 48 i 96 sati pri kombiniranim tretmanima ciklopaminom i tamoksifenom s različitim redoslijedom dodavanja pojedinog spoja, te kada su dva spoja dodana zajedno. Primjenjene kombinacije ciklopamina i tamoksifena (kada su dva spoja dodana zajedno) na staničnoj liniji MCF-7 (slika 4.20. A) uzrokuju od 75 do 88% preživljenja stanica u tretmanima kroz 48 sati dok izloženost stanica kroz 96 sati uzrokuje preživljenje stanica od 0 do 52% ovisno o koncentracijama primjenjenih spojeva pri čemu najviše koncentracije primjenjenih spojeva obaraju preživljenje stanica na 0%. Kod tretmana u kojima su stanice prvo tretirane ciklopaminom kroz 48 sati a zatim tamoksifenom kroz 48 sati preživljenje stanica je u rasponu od 17 do 60%. Pri tretmanu u kojem je prvo dodan tamoksifen kroz 48 sati a zatim ciklopamin kroz 48 sati već najniže koncentracije primjenjenih spojeva obaraju preživljenje stanica na 0%. Stanična linija Sk-Br-3 pokazuje drugačiji odgovor u odnosu na MCF-7 stanice (slika 4.20. B). Primjenjene kombinacije ciklopamina i tamoksifena (kada su dva spoja dodana zajedno) kroz 48 i 96 sati pokazuju sličan trend ovisno o duljini tretmana ali sa slabijim učinkom u odnosu na MCF-7 stanice koji se očituje boljim rastom i vijabilnošću stanica s preživljenjem od 0 do 146% ovisno o koncentracijama primjenjenih spojeva pri čemu najviše koncentracije primjenjenih spojeva obaraju preživljenje stanica na 0% samo kod tretmana u trajanju od 96 sati. Kod tretmana u kojima su stanice prvo tretirane ciklopaminom kroz 48 sati a zatim tamoksifenom kroz 48 sati preživljenje stanica je u rasponu od 96 do 112%. Pri tretmanu u kojem je prvo dodan

tamoksifen kroz 48 sati a zatim ciklopamin kroz 48 sati preživljenje stanica je u rasponu od 0 do 103% pri čemu najviše koncentracije primjenjenih spojeva obaraju preživljenje stanica na 0%.



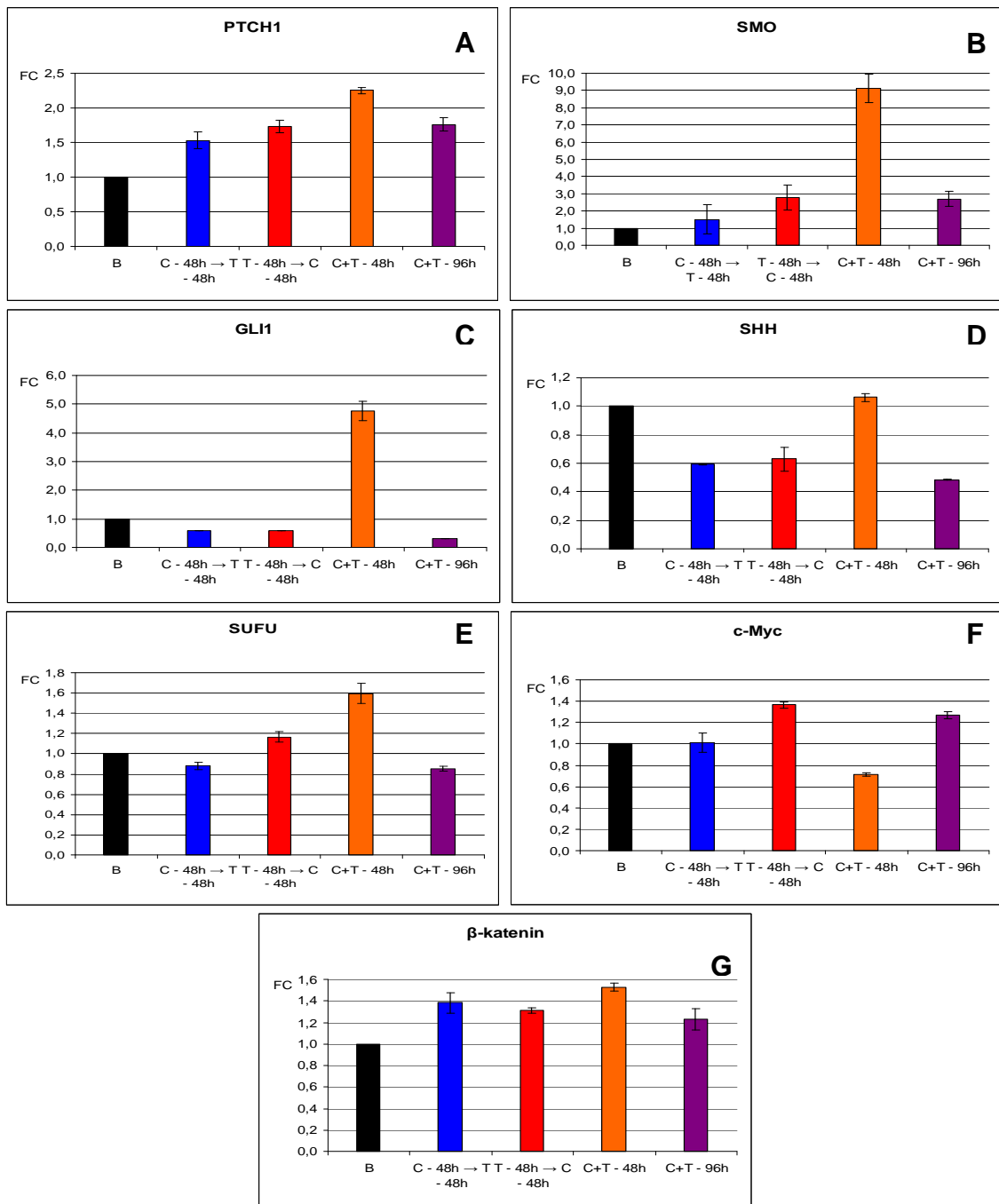
**Slika 4.20.** Rezultati MTT testa na estrogen-ovisnoj (MCF-7, A) i estrogen-neovisnoj (Sk-Br-3, B) staničnoj liniji tumora dojke nakon kombiniranih tretmana ciklopaminom i tamoksifenom, zajedno ili s različitim redosljedom dodavanja određenog spoja: ciklopamin kroz 48 sati zatim tamoksifen kroz 48 sati (oznake C - 48h → T - 48h, plavo), tamoksifen kroz 48 sati zatim ciklopamin kroz 48 sati (oznake T - 48h → C - 48h, crveno), ciklopamin i tamoksifen istovremeno kroz 48 sati (oznake C+T - 48h, zeleno), ciklopamin i tamoksifen istovremeni kroz 96 sati (oznake C+T - 96h, narančasto). Na apscisi su izražene koncentracije primjenjenih spojeva, a na ordinati postotak rasta stanica.

Redosljed dodavanja spoja mogao bi imati utjecaj na potencijalnu terapiju, te je stoga MTT ponovljen sa različitim redosljedom dodavanja spojeva. MCF-7 stanična linija bolje reagira na inhibiciju ciklopaminom i tamoksifenom od Sk-Br-3, a to je vidljivo i na ovom pokusu. Dapače, ukoliko se prvo stanice tretiraju tamoksifenom 48h, a zatim doda ciklopamin 48h, smrtnost je izrazito velik, veća od svakog spoja pojedinačno. Ukoliko se ciklopamin doda

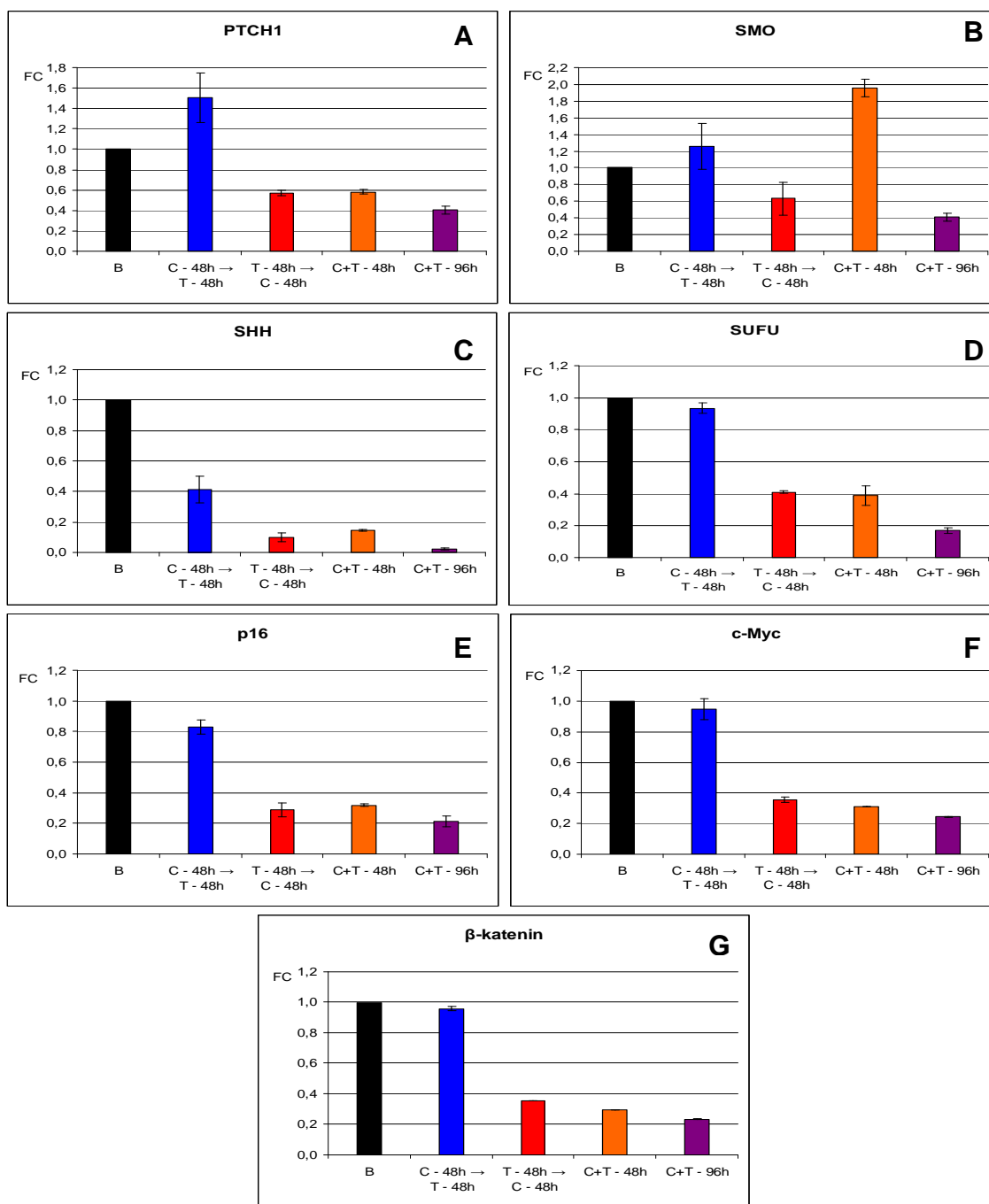
prvi, pa nakon toga tamoksifen, preživljenje je nešto bolje. Međutim, ukoliko se spojevi dodaju istovremeno, 48h tretman drastično poboljša preživljenje stanica. Ovaj efekt uočen je i na Sk-Br-3 liniji, koja u svim ostalim tretmanima pokazuje smrtnost. Dugotrajna izloženost obje linije (96h) u konačnici ipak uzrokuje smrt stanica.

#### **4.6.2. Ekspresija signalnog puta Hh-Gli na razini mRNA**

Rezultati na slikama 4.21. i 4.22. daju vrijednosti promjene ekspresije u odnosu na referentni gen ARP. Stanične linije MCF-7 i Sk-Br-3 pokazuju različitu ekspresiju gena signalnog puta Hh-Gli ovisno o primjenjenim tretmanima: kombiniranim tretmanima ciklopaminom i tamoksifenom s različitim redoslijedom dodavanja pojedinog spoja te kombinacijom ciklopamina i tamoksifena kada su dva spoja dodana zajedno kroz 48 ili 96 sati. Dodatak ciklopamina kroz 48 sati a zatim tamoksifena kroz 48 sati na MCF-7 stanice dovodi do povećanja ekspresije PTCH1 i  $\beta$ -katenina, te pada ekspresije GLI1, SHH i SUFU, pri čemu je razina ekspresije gena c-Myc i SMO na razini ekspresije u netretiranim kontrolnim stanicama (slika 4.21.). Pri obrnutom redoslijedu dodavanja ciklopamina i tamoksifena s istom duljinom djelovanja dodanih spojeva izmjerena je povećana razina ekspresije PTCH1, SMO, SUFU, c-Myc i  $\beta$ -katenina dok je razina ekspresije GLI1 i SHH gena bila smanjena. Kod kombiniranog tretmana ciklopaminom i tamoksifenom kroz 48 sati registrirana je povećana ekspresija PTCH1, SMO, GLI1, SHH, SUFU i  $\beta$ -katenina te smanjena ekspresija c-Myc gena. Nadalje, kombinirani tretman kroz 96 sati dovodi do povećanja ekspresije PTCH1, SMO, c-Myc i  $\beta$ -katenina dok je ekspresija GLI1, SHH i SUFU gena smanjena u odnosu na netretirane kontrolne stanice (slika 4.21.). Stanična linija Sk-Br-3 pri tretmanu ciklopaminom u trajanju od 48 sati a zatim tamoksifenom kroz 48 sati pokazala je povećanu razinu ekspresije PTCH1 i blago SMO, a pad razine ekspresije gena SHH, te slabi pad SUFU, p16, c-Myc i  $\beta$ -katenin (slika 4.22.). Nakon tretmana tamoksifenom kroz 48 sati a zatim ciklopaminom kroz 48 sati u stanicama je izmjerena smanjena razina ekspresije svih promatranih gena. Kombinacija ciklopamina i tamoksifena kroz 48 i 96 sati dovodi do smanjene ekspresije svih registriranih gena osim gena SMO, čija je izmjerena ekspresija povećana kod 48-satnog kombiniranog tretmana ciklopaminom i tamoksifenom. Neovisno o trajanju izloženosti primjenjenim spojevima nije registrirana ekspresija gena GLI1 (slika 4.22.).



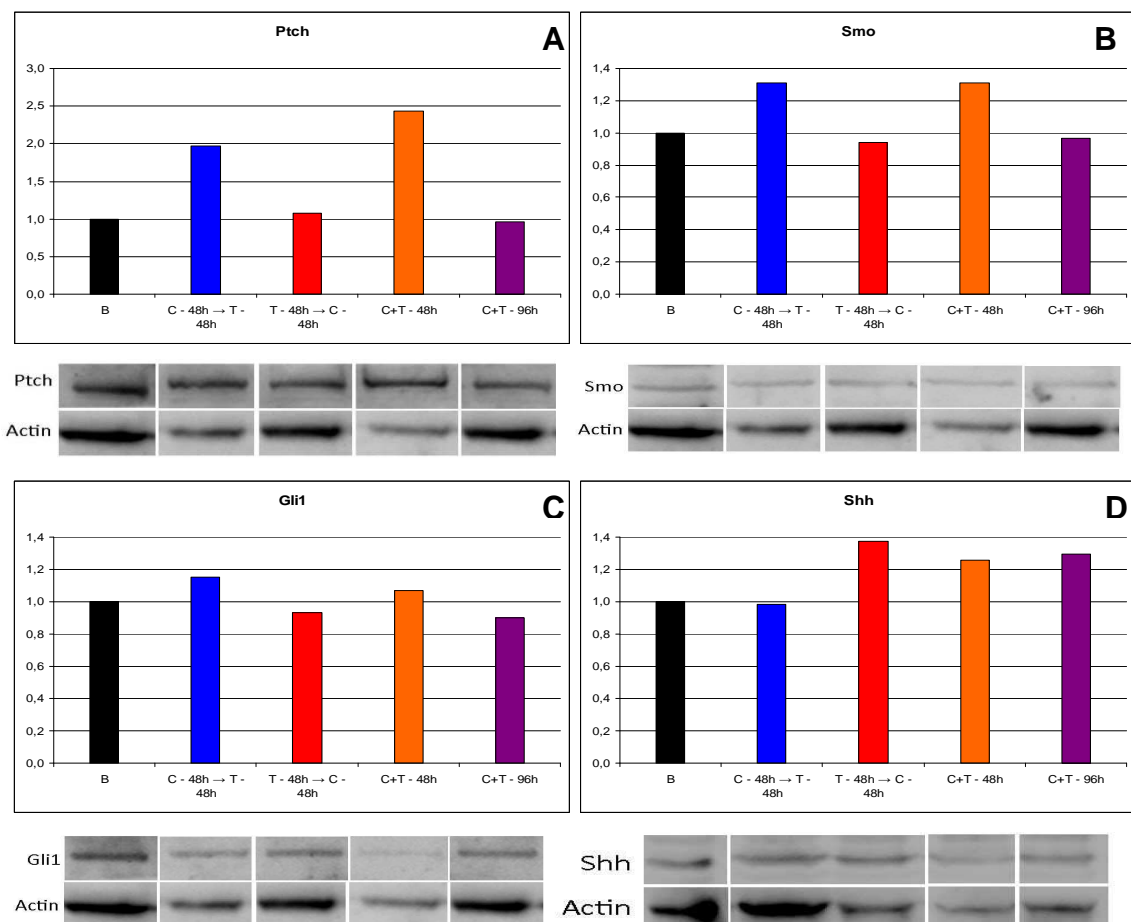
**Slika 4.21.** Rezultati kvantitativnog real-time PCR-a na estrogen-ovisnoj (MCF-7) staničnoj liniji tumora dojke nakon kombiniranih tretmana ciklopaminom i tamoksifenom, zajedno ili s različitim redosljedom dodavanja određenog spoja. Na apscisama su prikazane oznake primjenjenih spojeva i duljine tretmana: ciklopamin kroz 48 sati zatim tamoksifen kroz 48 sati (oznake C - 48h → T - 48h, plavi stupići), tamoksifen kroz 48 sati zatim ciklopamin kroz 48 sati (oznake T - 48h → C - 48h, crveni stupići), ciklopamin i tamoksifen zajedno kroz 48 sati (oznake C+T - 48h, narančasti stupići), te ciklopamin i tamoksifen zajedno kroz 96 sati (oznake C+T - 96h, ljubičasti stupići). Primjenjena koncentracija ciklopamina i tamoksifena iznosila je 2,5  $\mu$ M. Netretirane stanice (oznake B, crni stupići). Na ordinati je izražena promjena ekspresije u odnosu na gen ARP. Svaki grafikon (A-G) prikazuje relativnu ekspresiju jednog gena.



**Slika 4.22.** Rezultati kvantitativnog real-time PCR-a na estrogen neovisnoj (Sk-Br-3) staničnoj liniji tumora dojke nakon kombiniranih tretmana ciklopaminom i tamoksifenom, zajedno ili s različitim redosljedom dodavanja određenog spoja. Na apscisama su prikazane oznake primjenjenih spojeva i duljine tretmana: ciklopamin kroz 48 sati zatim tamoksifen kroz 48 sati (oznake C - 48h → T - 48h, plavi stupići), tamoksifen kroz 48 sati zatim ciklopamin kroz 48 sati (oznake T - 48h → C - 48h, crveni stupići), ciklopamin i tamoksifen zajedno kroz 48 sati (oznake C+T - 48h, narančasti stupići), te ciklopamin i tamoksifen zajedno kroz 96 sati (oznake C+T - 96h, ljubičasti stupići). Primjenjena koncentracija ciklopamina iznosila je 2,5  $\mu$ M a tamoksifena 10  $\mu$ M. Netretirane stanice (oznake B, crni stupići). Na ordinati je izražena promjena ekspresije u odnosu na gen ARP. Svaki grafikon (A-G) prikazuje relativnu ekspresiju jednog gena.

### 4.6.3. Ekspresija signalnog puta Hh-Gli na razini proteina

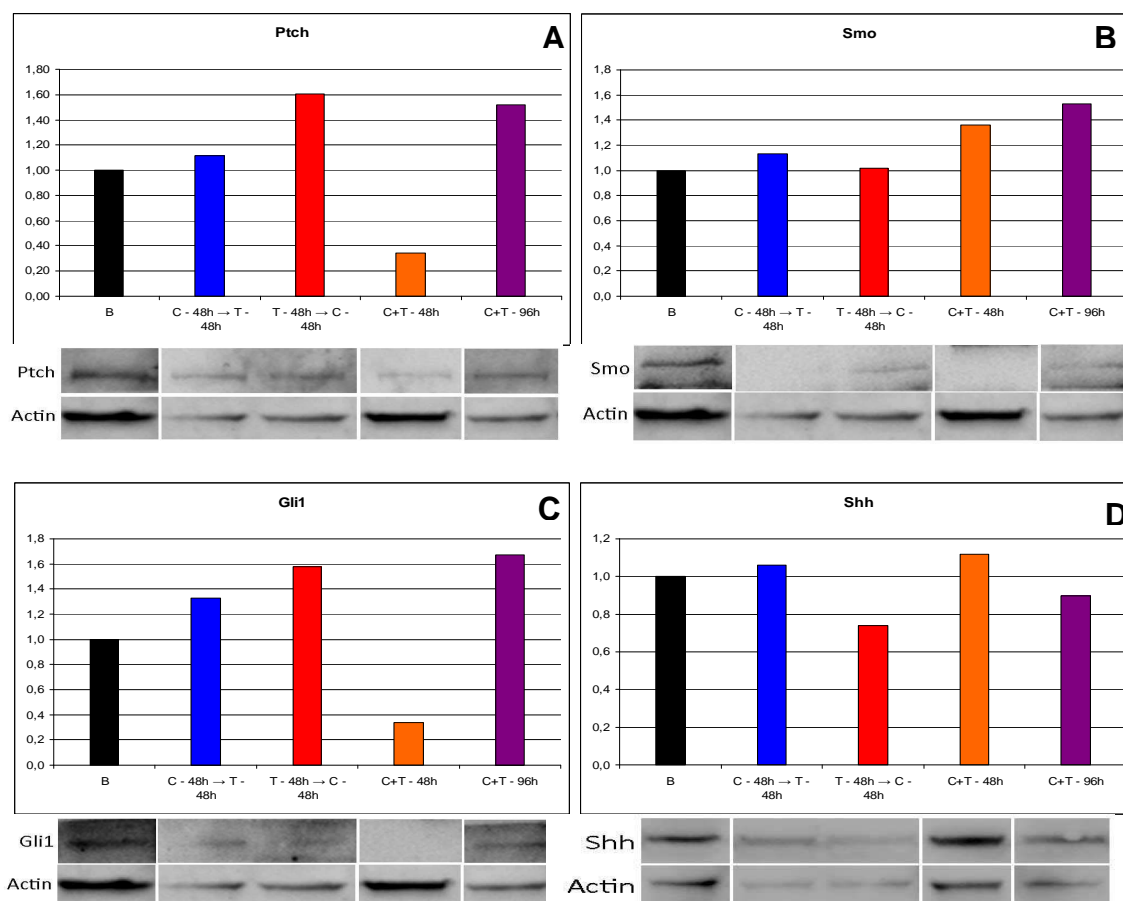
Nakon tretmana MCF-7 i Sk-Br-3 staničnih linija tumora dojke kombinacijom ciklopamina i tamoksifena s različitim redosljedom dodavanja pojedinog spoja te kombinacijom ciklopamina i tamoksifena kada su dva spoja dodana zajedno kroz 48 ili 96 sati proteini signalnog puta Hh-Gli detektirani su u obje stanične linije pri čemu su utvrđene razlike u reaktivnosti stanica ovisno o primjenjenim spojevima i trajanju izloženosti (48 ili 96 sati) stanica primjenjenim spojevima. Rezultati na slici 4.23. daju vrijednosti ekspresije promatranih proteina (Ptch, Smo, Gli1 i Shh) za staničnu liniju MCF-7.



**Slika 4.23.** Rezultati Western blot analize na estrogen-ovisnoj (MCF-7) staničnoj liniji tumora dojke nakon kombiniranih tretmana ciklopaminom i tamoksifenom, zajedno ili s različitim redosljedom dodavanja određenog spoja. Na apscisama su prikazane oznake primjenjenih spojeva i duljine tretmana: ciklopamin kroz 48 sati zatim tamoksifen kroz 48 sati (oznake C - 48h → T - 48h, plavi stupići), tamoksifen kroz 48 sati zatim ciklopamin kroz 48 sati (oznake T - 48h → C - 48h, crveni stupići), ciklopamin i tamoksifen zajedno kroz 48 sati (oznake C+T - 48h, narančasti stupići), te ciklopamin i tamoksifen zajedno kroz 96 sati (oznake C+T - 96h, ljubičasti stupići). Primjenjena koncentracija ciklopamina i tamoksifena iznosila je 2,5  $\mu$ M. Netretirane stanice (oznake B, crni stupići). Testirani su proteini Ptch (A), Smo (B), Gli1 (C) i Shh (D), a kao kontrola je korišten Aktin.



Iz slike 4.23. vidljivo je da tretman MCF-7 stanica ciklopaminom kroz 48 sati a zatim tamoksifenom kroz 48 sati uzrokuje povećanu ekspresiju proteina Ptch, Smo i Gli1 dok je ekspresija Shh proteina na razini ekspresije izmjerene u netretiranim kontrolnim stanicama. Izlaganje stanica kombiniranom tretmanu tamoksifenom kroz 48 sati a zatim ciklopaminom kroz 48 sati dovodi do povećane ekspresije samo proteina Shh pri čemu je registriran pad razine ekspresije proteina Ptch, Smo i Gli1. Kod tretmana kombinacijom ciklopamina i tamoksifena kroz 48 sati dolazi do povećane ekspresije svih promatranih proteina, dok izlaganje stanica kombiniranom tretmanu ciklopaminom i tamoksifenom kroz 96 sati uzrokuje povećanu ekspresiju samo proteina Shh pri čemu je registriran pad razine ekspresije proteina Ptch, Smo i Gli1. Rezultati na slici 4.24. daju vrijednosti ekspresije promatranih proteina (Ptch, Smo, Gli1 i Shh) za staničnu liniju Sk-Br-3.



**Slika 4.24.** Rezultati Western blot analize na estrogen-neovisnoj (Sk-Br-3) staničnoj liniji tumora dojke nakon kombiniranih tretmana ciklopaminom i tamoksifenom, zajedno ili s različitim redoslijedom dodavanja određenog spoja. Na apscisama su prikazane oznake primjenjenih spojeva i duljine tretmana: ciklopamin kroz 48 sati zatim tamoksifen kroz 48 sati (oznake C - 48h → T - 48h, plavi stupići), tamoksifen kroz 48 sati zatim ciklopamin kroz

48 sati (oznake T - 48h → C - 48h, crveni stupići), ciklopamin i tamoksifen zajedno kroz 48 sati (oznake C+T - 48h, narančasti stupići), te ciklopamin i tamoksifen zajedno kroz 96 sati (oznake C+T - 96h, ljubičasti stupići). Primjenjena koncentracija ciklopamina iznosila je 2,5  $\mu$ M a tamoksifena 10  $\mu$ M. Netretirane stanice (oznake B, crni stupići). Testirani su proteini Ptch (A), Smo (B), Gli1 (C) i Shh (D), a kao kontrola je korišten Aktin.

Iz slike 4.24. vidljivo je da tretman Sk-Br-3 stanica ciklopaminom kroz 48 sati a zatim tamoksifenom kroz 48 sati uzrokuje blago povećanu ekspresiju svih promatranih proteina. Izlaganje stanica kombiniranom tretmanu tamoksifenom kroz 48 sati a zatim ciklopaminom kroz 48 sati dovodi do povećane ekspresije proteina Ptch i Gli1, pada razine ekspresije proteina Shh pri čemu je registrirana razina ekspresije proteina Smo na razini ekspresije koja je izmjerena u netretiranim kontrolnim stanicama.

Kod kombiniranog tretmana ciklopaminom i tamoksifenom kroz 48 sati povećana je razina ekspresije proteina Smo i Shh dok je razina ekspresije proteina Ptch i Gli1 smanjena. Kombinirani tretman ciklopaminom i tamoksifenom kroz 96 sati uzrokuje povećanu razinu ekspresije proteina Ptch, Smo i Gli1 te pad razine ekspresije proteina Shh u odnosu na netretirane kontrolne stanice.

#### **4.7. Zbirni prikaz rezultata**

1. Signalni put Hh-Gli je aktivan u obje stanične linije: na razini ekspresije gena i proteina.

Hh-Gli put aktivan u obje stanične linije ali vjerojatno se odvija različitim mehanizmima.

2. Ekspresija gena signalnog puta Hh-Gli prema redoslijedu pojavljivanja:

(A) u estrogen ovisnoj MCF-7 signal je autokrin, jer stanica sama proizvodi ligand (visoka ekspresija Shh) te je na njega sposobna odgovoriti (ekspresija Ptch, Smo, Gli1).

*1. proliferacija jaka c-Myc*

*2. rana ekspresija SHH*

*3.  $\beta$ -katenin relativno rano (signalni put Wnt je aktivan), ciljni gen signalnog puta Hh-Gli*

*4. SUFU*

*5. SMO (11. ciklus)*

*6. PTCH*

*7. GLI 1*

*8. nema ekspresije p16*

(B) U estrogen-neovisnoj staničnoj liniji Sk-Br-3 svi istraživani geni su eksprimirani pri čemu je ekspresija gena SMO, GLI1 i SHH na granici detekcije (kasna ekspresija). Stanice su vjerojatno parakrino stimulirane, jer proizvode jako niske razine Shh, ali su u mogućnosti odgovoriti na signal.

1. *proliferacija jaka c-Myc*
2. *β-katenin relativno rano (Wnt signalni put aktivan)*
3. *relativno rano SUFU*
4. *PTCH*
5. *ekspresije p16*
6. *SMO*
7. *SHH*
8. *GLI1*

3. U obje stanične linije zabilježena je ekspresija glavnih proteina signalnog puta Hh-Gli: Shh, Smo, Ptch i Gli1, iako je ekspresija proteina nešto slabija u Sk-Br-3 liniji.

4. Signalni put Hh-Gli može se pokrenuti:

Egzogeno - ligandom Shh - obje stanične linije pokazuju povećanu proliferaciju nakon dodatka Shh.

Endogeno - ubacivanjem Gli - obje stanične linije povećavaju ekspresiju gena signalnog puta, autokrino odmah (autostimulacija) a parakrino nakon dodatka Shh

5. Signalni put Hh-Gli može se blokirati:

a) blokatorom Smo - ciklopaminom - obje stanične linije pokazuju smanjenu proliferaciju nakon dodatka ciklopamina, MCF-7 jače nego Sk-Br-3

c) kombinacijom blokatora estrogenih receptora može se djelovati na proliferaciju

6. Tamoksifen djeluje na obje stanične linije smanjenjem proliferacije, ali na estrogen-neovisne u puno većim dozama.

7. Kombinacijski tretman ciklopaminom i tamoksifenom kratkoročno uzrokuje aktivaciju signalnog puta i omogućuje preživljenje stanica.

Tumori dojke su najčešći tumori žena u svijetu. Velika epidemiološka istraživanja i kasnije najsuvremenije genomske i proteomske analize (mikroarray-i) pokazale su da je oko 400 gena u tumorima dojke izmijenjeno te da su tumori dojke vrlo heterogeni tumori sa stanovišta dijagnostike, terapije i prognoze. Među bitnijim genima za tumore dojke svakako treba spomenuti gene BRCA1 i BRCA2, koji su uključeni u 2,5% sporadičnih tumora dojke (Han i sur, 2006) te čak 20-30% nasljednih tumora dojke (Pharoah i sur, 2002). Osim nađenih mutacija u mnogim genima te epigenetskih promjenama, vrlo veliku ulogu igra i niz različitih signalnih puteva u stanici tumora, osobito oni vezani sa steroidnim hormonima (estrogenski receptori, progesteronski receptori i sl.). Jedan od signalnih puteva u novije vrijeme povezanim s tumorima dojke je upravo signalni put Hh-Gli. Mutacije u ovom signalnom putu pronađene su u tumorima dojke u genu PTCH1 (Xie i sur, 1997) i SHH (Oro i sur, 1997), dok u nekim slučajevima nisu pronađene (Vořechovský i sur, 1999). Zanimljiv je podatak da je polimorfizam u genu PTCH povezan sa rizikom za nastanak tumora dojke u kombinaciji sa korištenjem oralne kontracepcije (Chang-Claude i sur, 2003). Imunohistokemijske studije pokazale su da je signalni put Hh-Gli pojačano eksprimiran u tumorima dojke, posebice Shh, Ptch i Gli1, u odnosu na zdravo tkivo dojke gdje ekspresija ovih gena nije pronađena (Kubo i sur, 2004). Kasnija studija Moraes i sur. pokazala je obrnuto: da je Ptch1 eksprimiran u normalnom epitelu dojke, i smanjeno eksprimiran u tumorima dojke (Moraes i sur, 2007; Wolf i sur, 2007). Međutim, Gli1 je pojačano eksprimiran u tumorima dojke, i to korelira s stadijem, zahvaćenošću limfnih čvorova i lošijom prognozom (ten Haaf i sur, 2009). Slična situacija je i sa ekspresijom Shh, koja je povezana s TNM stadijem tumora (Cui i sur, 2010). Rezultati studija genske ekspresije vrlo su slični: GLI1, SMO i GLI2 često su pojačano eksprimirani u odnosu na zdravo tkivo (Mukherjee i sur, 2006), dok je ekspresija SHH povezana s lošijom prognozom (Bieche i sur, 2004). Stanične linije tumora dojke pokazuju osjetljivost na tretman ciklopaminom, i to neovisno o tome jesu li estrogen-ovisne ili estrogen-neovisne (Zhang i sur, 2009).

Novi trend u istraživanju tumora dojke su matične tumorske stanice, koje se relativno jednostavno mogu uzgojiti u kulturi u obliku tzv. mamosfera. Mamosfere su stanice koje uz odgovarajući hranjivi medij rastu u suspenziji u obliku nakupina, te nastavljaju tvoriti nove sfere ako se stanice razdvoje. U mamosferama je pokazana pojačana ekspresija Ihh, Shh,

Ptch1, Ptch2, Smo, Gli1 i Gli2 u odnosu na iste stanice koje rastu adherentne na podlozi; dodatak Shh potiče diobu stanica i stvaranje većeg broja sfera, dok ciklopamin ima obrnuti učinak (Liu i sur, 2006). Ekspresija estrogenskog receptora i progesteronskog receptora je smanjena u tim stanicama, što znači da su one neosjetljive na signale steroidnih hormona (Shipitsin i sur, 2007; Kok i sur, 2009).

U većini slučajeva se u terapijama raka dojke (osobito ako su estrogen-ovisni tumori) koriste blokatori sinteze estrogena ili blokatori receptora estrogena čime bi se utjecalo na smanjenje proliferacije tumora, te blokatori receptora za faktore rasta (najčešće epidermalnog faktora rasta), od kojih je u novije vrijeme najpoznatiji herceptin. Uz te osnovne principijelno se koriste u kombinacijama sa kemoterapeuticima.

Problemi terapije raka dojke većinom počinju zbog razvoja rezistentnosti na estrogen, pa brojne terapije koje obuhvaćaju blokatore estrogena ili njihovih receptora sve češće su neučinkovite. Zato su sve češći pokušaji aktivacije nekih drugih sustava, kojima bi se ta rezistentnost i neučinkovitost mogla minimalizirati. Signalni put Hh-Gli potencijalna je meta novih terapija tumora, osobito kada se uzme u obzir da se na većinu konvencionalnih terapija stječe otpornost. Ovaj signalni put je relativno nedavno otkriven, 1996. godine. Tada se je postavljala veza sa nekim vrstama tumora vezanim uz Gorlinov sindrom, prvenstveno bazocelularnim karcinomom kože i medulablastomom. Međutim, otkrićem inhibitora puta, ciklopamina, male molekule koja je u stanju blokirati proliferaciju stanica, počela su istraživanja i drugih agresivnih tumora, čime je i utvrđen značaj signalnog puta Hh-Gli, u mnogim tipovima tumora.

Ciljanjem do sada manje istraživanih signalnih puteva u stanici otvara se mogućnost terapija koje će zaobilaziti signalne puteve na koje je stečena otpornost. Dodatna prednost ciljanja upravo ovog signalnog puta je mogućnost djelovanja na matične stanice tumora. Konvencionalna terapija većinom djeluje na glavčinu tumorske mase, te se otpornost stvara kada tumorske matične stanice otporne na tu terapiju počnu diobu i nadomjestite tumorsku masu novim, otpornim stanicama. Signalni put Hh-Gli jedan je od puteva uključenih u održavanje tumorskih matičnih stanica, te bi se kombiniranom terapijom sa standardnim kemoterapeuticima istovremeno moglo djelovati na glavčinu tumora i tumorske matične stanice, što bi značilo smanjenje stvaranja otpornosti i temeljitije uklanjanje tumora. Ciklopamin je testiran u kombinaciji sa drugim lijekovima u tretmanu tumora prostate, gdje je pokazano da uistinu pokazuju sinergistički učinak (Mimeault 2006; Hu 2007; Shaw 2008; Mimeault 2010).

Ovaj rad ispituje moguće učinke kombiniranog tretmana tumora dojke ciklopaminom i tamoksifenom. Tamoksifen je inhibitor estrogenskog receptora, te se koristi u terapiji estrogen-ovisnih tumora dojke. Ciklopamin je, s druge strane, predložen kao jedan od potencijalnih terapeutika u tretmanu tumora dojke (Kubo i sur, 2004). Do sada njihov kombinirani učinak nije ispitan, te je ovo prvi rad koji ispituje ovakav učinak u tumorima dojke.

Prvi korak u ovom istraživanju bio je ispitati postoji li uistinu bazalna ekspresija gena signalnog puta Hh-Gli u tumorima dojke. Kao model izabrane su dvije stanične linije, jedna estrogen-ovisna te druga estrogen-neovisna. Analizom genske i proteinske ekspresije ustanovljeno je da su glavni geni signalnog puta eksprimirani u obje stanične linije (tablica 4.1.).

MCF-7 (estrogen-ovisna): c-Myc > SHH >  $\beta$ -katenin > SUFU > SMO > PTCH > GLI1

Sk-Br-3 (estrogen-neovisna): c-Myc >  $\beta$ -katenin > SUFU > PTCH > SMO > SHH > GLI1

Obje linije su izrazito proliferativne, što se vidi po ekspresiji markera proliferacije c-Myc. Osim toga, pokazuju i povećanu ekspresiju ciljnog gena signalnog puta,  $\beta$ -katenina, što govori u prilog da je signalni put Hh-Gli uistinu aktivan u obje stanične linije. Ograničavajuće su razine upravo onkogene SMO i GLI1, što je i za očekivati, a poznato je da su male količine GLI1 transkripcijskog faktora dovoljne da se signalni put aktivira. Proteinska ekspresija testiranih proteina (Ptch, Smo, Gli1 i Shh) također je detektirana u obje stanične linije, te je nešto intenzivnija u estrogen-ovisnoj liniji. Glavna razlika između estrogen-ovisne i estrogen-neovisne linije vidi se u razlici ekspresije liganda SHH: izrazito je jako eksprimiran u estrogen-ovisnoj liniji, dok je u estrogen-neovisnoj liniji ekspresija niska. Prema literaturi bilo je za očekivati da estrogen-ovisna stanična linija ima smanjenje ekspresije Gli, što se je potvrdilo našim prvim eksperimentima (tablica 4.1.), međutim, sličan je rezultat dobiven i u estrogen-neovisnoj staničnoj liniji.

Pošto su komponente signalnog puta eksprimirane u ovim stanicama, slijedeći korak bio je testirati reagiraju li stanice na aktivaciju ili inhibiciju signalnog puta. Za aktivaciju korišten je ligand signalnog puta, protein Shh, dok je za inhibiciju korišten ciklopamin, spoj koji vezanjem na protein Smo inhibira aktivnost signalnog puta. Tretman ligandom povećava proliferaciju obje stanične linije, što znači da je signalni puta u ovim stanicama aktivan i u potpunosti sposoban prenositi signal. Odgovor estrogen-neovisne linije ipak je nešto intenzivniji, što bi moglo biti posljedica niske bazalne ekspresije liganda u tim stanicama:

estrogen-ovisna linija već je autokrino stimulirana proteinom Shh te dodatak liganda djelomično pojačava proliferaciju, dok je autokrino stimulacija estrogen-neovisne linije slaba, te vanjski signal jače djeluje na proliferaciju. Djelovanje ciklopaminom pokazuje znatno veći učinak na estrogen-ovisnu nego na estrogen-neovisnu staničnu liniju, te je djelovanje ovisno o dozi i vremenu. Ciklopamin djeluje na smanjenje genske ekspresije u kratkom vremenskom roku nakon tretmana, već nakon 24h, dok nakon toga dolazi do oporavka. Protein Shh pak pokazuje aktivacijski učinak sa malim vremenskim odmakom, odnosno 48h nakon tretmana. Učinak je vidljiv čak i na razini proteina, ali nešto slabije. Pošto se sinteza proteina odvija s odmakom u odnosu na gensku ekspresiju, moguće je da bi učinak bio vidljiviji nakon duljeg vremena.

Drugi korak u istraživanju bio je ispitati djelovanje tamoksifena na stanice. Prema literaturnim podacima, tamoksifen bi trebao pokazivati inhibitorni učinak na estrogen-ovisne stanice, dok bi u estrogen-neovisnim stanicama učinak mogao biti vidljiv samo pri većim dozama, i to zbog citotoksičnosti (Bachmann-Moisson i sur, 1996). Upravo takav odgovor dobiven je i u ovom slučaju, te je ustanovljena LD50, koja za estrogen-ovisnu staničnu liniju iznosi otprilike 1  $\mu$ M, dok je u estrogen-neovisnoj staničnoj liniji ta koncentracija 10 puta viša, oko 10  $\mu$ M.

Odgovor stanica tretiranih sa subletalnim dozama tamoksifena razlikuje se u slučaju estrogen-ovisne i estrogen-naovisne stanične linije. U slučaju dugotrajnog tretmana LD50 dozom dolazi do smanjenja ekspresije svih testiranih gena. U estrogen-ovisnoj staničnoj liniji dolazi do postupnog smanjenja ekspresije gena za proliferaciju kako se produljuje tretman (c-Myc) i nekih elemenata signalnog puta Hh-Gli (SHH, SUFU), međutim i do povećanja ekspresije nekih gena signalnog puta (PTCH, SMO, GLI1). Ovakav odgovor ne nalazimo u estrogen neovisnoj liniji, gdje povećanjem doze i produljenjem tretmana većinom dolazi do smanjenja ekspresije većine gena (osim PTCH i SMO, čija ekspresija većinom varira oko vrijednosti netretiranih stanica).

Ovakav različiti odgovor stanica daje naslutiti da bi stanice mogle različito reagirati na kombinirani tretman ciklopaminom i tamoksifenom, ili proteinom Shh i tamoksifenom. MTT test nakon dugotrajnog tretmana (96h) pokazao je da u oba slučaja dolazi do smanjenja vijabilnosti stanica, i to do vrijednosti sličnih učinku samog tamoksifena. Međutim, uočene su zanimljive razlike kada se u obzir uzme redoslijed primjene spojeva na stanice, i to različite u estrogen-ovisnoj i estrogen-naovisnoj staničnoj liniji. Za estrogen ovisnu liniju, u slučaju dodavanja tamoksifena kroz 48h pa nakon toga ciklopamina kroz 48h, dolazi do rapidne smrti stanica, koja je brža od tretmana isključivo tamoksifenom. Međutim, kada je redoslijed dodavanja spoja obrnut, efekt na stanice sličan je efektu čistog tamoksifena. Najintrigantniji

nalaz ipak je istovremeni tretman ciklopaminom i tamoksifenom 48h: u tom slučaju dolazi do drastično poboljšanog preživljenja stanica u odnosu na bilo koji od tretmana. Ovaj nalaz ima potencijalno vrlo velike posljedice na moguću terapiju tumora dojke, jer bi kombinirani tretman mogao biti poguban za pacijenta. Ekspresija gena signalnog puta Hh-Gli također je značajno povećana u kombiniranom tretmanu u odnosu na netretirane stanice kao i na ostale tretmane. Estrogen ovisna stanična linija pokazuje sličan učinak preživljenja pri kombiniranom tretmanu, međutim kod nje genska ekspresija gena signalnog puta Hh-Gli očekivano pada tretmanom. Proteinsku ekspresiju je bilo nešto teže odrediti, jer je zbog smrtnosti stanica količina proteina varirala, a denzitometrijsko određivanje relativne količine produkta nepreciznije je od očitavanja na real-time aparatu. Stoga su rezultati genske ekspresije u ovom slučaju nešto pouzdanije od Western blot analize.

Tumačenje ovih razlika u odgovoru stanica komplicirano je zbog manjka literaturnih podataka. Do sada su poznati podaci dvije grupe koje su istraživale povezanost estrogenih receptora i signalnog puta Hh-Gli. Koga i sur. pokazali su da estrogen-ovisne stanice u nedostatku estrogena pokazuju smanjenu ekspresiju GLI1, a dodatak estrogena potiče njegovu ekspresiju. Taj efekt nije uočen na estrogen-neovisnoj staničnoj liniji. Estrogen-ovisne stanice reagiraju na protein Shh povećanjem ekspresije proteina Gli1, što znači da je signalni put Hh-Gli aktivan u njima (Koga i sur, 2008). S druge strane, Zhao i sur. pokazali su da aktivacija signalnog puta Hh-Gli u estrogen-neovisnim stanicama transfekcijom Gli1 povećava njihovo preživljenje i proliferaciju, smanjuje osjetljivost na estrogen i na inhibitore estrogena, te zaključuju da bi signalni put mogao igrati ulogu u prijelazu stanica iz estrogen-ovisnog u estrogen-neovisni tip (Zhao i sur, 2010).

Na temelju podataka u ovom radu, u kombinaciji s objavljenim podacima, predlažemo mogući tijek događaja u estrogen-ovisnoj liniji:

U slučaju tretmana tamoksifenom, nakon čega slijedi tretman ciklopaminom, dolazi do ubrzane stanične smrti. Tamoksifen u našem slučaju povećava ekspresiju nekih gena signalnog puta Hh-Gli, što bi moglo značiti da te stanice postaju osjetljivije na tretman ciklopaminom, te dolazi do ubrzane stanične smrti.

U obrnutom slučaju, kada tretman ciklopaminom prethodi tretmanu tamoksifenom, dolazi do smanjenja vijabilnosti stanica do razine iste kao sami tamoksifen, što bi značilo da oba spoja djeluju na istom signalnom putu.

Najintrigantniji nalaz, u kojem dolazi do preživljenja u slučaju kombiniranog tretmana, još je nejasan. Postoje dvije mogućnosti:



a) spojevi međusobno kemijski reagiraju te na taj način dolazi do međusobne inaktivacije oba spoja (malo vjerojatno, osim ako je reakcija reverzibilna, pošto nakon duljeg tretmana ipak dolazi do stanične smrti)

b) spojevi djeluju na način da omogućе stanično preživljenje, i to na način koji nije ovisan o estrogenskom receptoru, pošto je efekt uočen i u estrogen.neovisnoj staničnoj liniji. Moguće objašnjenje je da ciklopamin djeluje na smanjenje ekspresije estrogenskog receptora putem transkripcijskog faktora FoxM1 (Teh i sur, 2002), te da stanice time postaju otpornije na djelovanje tamoksifena. Međutim, uz ovo mora postojati još neki mehanizam, neovisan o estrogenskom receptoru, koji omogućava preživljenje stanica dojke pri kombiniranom tretmanu, ali taj mehanizam nije tema ovog rada.

Glavni zaključak ovog rada je da kombinirani tretman ciklopaminom i tamoksifenom, unatoč dobrim učincima svakog spoja zasebno, može imati neočekivane posljedice pri istovremenoj primjeni, jer nepoznatim mehanizmom omogućava preživljenje stanica, kako estrogen-ovisne tako i estrogen-neovisne, ako se spojevi primjenjuju istovremeno.

Nužno bi bilo u daljnjem radu ispitati interakciju vezanja na estrogeni receptor i receptor Ptch. Premda je jedan sigurno lociran na membrani a drugi u citoplazmi, postoji mogućnost interakcije.

Uz dodatne pokuse kojima bi se ispitivala kinetika vezanja i kompeticija za estrogene receptore u kombinaciji sa kinetikom vezanja na receptor Ptch u balansiranju sa koreceptorom Smo utvdili bismo vjerojatno sinergistički učinak na preživljenje stanica. Međutim, nužna bi bila i kombinacija sa *in vivo* modelima.

1. Signalni put Hh-Gli može se pokrenuti u obje linije egzogeno, pri čemu pokazuju povećanu proliferaciju liganda, te endogeno, pri čemu dolazi u autokrinoj liniji do autostimulacije a u parakrinoj tek nakon dodatka liganda Shh.
2. Signalni put Hh-Gli može se blokirati blokatorom Smo - ciklopaminom te blokatorom estrogenih receptora - tamoksifenom. Tamoksifen djeluje u puno većoj dozi u estrogen-neovisnoj liniji. Također kombinacijom tretmana ciklopaminom i tamoksifenom kratkoročno se aktivira Hh-Gli put.
3. Glavni zaključak ovog rada je da kombinirani tretman ciklopaminom i tamoksifenom, unatoč dobrim učincima svakog spoja zasebno, može imati neočekivane posljedice pri istovremenoj primjeni, jer nepoznatim mehanizmom omogućava preživljenje stanica, kako estrogen-ovisnih tako i estrogen-neovisnih linija, ako se spojevi primjenjuju istovremeno.

## 7. LITERATURA

---

Aboukassim TO, LaRue H, Lemieux P, Rousseau F, Fradet Y. Alteration of the *PATCHED* locus in superficial bladder cancer. *Oncogene* (2003) 22: 2969-2971.

Alcedo J, Ayzenzon M, Von Ohlen T, Noll M, Hooper JE. The *Drosophila* smoothed gene encodes a seven-pass membrane protein, a putative receptor for the hedgehog signal. *Cell* (1996) 86: 221-232.

Bachmann-Moisson N, Barberi-Heyob M, Merlin JL, Ledrich ML, Batt AM, Guillemin F. Cytotoxicity of tamoxifen and its principal metabolites in human breast cancer cell lines. *Bull Cancer* (1996) 83(10): 808-815.

Bai CB, Auerbach W, Lee JS, Stephen D, Joyner AL. *Gli2*, but not *Gli1*, is required for initial Shh signaling and ectopic activation of the Shh pathway. *Development* (2002) 129: 4753-4761.

Bale AE, Yu K-p. The hedgehog pathway and basal cell carcinoma. *Hum Mol Genet* (2001) 10(7): 757-762.

Bar-Eli M. The HOG-GLI face of melanoma. *Pigment Cell Res* (2007) 20(5): 341-342.

Barnes EA, Kong M, Ollendorf V, Donoghue DJ. Patched1 interacts with cyclin B1 to regulate cell cycle progression. *EMBO J* (2001) 20(9): 2214-2223.

Beachy PA, Cooper MK, Young KE, von Kessler DP, Park WJ, Hall TM, Leahy DJ, Porter JA. Multiple roles of cholesterol in hedgehog protein biogenesis and signaling. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* (1997) 62: 191-204.

Belloni E, Muenke M, Roessler E, Traverso G, Siegel-Bartelt, Frumkin A, Mitchell HF, Donis-Keller H, Helms C, Hing AV, Heng HHQ, Koop B, Martindale D, Rommens JM, Tsui L-C, Scherer SW. Identification of *Sonic hedgehog* as a candidate gene responsible for holoprosencephaly. *Nature Genet* (1996) 14: 353-360.

Bieche I, Lerebours F, Tozlu S, Espie M, Marty M, Lidereau R. Molecular profiling of inflammatory breast cancer: identification of a poor-prognosis gene expression signature. *Clin Cancer Res* (2004) 10: 6789-6795.

Bigelow RLH, Chari NS, Undén AB, Spurgers KB, Lee S, Roop DR, Toftgård R, McDonnell TJ. Transcriptional regulation of *bcl-2* mediated by the Sonic Hedgehog signaling pathway through *Gli-1*. *J Biol Chem* (2004) 279(9): 1197-1205.

Bitgood MJ, Shen L, McMahon AP. Sertoli cell signaling by Desert hedgehog regulates the male germline. *Curr Biol* (1996) 6: 298-304.

Bocker W, Yin Z, Drosse I, Haasters F, Rossmann O, Wierer M, Popov C, Locher M, Mutschler W, Docherva D, Schieker M. Introducing a single-cell-derived human mesenchymal stem cell line expressing hTERT after lentiviral transfer. *J Cell Mol Med* (2008) 12(4): 1347-1359.

Booth DR. The hedgehog signaling pathway and its role in basal cell carcinoma. *Cancer Metast Reviews* (1999) 18: 261-284.

Boyan BD, Sylvia VL, Frambach T, Lohmann CH, Dietl J, Dean DP, Schwartz Z. Estrogen-dependent rapid activation of protein kinase C in estrogen-receptor positive MCF-7 breast cancer cells and in estrogen-receptor negative HCC38 cells is membrane-mediated and inhibited by tamoxifen. *Endocrinology* (2003) 144: 1812-1824.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* (1976) 72: 248-254.

Brzozowski AM, Pike AC, Dauter Z, Hubbard RE, Bonn T, Engström O, Öhman L, Greene GL, Gustafsson J-Å, Carlquist M. Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor. *Nature* (1997) 389(6652): 753-758.

Buglino JA, Resh MD. What is a palmitoyltransferase with specificity for N-palmitoylation of Sonic hedgehog. *J Biol Chem* (2008) 283(32): 22076-22088.

Burke R, Nellen D, Bellotto M, Hafen E, Senti K-E, Dickson BJ, Basler K. Dispatched, a novel sterol-sensing domain protein dedicated to the release of cholesterol-modified Hedgehog from signaling cells. *Cell* (1999) 99: 803-815.

Cardoso CM, Custodio JB, Almeida LM, Moreno AJ. Mechanisms of the deleterious effects of tamoxifen on mitochondrial respiration rate and phosphorylation efficiency. *Toxicol Appl Pharmacol* (2001) 176: 145-152.

Cardoso CM, Moreno AJ, Almeida LM, Custodio JB. Comparison of the changes in adenine nucleotides of rat liver mitochondria induced by tamoxifen and 4-hydroxytamoxifen. *Toxicol In Vitro* (2003) 17: 663-670.

Chang-Claude J, Dunning A, Schnitzbauer U, Galmbacher P, Tee L, Wjst M, Chalmers J, Zenzoum I, Harbeck N, Pharoah PDP, Hahn H. The *patched* polymorphism Pro1315Leu (C3944T) may modulate the association between use of oral contraceptives and breast cancer risk. *Int J Cancer* (2003) 103: 779-783.

Charitidi K, Meltser I, Tahera Y, Canlon B. Functional responses of estrogen receptors in the male and female auditory system. *Hear Res* (2009) 252: 71-78.

Chen X, Horiuchi A, Kikuchi N, Osada R, Yoshida J, Shizawa T, Konishi I. Hedgehog signal is activated in ovarian carcinomas, correlating with cell proliferation: its inhibition leads to growth suppression and apoptosis. *Cancer Sci* (2007) 98(1): 68-76.

Chiang C, Litingtung Y, Lee E, Young KE, Corden JL, Westphal H, Beachy PA. Cyclopia and defective axial patterning in mice lacking *Sonic hedgehog* gene function. *Nature* (1996) 383: 407-413.

- Chuang PT, McMahon AP. Vertebrate Hedgehog signalling modulated by induction of a Hedgehog-binding protein. *Nature* (1999) 397(6720): 617-621.
- Clemons M, Goos P. Estrogen and the risk of breast cancer. *N Eng J Med* (2001) 344: 276-285.
- Cohen Jr. MM. The hedgehog signaling network. *Am J Med Genet* (2003) 123A(1): 5-28.
- Concoran RB, Scott MP. Oxysterols stimulate Sonic hedgehog signal transduction and proliferation of medulloblastoma cells. *PNAS* (2006) 103(22): 8408-8413.
- Cool J, Capel B. Mixed signals: development of the testis. *Semin Reprod Med* (2009) 27(1): 5-13.
- Couldwell WT, Hinton DR, He S. Protein kinase C inhibitors induce apoptosis in human malignant glioma cell lines. *FEBS Lett* (1994) 345: 43-46.
- Couse JF, Korach KS. Estrogen receptor null mice: what have we learned and where will they lead us? *Endocr Rev* (1999) 20:358-417.
- Cross SS, Bury JP. The hedgehog signaling pathways in human pathology. *Curr Diag Pathol* (2004) 10(2): 157-168.
- Cui W, Wang LH, Wen YY, Song M, Li BL, Chen XL, Xu M, An SX, Zhao J, Lu YY, Mi XY, Wang EH. Expression and regulation mechanisms of Sonic Hedgehog in breast cancer. *Cancer Sci* (2010) 101(4): 927-33.
- Custodio JB, Moreno AJ, Wallace KB. Tamoxifen inhibits induction of the mitochondrial permeability transition by  $Ca^{2+}$  and inorganic phosphate. *Toxicol Appl Pharmacol* (1998) 152: 10-17.
- Čretnik M, Musani V, Orešković S, Leović D, Levanat S. The Patched gene is epigenetically regulated in ovarian dermoids and fibromas, but not in basocellular carcinomas. *Int J Mol Med* (2007) 19(6): 875-883.
- Dai P, Akimaru H, Tanaka Y, Maekawa T, Nakafuku M, Ishii S. Sonic Hedgehog-induced activation of the Gli1 promoter is mediated by GLI3. *J Biol Chem* (1999) 274(12): 8143-8152.
- Day TF, Yang Y. Wnt and hedgehog signaling pathways in bone development. *J Bone Joint Surg Am* (2008) 90(1): 19-24.
- Delaunay F, Pettersson K, Tujague M, Gustafsson JA. Functional differences between the amino-terminal domains of estrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$ . *Mol Pharmacol* (2000) 58: 584-590.
- Dembinski JL, Krauss S. Characterization and functional analysis of a slow cycling stem cell-like subpopulation in pancreas adenocarcinoma. *Clin Exp Metastasis* (2009) 26(7): 611-623.
- de Médina P, Favre G, Poirot M. Multiple targeting by the antitumour drug: tamoxifen: a structure-activity study. *Curr Med Chem Anti-Canc Agents* (2004) 4(6): 491-508.

Dennler S, André J, Alexaki I, Li A, Magnaldo T, ten Dijke P, Wang X-J, Verrecchia F, Mauviel A. Induction of Sonic Hedgehog mediators by Transforming Growth Factor- $\beta$ : Smad3-dependent activation of *Gli2* and *Gli1*. *Cancer Res* (2007) 67(14): 6981-6985.

Detmer K, Thompson AJ, Garner RE, Walker AN, Gaffield W, Dannawi H. Hedgehog signaling and cell cycle control in differentiating erythroid progenitors. *Blood Cells Mol Dis* (2004) 34(1): 60-70.

Dietze EC, Caldwell LE, Grupin SL, Mancini M, Seewaldt VL. Tamoxifen but not 4-hydroxytamoxifen initiates apoptosis in p53(-) normal human mammary epithelial cells by inducing mitochondrial depolarization. *J Biol Chem* (2001) 276: 5384-5394.

di Marcotullio L, Ferretti E, De Smaele E, Argenti B, Mincione C, Zazzeroni F, Gallo R, Masuelli L, Napolitano M, Maroder M, Modesti A, Giangaspero F, Screpanti I, Alesse E, Gulino A. REN<sup>KCTD11</sup> is a suppressor of Hedgehog signaling and is deleted in human medulloblastoma. *PNAS* (2004) 101(29): 10833-10838.

Ding Q, Fukami S-i, Meng X, Nishizaki Y, Zhang X, Sasaki H, Dlugosz A, Nakafuku M, Hui C-c. Mouse Suppressor of fused is a negative regulator of Sonic hedgehog signaling and alters the subcellular distribution of Gli1. *Curr Biol* (1999) 9: 1119-1122.

Duman-Scheel M, Weng L, Xin S, Du W. Hedgehog regulates cell growth and proliferation by inducing Cyclin D and Cyclin E. *Nature* (2002) 417(6886): 299-304.

Dunaeva M, Michelson P, Kogerman P, Toftgård R. Characterization of the physical interaction of Gli proteins with SUFU. *J Biol Chem* (2003) 278(7): 5116-5122.

Echelard Y, Epstein DJ, St-Jacques B, Shen L, Mohler J, McMahon JA, McMahon AP. Sonic hedgehog, a member of a family of putative signaling molecules, is implicated in the regulation of CNS polarity. *Cell* (1993) 75: 1417-1430.

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

Fan H, Khavari PA. Sonic Hedgehog opposes epithelial cell cycle arrest. *J Cell Biol* (1999) 147: 71-76.

Ferlini C, Scambia G, Marone M, Distefano M, Gaggini C, Ferrandina G, Fattorossi A, Isola G, Benedetti, Pancini P, Mancuso S. Tamoxifen induces oxidative stress and apoptosis in oestrogen receptor-negative human cancer cell lines. *Br J Cancer* (1999) 79: 257-263.

Fisher B, Constantino JP, Wickerham CD, Redmond Ck, Kavanah M, Cronin WM, Vogel V, Robidoux A, Dimitrov N, Atkins J, Wieand S, Tan-Chiu E, Ford L, Wolmark N. Tamoxifen for prevention of breast cancer: report of the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project P-1 study. *J Natl Cancer Inst* (1998) 90: 1371-1388.

Foster JS, Henley DC, Bukovsky A, Seth P, Wimalasena J. Multifaceted regulation of cell cycle progression by estrogen: Regulation of Cdk inhibitors and Cdc25A independent of cyclin D1-Cdk4 function. *Mol Cell Biol* (2001) 21: 794-810.

Fujita E, Khoroku Y, Urase K, Tsuchakara T, Momoi MY, Kumagai H, Takemura T, Kuroki T, Momoi T. Involvement of *Sonic hedgehog* in the cell growth of LK-2 cells, human lung squamous carcinoma cells. *Biochem Biophys Res Comm* (1997) 238: 658-664.

Gelmann EP. Tamoxifen for the treatment of malignancies other than breast and endometrial carcinoma. *Semin Onco* (1997) 124: S65-S70.

Hahn H, Christiansen J, Wicking C, Zaphiropoulos PG, Chidambaram A, Gerrard B, Vorechovsky I, Bale AE, Toftgård R, Dean M, Wainwright B. A mammalian patched homolog is expressed in target tissues of sonic hedgehog and maps to a region associated with developmental abnormalities. *J Biol Chem* (1996) 271(21): 12125-12128.

Han SH, Lee KR, Lee DG, Kim BY, Lee KE, Chung WS. Mutation analysis of BRCA1 and BRCA2 from 793 Korean patients with sporadic breast cancer. *Clin Genet* (2006) 70(6): 496-501.

Hebrok M. Hedgehog signaling in pancreas development. *Mechanisms Dev* (2003) 120: 45-57.

Heerdt AS, Borgen PI. Current status of tamoxifen use: an update for the surgical oncologist. *J Surg Oncol* (1999) 72: 42-49.

Henderson BE, Ross R, Bernstein L. Estrogens as a cause of human cancer: the Richard and Hinda Rosenthal Foundation award lecture. *Cancer Res* (1988) 48: 246-253.

Holinka CF, Hata H, Kuramoto H, Gurpide E. Responses to estradiol in a human endometrial adenocarcinoma cell line (Ishikawa). *J Steroid Biochem* (1986) 24:85-89.

Hooper JE, Scott MP. The *Drosophila* patched gene encodes a putative membrane protein required for segmental patterning. *Cell* (1989) 59(4): 751-765.

Horowitz MC. Cytokines and estrogen in bone: anti-osteoporotic effects. *Science* (1993) 260: 626-627.

Howell A, Osborne CK, Morris C, Wakeling AE. ICI 182,780 (Faslodex): development of a novel, „pure“ antiestrogen. *Cancer* (2000) 89(4): 817-825.

Hu WG, Liu T, Xiong JX, Wang CY. Blockade of sonic hedgehog signal pathway enhances antiproliferative effect of EGFR inhibitor in pancreatic cancer cells. *Acta Pharmacol Sin* (2007) 28(8): 1224-1230.

Huangfu D, Anderson KV. Signaling from Smo to Ci/Gli: conservation and divergence of Hedgehog pathways from *Drosophila* to vertebrates. *Development* (2006) 133: 3-14.

Ikram MS, Neill GW, Regl G, Eichberger T, Frischauf AM, Aberger F, Quinn A, Philpott M. GLI2 is expressed in normal human epidermis and BCC and induces GLI1 expression by binding to its promoter. *J Invest Dermatol* (2004) 122(6): 1503-1509.

Incardona JP, Lee JH, Robertson CP, Enga K, Kapur RP, Roelink H. Receptor-mediated endocytosis of soluble and membrane-tethered Sonic hedgehog by Patched-1. PNAS (2000) 97(22): 12044-12049.

Incardona JP, Gruenberg J, Roelink H. Sonic Hedgehog induces the segregation of Patched and Smoothed in the endosomes. Curr Biol (2002) 12: 983-995.

Ingham PW. How cholesterol modulates the signal. Curr Biol (2000) 10(5): R180-R183.

Ingham PW, McMahon AP. Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles. Genes Dev (2001) 15(23): 3059-3087.

Jensen EV, Jacobson HI. Basic guides to the mechanism of estrogen action. Rec Prog Horm Res (1962) 18: 387-414.

Jensen EV. On the mechanism of estrogen action. Perspect Biol Med (1962) 6: 47-54.

Jensen EV, Jacobson HI. Basic guides to the mechanism of estrogen action. Rec Prog Horm Res (1962) 18: 387-414.

Ji Z, Mei FC, Xie J, Cheng X. Oncogenic KRAS activates hedgehog signaling pathway in pancreatic cancer cells. J Biol Chem (2007) 282(19): 14048-14055.

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

Johnson RL, Rothman AL, Xie J, Goodrich LV, Bare JW, Bonifas JM, Quinn AG, Myers RM, Cox DR, Epstein Jr. EH, Scott MP. Human homolog of *patched*, a candidate gene for the basal cell nevus syndrome. Science (1996) 272: 1668-1671.

Kalirai H, Clarke RB. Human breast epithelial stem cells and their regulation. J Pathol (2006) 208: 7-16.

Kallassy M, Toftgard R, Ueda M, Nakazawa K, Vorechovsky I, Yamasaki H, Nakazawa H. Patched (ptch)-associated preferential expression of smoothed (smoh) in human basal cell carcinoma of the skin. Cancer Res (1997) 57(21): 4731-4735.

Kallio A, Zheng A, Dahllund J, Heiskanen KM, Härkönen P. Role of mitochondria in tamoxifen-induced rapid death of MCF-7 breast cancer cells. Apoptosis (2005) 10: 1395-1410.

Kang S, Graham JM Jr, Olney AH, Biesecker LG. GLI3 frameshift mutations cause autosomal dominant Pallister-Hall syndrome. Nat Genet (1997) 15(3): 266-268.

Karhadkar SS, Bova GS, Abdallah N, Dhara S, Gardner D, Maitra A, Isaacs JT, Berman DM, Beachy PA. Hedgehog signaling in prostate regeneration, neoplasia and metastasis. Nature (2004) 431(7009): 707-712.

Katano M. Hedgehog signaling pathway as a therapeutic target in breast cancer. Cancer Lett (2005) 227(2): 99-104.



- Kato M, Seki N, Sugano S, Hashimoto K, Masuho Y, Muramatsu M, Kaibuchi K, Nakafuku M. Identification of Sonic Hedgehog-responsive genes using cDNA microarray. *Biochem Biophys Res Comm* (2001) 289: 472-478.
- Kim J-A, Kang YS, Jung M-W, Lee SH, Lee YS. Involvement of Ca influx in the mechanism of tamoxifen-induced apoptosis in HepG2 human hepatoblastoma cells. *Cancer Lett* (1999) 147: 115-123.
- Kinzler KW, Bigner SH, Bigner DD, Trent JM, Law ML, O'Brien SJ, Wong AJ, Vogelstein B. Identification of an amplified, highly expressed gene in a human glioma. *Science* (1987) 236(4797): 70-73.
- Kinzler KW, Ruppert JM, Bigner SH, Vogelstein B. The GLI gene is a member of the Kruppel family of zinc finger proteins. *Nature* (1988) 332(6162): 371-374.
- Kinzler K, Vogelstein B. The GLI gene encodes a nuclear protein which binds specific sequences in the human genome. *Mol Cell Biol* (1990) 10(2): 634-642.
- Klinge CM. Estrogen receptor interaction with co-activators and co-repressors. *Steroids* (2000) 65(5): 227-251.
- Koch A, Waha A, Hartmann W, Milde U, Goodyer CG, Sörensen N, Berthold F, Digon-Söntgerath B, Krätzschmar J, Wiestler OD, Pietsch T. No evidence for mutations or altered expression of the *Suppressor of Fused* gene (*SUFU*) in primitive neuroectodermal tumours. *Neuropathol Appl Neurobiol* (2004) 30: 532-539.
- Koga K, Nakamura M, Nakashima H, Akiyoshi T, Kubo M, Sato N, Kuroki S, Nomura M, Tanaka M, Katano M. Novel link between estrogen receptor  $\alpha$  and hedgehog pathway in breast cancer. *Anticancer Res* (2008) 28: 731-740.
- Kogerman P, Grimm T, Kogerman L, Krause D, Uden AB, Sandstedt B, Toftgård R, Zaphiropoulos PG. Mammalian suppressor-of-fused modulates nuclear-cytoplasmic shuttling of Gli-1. *Nat Cell Biol* (1999) 1(5): 312-319.
- Kok M, Koornstra RH, Margarido TC, Fles R, Armstrong NJ, Linn SC, Van't Veer LJ, Weigelt B. Mammosphere-derived gene set predicts outcome in patients with ER-positive breast cancer. *J Pathol* (2009) 218: 316-326.
- Krauss S, Concordet JP, Ingham PW. A functionally conserved homolog of the *Drosophila* segment polarity gene hh is expressed in tissues with polarizing activity in zebrafish embryos. *Cell* (1993) 75: 1431-1444.
- Kubo M, Nakamura M, Tasaki A, Yamanaka N, Nakashima H, Nomura M, Kuroki S, Katano M. Hedgehog signaling pathway is a new therapeutic target for patients with breast cancer. *Cancer Res* (2004) 64: 6071-6074.
- Kumar R, Thompson EB. The structure of the nuclear hormone receptors. *Steroids*. (1999) 64(5):310-319.

Le H, Kleinerman R, Lerman OZ, Brown D, Galiano R, Gurtner GC, Warren SM, Levine JP, Saadeh PB. Hedgehog signaling is essential for normal wound healing. *Wound Rep Reg* (2008) 16: 768-773.

Lee J, Platt KA, Censullo P, Ruiz i Altaba A. Gli1 is a target of Sonic hedgehog that induces ventral neural tube development. *Development* (1997) 124(13): 2537-2552.

Lehenkari P, Parikka V, Rautiala TJ, Weckstrom M, Dahllund J, Härkönen PL, Väänänen HK. The effects of tamoxifen and toremifene on bone cells involve changes in plasma membrane ion conductance. *J Bone Miner Res* (2003) 18: 473-478.

Levanat S, Gorlin RJ, Fallet S, Johnson DR, Fantasia JE, Bale AE. A two-hit model for developmental defects in Gorlin syndrome. *Nature Genet* (1996) 12: 85-87.

Levanat S, Musani V, Komar A, Orešković S. Role of the hedgehog/patched signaling pathway in oncogenesis: a new polymorphism in the PTCH gene in ovarian fibroma. *Ann N Y Acad Sci* (2004) 1030: 134-143.

Levanat S, Pavelić B, Crnić I, Orešković S, Manojlović S. Involvement of PTCH gene in various noninflammatory cysts. *J Mol Med* (2000) 78(3): 140-146.

Lewis MT, Veltmaat JM. Next stop, the twilight zone: hedgehog network regulation of mammary gland development. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* (2004) 9(2): 165-181.

Li X, Deng W, Lobo-Ruppert SM, Ruppert JM. Gli1 acts through Snail and E-Cadherin to promote nuclear signaling by  $\beta$ -catenin. *Oncogene* (2007) 26: 4489-4498.

Liao X, Sui MKY, Au CWH, Wong ESY, Chan HY, Ip PCP, Ngan HYS, Cheung ANY. Aberrant activation of hedgehog signaling pathway in ovarian cancers: effects on prognosis, cell invasion and differentiation. *Carcinogenesis* (2009) 30(1): 131-140.

Lipinski RJ, Dengler E, Kiehn M, Peterson RE, Bushman W. Identification and Characterization of Several Dietary Alkaloids as Weak Inhibitors of Hedgehog Signaling. *Toxicol Sci* (2007) 100(2): 456-463.

Litingtung Y., Dahn RD, Li Y, Fallon JF, Chiang C. Shh and Gli3 are dispensable for limb skeleton formation but regulate digit number and identity. *Nature* (2002) 418(6901): 979-983.

Liu S, Dontu G, Wicha MS. Mammary stem cells, self-renewal pathways, and carcinogenesis. *Breast Cancer Research* (2005) 7: 86-95.

Liu S, Dontu G, Mantle ID, Patel S, Ahn NS, Jackson KW, Suri P, Wicha MS. Hedgehog signaling and Bmi-1 regulate self-renewal of normal and malignant human mammary stem cells. *Cancer Res* (2006) 66(12): 6063-6071.

Lou H, Dean M. Targeted therapy for cancer stem cells: the patched pathway and ABC transporters. *Oncogene* (2007) 26: 1357-1360.

Love RR. Tamoxifen therapy in primary breast cancer: biology, efficacy, and side effects. *J Clin Oncol* (1989) 7: 803-315.

- Lowry WE, Richter L. Signaling in adult stem cells. *Frontiers Biosc* (2007) 12: 3911-3827.
- Löf-Öhlin Z, Levanat S, Sabol M, Sorbe B, NilssonTK. Promoter methylation in the PTCH gene in cervical epithelial cancer and ovarian cancer tissue as studied by eight novel Pyrosequencing assays. *Int J Oncol* (2010) 38: 685-692.
- Mann RK, Beachy, PA. Novel lipid modifications of secreted protein signals. *Annu Rev Biochem* (2004) 73: 891-923.
- Marigo V, Roberts DJ, Lee SM, Tsukurov O, Levi T, Gastier JM, Epstein DJ, Gilbert DJ, Copeland NG, Seidman CE. Cloning, expression, and chromosomal location of SHH and IHH: two human homologues of the *Drosophila* segment polarity gene hedgehog. *Genomics* (1995) 28(1): 44-51.
- Marigo V, Davey RA, Zuo Y, Cunningham JM, Tabin CJ. Biochemical evidence that patched is the Hedgehog receptor. *Nature* (1996) 384: 176-179.
- Marshall E. Tamoxifen: „a bigdeal“, but a complex hand to play. *Science* (1998) 280: 196.
- Masai I, Yamaguchi M, Tonou-Fujimori N, Komori A, Okamoto H. The hedgehog-PKA pathway regulates two distinct steps of the differentiation of retinal ganglion cells: the cell-cycle exit of retinoblasts and their neuronal maturation. *Development* (2005) 132: 1539-1553.
- McFerren MA. Useful plants of dermatology. VIII. The false hellebore (*Veratrum californicum*). *J Am Acad Dermatol* (2006) 54(4): 718-720.
- McKeon VA. The breast cancer prevention trial: should women at high risk take tamoxifen? *Jobstet Gynecol Neonatal Nurs* (1999) 28: 34-38.
- Melvin VS, Harrell C, Adelman JS, Kraus WL, Churchill M, Edwards DP. The role of the C-terminal extension (CTE) of the estrogen receptor alpha and beta DNA binding domain in DNA binding and interaction with HMGB. *J Biol Chem* (2004) 279: 14763-14771.
- Michaud EJ, Yoder BK. The primary cillium in cell signaling and cancer. *Cancer Res* (2006) 66(13): 6463-6467.
- Miller L-AD, Wert SE, Clark JC, Xu Y, Perl A-KT, Whitsett JA. Role of *Sonic hedgehog* in patterning of tracheal-bronchial cartilage and the peripheral lung. *Developmental Dynamics* (2004) 231: 57-71.
- Mimeault M, Moore E, Moniaux N, Hénichart JP, Depreux P. Cytotoxic effects induced by a combination of cyclopamine and gefitinib, the selective hedgehog and epidermal growth factor receptor signaling inhibitors, in prostate cancer cells. *Int J Cancer* (2006) 118: 1022-1031.
- Mimeault M, Hauke R, Mehta PP, Batra SK. Recent advances in cancer stem/progenitor cell research: therapeutic implications for overcoming resistance to the most aggressive cancers. *J Cell Mol Med* (2007) 11(5): 981-1011.

Mimeault M, Johansson SL, Henichart JP, Depreux P, Batra SK. Cytotoxic effects induced by docetaxel, gefitinib, and cyclopamine on side population and nonside population cell fractions from human invasive prostate cancer cells. *Mol Cancer Ther* (2010) 9(3): 617-630.

Moraes RC, Zhang X, Harrington N, Fung JY, Wu MF, Hilsenbeck SG, Allred DC, Lewis MT. Constitutive activation of smoothened (SMO) in mammary glands of transgenic mice leads to increased proliferation, altered differentiation and ductal dysplasia. *Development* (2007) 134: 1231-1242.

Mosselman S, Polman J, Dijkema R. ER beta: identification and characterization of a novel human estrogen receptor. *FEBS Lett* (1996) 392: 49-53.

Motoyama J, Heng H, Crackower MA, Takabatake T, Takeshima K, Tsui L-C, Hui C-C. Overlapping and non-overlapping Ptch2 expression with Shh during mouse embryogenesis. *Mech Dev* (1998) 78(1-2): 81-84.

Motoyama J, Takabatake T, Takeshima K, Hui C. Ptch2, a second mouse Patched gene is co-expressed with Sonic hedgehog. *Nat Genet* (1998) 2(18): 104-106.

Mukherjee S, Frolova N, Sadlonova A, Novak Z, Steg A, Page GP, Welch DR, Lobo-Ruppert SM, Ruppert JM, Johnson MR, Frost AR. Hedgehog signaling and response to cyclopamine differ in epithelial and stromal cells in benign breast and breast cancer. *Cancer Biol Ther* (2006) 5(6): 674-683.

Mullor JL, Dahmane N, Sun T, Ruiz i Altaba A. Wnt signals are targets and mediators of Gli1 function. *Curr Biol* (2001) 11: 769-773.

Murone M, Rosenthal A, de Sauvage FJ. Hedgehog signal transduction: from flies to vertebrates. *Exp Cell Res* (1999) 253(1): 25-33.

Nakamura T, Aikawa T, Iwamoto-Enomoto M, Iwamoto M, Higuchi Y, Maurizio P, Kinto N, Yamaguchi A, Noji S, Kurisu K, Matsuya T. Induction of osteogenic differentiation by Hedgehog proteins. *Biochem Biophys Res Comm* (1997) 237: 465-469.

Nicolis SK. Cancer stem cells and „stemness“ genes in neuro-oncology. *Neurobiol Disease* (2007) 25: 217-229.

Nüsslein-Volhard C, Wieschaus EF. Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature* (1980) 287: 795-801.

Oliver TG, Gräsfeder LL, Carroll AL, Kaiser C, Gillingham CL, Lin SM, Wickramasinghe R, Scott MP, Weschler-Reya RJ. Transcriptional profiling of the Sonic hedgehog response: a critical role for N-myc in proliferation of neuronal precursors. *PNAS* (2003) 100(12): 7331-7336.

Omi M, Fisher M, Maihle NJ, Dealy CN. Studies on epidermal growth factor receptor signaling invertebrate limb patterning. *Dev Dynamics* (2005) 233: 288-300.

Oro AE, Higgins KM, Hu Z, Bonifas JM, Epstein EH, Scott MP. Basal cell carcinomas in mice overexpressing Sonic hedgehog. *Science* (1997) 276: 817-821.

Otto A, Paddenberg R, Schubert S, Mannhertz H. Cell-cycle arrest, micronucleus formation, and cell death in growth inhibition of MCF-7 breast cancer cells by tamoxifen and cisplatin. *J Cancer Res Clin Oncol* (1996) 122: 603-612.

Pathi S, Pagan-Westphal S, Baker DP, Garber EA, Rayhorn P, Bumcrot D, Tabin CJ, Blake Pepinsky R, Williams KP. Comparative biological responses to human Sonic, Indian and Desert hedgehog. *Mechanisms Dev* (2001) 106(1-2): 107-117.

Pavletich NP, Pabo CO. Crystal structure of a five-finger GLI-DNA complex: new perspectives on zinc fingers. *Science* (1993) 261(5129): 1701-1707.

Peacock CD, Wang Q, Gessel GS, Corcoran-Schwartz IM, Jones E, Kim J, Devereux WL, Rhodes JT, Huff CA, Beachy PA, Watkins DN, Matsui W. Hedgehog signaling maintains a tumor stem cell compartment in multiple myeloma. *PNAS* (2007) 104(10): 4048-4053.

Perry R, Kang Y, Greaves B. Effects of tamoxifen on growth and apoptosis of estrogen-dependent and -independent human breast cancer cells. *Ann Surg Oncol* (1995) 12: 238-245.

Pettersson K, Gustafsson JA. Role of estrogen receptor  $\beta$  in estrogen action. *Annu Rev Physiol* (2001) 63: 165-192.

Pharoah PD, Antoniou A, Bobrow M, Zimmern RL, Easton DF, Ponder BA. Polygenic susceptibility to breast cancer and implications for prevention. *Nat Genet* (2002) 31.

Philipp M, Fralish GB, Meloni AR, Chen W, MacInnes AW, Barak LS, Caron MG. Smoothed signaling in the vertebrates is facilitated by a G protein-coupled receptor kinase. *Mol Biol Cell* (2008) 19: 5478-5489.

Pietsch T, Waha A, Koch A, Kraus J, Albrecht S, Tonn J, Sørensen N, Berthold F, Henk B, Schmandt N, Olf HK, von Deimling A, Wainwright B, Chevenix-Trench G, Wiestler OD, Wicking C. Medulloblastomas of the desmoplastic variant carry mutations of the human homologue of *Drosophila patched*. *Cancer Res* (1997) 57: 2085-2088.

Ponchel F, Toomes C, Bransfield K, Leong FT, Douglas SH, Field SL, Bell SM, Combaret V, Puisieux A, Mighell AJ, Robinson PA, Inglehearn CF, Isaacs JD, Markham AF. Real-time PCR based on SYBR-Green I fluorescence: An alternative to the TaqMan assay for a relative quantification of gene rearrangements, gene amplifications and micro gene deletions. *BMC Biotechnology* (2003) 3: 18.

Pritchard JI, Olson JM. Methylation of *PTCH1*, the Patched-1 gene, in a panel of primary medulloblastomas. *Cancer Genet Cytogenet* (2008) 180: 47-50.

Qualthorough D, Buda A, Gaffield W, Williams AC, Paraskeva C. Hedgehog signaling in colorectal tumor cells: induction of apoptosis with cyclopamine treatment. *Int J Cancer* (2004) 110: 831-837.

Radhakrishna U, Bornholdt D, Scott HS, Patel UC, Rossier C, Engel H, Bottani A, Chandal D, Blouin JL, Solanki JV, Grzeschik KH, Antonarakis SE. The phenotypic spectrum of GLI3 morphopathies includes autosomal dominant preaxial polydactyly type-IV and postaxial polydactyly type-A/B; No phenotype prediction from the position of GLI3 mutations. *Am J Hum Genet* (1999) 65(3): 645-655.

Radmacher MD, Simon R. Estimation of tamoxifens's efficiency for preventing the formation and growth of breast tumors. *J Natl Cancer Inst* (2000) 92: 48-53.

Rahnama F, Shimokawa T, Lauth M, Finta C, Kogerman P, Teglund S, Toftgård R, Zaphiropoulos PG. Inhibition of *GLII* gene activation by Patched1. *Biochem J* (2006) 394: 19-26.

Rahnama F, Toftgård R, Zaphiropoulos PG. Distinct roles of PTCH2 splice variants in Hedgehog signalling. *Biochem J* (2004) 378(2): 325-334.

Regl G, Neill GW, Eichberger T, Kasper M, Ikram MS, Koller J, Hintner H, Quinn AG, Frischauf AM, Aberger F. Human GLI2 and GLI1 are part of a positive feedback mechanism in Basal Cell Carcinoma. *Oncogene* (2002) 21(36): 5529-5539.

Regl G, Kasper M, Schnidar H, Eichberger T, Neill GW, Philpott MP, Esterbauer H, Hauser-Kronberger C, Frischauf AM, Aberger F. Activation of the BCL2 promoter in response to Hedgehog/GLI signal transduction is predominantly mediated by GLI2. *Cancer Res* (2004) 64(21): 7724-7731.

Riddle RD, Johnson RL, Laufer E, Tabin C. Sonic hedgehog mediates the polarizing activity of the ZPA. *Cell* (1993) 75: 1401-1416.

Roessler E, Belloni E, Gaudenz K, Jay P, Berta P, Scherer SW, Tsui L-C, Muenke M. Mutations in the human Sonic hedgehog gene cause holoprosencephaly. *Nature Genet* (1996) 14: 357-360.

Rose PG. Endometrial carcinoma. *N Eng J Med* (1996) 335: 640-649.

Ruppert JM, Kinzler KW, Wong AJ, Bigner SH, Kao FT, Law ML, Seunanez HN, O'Brien SJ, Vogelstein B. The GLI-Kruppel family of human genes. *Mol Cell Biol* (1988) 8(8): 3104-3113.

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(17): 3915-3924.

Schwartz Z, Sylvia VL, Guinee T, Dean DD, Boyan BD. Tamoxifen elicits its anti-estrogen effects in growth plate chondrocytes by inhibiting protein kinase C. *J Steroid Biochem Mol Biol* (2002) 80: 401-410.

Sengupta A, Banerjee D, Chandra S, Banerji SK, Ghosh R, Roy R, Banerjee S. Dereglulation and cross talk among Sonic hedgehog, Wnt, Hox and Notch signaling in chronic myeloid leukemia progression. *Leukemia* (2007) 21: 949-955.

Sentis S, Le Romancer M, Bianchin C, Rostan MC, Corbo L. Sumoylation of the estrogen receptor alpha hinge region regulates its transcriptional activity. *Mol Endocrinol* (2005) 19: 2671-2684.

Shaw G, Prowse DM. Inhibition of androgen-independent prostate cancer cell growth is enhanced by combination therapy targeting Hedgehog and ErbB signaling. *Cancer Cell International* (2008) 8: 3.

Shi Y, Sun G, Zhao C, Stewart R. Neural stem cell self-renewal. *Crit Rev Oncol/Hematol* (2008) 65(1): 43-53.

Shiau AK, Barstad D, Loria PM, Cheng L, Kushner PJ, Agard DA, Greene GL. The structural basis of estrogen receptor/coactivator recognition and the antagonism of this interaction by tamoxifen. *Cell* (1998) 95(7): 927-937.

Shipitsin M, Campbell LL, Argani P, Weremowicz S, Bloushtain-Qimron N, Yao J, Nikolskaya T, Serebryskaya T, Beroukhim R, Hu M, Halushka MK, Sukumar S, Perker LM, Anderson KS, Harris LN, Garber JE, Richardson AL, Schnitt SJ, Nikolsky Y, Gelman RS, Polyak K. Molecular definition of breast tumor heterogeneity. *Cancer Cell* (2007) 11: 259-273.

Silva-Vargas V, Lo Celso C, Giangreco A, Ofstad T, Prowse DM, Braun KM, Watt FM. B-catenin and hedgehog signal strength can specify number and location of hair follicles in adult epidermis without recruitment of bulge stem cells. *Dev Cell* (2005) 9: 121-131.

Skafar DF, Zhao C. The multifunctional estrogen receptor-alpha F domain. *Endocrine* (2008) 33: 1-8.

Stecca B, Mas C, Clement V, Zbinden M, Correa R, Piguet V, Beerman F, Ruiz i Altaba A. Melanomas require HEDGEHOG-GLI signaling regulated by interactions between GLI1 and the RAS-MEK/AKT pathways. *PNAS* (2007) 104(14): 5895-5900.

Stecca B, Ruiz i Altaba A. Brain as a paradigm of organ growth: Hedgehog-Gli signaling in neural stem cells and brain tumors. *J Neurobiol* (2005) 64: 476-490.

St-Jacques B, Hammerschmidt M, McMahon AP. Indian hedgehog signaling regulates proliferation and differentiation of chondrocytes and is essential for bone formation. *Genes Dev* (1999) 13: 2072-2086.

Stone DM, Hynes M, Armanini M, Swanson TA, Gu Q, Johnson RL, Scott MP, Pennica D, Goddard A, Phillips H, Noll M, Hooper JE, de Sauvage F, Rosenthal A. The tumour-suppressor gene patched encoded a candidate receptor for Sonic hedgehog. *Nature* (1996) 384(6605): 129-134.

Strange RC, El-Genidy N, Ramachandran S, Lovatt TJ, Fryer AA, Smith AG, Lear JT, Wong C, Jones PW, Ichii-Jones F, Hoban PR. Susceptibility to basal cell carcinoma: associations with *PTCH* polymorphisms. *Ann Hum Genet* (2004) 68: 536-546.

Taipale J, Beachy PA. The Hedgehog and Wnt signalling pathways in cancer. *Nature* (2001) 411: 349-354.

Taipale J, Chen JK, Cooper MK, Wang B, Mann RK, Milenkovic L, Scott MP, Beachy PA. Effects of oncogenic mutations in Smoothed and Patched can be reversed by cyclopamine. *Nature* (2000) 406(6799): 1005-1009.

Tanaka Hall TM, Porter JA, Beachy PA, Leahy DJ. A potential catalytic site revealed by the 1.7-Å crystal structure of the amino-terminal signalling domain of Sonic hedgehog. *Nature* (1995) 378(9): 212-216.

Teh M-T, Wong S-T, Neill GW, Ghali LR, Phillipot MP, Quinn AG. FOXM1 is a downstream target of Gli1 in basal cell carcinomas. *Cancer Res* (2002) 62: 4773-4780.

ten Haaf A, Bektas N, von Serenyi S, Losen I, Arweiler EC, 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.

Thayer SP, di Magliano MP, Heiser PW, Nielsen CM, Roberts DJ, Lauwers GY, Qi YP, Gysin S, Fernandez-del Castillo C, Yajnik V, Antoniu B, McMahon M, Warshaw AL, Hebrok M. Hedgehog is an early and late mediator of pancreatic cancer tumorigenesis. *Nature* (2003) 425(6960): 851-856.

Thievensen I, Wolter M, Prior A, Seifert H-H, Schulz WA. Hedgehog signaling in normal urothelial cells and in urothelial carcinoma cell lines. *J Cell Physiol* (2005) 203: 372-377.

Tostar U, Malm CJ, Meis-Kindblom JM, Kindblom L-G, Toftgård R, Undén B. Deregulation of the hedgehog signaling pathway: a possible role for the PTCH and SUFU genes in human rhabdomyoma and rhabdomyosarcoma development. *J Pathol* (2006) 208: 17-25.

Vamsidhar V, Ramaswamy G. Hedgehog signaling pathway and lung cancer. *J Thorac Oncol* (2007) 2(1): 7-10.

van den Brink GR. Hedgehog signaling in development and homeostasis of the gastrointestinal tract. *Physiol Rev* (2007) 87: 1343-1375.

Varjosalo M, Taipale J. Hedgehog: functions and mechanisms. *J Genes Dev* (2008) 22(18): 2454-2472.

Vila G, Theodoropoulou M, Stalla J, Tonn JC, Losa M, Renner U, Stalla GK, Paez-Pereda M. Expression and function of Sonic hedgehog pathway components in pituitary adenomas: evidence for a direct role in hormone secretion and cell proliferation. *J Clin Endocrinol Metab* (2005) 90(12): 6687-6694.

Vogt A, Chuang PT, Hebert J, Hwang J, Lu Y, Kopelovich L, Athar M, Bickers DR, Epstein Jr. EH. Immunoprevention of basal cell carcinomas with recombinant hedgehog-interacting protein. *J Exp Med* (2004) 199(6): 753-761.

Vořechovský I, Undén AB, Sandstedt B, Toftgård R, Stähle-Bäckdahl S. Thichoepitheliomas contain somatic mutations in the overexpressed *PTCH* gene: support for a gatekeeper mechanism in skin tumorigenesis. *Cancer Res* (1997) 57: 4677-4681.



Vořechovský I, Benediktsson KP, Toftgård R. The Patched/Hedgehog/Smoothed signaling pathway in human breast cancer: no evidence for H133Y SHH, PTCH and SMO mutations. *Eur J Cancer* (1999) 35(5): 711-713.

Vortkamp A, Lee K, Lanske B, Segre GV, Kronenberg HM, Tabin CJ. Regulation of rate of cartilage differentiation by Indian hedgehog and PTH-related protein. *Science* (1996) 273: 613-622.

Watkins DN, Berman DM, Burkholder SG, Wang B, Beachy PA, Baylin SB. Hedgehog signaling within airway epithelial progenitors and in small-cell lung cancer. *Nature* (2003) 422(20): 313-317.

Wärnmark A, Treuter E, Wright AP, Gustafsson J-Å. Activation functions 1 and 2 of nuclear receptors: molecular strategies for transcriptional activation. *Mol Endocrinol* (2003) 17(10): 1901-1909.

Wolf I, Bose S, Desmond JC, Lin BT, Williamson EA, Karlan BY, Koeffler HP. Unmasking of epigenetically silenced genes reveals DNA promoter methylation and reduced expression of PTCH in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* (2007) 105: 139-155.

Wong SCC, Lo SFE, Cheung MT, Ng KOE, Tse CW, Lai BSP, Lee KC, Lo YMD. Quantification of plasma  $\beta$ -catenin mRNA in colorectal cancer and adenoma patients. *Clin Cancer Res* (2004) 10: 1613-1617.

Xie J, Johnson RL, Zhang X, Bare JW, Waldman FM, Cogen PH, Menon AG, Warren RS, Chen LC, Scott MP, Epstein EH Jr. Mutations of the PATCHED gene in several types of sporadic extracutaneous tumors. *Cancer Res* (1997) 57: 2369-2372.

Yauch RL, Gould SE, Scales SJ, Tang T, Tian H, Ahn CP, Marshall D, Fu L, Januario T, Kallop D, Nannini-Pepe M, Kotkow K, Marsters Jr. JC, Rubin LL, de Sauvage FJ. A paracrine requirement for hedgehog signalling in cancer. *Nature* (2008) 455: 406-411.

Yue S, Chen Y, Cheng SY. Hedgehog signaling promotes the degradation of tumor suppressor Sufu through the ubiquitin-proteasome pathway. *Oncogene* (2009) 28: 492-499.

Zaphiropoulos PG, Undén AB, Rahnama F, Hollingsworth RE, Toftgård R. PTCH2, a novel human patched gene, undergoing alternative splicing and up-regulated in basal cell carcinomas. *Cancer Res* (1999) 59: 787-792.

Zhan S, Helman LJ. Glimpsing the cause of rhabdomyosarcoma. *Nat Med* (1998) 4(5): 559-560.

Zhang W, Couldwell WT, Song H, Takano T, Lin JH, Nedergaard M. Tamoxifen-induced enhancement of calcium signaling in glioma and MCF-7 breast cancer cells. *Cancer Res* (2000) 60: 5395-5400.

Zhang X, Harrington N, Moraes RC, Wu MF, Hilsenbeck SG, Lewis MT. Cyclopamine inhibition of human breast cancer cell growth independent of Smoothed (Smo). *Breast Cancer Res Treat* (2009) 115: 505-521.

Zhao J, Chen G, Cao D, Li Y, Diao F, Cai H, Jin Y, Lu J. Expression of Gli1 correlates with the transition of breast cancer cells to estrogen-independent growth. *Breast Cancer Res Treat* (2010) 119: 39-51.

Zhou Y-x, Jia L-w, Liu W-m, Miao C-l, Liu S, Cao Y-j, Duan E-k. Role of sonic hedgehog in maintaining a pool of proliferating stem cells in the human fetal epidermis. *Hum Reprod* (2006) 21(7): 1698-1704.

## 8. ŽIVOTOPIS I POPIS PUBLIKACIJA

---

**Ime i prezime:** Zvonimir Užarević

**Datum rođenja:** 17. 02. 1975.

**Mjesto rođenja:** Slavonski Brod

**Adresa:** Stjepana Radića 97, 35222 Gundinci

**E-mail:** zuzarevic@ufos.hr

**Edukacija:** 2007. - (do danas) Sveučilišni poslijediplomski interdisciplinarni doktorski studij  
Molekularne bioznanosti

1994. - 1998. Pedagoški fakultet, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

1990. - 1994. Srednja medicinska škola, Slavonski Brod

1982. - 1990. Osnovna škola Augusta Šenoje, Gundinci

### **Radno iskustvo:**

2008. - (do danas) Učiteljski fakultet, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

2006. - 2008. Odjel za biologiju, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

2004. - 2006. Srednja škola Matije Antuna Reljkovića, Slavonski Brod

2000. - 2004. Pedagoški fakultet, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

1999. - 2000. Srednja škola Mate Balote, Poreč

### **Posebna znanja i vještine:**

Poznavanje engleskog jezika u govoru i pismu

Poznavanje rada na računalu

Vozačka dozvola B kategorije

### **Članstva:**

Hrvatsko društvo za istraživanje raka

Hrvatsko biološko društvo

Hrvatsko društvo za biljnu fiziologiju

Hrvatsko kemijsko društvo

## **Publikacije**

### **Znanstveni radovi objavljeni u časopisima koji se indeksiraju u Current Contents:**

Bačić, T., Ljubešić, N., **Užarević, Z.**, Grgić, Lj., Roša, J., 2004. TEM investigation of tannins and chloroplast structure in needles of damaged silver fir trees (*Abies alba* Mill.). Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica, 46, 145-149.

Bačić, T., **Užarević, Z.**, Grgić, Lj., Roša, J., Popović Ž., 2002. Chlorophylls and carotenoids in the needles of damaged fir (*Abies alba* Mill.) trees from Risnjak National Park in Croatia. Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica, 45/2, 87-92.

### **Znanstveni radovi objavljeni u časopisima koji se indeksiraju u Science Citation Index Expanded:**

Lepeduš, H., Begović, L., Mlinarić, S., Šimić, D., Štolfa, I., Parađiković, N., **Užarević, Z.**, Jurković, V., Cesar, V., 2011. Physiology and biochemistry of leaves bleaching in prematurely aging maple (*Acer saccharinum* L.) trees: II. Functional and molecular adjustment of PSII. Acta botanica Croatica, 70/ 2, 137-150.

**Užarević, Z.**, Štolfa, I., Parađiković, N., Cesar, V., Lepeduš, H., 2011. Physiology and biochemistry of leaves bleaching in prematurely aging maple (*Acer saccharinum* L.) trees: I. Hydrogen peroxide level, antioxidative responses and photosynthetic pigments. Acta botanica Croatica. 70/2, 125-136.

Cesar, V., **Užarević, Z.**, Potočić, N., Seletković, I., Lepeduš, H., 2005. Preliminary report on episuticular wax structure in Black pine needles affected by SO<sub>2</sub> emitted from thermal power plant Plomin (Croatia). Periodicum Biologorum, 107/3, 357-360.

### **Znanstveno-popularni radovi:**

Varžić, C., Grgić, Lj., **Užarević, Z.**, 2001. Valpovački park. Priroda, 885, 29-31.

## Sažeci u zbornicima međunarodnih i domaćih skupova:

**Užarević, Z.**, Sabol, M., Car, D., Ozretić, P., Musani, V., Bogut, I., Levanat, S., 2010. Hh-Gli signaling pathway activity in ER-positive (MCF-7) and ER-negative (Sk-Br-3) breast cancer cell lines treated with tamoxifen. Book of Abstracts of the First meeting of the Croatian Association for Cancer Research with international participation HDIR-1 „From Bench to Clinic“, Zagreb, 35-35.

Popović, Ž., Bogut, I., **Užarević, Z.**, Medica, I., 2009. Nužnost terenske nastave iz prirodoslovlja na učiteljskom studiju. Edukacija prirodoslovlja, geografije i povijesti za društvo znanja, 3. međunarodna konferencija o naprednim i sustavnim istraživanjima (Zadar), Zagreb, 16.

Popović, Ž., Bogut, I., **Užarević, Z.**, Medica, I., 2009. Katalog znanja, vještina i sposobnosti iz Prirodoslovlja na učiteljskom studiju. Edukacija prirodoslovlja, geografije i povijesti za društvo znanja, 3. međunarodna konferencija o naprednim i sustavnim istraživanjima (Zadar), Zagreb, 25.

**Užarević, Z.**, Čretnik, M., Car, D., Ozretić, P., Musani, V., Levanat, S., 2009. Aktivnost signalnog puta Hh-Gli u staničnim linijama raka dojke. Proceedings of Abstracts of 10<sup>th</sup> Croatian Biological Congress, Zagreb, 96-97.

**Užarević Z.**, Štolfa, I., Paradžiković, N., Cesar, V., Lepeduš, H., 2007. The regulation of hydrogen peroxide level in prematurely aged silver maple (*Acer saccharinum* L.) leaves. 2<sup>nd</sup> Croatian Botanical Symposium with international participation, Zagreb, 124-125.

Krstin, Lj., Bačić, T., Roša, J., **Užarević Z.**, 2004. Condition of epicuticular wax abaxial epistomatal rims of stomata in silver fir trees needles (*Abies alba* Mill.). 1<sup>st</sup> Croatian Botanical Symposium with international participation, Zagreb, 161-162.

Besendorfer, V., Krajačić-Sokol, I., **Užarević, Z.**, Mlinarec, J., Papeš, D., 2003. Physical mapping of nuclear ribosomal RNA (rRNA) genes and characterization of 5SrDNA and ITS sequences in *Abies alba* Mill. 2<sup>nd</sup> Scientific Symposium with International Participation „45

Years of Molecular Biology in Croatia 50 Years of Double Helix“, Book of Abstracts, Zagreb, 26.

Besendorfer, V., Krajačić-Sokol, I., **Užarević, Z.**, Mlinarec, J., Papeš, D., 2003. Fizičko kartiranje jezgrinih gena za ribosomsku RNA (rRNA) i karakterizacija 5S rDNA i ITS sekvenci u vrste *Abies alba* Mill. 8. hrvatski biološki kongres s međunarodnim sudjelovanjem, Zagreb, 144.

**Užarević, Z.**, Besendorfer, V., Grgić, Lj., Papeš, D., Bačić, T., 2003. Elemental and cytogenetical analysis of damaged silver fir trees from Risnjak National Park. Third International Balkan Botanical Congress, Abstracts, Sarajevo, 366.

**Užarević, Z.**, Ljubešić, N., Grgić, Lj., Bačić, T., 2003. Ultrastructure of chloroplasts in damaged fir trees (*Abies alba* Mill.) at the Risnjak National Park. 6<sup>th</sup> Multinational Congress on Microscopy - European Extension, Proceedings, Pula, 291.

**Užarević, Z.**, Grgić, Lj., Bačić, T., 2001. Preliminary research on AT.% and WT.% of some elements in silver fir (*Abies alba* Mill.) needles of damaged trees from Risnjak National Park. XVII. Hrvatski skup kemičara i kemijskih inženjera, Abstracts, Osijek, 265.

Čačić, M., Kuleš, M., Kovač, S., Trković, M., **Užarević, Z.**, 1998. Synthesis chemiluminescent compounds on the basis nitrocoumarins. Zbornik radova: 9. Ružičkine dani, Vukovar, 131.