

SVEUČILIŠTE U RIJECI  
ODJEL ZA BIOTEHNOLOGIJU

Matea Kurtović

**Jedinstveni i preklapajući ciljni geni  
transkripcijskih faktora GLI1, GLI2 i GLI3  
u melanomu čovjeka**

Doktorski rad

Rijeka, 2023.

SVEUČILIŠTE U RIJECI  
ODJEL ZA BIOTEHNOLOGIJU

Matea Kurtović

**Jedinstveni i preklapajući ciljni geni  
transkripcijskih faktora GLI1, GLI2 i GLI3  
u melanomu čovjeka**

Doktorski rad

Mentor: dr.sc. Maja Sabol

Rijeka, 2023.

UNIVERSITY OF RIJEKA  
DEPARTMENT OF BIOTECHNOLOGY

Matea Kurtović

**Unique and overlapping target genes of  
transcription factors GLI1, GLI2 and GLI3  
in human melanoma**

Doctoral thesis

Mentor: Maja Sabol, PhD

Rijeka, 2023

Ovaj doktorski rad izrađen je u Laboratoriju za nasljedni rak, na Zavodu za molekularnu medicinu Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu. Mentorica doktorskog rada je dr. sc. Maja Sabol, a rad je sastavni dio istraživačkog projekta „*Regulacija GLI koda u tumorima ovisnim o BRAF/NRAS mutacijama*“ financiranog od strane Hrvatske zaklade za znanost (HRZZ IP-01-2018-4889).

Mentor: dr.sc. Maja Sabol, viša znanstvena suradnica na Institutu Ruđer Bošković

Doktorski rad obranjen je dana 22.5.2023. na Odjelu za biotehnologiju, Sveučilišta u Rijeci, pred povjerenstvom u sastavu:

1. izv. prof. dr. sc. Igor Jurak, predsjednik povjerenstva
2. izv. prof. dr. sc. Dubravka Švob Štrac, član
3. izv. prof. dr. sc. Ivana Ratkaj, član

Doktorski rad ima 137 stranica, 61 sliku, 18 tablica i 184 reference.

# Zahvale

*Prije svega, hvala mentorici Maji Sabol na velikoj podršci koju mi pruža od prvog dana, na svim savjetima, idejama, planovima B, priskakanju u pomoć..... Zaista si uzor doktorandima kada misle da je sve izgubljeno i da se pokus ne može spasiti. Još više od toga, hvala ti na susretljivosti i razumijevanju.*

*Hvala mojim curama, Nikolini, Josipi i Tini što su mi uljepšavale ovo putovanje. Pružale ste mi nesebičnu pomoć u labosu kad je trebalo, ali puno češće u životu - sa svojom pozitivnom energijom i smijehom. Falit će mi naše čakule u 304.*

*Hvala Petru i Vesni, na brojnim savjetima i odgovorima na sva moja znanstvena pitanja :)*

*Hvala mojim prijateljima koji su me pratili u svemu... Lei, Tamari, Lori, Romani, Petri, Marku i Martini, Tomislavu, Miji, Juranu... svi ste vjerovali u mene i bodrili me.*

*Hvala dr.sc. Barbari Stecci što me ugostila u svom laboratoriju u Firenci.... I njenim prekrasnim curama - Luisi, Giuliji, Sari, Enrici i Federici... uvijek ću pamtiti vašu gostoljubivost.*

*Veliko hvala mojoj obitelji, posebno mojim roditeljima i bratu Vedranu... na razumijevanju, podršci i ohrabrivanju tijekom svih mojih „školskih“ dana.*

*Najviše hvala mom Mateu – bez tebe ne bih bila tu gdje jesam. Ne dopuštaš mi da odustanem ili posustanem i uvijek nalaziš rješenje... Volim te i veselim se godinama koje su pred nama!*

## Sažetak

### Jedinstveni i preklapajući ciljni geni transkripcijskih faktora GLI1, GLI2 i GLI3 u melanomu čovjeka

Melanom je jedan od najagresivnijih i najzloćudnijih tumora kože, uz veliku sklonost metastaziranju. Uključenost i važnost signalnog puta Hedgehog-GLI u melanomu te njegova interakcija sa signalnim putem MAPK već je zabilježena u dosadašnjim istraživanjima. U ovom doktorskom radu se nastoje dodatno razjasniti još nedovoljno istražene uloge ovog signalnog puta u melanomu te pronaći nove gene koje on regulira. Sekvenciranjem RNA tri stanične linije s prekomjernom ekspresijom proteina GLI1, GLI2 ili GLI3 dobiveni su podaci da postoji 1 642 ciljna gena koji su preklapajući za GLI1 i GLI2, 23 preklapajuća ciljna gena za GLI2 i GLI3 i samo 9 preklapajućih gena za GLI1 i GLI3. Pronađeno je 607 jedinstvenih ciljnih gena GLI1, 1 080 jedinstvenih gena GLI2 i 37 jedinstvenih gena GLI3. Daljnje bioinformatičke analize su pokazale da je u slučaju uzoraka s prekomjernom ekspresijom GLI1 i GLI2, oko 20-30% gena sa značajno promijenjenom ekspresijom uključeno u signalne puteve Wnt, MAPK i RAS. Nakon detaljne selekcije i analize javnih baza podataka, odabrano je 12 gena za validaciju qPCR-om na proširenom panelu od dodatnih 11 staničnih linija melanoma. Validacija qPCR-om je omogućila da se lista dobrih gena kandidata smanji na 6 gena koji su pokazali ujednačeno povećanu ekspresiju u velikom broju staničnih linija. Iako je prvotno planirana validacija odabranih gena u staničnim linijama s potpuno uklonjenim genima GLI1, GLI2, i GLI3, nije bilo moguće uspostaviti spomenute modele koristeći metodu CRISPR/Cas9. Također nije bilo moguće provesti utišavanje gena GLI pomoću siRNA. Iz tih razloga su kao model za smanjenu aktivnost signalnog puta HH-GLI, korištene stanične linije melanoma rezistentne na inhibitor GANT61 te je na njima validirano 6 ciljnih gena. Dodatno su ovi geni validirani na staničnoj liniji s prekomjernom ekspresijom SHH te na sferoidnim kulturama tri stanične linije melanoma (CHL-1, A375 i MEL224), uspostavljenih metodom viseće kapljice u svrhu ovog doktorskog rada. Novoidentificirani ciljni geni proteina GLI koji bi se trebali dodatno istražiti i funkcionalno validirati u melanomu su geni KRT16, KRT17, S100A7, IL1R2 te MRAS.

**Ključne riječi:** Hedgehog-GLI, melanom, ciljni geni, RAS/RAF/MAPK

## Abstract

### Unique and overlapping target genes of transcription factors GLI1, GLI2 and GLI3 in human melanoma

Melanoma is one of the most aggressive and malignant skin tumors, with a high tendency to metastasize. The involvement and importance of the Hedgehog-GLI signaling pathway in melanoma and its interaction with the MAPK signaling pathway have already been reported in previous studies. In this PhD thesis, we are trying to further clarify the role of this signaling pathway in melanoma and to find its new target genes. RNA-sequencing of three melanoma cell lines with overexpressed GLI1, GLI2, or GLI3 revealed that there are 1 642 overlapping target genes for GLI1 and GLI2, 23 overlapping target genes for GLI2 and GLI3, and only 9 overlapping genes for GLI1 and GLI3. There were 607 unique target genes of GLI1, 1 080 unique targets of GLI2, and 37 unique targets of GLI3. Further bioinformatic analysis revealed that in case of GLI1 and GLI2 overexpression, about 20-30% of differentially expressed genes are involved in Wnt, MAPK and RAS signaling pathways. After detailed selection and analysis of several publicly available databases, 12 genes were selected for further validation by qPCR on an expanded panel of additional 11 melanoma cell lines. qPCR validation allowed us to narrow down the gene list to 6 genes that show consistent expression in majority of the cell lines. Although it was planned to conduct target gene validation on melanoma cell lines with completely removed GLI1, GLI2 and GLI3, this could not be achieved using CRISPR/Cas9 method. It was also not possible to achieve silencing of the GLI genes using siRNA. For that reason, melanoma cell lines resistant to GANT61 were used as a model for downregulated activity of the HH-GLI signaling pathway, and 6 target genes were validated on this model. Additionally, these 6 genes were validated on a cell line with stable overexpression of SHH and on spheroid cultures of three melanoma cell lines (CHL-1, A375 and MEL224), established by hanging drop method for the purpose of this thesis. Novel identified target genes of GLI proteins that should be investigated further and functionally validated in melanoma are KRT16, KRT17, S100A7, IL1R2 and MRAS.

**Key words:** Hedgehog-GLI, melanoma, target genes, RAS/RAF/MAPK



# Sadržaj

1.	Uvod.....	1
1.1.	Melanom kože.....	2
1.2.	Dosadašnji terapijski pristupi u liječenju metastatskog melanoma.....	4
1.2.1.	<i>Radioterapija i kemoterapija</i> .....	4
1.2.2.	<i>Imunoterapija</i> .....	4
1.2.3.	<i>Ciljana terapija</i> .....	5
1.3.	Signalni put Hedgehog-GLI (HH-GLI) .....	6
1.4.	Komponente signalnog puta HH-GLI.....	7
1.4.1.	<i>Ligandi Hedgehog (HH)</i> .....	7
1.4.2.	<i>PTCHI</i> .....	7
1.4.3.	<i>SMO</i> .....	8
1.4.4.	<i>SUFU</i> .....	9
1.4.5.	<i>Transkripcijski faktori GLI</i> .....	9
1.5.	Kanonska aktivacija signalnog puta HH-GLI .....	11
1.6.	Nekanonska aktivacija signalnog puta HH-GLI .....	12
1.6.1.	<i>Interakcija signalnih puteva HH-GLI i MAPK</i> .....	14
1.7.	Inhibicija signalnog puta HH-GLI .....	17
1.7.1.	<i>Inhibitori proteina SMO</i> .....	18
1.7.2.	<i>Inhibitori proteina GLI</i> .....	19
1.7.3.	<i>Blokiranje interakcija između receptora PTCHI i liganada HH</i> .....	20
1.8.	Uloga signalnog puta HH-GLI u karcinogenezi .....	21
2.	Ciljevi istraživanja .....	23
3.	Materijali i metode .....	24
3.1.	Metode rada sa staničnim kulturama.....	25
3.1.1.	<i>Uzgoj i održavanje staničnih linija melanoma</i> .....	25
3.1.2.	<i>Izrada sferoida metodom viseće kapljice</i> .....	25
3.1.3.	<i>Transfekcija staničnih linija</i> .....	27
3.1.4.	<i>Utišavanje ekspresije gena pomoću siRNA metodom s kalcijevim fosfatom</i> .....	27
3.1.5.	<i>Izolacija RNA iz stanica</i> .....	28
3.1.6.	<i>Izolacija DNA</i> .....	29
3.1.7.	<i>Imunofluorescentno bojanje stanica</i> .....	29
3.1.8.	<i>Izolacija proteina iz stanica</i> .....	31
3.1.9.	<i>Određivanje koncentracije proteina metodom BCA</i> .....	31
3.1.10.	<i>Metoda western blot</i> .....	31
3.1.11.	<i>Test MTT</i> .....	32

3.1.12.	<i>Protočna citometrija za mjerenje vijabilnosti i proliferacije stanica</i> .....	33
3.1.13.	<i>Statistička obrada podataka</i> .....	33
3.2.	<i>Sekvenciranje RNA</i> .....	34
3.2.1.	<i>Elektroforeza RNA na agaroznom gelu</i> .....	34
3.2.2.	<i>Priprema biblioteka cDNA i sekvenciranje RNA</i> .....	34
3.2.3.	<i>Bioinformatička obrada podataka sekvenciranja RNA</i> .....	34
3.2.4.	<i>Selekcija ciljnih gena dobivenih sekvenciranjem RNA</i> .....	35
3.2.5.	<i>Reverzna transkripcija</i> .....	37
3.2.6.	<i>Optimizacija početnica za kvantitativnu lančanu reakciju polimerazom (qPCR)</i> .....	37
3.2.7.	<i>Validacija ciljnih gena metodom qPCR</i> .....	39
3.3.	<i>Primjena tehnologije CRISPR/Cas9 za uklanjanje gena iz genoma stanica</i> .....	40
3.3.1.	<i>Odabir ciljnih sekvenci</i> .....	40
3.3.2.	<i>Priprema oligonukleotidnih sljedova sgRNA</i> .....	40
3.3.3.	<i>Kloniranje sgRNA u vektor pX330-Cas9</i> .....	41
3.3.4.	<i>Metoda lančane reakcije polimerazom (eng. Polymerase Chain Reaction, PCR)</i> .....	43
3.3.5.	<i>Izrada vektora HR210PA-1/GFP/Puro</i> .....	44
3.3.6.	<i>Transfekcija staničnih linija s vektorima sgRNA-pX330 i HR210PA-1/GFP/Puro</i> .....	47
3.3.7.	<i>Probir i propagacija pozitivnih staničnih klonova monoklinalnom selekcijom</i> .....	47
3.3.8.	<i>Hibridizacija DNA metodom po Southernu</i> .....	49
4.	<i>Rezultati</i> .....	52
4.1.	<i>Odabir staničnih modela</i> .....	53
4.2.	<i>Sekvenciranje RNA</i> .....	54
4.2.1.	<i>Kvaliteta i čistoća uzoraka RNA za sekvenciranje</i> .....	54
4.2.2.	<i>Kvaliteta podataka dobivenih sekvenciranjem RNA</i> .....	57
4.2.3.	<i>Analiza glavnih komponenti (PCA)</i> .....	58
4.3.	<i>Bioinformatička analiza</i> .....	59
4.4.	<i>Validacija ciljnih gena proteina GLI</i> .....	69
4.4.1.	<i>Validacija ciljnih gena metodom qPCR</i> .....	69
4.4.2.	<i>Validacija ciljnih gena imunofluorescentnim bojanjem stanica</i> .....	73
4.5.	<i>Utišavanje ekspresije gena GLI pomoću siRNA</i> .....	78
4.6.	<i>Primjena tehnologije CRISPR/Cas9 za potpuno uklanjanje gena GLI</i> .....	79
4.7.	<i>Validacija ciljnih gena proteina GLI na različitim staničnim modelima</i> .....	87
4.7.1.	<i>Ekspresija ciljnih gena u staničnim linijama rezistentnim na GANT61</i> .....	87
4.7.2.	<i>Ekspresija ciljnih gena u staničnoj liniji CHL-1 s prekomjernom ekspresijom SHH</i> .....	89
4.7.3.	<i>Validacija na sferoidnim kulturama staničnih linija melanoma</i> .....	90
5.	<i>Rasprava</i> .....	100
6.	<i>Zaključci</i> .....	111

7.	Literatura.....	113
8.	Popis kratica.....	127
9.	Popis slika i tablica .....	131
10.	Životopis .....	136

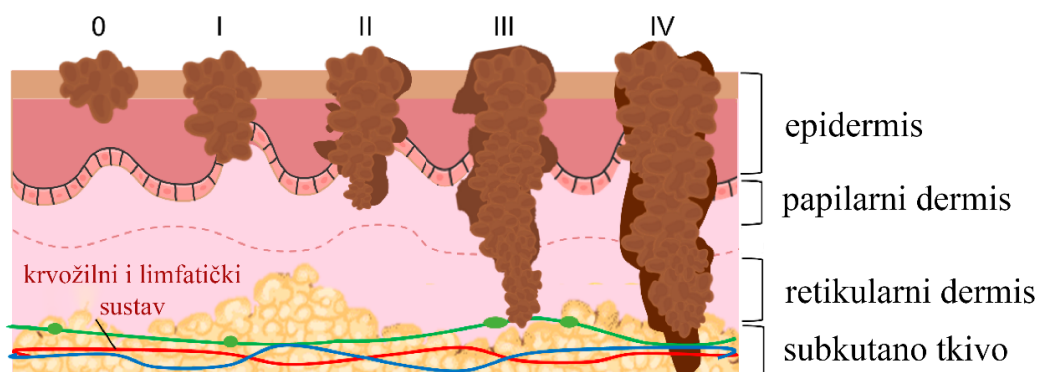
# 1. Uvod

## 1.1. Melanom kože

Melanom se ubraja među najagresivnije i najzloćudnije tumore kože i sluznice, uz veliku sklonost ranom metastaziranju. Najveći okolišni rizični čimbenik za nastanak melanoma je izlaganje ultraljubičastom (UV) zračenju. Ostali rizični čimbenici su obiteljska povijest obolijevanja od melanoma, broj i tip melanocitnih nevusa, tip kože i pigmentacija te genetske mutacije [1], [2]. Melanom se razvija iz melanocita – stanica koje se nalaze u bazalnom sloju epidermisa i proizvode pigment melanin koji apsorbira UV zračenje (Slika 1). Susjedne stanice, keratinociti, uslijed izlaganja UV zračenju, izlučuju hormone koji reguliraju preživljenje, diferencijaciju i proliferaciju, čime potiču melanocite na proizvodnju melanina. Melanociti zatim prenose melanin na susjedne keratinocite i tako štite njihove jezgre od štetnog UV-zračenja [3]. Kako keratinociti sazrijevaju, podvrgavaju se keratinizaciji, gube jezgru i umiru. Stoga je vanjski sloj kože zaštićen pigmentom melaninom u keratinocitima i slojem mrtvih keratinocita koji djeluju kao barijera za zaštitu živih stanica ispod. Postoje dva oblika melanina koje proizvode melanociti: crno/smeđi pigment eumelanin i crveno/žuti pigment feomelanin. Omjer eumelanina i feomelanina u koži određuje boju kože. Tamniji eumelanin je bolja zaštita od UV zračenja, a posljedično ljudi s tamnijom kožom imaju manji rizik od razvoja melanoma [4], [5].

Primarni melanomi kože razvijaju se iz melanocitnog nevusa ili *de novo* uslijed proliferacije zloćudnih melanocita. Melanom može pokazivati dva načina rasta, radijalni i vertikalni. Radijalna faza rasta (horizontalno, površinsko širenje) karakterizirana je proliferacijom melanocita u epidermisu uzduž bazalne membrane i/ili proliferacijom u površinskom dijelu papilarnog dermisa. Tumori u ovoj fazi rasta imaju izrazito povoljnu prognozu. Ranim otkrivanjem i liječenjem, smrtnost od melanoma može se znatno smanjiti. Naime, ukoliko se bolest otkrije u ranom stadiju, petogodišnje preživljenje iznosi i preko 90 %. Vertikalna faza rasta (rast prema dubini i visini) karakterizirana je sposobnošću proliferacije tumora i stvaranje tumorske mase u dermisu. Melanomi se tradicionalno na temelju histološkog izgleda dijele na četiri osnovna histološka podtipa: površinsko šireći, nodularni, lentigo maligna i akralni melanom [6]. Poznato je da se kod trećine oboljelih od melanoma razvijaju udaljene metastaze. U 86 % slučajeva metastaze su lokalizirane u jednom organu i to najčešće u koži, limfnim čvorovima, plućima, mozgu, jetri i gastrointestinalnom traktu.

## stadiji razvoja melanoma



*Slika 1. Shematski prikaz razvoja melanom iz melanocita. Označeni su slojevi epidermis, papilarni dermis, retikulatni dermis i subkutano tkivo. Stadij melanoma se utvrđuje na temelju lokalne, regionalne i udaljene bolesti. Stadij I i II: lokalizirani primarni melanom, stadij III: metastaze u regionalnim limfnim čvorovima, stadij IV: udaljena metastatska bolest. Preuzeto i prilagođeno iz [7].*

Iako predstavlja samo 5 % zloćudnih tumora kože, melanom je odgovoran za oko 75 % svih smrtnih slučajeva tumora kože. Diljem svijeta, pojavnost melanoma čini oko 1,7 % svih novodijagnosticiranih primarnih karcinoma. Učestalost od obolijevanja te smrtnost od melanoma razlikuju se među zemljama, a relativno su visoke u Australiji, Novom Zelandu, Europi i Sjevernoj Americi, dok su najniže u Africi [8]. Prema podacima Registra za rak Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo za 2020. godinu, prema učestalosti sijela raka u Hrvatskoj melanom je i kod muškaraca i kod žena na 9. mjestu. Incidencija melanoma je te godine bila 412 slučajeva kod muškaraca i 341 slučaj kod žena [9].

## 1.2. Dosadašnji terapijski pristupi u liječenju metastatskog melanoma

Prvi terapijski izbor u liječenju melanoma je kirurška ekscizija u cijelosti, uz patohistološku analizu. Kao i kod primarnog (lokaliziranog) oblika melanoma, kirurško liječenje važno je i kod oboljelih s jednom ili vrlo ograničenim brojem metastaza. Ostali terapijski pristupi koji omogućavaju poboljšanje kliničkog stanja oboljelih s metastatskim melanomom su radioterapija, kemoterapija, imunoterapija i ciljana terapija.

### 1.2.1. Radioterapija i kemoterapija

Od svih tumora kože, melanom je najmanje radiosenzitivan. Usprkos tome, ovisno o stadiju bolesti, radioterapija se može primijeniti kao primarni način liječenja (u slučajevima lentigo melanoma, melanoma sluznice te melanoma oka), kao adjuvantna radioterapija regionalnih limfnih čvorova te kao palijativna radioterapija. Primarni cilj palijativne radioterapije je smanjiti simptome bolesti te poboljšati kvalitetu života pacijenata, a uvodi se u slučajevima kada operacija nije moguća (zbog tehnički inoperabilnih tumora ili lošeg općeg stanja pacijenta).

Kemoterapija se također nije pokazala učinkovitom u liječenju melanoma te se više ne koristi kao prva linija liječenja u uznapredovalom stadiju, no još uvijek ima primjenu u melanomima koji ne sadrže somatske mutacije na koje se može djelovati specifičnim inhibitorima. Najčešće korišteni kemoterapeutici u liječenju melanoma su dakarbazin ili temozolomid, a zatim cisplatina, karboplatina/paklitaksel [10], [11].

### 1.2.2. Imunoterapija

Imunoterapija je način liječenja oboljelih s uznapredovalim metastatskim melanomom kod kojeg primjenom monoklonalnih protutijela, limfocita T ili dendritičkih stanica dolazi do aktivacije odgovora imunološkog sustava oboljelog [12], [13].

Neke od takvih terapija koje su u primjeni ili su u fazi kliničkih studija su: imunoterapija interferonima (interferon  $\alpha$ -2b jedini je interferon odobren za terapiju melanoma), terapija interleukinom-2 (IL-2), imunoterapija primjenom anti-CTLA-4 protutijela (eng. *Cytotoxic T-lymphocyte-Associated Antigen 4*), imunoterapija primjenom anti-PD-1 protutijela (eng.

*Programmed Cell-Death Protein 1*), inhibicija regulatornih T limfocita (eng. *Regulatory T cells, Tregs*).

Ipilimumab, anti-CTLA-4 protutitijelo odobreno od strane Agencije za hranu i lijekove (eng. *Food and Drug Administration, FDA*) 2011. godine, inducira proizvodnju proupalnih citokina T-stanica i povećava infiltraciju T-stanica. Nivolumab i pembrolizumab, anti-PD-1 protutijela odobrena od strane FDA 2014. i 2015. godine, blokiraju interakciju između PD-1 i PD-L1/PD-L2 [14]. Kao i terapija interferonima, terapija IL-2 je još uvijek uključena u klinička ispitivanja, u kombinaciji s kemoterapijom, radioterapijom, drugim imunoterapijama i ciljanim terapijama.

Za terapiju metastatskog melanoma korištena je i kombinacija imunoterapije i kemoterapije. Najčešći pristup primjenjivao je kao kemoterapiju kombinaciju dakarbazina, cisplatine i vinblastina te IL-2 i interferon  $\alpha$ -2b kao imunoterapiju. U usporedbi s kemoterapijom kao monoterapijom, ovaj kombinirani pristup je pokazao značajno višu stopu odgovora i produljenje intervala bez bolesti. Međutim, nije pokazao poboljšanje ukupnog preživljenja i bio je povezan s teškom toksičnošću te rizikom od razvoja metastaza u mozgu [15].

### 1.2.3. Ciljana terapija

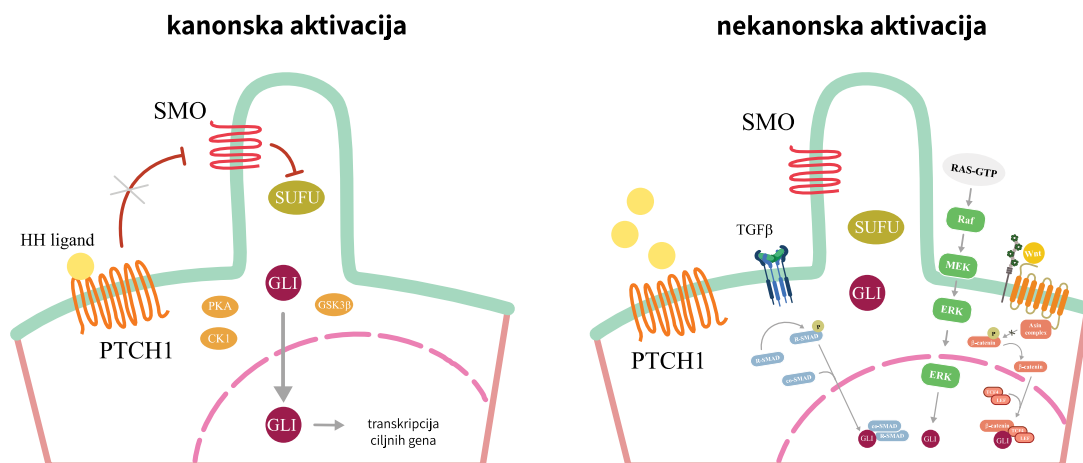
Razumijevanje signalnih puteva i molekularnih zbivanja u stanici omogućilo je razvoj takozvanih „pametnih“ lijekova vrlo specifičnog djelovanja. Tako se umjesto nespecifične kemoterapije koja djeluje štetno na sve stanice, fokus prebacio na terapiju čije je djelovanje usmjereno na signalne putove specifične za razvoj te bolesti. Najčešće dereguliran signalni put u melanomu je RAS/RAF/MEK1/2-ERK1/2 (signalni put MAPK). BRAF je serin/treonin kinaza koja pripada obitelji RAF. 2002. godine je u genu *BRAF* otkrivena točkasta mutacija koja uzrokuje supstituciju valina s glutaminskom kiselinom na kodonu 600 (V600E), a koja dovodi do konstitutivne aktivacije signalnog puta MAPK. Gotovo 50 % svih melanoma ima mutaciju u genu *BRAF*, dok 15-20 % ima mutaciju u genu *NRAS*. Stoga ne čudi što su prvi oblici ciljane terapije specifičnim inhibitorima bili usmjereni upravo na BRAF. Vemurafenib i dabrafenib odobreni su 2011. i 2013. godine za liječenje metastatskih melanoma s mutiranim BRAF. Inhibitori BRAF-a poboljšali su preživljenje pacijenata u usporedbi sa standardnom kemoterapijom, ali te dobrobiti nisu dugoročne jer većina pacijenata razvija otpornost na terapiju unutar relativno kratkog vremena [16].



### 1.3. Signalni put Hedgehog-GLI (HH-GLI)

Gen Hedgehog (HH) prvi je put identificiran u vinskoj mušici *Drosophila melanogaster* u analizama Christiane Nüsslein-Volhard i Erica Wieschausa, objavljenim 1980. godine [17]. Čovjek dijeli mnoge ključne komponente signalnog puta HH s vinskom mušicom, a do neke mjere je očuvan i mehanizam prijenosa signala. Signalni put Hedgehog-GLI (HH-GLI) jedan je od najvažnijih puteva prijenosa signala u embrionalnom razvoju, homeostazi i popravku tkiva [18]. U odraslom je organizmu uglavnom neaktivan ili slabo aktivan. Uključen je u održavanje somatskih matičnih stanica i pluripotentnih stanica važnih za popravak tkiva, kao što su matične stanice kože, neuralne, eritropoetske i matične stanice pluća, kao i neke epitelne stanice unutarnjih organa. U ostalim tkivima komponente signalnog puta HH-GLI prisutne su samo u primarnim cilijama - organelima koje se sastoje od mikrotubula i izbijaju sa površine stanice, primajući mehaničke, kemijske i toplinske signale [19]. Dokazi o ulozi signalnog puta HH-GLI u bolestima nisu izneseni sve do kasnih 1990-ih godina. Prva njegova implikacija u nekoj bolesti bila je u sindromu nevusa bazalnih stanica 1996. godine [20], [21].

Postoje dva oblika aktivacije signalnog puta, kanonski i nekanonski, a detaljnije su opisani u poglavljima 1.5. i 1.6 te shematski prikazani na Slici 2.



Slika 2. Dva oblika aktivacije signalnog puta HH-GLI: kanonski (lijevo) i nekanonski (desno). U kanonskoj aktivaciji sudjeluju komponente signalnog puta: receptor PTCH1, ligandi HH, koreceptor SMO te SUFU. Kod nekanonske aktivacije članovi drugih signalnih puteva poput RAS/MAPK, Wnt ili TGFβ djeluju na transkripcijske faktore GLI, neovisno o ostalim komponentama signalnog puta HH-GLI.

## 1.4. Komponente signalnog puta HH-GLI

Glavne komponente signalnog puta HH-GLI čine ligandi *Hedgehog* (HH), receptor *Patched* (PTCH1), koreceptor *Smoothed* (SMO), protein *Suppressor of Fused* (SUFU) te transkripcijski faktori GLI. Geni *PTCH* i *SMO* dobili su ime po izgledu krila mutantnih ličinki vinske mušice (*patched* hrv. zakrpan, *smoothed* hrv. zaglađen) u kojima su prvi put identificirani.

### 1.4.1. Ligandi *Hedgehog* (HH)

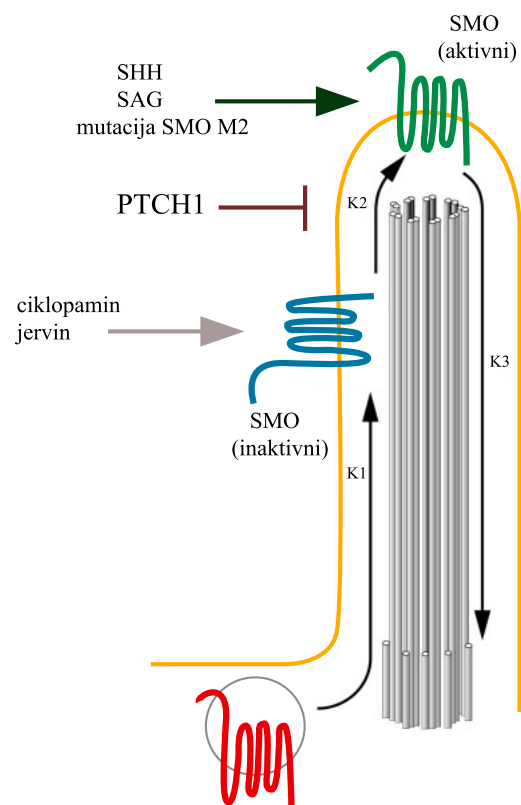
Kod sisavaca su danas poznata tri tkivno specifična homologna liganda - *Sonic Hedgehog* (SHH), *Indian Hedgehog* (IHH) i *Desert Hedgehog* (DHH) [22]. Svi ligandi HH se sintetiziraju kao prekursorski proteini veličine 45 kDa koji prolaze kroz autokatalitičko cijepanje te popratnu modifikaciju vezanja kolesterola na C-terminalnom kraju i palmitinske kiseline na N-terminalnom kraju, što rezultira izlučenim, dvostruko lipidiranim proteinom veličine 19 kDa [23], [24]. Ove lipidne modifikacije potrebne su za ispravno vezanje, raspodjelu i aktivnost liganada.

### 1.4.2. *PTCH1*

PTCH je primarni receptor proteina HH i predstavlja glavni negativni regulator signalnog puta. Humani PTCH1 se sastoji od 1 447 aminokiselina, a u svojoj strukturi sadrži dvije izvanstanične domene, transmembransku domenu s 12 spiralnih uzvojnica koja ima dvostruku pseudo-simetriju te unutarstaničnu domenu [25]. Kod sisavaca postoje dva homologa, PTCH1 i PTCH2 [26] pri čemu PTCH2 nije toliko uključen u razvoj bolesti zbog čega nije ni toliko istraživan kao PTCH1. Izvanstanična domena PTCH1 sadrži regiju osjetljivu na sterol (eng. *Sterol-Sensing Domain, SSD*), a koja stupa u interakciju s kolesterolskom modifikacijom liganada HH [27]. Jedno istraživanje je dokazalo da postoji kompleks koji se sastoji od SHH-N i dviju molekula PTCH1, asimetričnog rasporeda. Testovima *in vitro* su pokazali da su obje interakcije PTCH1-SHH-N potrebne za učinkovit prijenos signala [28].

### 1.4.3. SMO

SMO pripada skupini membranskih receptora spregnutih s G proteinom (eng. *G Protein-Coupled Receptors, GPCRs*). Protein SMO se smatra ko-receptorom signalnog puta, a svoju aktivnost mijenja ovisno o aktivnosti proteina PTCH. Lokalizacija SMO u primarnoj ciliji usko je povezana s aktivacijom signalnog puta. Naime, mutacije u SMO koje uzrokuju aktivaciju signalnog puta neovisnu o ligandu, također uzrokuju konstitutivnu lokalizaciju mutiranog proteina SMO unutar cilije. Mehanizmi prijenosa SMO do cilije nisu još uvijek potpuno poznati. Do sada se upravo SMO smatrao komponentom signalnog puta koja ima najviše potencijala za ciljanu terapiju. Ciklopamin, spoj biljnog podrijetla, prvi je inhibitor koji ciljano djeluje na SMO [29].



Slika 3. Lokalizacija i aktivacija SMO na primarnoj ciliji. Potpuna aktivacija SMO zahtijeva transport neaktivnog citoplazmatskog SMO (crveno) iz citoplazme u primarnu ciliju (korak K1). SMO unutar cilije može postojati u neaktivnom stanju (plavo) koji se izbacuje iz cilije kada se ne postigne daljnja aktivacija (korak K3). Taj neaktivni oblik stabiliziraju antagonisti ciklopamin i jervin. SMO se može aktivirati (zeleno, korak K2), što je potaknuto signalom proteina PTCH1 nakon vezanja liganda SHH ili se može stabilizirati agonistom SAG te aktivirajućim mutacijama poput SMOM2. Prilagođena slika iz [30].

#### 1.4.4. SUFU

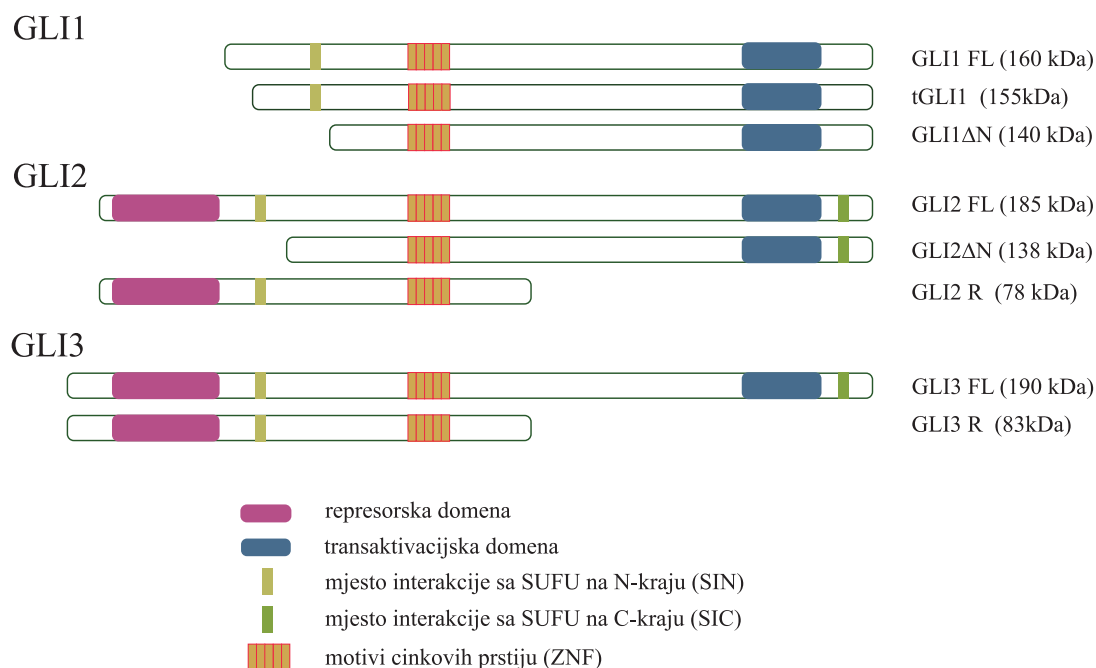
Citoplazmatski protein SUFU je, uz PTCH, drugi negativni regulator signalnog puta. Vežanjem SUFU na proteine GLI, onemogućena je njihova translokacija u jezgru. Formiranjem kompleksa SUFU-GLI aktiviraju se kinaze: PKA (eng. *Protein Kinase A*), CK1 (eng. *Casein Kinase 1*) te GSK3 $\beta$  (eng. *Glycogen Synthase Kinase 3 beta*) koje fosforiliraju proteine GLI. Fosforilirani proteini GLI su supstrat za E3 ubikvitinsku ligazu,  $\beta$ TrCP (eng. *Beta-transducin repeat containing E3 ubiquitin protein ligase*) koja na proteine GLI veže ubikvitin i tako ih obilježava za degradaciju u proteasomu. U slučaju proteina GLI1 razgradnja je potpuna, dok se proteini GLI2 i GLI3 cijepaju u skraćene forme. Skraćeni oblici proteina GLI2 i GLI3 djeluju kao transkripcijski represori [31], [32]. SUFU se smatra tumor supresorom, budući da gubitak njegove funkcije pojačava signalnu aktivnost puta HH-GLI i potiče proces tumorigeneze [33], [34]. Danas je poznato da mutacije u SUFU imaju značajan utjecaj na nastanak i razvoj bolesti [35]–[37].

#### 1.4.5. Transkripcijski faktori GLI

Kod sisavaca postoje tri proteina GLI - GLI1, GLI2 i GLI3. Ljudski gen *GLI1* prvi su identificirali Vogelstein i kolege kao protein koji se prekomjerno nakuplja u glioblastomu, stoga je i dobio ime GLI [38]. Proteini GLI su članovi obitelji proteina Gli-Kruppel kojima je zajedničko da u svojoj strukturi imaju evolucijski očuvane motive cinkovog prsta (eng. *Zinc Finger, ZNF*) te djeluju kao transkripcijski faktori vežući se za specifične sekvence DNA [39]. Proteini GLI1 i GLI3 prepoznaju evolucijski očuvanu sekvencu 5'-GACCACCCA-3' u promotorskim regijama ciljnih gena, dok GLI2 prepoznaje jako sličnu sekvencu 5'-GAACCACCCA-3'. Proteini GLI djeluju kao aktivatori ili represori, ovisno o građi terminalnih domena. N-terminalna domena sadrži represorsku aktivnost, dok je u C-terminalnoj regiji sadržana aktivacijska aktivnost (Slika 4.). Kod proteina GLI1 N-terminalna domena je jako skraćena čime je izgubio represorsku aktivnost i djeluje isključivo kao transkripcijski aktivator. GLI2 i GLI3 mogu djelovati i kao aktivatori i kao represori [39]–[41]. GLI2 i GLI3 pokazuju 95% sličnosti u sastavu aminokiselina, međutim, proteasomalna razgradnja GLI2 nije vrlo učinkovita te se produkt cijepanja koji se proizvodi vrlo brzo razgrađuje, dok je GLI3 R vrlo stabilan [42]. Svi proteini GLI posjeduju mjesto interakcije sa SUFU koje se nalazi na njihovom N-kraju (SIN), koje je odgovorno za citoplazmatsku retenciju

proteina GLI1. GLI2 i GLI3 sadrže dodatno mjesto za interakciju sa SUFU na svom C-kraju (nazvano SIC) [43].

Transkripcijski faktori GLI sudjeluju u regulaciji velikog broja staničnih procesa, uključujući staničnu proliferaciju, apoptozu, diferencijaciju i razvoj [44]. Međusobna interakcija i komunikacija između tri proteina GLI opisana je u literaturi pod nazivom GLI kod.

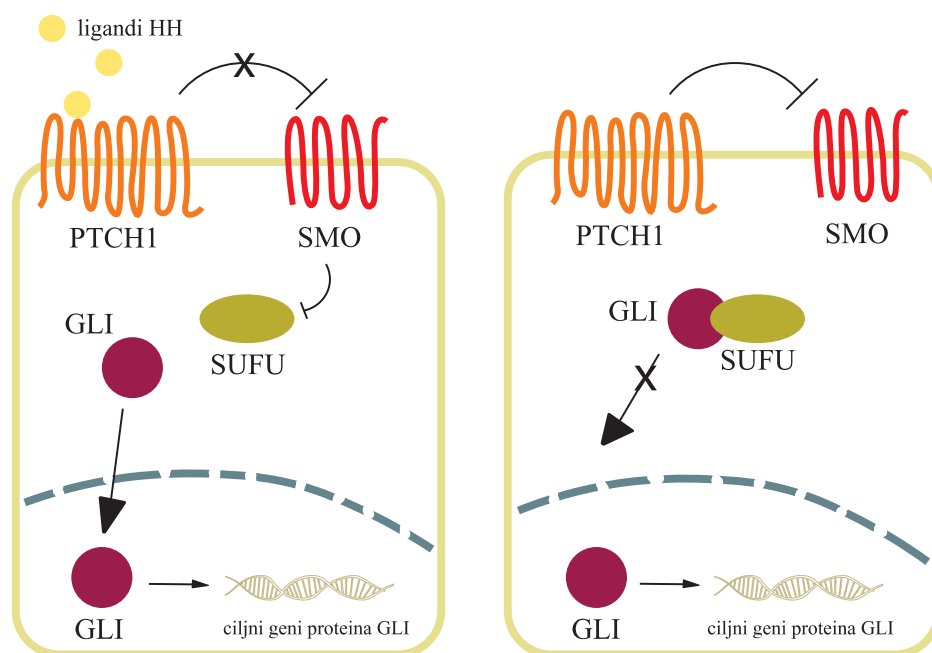


*Slika 4. Građa domena proteina GLI1, GLI2 i GLI3 te njihovih izoformi. GLI2 i GLI3 mogu djelovati i kao aktivatori i kao represori jer posjeduju i transaktivacijsku domenu, kao i represorsku domenu, dok GLI1 djeluje samo kao aktivator transkripcije i nema represorsku domenu. Na slici FL označava protein u punoj veličini, R represorski oblik proteina, t označava skraćeni protein (eng. Truncated), a ΔN deleciju N-terminalnog kraja. Prilagođena slika iz [45].*

Interakcije između ovih proteina uvelike su uvjetovane staničnim kontekstom, a represori i aktivatori mogu raditi zajedno kako bi stvorili spektar transkripcijskih odgovora [46], [47]. Karakterizirane su izoforme svakog od proteina GLI (GLI1FL, tGLI1, GLI1ΔN, GLI2FL, GLI2ΔN, GLI2 R, GLI3FL te GLI3 R), a neke od izoformi pokazuju dodatnu tkivnu specifičnost. To još više pridonosi različitim ulogama i staničnim odgovorima HH-GLI na prijenos signala te promiče jedinstvene nizvodne učinke ovisno o vrsti tkiva ili staničnom kontekstu [48], [49].

## 1.5. Kanonska aktivacija signalnog puta HH-GLI

Vežanjem jednog od liganada Hedgehog (HH) na receptor PTCH započinje kanonska aktivacija signalnog puta. U odsustvu liganada, PTCH se lokalizira u primarnoj ciliji inhibirajući koreceptor SMO i onemogućavajući daljnji prijenos signala. Proteini GLI su u tom slučaju vezani na protein SUFU koji sprječava njihovu translokaciju u jezgru, a istovremeno potiče razgradnju u proteasomu što koči ekspresiju ciljnih gena. Vežanjem liganada, prestaje inhibicija SMO od strane PTCH, a aktivirani SMO se translocira na membranu primarne cilije i blokira proteolitičku razgradnju proteina GLI, potičući njihovu disocijaciju od SUFU. SUFU se fosforilira i otpušta proteine GLI koji se premještaju se u jezgru te naposljetku dolazi do transkripcije ciljnih gena među kojima su i sam *PTCH1* te *GLI1*. Ekspresija *GLI2* u keratinocitima potiče aktivaciju niza gena uključenih u proces regulacije staničnog ciklusa kao što su *E2F*, cikline tipa D, ciklin A2, *CDK1*, ciklin B1, ciklin D2 [50], [51], [52]. Ostali ciljni geni puta HH-GLI uključuju *HHIP*, *CCND2* i *CCNE1*, *BCL2*, *ABCG2*, *FGF4*, *VEGFA*, *PAX6*, *PAX7*, *PAX9*, *FOXM1*, *JAG1* [53].



Slika 5. Kanonska aktivacija signalnog puta HH-GLI. Desni dio slike prikazuje signalni put HH-GLI koji je neaktivan zbog odsutnosti liganada. *PTCH1* inhibira koreceptor *SMO* i onemogućava daljnji prijenos signala. Proteini *GLI* su u tom slučaju vezani na protein *SUFU* koji sprječava njihovu translokaciju u jezgru, a istovremeno potiče razgradnju u proteasomu

što koči ekspresiju ciljnih gena. Lijevi dio slike prikazuje aktivaciju signalnog puta pomoću liganada SHH, čime prestaje inhibicija SMO od strane PTCH, a aktivirani SMO se blokira proteolitičku razgradnju proteina GLI, potičući njihovu disocijaciju od SUFU. SUFU otpušta proteine GLI koji se premještaju se u jezgru te naposljetku dolazi do transkripcije ciljnih gena.

## 1.6. Nekanonska aktivacija signalnog puta HH-GLI

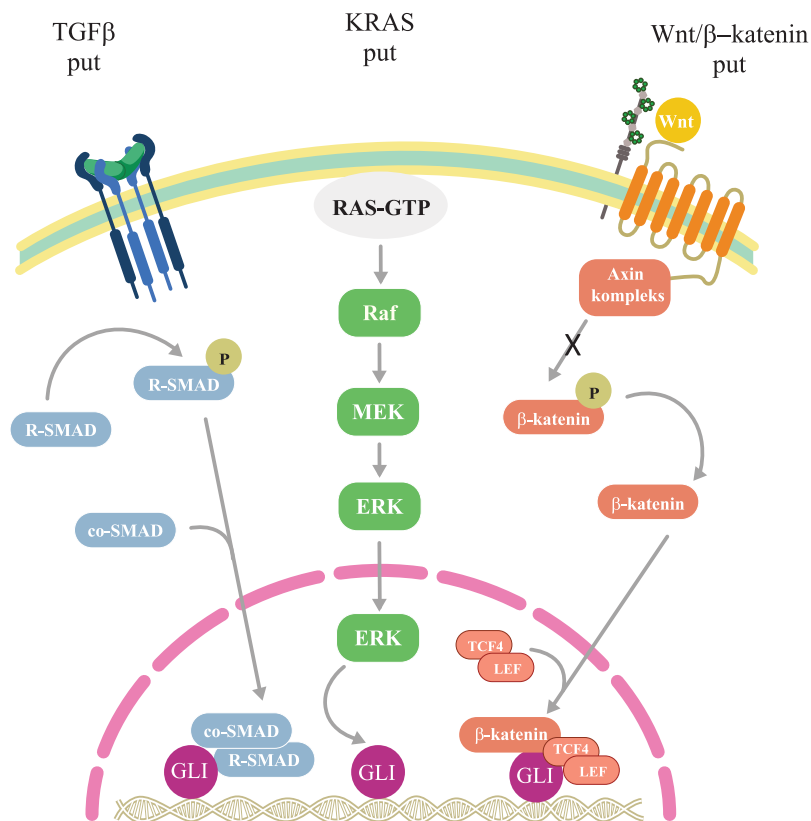
Osim kanonskog oblika aktivacije signalnog puta, postoji i nekanonski oblik aktivacije. Ovakav oblik aktivacije signalnog puta se prvi put u literaturi spominje 2009. godine kao prijenos signala koji uključuje komponente puta HH-GLI, ali koji je neovisan o transkripciji posredovanoj proteinima GLI, odnosno događa se uzvodno od SMO [54]. Na primjer, istraživanja su pokazala da SMO stimulira aktivaciju GTPaze RhoA i migraciju preko proteina Gi (heterotrimerni proteini G), neovisno o uključenosti proteina GLI [55].

Danas se nekanonskim najčešće nazivaju svi mehanizmi aktivacije transkripcijskih faktora GLI do kojih dolazi uslijed interakcije s drugim signalnim putevima, dakle neovisno o ligandima HH. Često u slučajevima bolesti poput tumora, istovremeno postoje i kanonska i nekanonska aktivacija signalnog puta HH-GLI, a u nekim tipovima tumora se može se pojaviti i više od jednog mehanizma nekanonske aktivacije [45]. U literaturi je već zabilježena interakcija signalnog puta HH-GLI s putevima PI3K/AKT, mTOR, TGF- $\beta$ , AMPK, PKC, Wnt/ $\beta$ -katenin te RAS/RAF/MAPK.

Poznato je da PI3K/AKT sprječava degradaciju GLI2 u proteasomu tako što ometa inhibitornu funkciju kinaze PKA, čime potiče njegovo premještanje u jezgru i transkripcijsku aktivnost [56]. Zatim je pokazano da kombinacija antagonista SMO s modulatorima signalnog puta PI3K/mTOR predstavlja potencijalnu strategiju za nadilaženje rezistencije proteina SMO na inhibitore u meduloblastomu [57]. U drugom istraživanju, nekoliko godina kasnije, dokazano je da putevi HH-GLI i PI3K koordiniraju svoje aktivnosti kako bi potaknuli rast tumora u slučaju glioblastoma s nedostatkom gena *PTEN*. Kombinacija inhibitora signalnih puteva PI3K i HH-GLI rezultira apoptozom tumorskih stanica i značajnim smanjenjem glioblastoma *in vitro* i *in vivo* [58]. Kod interakcije sa signalnim putem TGF- $\beta$ , vezanje liganda u izvanstaničnoj domeni inducira katalitičku aktivnost receptora na unutarstaničnoj domeni. U ovoj signalizaciji sudjeluje obitelj proteina SMAD, koja se može klasificirati u tri skupine: (1) proteini SMAD

povezani s receptorom (R-SMAD: SMAD1, SMAD2, SMAD3, SMAD5 i SMAD9), (2) kooperativni SMAD (ko-SMAD) i (3) inhibitorni SMAD (I-SMAD: SMAD6 i SMAD7). Proteini R-SMAD mogu biti fosforilirani i vezani s proteinima ko-SMAD te se zatim premještaju u jezgru. Unutar jezgre, proteini SMAD mogu regrutirati i vezati se s GLI1 kako bi aktivirali transkripciju ciljnih gena HH-GLI. Nekanonska aktivacija GLI pomoću TGF- $\beta$  ima ulogu u procesu epitelno-mezenhimalne tranzicije (EMT) te u invaziji različitih vrsta tumora. Kod melanoma, visoke razine ekspresije GLI2 povezane su s metastatskim fenotipom i pojavom mezenhimalnih karakteristika i *in vitro* i *in vivo*. [59]. Protein kinaza aktivirana adenozin monofosfatom (AMPK) je serin/treonin kinaza koja nadzire energetski status stanice kao odgovor na opskrbu hranjivim tvarima i uvjete okoliša, a kontrolira različite energetske procese (rast, metabolizam, sintezu proteina). Aktivirani AMPK fosforilira protein GLI1 na položaju Ser408, smanjujući transkripcijsku aktivnost i stabilnost proteina [60]. Nadalje, pokazano je da AMPK povećava citoplazmatsku lokalizaciju GLI1 i potiče njegovu interakciju s E3 ubikvitin ligazom  $\beta$ -TrCP, što dovodi do razgradnje proteina GLI1 u proteasomu [61]. U slučaju interakcije sa signalnim putem Wnt/ $\beta$ -katenin, izvanstanično vezanje liganda Wnt potiče izdvajanje kompleksa Axin na intracelularnu stranu receptora. To inhibira fosforilaciju  $\beta$ -katenina, dopuštajući njegovu nuklearnu translokaciju i regrutiranje dodatnih transkripcijskih faktora, uključujući GLI1, za aktivaciju transkripcije (Slika 6.) [44].





Slika 6. Neki od primjera nekanonske aktivacije signalnog puta HH-GLI. Interakcija signalnog puta HH-GLI sa putevima TGFβ, RAS/RAF/MAPK te Wnt/β-katenin. Prilagođena slika iz [44].

### 1.6.1. Interakcija signalnih puteva HH-GLI i MAPK

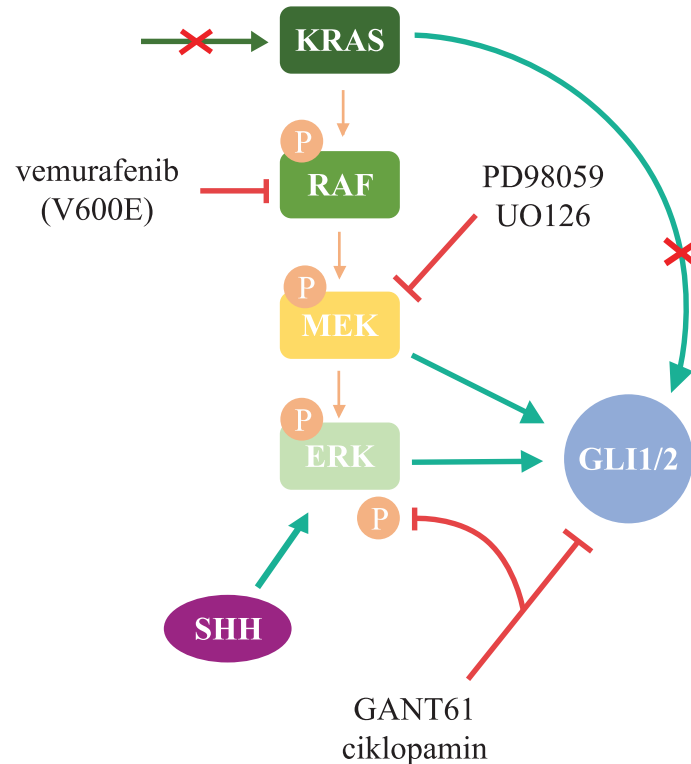
Kao što je već spomenuto, signalni put MAPK je najčešće dereguliran signalni put u melanomu, stoga je interakcija signalnih puteva HH-GLI i MAPK posebno zanimljiva. Protein kinaze aktivirane mitogenom (MAPK) su serin/treonin kinaze koje sudjeluju u staničnim procesima poput preživljenja, proliferacije, migracije i apoptoze. Uključuju konvencionalne kinaze (ERK1 i ERK2, p38, c-Jun N-terminalne kinaze, JNK i ERK5) i atipične kinaze (ERK4, ERK8, ERK3 i ERK7, kinaze nalik Nemo proteinu, NLK). MAP kinaze mogu biti aktivirane pomoću čimbenika rasta, citokina, izvanstaničnog matriksa, osmotskog stresa, reaktivnih kisikovih vrsta te lipopolisaharida [62]. Aktivacija signalnog puta MAPK može dovesti do aktivacije tri različite grane puta ERK1/2, JNK1/2/3 te p38 [63].

Dosadašnja istraživanja pokazuju da kaskada MEK1/2-ERK1/2 djeluje uzvodno od HH i regulira aktivnost transkripcijskih faktora GLI. Kod interakcije sa signalnim putem RAS/RAF/MAPK, konstitutivno aktivan KRAS će fosforilirati RAF, koji zatim fosforilira

MEK, a koji fosforilira ERK. Aktivirani ERK tada će se translocirati u jezgru i aktivirati razne faktore transkripcije, uključujući GLI1/2. U staničnim linijama melanoma je pokazano da ekspresija NRAS<sup>Q61K</sup> i HRAS<sup>V12G</sup> pojačava funkciju GLI1, tako što sprječava zadržavanje GLI1 u citoplazmi [64]. Također, koekspresija aktiviranog MEK1 i GLI1/GLI2 izaziva sinergističko povećanje transkripcijske aktivnosti proteina GLI, a koja je blokirana MEK1/2 inhibitorom PD98059. Iako je pokazano da GLI1 nije izravno fosforiliran pomoću ERK1/2, kasnije je računalnim predikcijama identificirano konsenzusno mjesto za ERK2, unutar N-kraja proteina GLI [65], [66]. Drugo istraživanje je pokazalo da se ponovno stečena osjetljivost stanica na vemurafenib, a koja je rezultat supresije GLI1/GLI2, ne događa u slučajevima koji uključuju kontinuiranu ili izmjeničnu monoterapiju vemurafenibom. Međutim, primijećeno je da bi naizmjenično liječenje vemurafenibom i inhibitorom GANT61 moglo suzbiti ekspresiju proteina GLI, odgađajući ili smanjujući otpornost na vemurafenib. Istraživači su zaključili da smanjenje ekspresije proteina GLI zaista izaziva apoptozu stanica te da možda upravo to pridonosi povećanoj osjetljivosti stanica melanoma na vemurafenib [67].

Osim u melanomima, interakcija signalnih puteva MAPK i HH-GLI je zabilježena i u drugim vrstama tumora. Aktivacija kaskade KRAS-MEK1/2-ERK1/2 povećava transkripcijsku aktivnost proteina GLI i inducira ekspresiju njihovih ciljnih gena u stanicama raka želuca, dok uklanjanje N-terminalne domene GLI1 smanjuje odgovor na stimulaciju MEK1. S druge strane, SHH stimulira proliferaciju stanica želučane sluznice štakora putem aktivacije ERK1/2 [68]. Osim toga, tretiranje inhibitorima GANT61 i ciklopaminom smanjuje proliferaciju, migraciju i fosforilaciju ERK1/2 u stanicama raka želuca MKN45 [69]. U staničnim linijama raka dojke ciklopamin inhibira proliferaciju stanica, no taj je učinak djelomično smanjen djelovanjem inhibitora MEK/MEK2, UO126, što ukazuje da inhibicija puta HH zahtijeva aktivni prijenos signala MEK1/2-ERK1/2 kako bi se smanjila proliferacija [70]. Dodatno, SHH aktivira ERK1/2, neovisno o SMO u normalnim stanicama dojke MCF10A [71]. Pokazano je da u stanicama raka gušterače, HPDE-c7, ekspresija KRAS<sup>G12D</sup> povećava ekspresiju GLI1 i njegovu transkripcijsku aktivnost. U skladu s tim, supresija KRAS-a pomoću siRNA smanjuje ekspresiju i aktivnost GLI1 u staničnim linijama duktalnog adenokarcinoma gušterače koje imaju aktivirajuće mutacije KRAS<sup>G12V</sup> KRAS<sup>G12D</sup>. Aktivacija HH posredovana proteinom KRAS je potisnuta inhibicijom MEK1/2 pomoću UO126 [72]. Istraživanja su također pokazala da bi HH-GLI mogao djelovati i uzvodno od ERK1/2, jer u epitelnim stanicama kanala gušterače ektopična ekspresija SHH pojačava proliferaciju i aktivira PI3K i ERK1/2 [73].

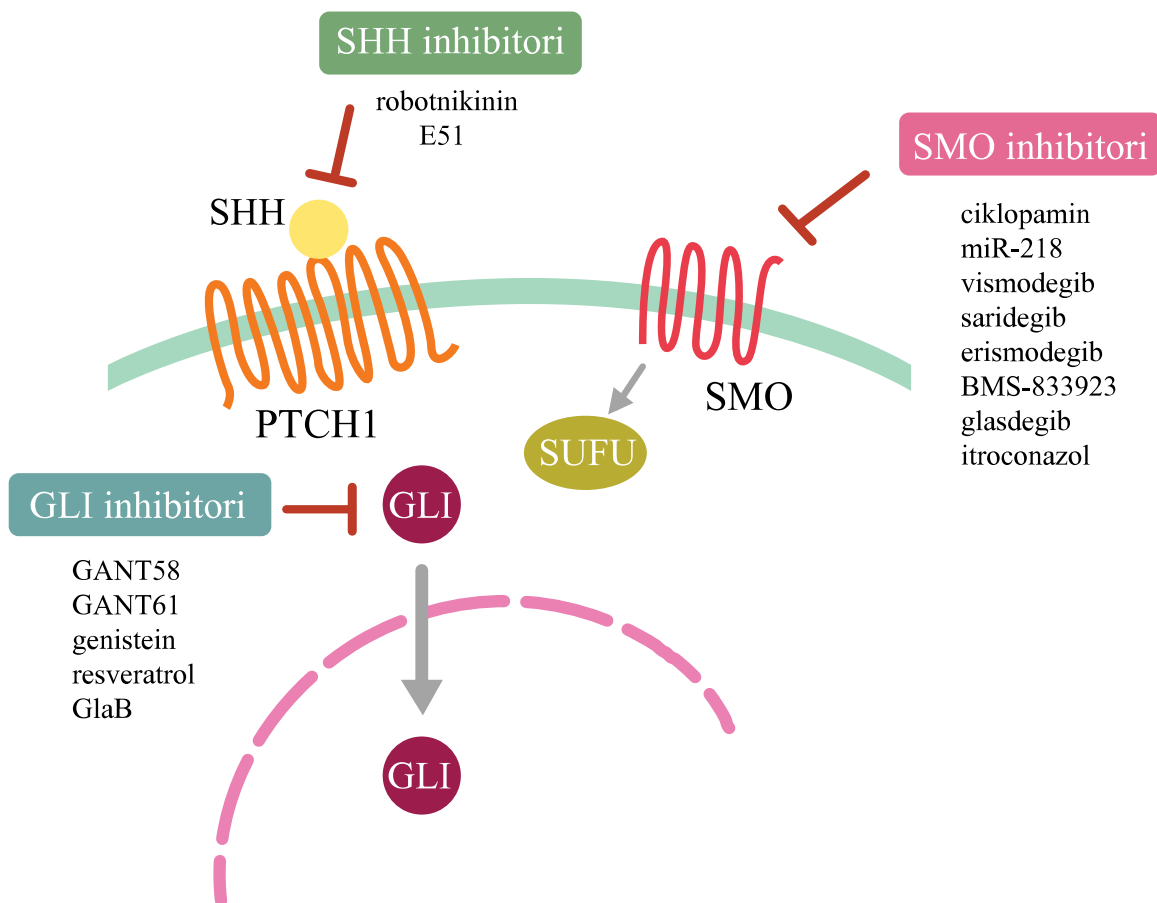
Osim u ovdje opisanim tumorima, interakcija između signalnih puteva HH-GLI i MAPK zabilježena je i u glioblastomu [74], hepatocelularnom karcinomu [75], leukemiji [76], karcinomu debelog crijeva [77] i drugima.



Slika 7. Interakcija signalnih puteva HH-GLI i MAPK te njihovi inhibitori. Najpoznatiji inhibitor signalnog puta MAPK, vemurafenib, djeluje selektivno na mutirani oblik kinaze RAF, BRAF V600E i tako sprječava daljnu kaskadu signala. Inhibitori PD98059 te UO126 djeluju na MEK, što blokira povećanje ekspresije proteina GLI1/2. Supresija KRAS-a smanjuje ekspresiju i aktivnost GLI1. GANT61 i ciklopamin su inhibitori proteina GLI, a tretiranje tim inhibitorima smanjuje i fosforilaciju ERK1/2. SHH djeluje na aktivaciju ERK1/2.

## 1.7. Inhibicija signalnog puta HH-GLI

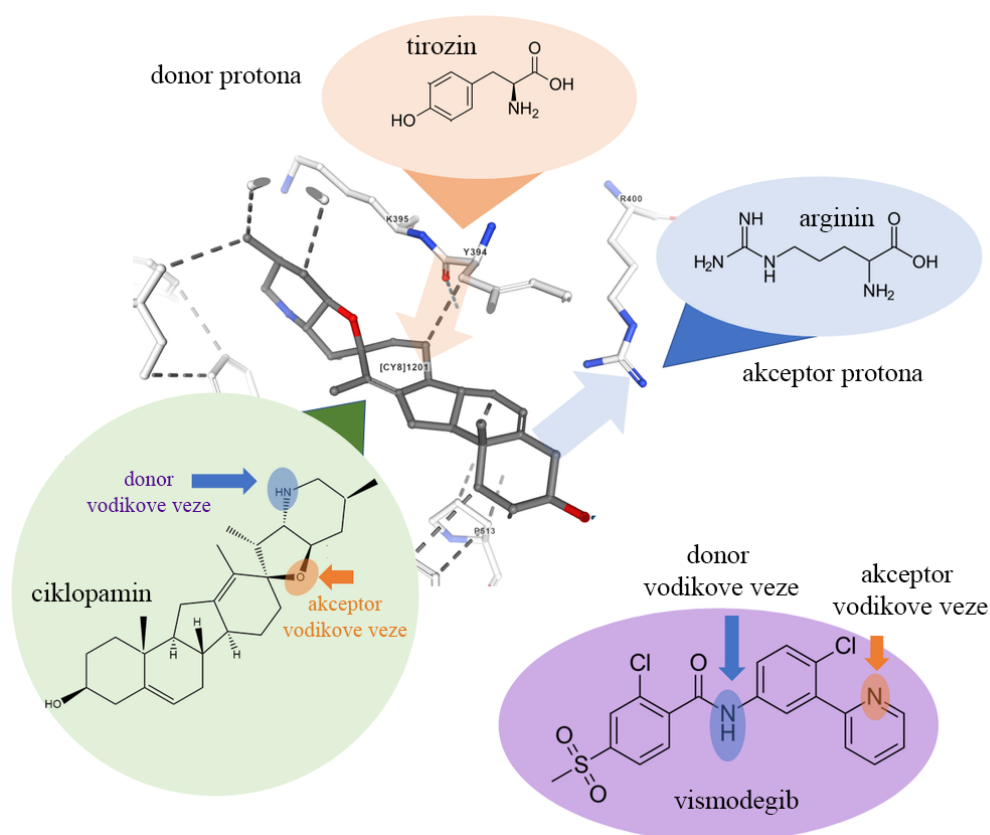
Za inhibiciju signalnog puta HH-GLI postoje tri glavna pristupa: inhibicija SMO, inhibicija proteina GLI te blokiranje interakcije između receptora PTCH1 i liganada HH (Slika 8.).



Slika 8. Različiti pristupi inhibiciji signalnog puta HH-GLI. Slika je prilagođena iz [78]. Najpoznatiji inhibitori transmembranskog proteina SMO su ciklopamin, miR-218, vismodegib, saridegib, erismodegib, BMS-833923, glasdegib te itroconazol. Uzvodno od SMO, signalni put HH-GLI je moguće inhibirati prekidanjem interakcije između receptora PTCH1 i njegovih liganada SHH, korištenjem anti-HH monoklonskog protutijela 5E1 ili spoja robotnikinina. Izravnim djelovanjem na transkripcijske faktore GLI je moguće pomoću spojeva GANT58, GANT61, GlaB, genistein te resveratrol.

### 1.7.1. Inhibitori proteina SMO

Prvi inhibitor signalnog puta bio je prirodni spoj ciklopamin koji djeluje na protein SMO. Nakon ciklopamina razvijeno je nekoliko jačih i specifičnijih inhibitora SMO. To su vismodegib, koji je 2012. godine odobren od FDA za liječenje karcinoma bazalnih stanica (bazocelularnog karcinoma), BMS-833923, saridegib (IPI-926), sonidegib/erismodegib (NVP-LDE-225), PF-04449913, LY2940680, LEQ506 i TAK-441 [79]. Strukture i način djelovanja ciklopamina i vismodegiba prikazane su Slikom 9.



Slika 9. Sličnosti i razlike između inhibitora ciklopamina i vismodegiba. Središnja struktura na slici je rekonstrukcija ciklopamina kristaliziranog u receptoru SMO iz baze PDB. Postoje dvije vodikove veze koje stabiliziraju ovu interakciju: jedna u kojoj tirozinski ostatak djeluje kao donor protona te druga u kojoj arginin djeluje kao akceptor protona. Glavna razlika između vismodegiba i ciklopamina je ta što je piridinski dušik u vismodegibu učinkovitiji akceptor protona od kisika u ciklopaminu. Zbog toga je vodikova veza jača i lijek ima veći afinitet za receptor. Preuzeto i prilagođeno iz [80].

Zabilježeno je korištenje inhibitora NVP-LDE-225 u stanicama melanoma. Ovdje je inhibicija SMO bila popraćena značajnom inhibicijom rasta stanica *in vitro* i *in vivo* te izazivanjem apoptoze u staničnim linijama i s mutiranim proteinom BRAF<sup>V600E</sup> i divljeg tipa BRAF [81].

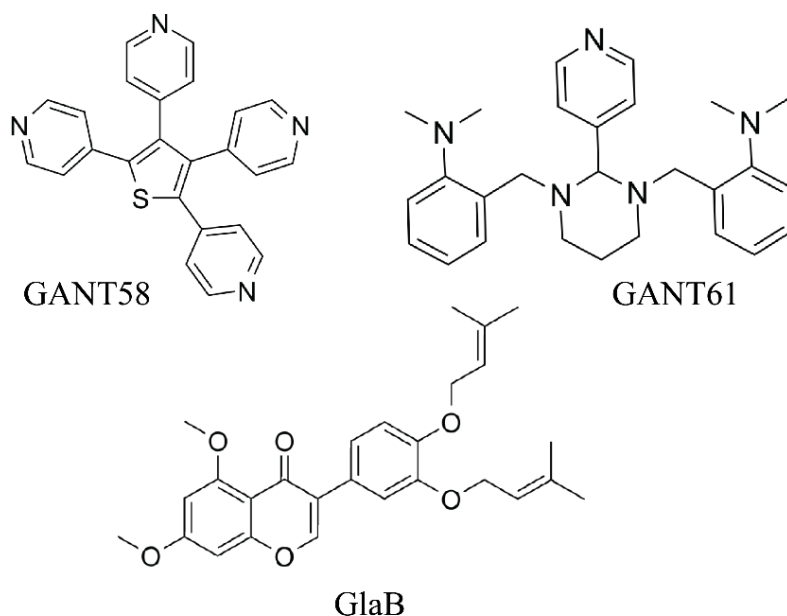
SMO inhibitori su se pokazali učinkoviti u slučajevima bazocelularnog karcinoma i meduloblastoma kod kojih postoje mutacije u SMO ili PTCH1. Unatoč obećavajućim rezultatima, uspostavilo se da inhibitori proteina SMO nisu jednako učinkoviti kod tumora koji ne nose spomenute mutacije. Slaba klinička učinkovitost inhibitora SMO objašnjava se kao moguća posljedica interakcije između puta HH-GLI i drugih signalnih puteva. Problem koji se pojavljuje je stjecanje rezistencije na inhibitore SMO. Rezistencije se mogu razviti kao posljedice novonastalih mutacija u SMO (D473H), uočenih tijekom liječenja vismodegibom; kao posljedice amplifikacija ciljnih gena nizvodno od HH, kao što su *GLI2* i *ciklin D1*, uočenih kod liječenja vismodegibom i sonidegibom; zatim uslijed pojačane regulacije drugog signalnog puta, poput PI3K/AKT, uočene tijekom liječenja sonidegibom; te zbog povećane ekspresije transportera ABC poput P-glikoproteina, što dovodi do povećanog efluksa lijeka, opaženog tijekom liječenja saridegibom [57], [82], [83].

### 1.7.2. Inhibitori proteina GLI

2007. godine pronađena su dva spoja (NSC136476 i NSC75503) koja su bila sposobna smanjiti transkripciju posredovanu GLI1 u HEK293 stanicama koje prolazno ekspimiraju GLI1. Ti spojevi su nazvani GANT61 i GANT58 (eng. *Gli-ANTagonist*) [84]. Spojevi GANT61 i GANT58 blokiraju aktivaciju i/ili transkripcijsku aktivnost proteina GLI1 i GLI2. Autori su provjerili specifičnost ovih spojeva tako što su istražili njihov utjecaj i na nekoliko drugih puteva prijenosa signala: aktivaciju TNF/NF- $\kappa$ B puta, transaktivaciju gena glukokortikoidnog receptora i kaskadu signala RAS–RAF–MAPK. GANT61 i GANT58 nisu imali utjecaja ni na jedan od ovih puteva do koncentracije od 10  $\mu$ M. Unatoč visokoj specifičnosti i selektivnosti, GANT61 je kemijski nestabilan u fiziološkim uvjetima te se brzo hidrolizira u biološki inaktivnu aldehidnu formu (GANT61-A) i bioaktivni derivat (GANT61-D) [85].

Spoj arsenov trioksid (ATO) se veže izravno na protein GLI1 i tako inhibira njegovu aktivnost [86], a odobren je od FDA kao terapija druge linije za liječenje akutne promijelocitne leukemije. Zbog visoke toksičnosti, klinička primjena arsenovog trioksida ograničena je na nehematološka maligna oboljenja.

Spoj glabrescione B (GlaB) prvi put je okarakteriziran kao specifični inhibitor proteina GLI1 2015. godine [87]. On interferira s vezanjem proteina GLI1 na DNA tako što se veže na domenu cinkovih prstiju u GLI1. Strukture inhibitora GANT58, GANT61 i GlaB prikazane su Slikom 10.



Slika 10. Strukture inhibitora proteina GLI: GANT58, GANT61 i GlaB.

### 1.7.3. Blokiranje interakcija između receptora PTCH1 i liganada HH

Put HH-GLI se može blokirati i uzvodno od SMO, prekidanjem interakcije između receptora PTCH1 i njegovih liganada HH, korištenjem anti-HH monoklonskog protutijela 5E1 [88] ili makrocikličkog spoja robotnikinina [89], od kojih oba pokazuju antitumorska svojstva. 5E1 je generiran tehnologijom mišjeg hibridoma korištenjem N-terminalne domene SHH iz štakora kao antigena. Epitop 5E1 na ligandu SHH se uvelike preklapa s veznim mjestom HHIP (eng. *Hedgehog interacting protein*), prirodnog antagonističkog receptora liganada HH, za koji su autori pokazali da se natječe s PTCH1 za vezanje SHH [90].

## 1.8. Uloga signalnog puta HH-GLI u karcinogenezi

Već je iz prethodnog poglavlja vidljivo da dolazi do aktivacije signalnog puta HH-GLI u mnogim vrstama raka. Znatno povećana ekspresija GLI1 i GLI2 zabilježena je u bazocelularnom karcinomu [50], [91]. To je najzastupljeniji oblik tumora kože u ljudi te predstavlja oko 80% nemelanomskih tumora. Kritična uloga prijenosa signala putem HH-GLI u razvoju ovog karcinoma dokazana je na nekoliko mišjih modela i analizama genetskih mutacija. Inaktivirajuće mutacije u PTCH1 se pojavljuju u oko 70% – 80% bazocelularnih karcinoma i uglavnom proizvode skraćeni protein [92].

Povećanja ekspresija PTCH1 i GLI1 je zabilježena i u nodularnim meduloblastomima [93]. Kasnija studija na uzorcima primarnih meduloblastima je predložila koncept da proteini GLI reguliraju apoptozu i ekspresiju anti-apoptotskog proteina BCL2 u meduloblastomu [94].

Neovisno o interakciji sa signalnim putem MAPK, uloga puta HH-GLI je zabilježena u karcinomu gušterače [95]. Aktivnost reportera HH u stanicama iz ksenografta raka gušterače je potisnuta djelovanjem protutijela 5E1, dok ju je dodavanje liganda SHH povećavalo. Uz to, tretman s protutijelom 5E1 značajno je smanjio staničnu masu. Ovi efekti su primijećeni isključivo u stanicama tumora koje su imale endogenu ekspresiju PTCH1.

Također, neovisno o drugim signalnim putevima, opisana je uloga HH-GLI u karcinomu prostate [96]. Istraživači su pokazali da u uznapredovalim karcinomima prostate može postojati nekoliko različitih mehanizama pomoću kojih dolazi do aktivacije puta HH-GLI, uključujući gubitak ekspresije SUFU, prekomjernu ekspresiju SHH ili druge promjene. Pokazali su da je aktivacija puta HH-GLI povezana sa sintezom DNA i invazivnošću stanica, dok inhibicija puta uzrokuje apoptozu stanica karcinoma prostate.

U karcinomu debelog crijeva je pokazano da je aktivnost puta HH-GLI potrebna i za rani i za uznapredovali stadij *in vitro* i *in vivo*. Dodatno, rezultati dobiveni iz uzoraka pacijenata s metastazama sugeriraju da metastatski karcinom debelog crijeva pokazuje povećanu ovisnost o funkciji HH-GLI [97].

U slučajevima karcinoma pluća je pokazano da SHH utječe na razmjenu signala između mezenhimalnih stanica i tumorskih stanica. Točnije, u slučaju karcinoma pluća nemalih stanica, stanice karcinoma putem SHH povećavaju preživljavanje i proliferaciju plućnih



fibroblasta. Fibroblasti, zauzvrat, kada se uzgajaju zajedno sa stanicama karcinoma pluća, poboljšavaju proliferaciju i održivost stanica raka [98]. U drugom istraživanju, ovog puta raka pluća skvamoznih stanica, aktivacija HH-GLI signalizacije bila je značajno povezana s preživljenjem stanica. Utišavanje proteina GLI2 je značajno smanjilo proliferaciju i induciralo apoptozu stanica. Sukladno tome, SMO inhibitor GDC-0449 je rezultirao ograničenom djelotvornošću, dok je GLI inhibitor GANT61 bio vrlo učinkovit [99].

Put HH-GLI je uključen je u otpornost na sve glavne tretmane raka pluća: kemoterapiju, radioterapiju te ciljanu terapiju inhibitorima EGFR-a. Iako postoje dokazi za kanonsku aktivaciju puta HH-GLI, nije isključena ni mogućnost nekanonske aktivacije. Istraživači su već tada sugerirali da bi buduća klinička ispitivanja raka pluća trebala uzeti u obzir i mogućnost nekanonske aktivacije i stoga ne koristiti samo inhibitore SMO ili protutijela za SHH, već i inhibitore proteina GLI u raku pluća [100].

Postoje brojni dokazi o važnosti signalnog puta HH-GLI u karcinomu jajnika. Jedno istraživanje je pokazalo da je pojačana regulacija nekoliko komponenti puta HH zajednička značajka primarnih tumora jajnika i staničnih linija te da ciklopamin inhibira proliferaciju i klonski rast stanica tumora jajnika *in vitro*, a zaustavlja rast tumora jajnika *in vivo* [101]. Drugo istraživanje potvrđuje da je signalni put HH-GLI aktivan u tumorima jajnika, ali i da su GLI1 i SUFU povezani s tipom tumora i stadijem FIGO. Ta aktivacija se događa nizvodno od membranskih komponenti, što ukazuje na nekanonsku aktivaciju puta. Također su pokazali da aktivnost puta HH-GLI postoji i u staničnoj liniji razvijenoj iz primarnog jajnika [102].

Prvi dokaz o povezanosti povišene razine ekspresije proteina SMO sa značajno smanjenim preživljenjem u pacijenata s metastatskim melanomom se pojavio 2013. godine. Uočen je i zaštitni učinak povišenih razina GLI3 koji naglašava ulogu aktivacije puta HH-GLI u ovoj bolesti. Dodatno, u istom istraživanju je pokazano da klinički relevantan inhibitor NVP-LDE-225 zaustavlja rast melanoma *in vitro* i *in vivo* [103]. Istraživan je odnos između blokiranog prijenosa signala HH-GLI i ekspresije proteina MITF koji ima bitnu ulogu u svojstvu tumorskih stanica da mijenjaju fenotip s neinvazivnim i invazivnim potencijalom. Pokazano je da utišavanje funkcije GLI1 smanjuje sposobnost invazije i migracije stanica melanoma, neovisno o regulaciji ekspresije MITF [104].

## 2. Ciljevi istraživanja

Hipoteza ovog istraživanja je da transkripcijski faktori GLI1, GLI2 i GLI3 imaju jedinstvene i preklapajuće funkcije u stanicama melanoma. Identifikacija novih ciljnih gena proteina GLI može dovesti do karakterizacije do sada neopisanih nekanonskih interakcija s drugim signalnim putevima. Djelovanjem na proteine GLI i na nizvodnu aktivnost signalnog puta može se razviti potencijalni novi pristup u liječenju melanoma ciljanom terapijom.

Cilj istraživanja ovog doktorskog rada je identifikacija novih, dosad nepoznatih, ciljnih gena proteina GLI u stanicama melanoma.

Specifični ciljevi ovog rada su:

1. Identifikacija gena koji su pod transkripcijskom kontrolom proteina GLI1, GLI2 i GLI3 u staničnim linijama melanoma, koristeći metodu sekvenciranja RNA, a zatim provođenjem bioinformatičkih analiza te pretraživanjem javno dostupnih baza podataka.
2. Validacija manjeg broja gena kandidata na većem setu staničnih linija melanoma metodom kvantitativne lančane reakcije polimerazom, čime će se omogućiti dodatno sužavanje liste gena kandidata za daljnju analizu *in vitro*.
3. Razvoj i karakterizacija novih *in vitro* modela za validaciju odabranih identificiranih gena, u ovom slučaju sferoidnih 3D kultura staničnih linija melanoma, metodom viseće kapljice.
4. Validacija značajno diferencijalno eksprimiranih gena na razvijenim modelima sferoidnih kultura i dodatnim dostupnim staničnim modelima kako bi se pronašli najznačajniji, dosad neotkriveni ciljni geni proteina GLI.

### 3. Materijali i metode

### 3.1. Metode rada sa staničnim kulturama

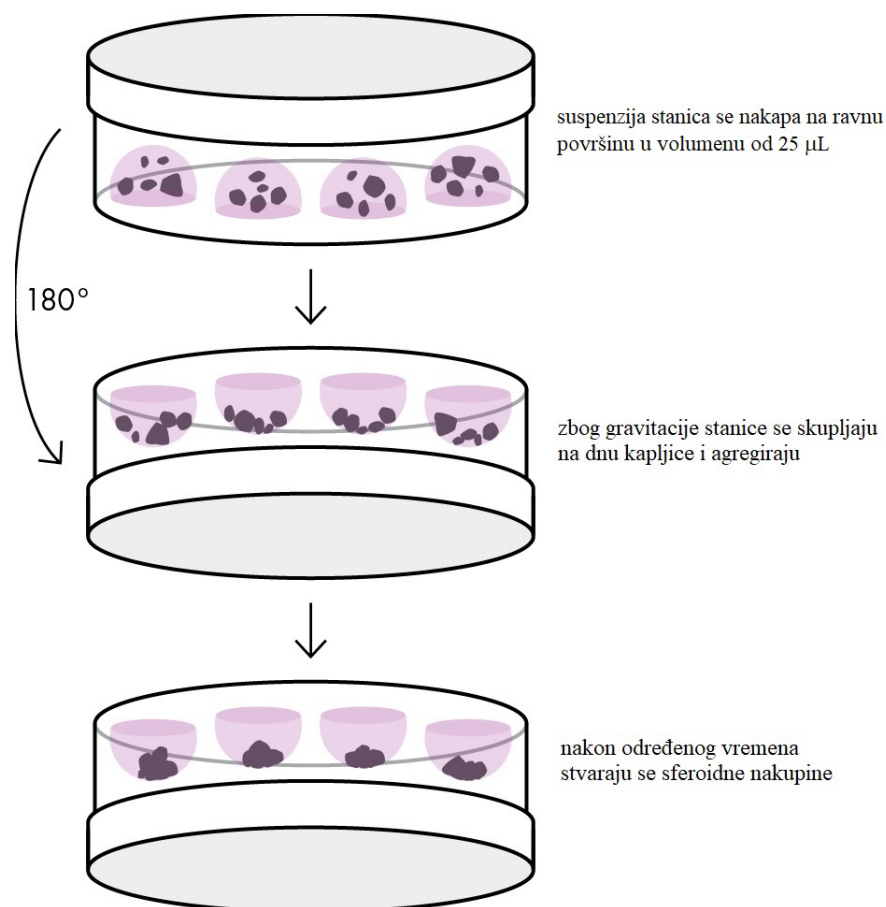
#### 3.1.1. Uzgoj i održavanje staničnih linija melanoma

Kao modeli u ovoj doktorskoj disertaciji korištene su stanične linije melanoma čovjeka. Većina eksperimenata je napravljena na tri stanične linije, CHL-1, A375 i MEL224, no za validaciju RNA sekvenciranja korišteno je još dodatnih 8 staničnih linija melanoma. Stanične linije CHL-1, A375, MEL224, SKMEL24, A375M, MEL501, MEL505 i MEWO ljubazno su ustupile dr. sc. Andreja Ambriović Ristov i dr. sc. Neda Slade. Stanične linije HS940.T (ATCC CRL-7691; pristupni broj CVCL\_1038) i SKMEL2 (ATCC HTB-68; pristupni broj CVCL\_0069) kupljene su od ATCC (Manassas, VA, SAD). Za neke eksperimente je korištena i stanična linija humanih imortaliziranih keratinocita, HaCaT. Sve stanične linije održavane su u preporučenim medijima: *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM, Merck KGaA, Darmstadt, Njemačka), *Roswell Park Memorial Institute 1640* (RPMI 1640, Merck KGaA, Darmstadt, Njemačka) ili *Eagle's Minimum Essential Medium* (EMEM, Merck KGaA, Darmstadt, Njemačka), dopunjen sa 10% fetalnog goveđeg seruma (FBS, Merck KGaA, Darmstadt, Njemačka), 1 mM natrijevog piruvata, 1% streptomicina/penicilina i 4 mM L-glutamina (Gibco Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD). Stanice su zamrzavane u mediju za zamrzavanje kojeg čine 50% serum, 40% odgovarajući medij te 10% DMSO. Kratkoročno su pohranjene na -80°C ili dugoročno krioprezervirane u tekućem dušiku. Prilikom odmrzavanja stanica dodano je 5 mL odgovarajućeg medija sobne temperature te su stanice centrifugirane na 300 x g 5 minuta. Supernatant koji sadrži DMSO je uklonjen i stanice su resuspendirane u 10 mL svježeg medija. Stanice su potom prebačene u plastične Petrijeve posudice za uzgoj adherentnih stanica, promjera 10 cm (Sarstedt, Nümbrecht, Njemačka).

#### 3.1.2. Izrada sferoida metodom viseće kapljice

Za validaciju ciljnih gena proteina GLI, uspostavljene su sferoidne kulture metodom viseće kapljice za tri stanične linije melanoma, CHL-1, A375 i MEL224. U svrhu optimizacije broja stanica potrebnog za formiranje sfera kod staničnih linija melanoma, nasadeno je 1 000, 2 000, 5 000 i 10 000 stanica po kapljici. Kada se uzme u obzir dužina uzgoja sfera, prinos stanica i izgled formirane sfere, za optimalan broj odabrano je 2 000 stanica po kapljici. Kapljice su nasadene u volumenu od 25 µL na ravnu površinu plastične Petrijeve posudice za uzgoj stanica

(Slika 11.) koja se zatim preokrene. Na dno Petrijeve posudice je dodano 5 mL pufera PBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,2) kako bi se spriječilo isušivanje sferoidnih kapljica tijekom vremena. Stanice su puštene da formiraju sfere u trajanju od najduže sedam dana. Tijekom sedam dana su sakupljane u svrhu izolacije RNA, izolacije proteina, mjerenja vijabilnosti na protočnom citometru te samog praćenja i fotografiranja oblika te veličine formirane sfere pod svjetlosnim mikroskopom *BOECO Germany Microscope, BIB-100*.



*Slika 11. Shematski prikaz formiranja sfera pomoću metode viseće kapljice. Preuzeto i prilagođeno iz [105].*

### 3.1.3. *Transfekcija staničnih linija*

U svrhu sekvenciranja RNA stanične linije CHL-1, A375 i MEL224 transfecirane su ekspresijskim vektorima za proteine GLI1, GLI2 i GLI3. Za validaciju rezultata dobivenih sekvenciranjem, stanične linije SKMEL24, A375M, MEL501, MEL505, MEWO, SKMEL2, HS940.T te HaCaT također su transfecirane s istim ekspresijskim vektorima. Ekspresijski vektor pcDNA4NLSMT-GLI1 je ljubazno ustupio prof. Fritz Aberger (Fakultet prirodnih znanosti, Austrija), dok je vektore p4TO6MT-GLI2 te pcDNA4/TO/GLI3richtig ljubazno ustupila prof. Milena Stevanović (Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Srbija). Za transfekciju je korišten komercijalni komplet *Xfect RNA Transfection Reagent* (Clontech, Mountain View, CA, SAD) te su praćene upute proizvođača. Stanične linije su 24 sata prije transfekcije nasadene u pločice formata 6 bunarića tako da je u svakom bunariću 200 000 stanica. Sljedeći dan je pomiješano 5 µg plazmidne DNA u volumenu od 100 µl pufera XFECT te je dodano 1,5 µL polimera XFECT. Sadržaj je vorteksiran 10 sekundi i zatim inkubiran 10 minuta na sobnoj temperaturi. Cijeli volumen transfekcijskog sadržaja je nakapan kap po kap na stanice kojima je prethodno dodan 1 mL medija koji ne sadrži serum. Stanice su inkubirane 4 sata u inkubatoru na 37°C, u 5% CO<sub>2</sub>. 48 sati nakon transfekcije talozi stanica su sakupljeni u svrhu izolacije RNA.

### 3.1.4. *Utišavanje ekspresije gena pomoću siRNA metodom s kalcijevim fosfatom*

Utišavanje ekspresije gena GLI provedeno je metodom unosa molekula malih interferirajućih RNA (eng. *small interfering RNA, siRNA*) pomoću kalcijevog fosfata. Korištene su komercijalne smjese siRNA *ON-TARGET plus Human GLI siRNA- SMARTpool* 5 nM (Dharmacon, Colorado, SAD). Sekvence siRNA koje su se nalazile u komercijalnoj smjesi prikazane su u Tablici 1., a kao negativna kontrola je korištena siRNA *ON-TARGET plus Control NON-Targeting Pool* 5 nM (Dharmacon, D-001810-10-05). Ukratko, prethodni dan je 200 000 stanica po bunariću nasadeno u pločice formata 6 bunarića, a 30 minuta prije samog utišavanja stanicama je uklonjen kompletni medij te im je dodan medij DMEM koji ne sadrži antibiotike. Smjesa kalcijevog fosfata i siRNA je pripremljena tako da je pomiješano 50 µL pufera HBSP 2X (280 mM NaCl, 10mM KCl, 1.5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 50 mM HEPES, pH 7,05) sa 50 µL smjese vode i kalcijevog klorida (c = 250 mM) koja sadrži finalnu koncentraciju siRNA 50 nM. Dobivena smjesa od 100 µL je promiješana pipetom, inkubirana na sobnoj

temperaturi 1 minutu i zatim dodana na stanice. Stanice su inkubirane preko noću na 37°C u inkubatoru te su sljedeći dan isprane u otopini PBS dva puta. Nakon toga im je dodan odgovarajući kompletan medij. Stanice su u svrhu analize sakupljane nakon 24, 48 te 72 sata.

Tablica 1. Sekvence molekula malih interferirajućih RNA (siRNA) za utišavanje gena GLI.

ime i kataloški broj	sekvenca
L-003896-00-0005, ON-TARGET plus Human <b>GLI1</b> (2735) siRNA- SMARTpool	
J-003896-05, GLI1	GCAAAUAGGGCUUCACAUA
J-003896-06, GLI1	AGGCUCAGCUUGUGUGUAA
J-003896-07, GLI1	GGACGAGGGACCUUGCAUU
J-003896-08, GLI1	CAGCUAGAGUCCAGAGGUU
L-006468-00-0005, ON-TARGET plus Human <b>GLI2</b> (2736) siRNA- SMARTpool	
J-006468-06, GLI2:	CGUCAACCCUGUCGCAAUU
J-006468-07, GLI2:	AGGCUGAGGUGGUCAUCUA
J-006468-08, GLI2:	GCACACCGCUGCUCAAAGA
J-006468-09, GLI2:	UCAAGUCACUCAAGGAUUC
M-011043-01-0005, ON-TARGET plus Human <b>GLI3</b> (2737) siRNA- SMARTpool	
D-011043-01, GLI3	GCAUAUGACUUCGCCUUA
D-011043-01, GLI3	GCACGAAGGUUGCAACAAG
D-011043-01, GLI3	GCACUAAGCGUUACACAGA
D-011043-01, GLI3	GAAUUACUCUGGUCAGUUC

### 3.1.5. Izolacija RNA iz stanica

Za potrebe sekvenciranja, RNA je izolirana iz stanica komercijalnim kompletom *Absolutely RNA miRNA Kit* (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SAD), slijedeći upute proizvođača. Za izolaciju RNA u ostale svrhe korištena je otopina *NucleoZOL* (Macherey-Nagel, Düren, Njemačka). Talog stanica resuspendiran je u 500 µL NucleoZOL-a i dodano je 200 µL vode bez RNAza. Nakon inkubacije od 5 minuta na sobnoj temperaturi, uzorci su centrifugirani 15 minuta na 16 000 x g, a supernatant u kojem se nalazi RNA je zatim prebačen u čistu mikrotubu.

Dodano je 700  $\mu$ L izopropanola i inkubirano 5 minuta na sobnoj temperaturi. Uzorci su zatim centrifugirani 10 minuta na 8 000 x g. Talog RNA je ispran u 500  $\mu$ L 70 %-tnog etanola i centrifugiran 3 minute na 3 000 x g na sobnoj temperaturi. Postupak ispiranja u etanolu je ponovljen dva puta. Talog RNA je otopljen u 50  $\mu$ L pufera TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0) i spremljen na  $-80^{\circ}\text{C}$  za daljnju upotrebu. Koncentracija RNA je izmjerena na spektrofotometru *NanoPhotometer N60* (Implen, München, Njemačka). Uređaj mjeri apsorbanciju pri valnim duljinama od 230 nm, 260 nm te 280 nm.

### 3.1.6. *Izolacija DNA*

Za potrebe provjere uspješnosti uklanjanja gena iz genoma metodom PCR, genomska DNA je izolirana iz staničnih linija A375, A375 GLI2ko, MEL224 te MEL224 GLI2ko, metodom ekstrakcije fenolom i kloroformom. Za potrebe restrikcije i analize hibridizacije DNA po Southernu, DNA je izolirana iz istih uzoraka, koristeći istu metodu. Stanice su sakupljene iz Petrijeve posudice i centrifugirane kako bi im se uklonio medij. Talog stanica je ispran u puferu PBS i na talog je dodano 1 mL pufera za DNA ekstrakciju (10 mM Tris-HCl, 0,4 M NaCl, 2 mM EDTA, 1% SDS, pH 8,0), kao i 20  $\mu$ L otopine Proteinaze K. Reakcija je inkubirana preko noći na  $37^{\circ}\text{C}$ . Sljedeći dan je u reakciju dodano 1 mL fenola i tubice su dobro protresene, a zatim centrifugirane 10 minuta na 13 000 x g na temperaturi od  $15^{\circ}\text{C}$ . Gornja vodena faza u kojoj se nalazi DNA je prenesena u čiste tubice i dodano joj je 1 mL smjese kloroforma i izoamilnog alkohola u omjeru 24:1 te su tube dobro protresene. Reakcija je ponovno centrifugirana kao i u prethodnom koraku te je 600  $\mu$ L gornje faze preneseno u čiste tubice. Dodano je 1200  $\mu$ L ledeno hladnog 75%-tnog etanola. Za taloženje DNA smjesa je centrifugirana 30 minuta na  $15^{\circ}\text{C}$  na 13 000 x g. Etanol je uklonjen, a talog DNA je resuspendiran u 100  $\mu$ L pufera TE.

### 3.1.7. *Imunofluorescentno bojanje stanica*

Za vizualizaciju proteina u stanicama linija CHL-1, A375, MEL224 i HaCaT korišteno je fluorescentno bojanje stanica. U pločice formata 24 bunarića je nasađeno 40 000 stanica po bunariću od svake stanične linije. Sutradan je stanicama uklonjen medij i isprane su tri puta sa 500  $\mu$ L otopine PBS (136,8 mM NaCl, 2,68 mM KCl, 15,21 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  and  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0,9 mM  $\text{CaCl}_2$ , 0,49 mM  $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ , pH 7,2). Zatim su fiksirane 15 min u otopini 3,6%



paraformaldehida na sobnoj temperaturi. Nakon fiksacije, stanice su ponovno isprane tri puta otopinom PBS-a te inkubirane u metanolu u trajanju od 15 minuta na sobnoj temperaturi. Nespecifično vezanje protutijela spriječeno je inkubiranjem u otopini *Protein Block* (Dako-Agilent, CA, US) 30 minuta na sobnoj temperaturi. Dodano je 100  $\mu$ L po bunariću primarnih protutijela razrijeđenih 1:100 u 2 %-tnoj otopini BSA u puferu PBS. Popis svih korištenih primarnih protutijela prikazan je u Tablici 2. Primarna protutijela su inkubirana na 4°C preko noći, u vlažnoj komori. Sljedeći dan su stanice u bunarićima isprane tri puta sa otopinom PBS i zatim su dodana crvena fluorescentna sekundarna protutijela, *Rabbit-Alexa 594* (Cell Signaling Technology, 8889S) ili *Mouse-Alexa 594* (Cell Signaling Technology, 8890S), razrijeđena također 1:100 u 2 %-tnoj otopini BSA u puferu PBS. Stanice su inkubirane u otopinama sekundarnih protutijela u trajanju od 1 sat na sobnoj temperaturi, zaštićene folijom od svjetla. Nakon ispiranja otopinom PBS, na stanice je dodano po 100  $\mu$ L otopine DAPI (razrijeđene 1 : 50 000 u PBS) i inkubirano je 5 minuta u mraku. DAPI je zatim također ispran otopinom PBS i slijedila je vizualizacija stanica na mikroskopu *EVOS Flouid Imaging System* (Thermo Fisher Scientific, US).

Tablica 2. Popis primarnih protutijela korištenih za imunofluorescentno bojanje stanica (IFC) i western blot (WB) analizu.

protutijelo	proizvođač i kataloški broj	životinja	razrjeđenje za WB	razrjeđenje za IFC
GLI1	Novus Biologicals, NB600-600	zec	1:500	1:100
GLI2	Santa Cruz Biotechnology, sc-271786	miš	1:200	1:100
GLI3	GeneTex, GTX104362	zec	1:1 000	1:100
PTCH1	Abclonal	zec	-	1:100
EBI3	Santa Cruz Biotechnology, sc-166158	miš	1:100	1:100
KRT16	Santa Cruz Biotechnology, sc-53255	miš	1:100	1:100
S100A7	Novus Biologicals, 47C1068	miš	1:100	1:100
MRAS	OriGene, TA502864	miš	1:1 000	1:100
$\beta$ -aktin	Cell Signaling, 8H10D10	miš	1:5 000	-

### 3.1.8. Izolacija proteina iz stanica

Za izolaciju proteina adherentne stanice su sakupljene metodom struganja na ledu kako bi se očuvao integritet membranskih proteina. Proteini su izolirani iz taloga stanica pomoću pufera RIPA (25 mM Tris-HCl, 1 % Na-deoksiholat, 1 % Nonidet P-40, 150 mM NaCl, 0,1 % SDS) s dodatkom inhibitora proteaza *Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail Tablets* (Roche, Basel, Švicarska). Na taloge stanica dodano je 50  $\mu$ L do 100  $\mu$ L pufera, ovisno o veličini taloga. Uzorci su zatim sonicirani pomoću sonikatora *Labsonic M* (Sartorius, Göttingen, Njemačka) te sonde debljine 1 mm, u trajanju od 15 sekundi. Sonikacija je provedena na ledu i ponovljena dva puta. Nakon sonikacije uzorci su centrifugirani 30 minuta na 16 000 x g u centrifugi ohlađenoj na +4°C. Supernatanti s izdvojenim proteinima su prebačeni u čiste mikrotube i spremljeni na -80°C za daljnju upotrebu.

### 3.1.9. Određivanje koncentracije proteina metodom BCA

Koncentracija proteina određena je kolorimetrijskom metodom BCA, pomoću komercijalnog kompleta *Pierce BCA Protein Assay* (Thermo Fischer Scientific). Komplet čine dvije otopine, A i B, koje su pomiješane u omjeru 50 : 1 kako bi se dobila radna otopina. U svrhu izrade baždarnog pravca korištena je otopina albumina iz goveđeg seruma (BSA) ( $\gamma = 1$  mg/mL). Ona je nanesa na mikrotitarsku pločicu, na koju je prethodno dodano po 200  $\mu$ L komercijalne otopine BCA, tako da su finalne koncentracije albumina redom: 2000  $\mu$ g/mL, 1500  $\mu$ g/mL, 1000  $\mu$ g/mL, 750  $\mu$ g/mL, 500  $\mu$ g/mL, 250  $\mu$ g/mL, 125  $\mu$ g/mL, 25  $\mu$ g/mL te 0  $\mu$ g/mL. Uzorci proteina također su dodani u bunariće u koje je prethodno naneseo po 200  $\mu$ L BCA otopine. Dodano je po 25  $\mu$ L proteina razrijeđenih 10x u vodi, u duplikatima. Pločica je inkubirana 30 minuta na 37°C u inkubatoru. Apsorbancije uzoraka su očitane na valnoj duljini od 562 nm na spektrofotometru *Labsystems Multiskan MS* (Thermo Fischer Scientific).

### 3.1.10. Metoda western blot

Za određivanje relativne ekspresije proteina GLI1, GLI2, GLI3 korištena je metoda western blot. Sama metoda se sastoji od nekoliko koraka od kojih je prvi odjeljivanje proteina elektroforezom u poliakrilamidnom gelu. Za razdvajanje proteina velikih molekulskih masa korišteni su 7 %-tni SDS-PAGE gelovi, a za razdvajanje proteina malih molekulskih masa 12%-tni SDS-PAGE gelovi. Kao marker za određivanje veličine proteina korišten je *CozyHi*

*Prestained Protein Ladder* (Bio-Rad, CA, US). Uzorci su nanoseni u volumenima koji odgovaraju masi od 50 µg proteina i pomiješani s puferom LB (0,2 M Tris-HCl pH 6,8, 0,4 M DTT, 8 % SDS, 40 % glicerol, 0,001 % bromfenol plavo). Uzorci su zatim zagrijani 10 minuta na 95°C u svrhu denaturacije. Elektroforeza je provedena u sustavu Mini-Protean III (Bio-Rad), prvo 20 minuta na 90 V, a zatim 1 sat na 100 V. Nakon elektroforeze proteini su preneseni na nitroceluloznu membranu veličine pora 0,2 µm (Protran, GE Healthcare, Chicago, Illinois, SAD) u sistemu za prijenos Mini-Protean III (Bio-Rad). Prijenos proteina s gela na membranu, u slučaju malih proteina, proveden je na 200 mA u trajanju od 1 sat, dok je u slučaju velikih proteina prijenos proveden preko noći na 40 mA, uz hlađenje. Nakon prijenosa proteina, membrana je isprana u puferu TBS-T (10 mM Tris-HCl, pH 8; 40 mM NaCl; 0,05% Tween-20) i spriječeno je vezanje nespecifičnih proteina inkubacijom u 10 mL pufera za blokiranje (5% otopina mlijeka u puferu TBS-T) u trajanju od 1 sat. Nakon blokiranja, membrane su inkubirane u otopinama primarnih protutijela pripremljenih u 5 %-tnom mlijeku u puferu TBS-T, preko noći na 4°C. Korištena primarna protutijela i njihova razrjeđenja prikazana su u Tablici 2. Kao kontrola količine nanesenih uzoraka proteina korišten je β-aktin. Sljedeći dan su membrane isprane tri puta po 10 minuta u puferu TBS-T i zatim inkubirane u otopini sekundarnih protutijela, razrjeđenja 1: 6 000 za protutijelo HRP kozji protu-zečji IgG (BD Pharmingen, 554021) te 1: 8 000 za protutijelo HRP kozji protu-mišji IgG (BD Pharmingen, 554002), u 5% otopini mlijeka u puferu TBS-T, u trajanju od 1 sat na sobnoj temperaturi. Za detekciju signala korištena je kombinacija kemiluminiscentnih reagensa *SuperSignal West PICO* i *SuperSignal West FEMTO* (Thermo Fischer Scientific), u omjeru PICO:FEMTO 3:1. Membrane su uslikane na uređaju UVItec *Alliance Q9 Mini* (UVItec, Cambridge, Engleska, UK). Za kvantifikaciju razine relativne ekspresije proteina korištena je metoda denzitometrije, u programu *ImageJ* [106].

### 3.1.11. *Test MTT*

U svrhu izrade krivulje preživljenja za antibiotik puromicin za stanične linije CHL-1, A375 i MEL224 korišten je test MTT (spoj 3-(4,5-dimetiltiazol-2)-2,5-difeniltetrazoliumbromid). Krivulja preživljenja je napravljena kako bi se odredila letalna doza antibiotika, a u svrhu selekcije stanica koje su podvrgnute uređivanju genoma metodom CRISPR/Cas9. 2 000 stanica po bunariću je nasađeno u pločicu formata 96 bunarića, u četriplicatima. Sljedeći dan stanice su tretirane sa šest različitih doza puromimicina, koncentracija: 1 µg/mL, 1,5 µg/mL, 2 µg/mL,

5 µg/mL, 10 µg/mL i 20 µg/mL. Rezultati testa MTT su očitani nakon 72 sata. Ukratko, stanicama je dodana otopina MTT u mediju koji ne sadrži serum ( $\gamma = 1$  mg/mL). Pločica je inkubirana 4 sata u inkubatoru pri 37°C i 5 % CO<sub>2</sub>, folijom zaštićena od svjetla. Zatim je u bunariće dodano 160 µL otopine DMSO kako bi se zaustavila reakcija. Rezultati su očitani na spektrofotometru *Labsystem Multiskan MS* (Thermo Fisher Scientific) pri absorbanciji od 570 nm.

### 3.1.12. Protočna citometrija za mjerenje vijabilnosti i proliferacije stanica

Za mjerenje vijabilnosti stanica koje se nalaze unutar formiranih sfera, sfere su sakupljane tijekom sedam dana. Vijabilnost je izmjerena stolnim protočnim citometrom *Guava Muse Cell Analyzer*, koristeći komercijalni komplet *Muse Count & Viability Kit* (Luminex, SAD). Sakupljene sfere su centrifugirane nakon čega im je uklonjen medij i dodano 100 µL tripsina. Sfere su inkubirane u tripsinu 15 minuta kako bi se osiguralo dobro izdvajanje pojedinačnih stanica iz sfera. Tripsin je inaktiviran sa 100 µL odgovarajućeg medija. Na 360 µL komercijalnog reagensa dodano je 40 µL resuspendiranih stanica i dobro promiješano što čini faktor razrjeđenja 10. Svaki uzorak je izmjeren tri puta, a dobiveni su podaci o vijabilnosti, odnosno točnom broju živih stanica, mrtvih stanica i ukupnom broju stanica.

### 3.1.13. Statistička obrada podataka

Normalnost raspodjele podataka je utvrđena D'Agostino-Pearson testom. Za analizu kontinuiranih varijabli normalne raspodjele korišten je parametrijski test Studentov T-test (za usporedbu dva seta podataka). P vrijednosti manje od 0,05 smatrale su se statistički značajnima, a razine statističke značajnosti su na grafovima označene zvijezdicama \*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$ . Eksperimenti protočne citometrije rađeni su u biološkim duplikatima i tehničkim triplikatima. Podaci su obrađeni programom *MedCalc for Windows v.19.4.1* (MedCalc Software, Belgija). Bioinformatička obrada podataka sekvenciranja RNA opisana je u posebnoj poglavlju, 3.2.3.

## 3.2. Sekvenciranje RNA

Kao što je već spomenuto, za sekvenciranje RNA su korištene tri stanične linije melanoma CHL-1, A375 i MEL224, koje su transfecirane ekspresijskim vektorima za GLI1, GLI2 ili GLI3 u dva neovisna eksperimenta. Netransfecirane stanične linije su korištene kao kontrole. Prije sekvenciranja, koncentracije i čistoća RNA su izmjerene na instrumentu *NanoPhotometer N60* (Implen, München, Njemačka).

### 3.2.1. Elektroforeza RNA na agaroznom gelu

Uspješnost izolacije i čistoća RNA provjerena je i elektroforezom na agaroznom gelu ( $w(\text{agaroz}) = 1\%$ ). Kao marker masa je korišten *Gene Ruler 1 kb Plus DNA ladder* (Invitrogen Thermo Fisher, US) u volumenu od 5  $\mu\text{L}$ . Elektroforeza je provedena pri 80 V u trajanju od 1 sat. Za detekciju fragmenata RNA na gelu korišten je uređaj *Uvitec Image Alliance 4.7* instrument (UVItec, Cambridge, Engleska, UK).

### 3.2.2. Priprema biblioteka cDNA i sekvenciranje RNA

Biblioteke cDNA su generirane i sekvencirane u firmi *DNA Link* (Seoul, Južna Koreja). Integritet uzoraka RNA provjeren je na uređaju *Agilent 2100 Bioanalyzer* (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SAD). Instrument je dao podatke o koncentraciji RNA, omjerima podjedinica rRNA, RIN broj te elektroferograme uzoraka. Svi uzorci imali su broj  $\text{RIN} \geq 8,0$  i omjer podjedinica RNA 28S:18S  $\geq 1,4$ . cDNA biblioteke su pripremljene od 1  $\mu\text{g}$  RNA, uz pomoć komercijalnog kompleta *TruSeq mRNA Library Kit*. Sekvenciranje je provedeno na instrumentu *Novaseq 6000* (Illumina, San Diego, CA, SAD).

### 3.2.3. Bioinformatička obrada podataka sekvenciranja RNA

Rezultati sekvenciranja transkriptoma nazivaju se sirove sekvence. Prije daljnje analize bilo je potrebno provjeriti kvalitetu sirovih sekvenci i ukloniti potencijalne nevaljale sekvence. Nakon provjere kvalitete sekvenci, slijedilo je poravnavanje sekvenci na referentni ljudski genom i kvantifikacija ekspresije gena u uzorcima. U svrhu identifikacije gena čija je razina promijenjena u linijama s prekomjernom ekspresijom pojedinog proteina GLI u odnosu na parentalne stanične linije, napravljena je analiza diferencijalne ekspresije gena.

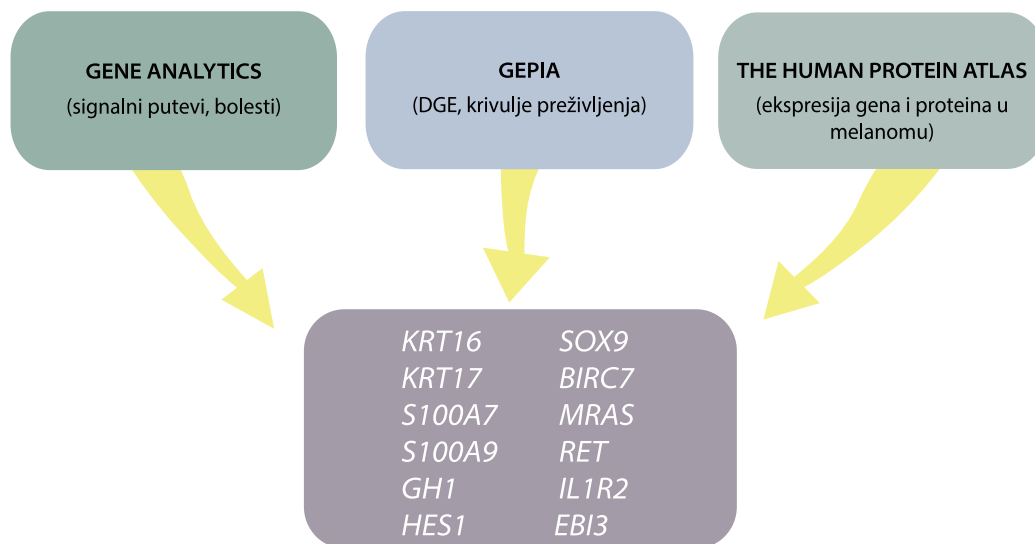
Softver FastQC (v.0.11.5) korišten je za procjenu kvalitete sekvenciranja neobrađenih fastq podataka. Sekvence adaptera su uklonjene iz očitavanja sekvenciranja pomoću alata Trim galore (v.0.3.7) te su očitavanja zatim mapirana na ljudski genom hg38 pomoću STAR alignera (v.2.4.0d) sa sljedećim parametrima: sjdbOverhang 99, outFilterMismatchNoverReadLmax 0.04, outFilterMultimap-Nmax 500, outSAMmultNmax 1. Mapirana čitanja su zatim kvantificirana pomoću RSEM (v.1.2.26) preko hg38 gencode transkriptoma (v.28). Daljnja analiza provedena je u programskom jeziku R (v.4.0.1). Analiza diferencijalne ekspresije gena napravljena je pomoću paketa edgeR (v.3.30.3) za svaku staničnu liniju s prekomjerno ekspimiranim proteinom GLI u odnosu na kontrolu. Analiza obogaćivanja skupa gena (eng. *Gene set Enrichment Analysis*) prema bazi podataka *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG) (<http://www.genome.ad.jp/kegg>) provedena je s funkcijom gseKEGG iz R paketa clusterProfiler (v.3.0.4).

#### 3.2.4. Selekcija ciljnih gena dobivenih sekvenciranjem RNA

Kako bi se identificirali potencijalni ciljni geni proteina GLI1, GLI2 i GLI3, dobivene liste gena su prvo filtrirane prema vrijednostima FDR (eng. *False Discovery Rate*), odnosno prilagođenim P-vrijednostima (eng. *P adjusted value*). FDR vrijednosti ukazuju na statističku značajnost pojedinog rezultata. Samo rezultati koji su imali FDR vrijednost manju od 0,01 su uzeti u obzir. Nakon filtriranja prema statističkoj značajnosti, liste gena su filtrirane prema logFC vrijednostima gdje se promjena logFC veća od 2 smatrala značajnom.

Nadalje, za identifikaciju uloge diferencijalno ekspimiranih gena u signalnim putovima i bolestima, korištena je platforma *GeneAnalytics* [107] iz baze podataka GeneCards (genecards.org). Prilikom odabira gena od interesa uzeto je u obzir nekoliko kategorija signalnih puteva i bolesti s visokom ocjenom relevantnosti: „Putevi kod raka“, „signalni put PI3K-AKT“, „signalni put MAPK“, „Wnt/Hedgehog/NOTCH“, „neoplazme“, „melanom“ i „abnormalnosti kože“. Daljnji probir napravljen je na temelju njihove ekspresije u melanomu iz GEPIA servera [108]. GEPIA sadrži podatke za oko 10 000 tumorskih i oko 8 500 normalnih/zdravih uzoraka iz TCGA i GTEx projekata, a TCGA baza sadrži podatke dobivene analizama uzoraka tumora od preko 11 000 pacijenata, tijekom perioda od 12 godina. Također sadrži podatke o somatskim mutacijama, kliničke podatke te razne „omics“ podatke. Tako se iz GEPIA servera mogu dobiti informacije o diferencijalnoj ekspresijskoj analizi tumora u odnosu na normalno tkivo, profiliranje prema tipu i stadiju tumora te analize o preživljenju

pacijenata. U GEPIA serveru je prilikom analize promatran skup podataka kožnog melanoma (eng. *Skin Cutaneous Melanoma, SKCM*) u odnosu na podatke za normalna tkiva iz baza TCGA i GTEx, gdje je veličina kohorte tumorskih tkiva izbosila  $N(T)=461$ , a normalnih tkiva  $N(N)=558$ . Za dodatni probir je korišten i program *The Human Protein Atlas* [109]. U ovom programu se u odjeljku „Tissue“ ili „Tissue Cell Type“ nalaze podaci o ekspresiji proteina iz 44 normalna tipa ljudskog tkiva dobivenih imunohistokemijskim bojanjem. Podaci o proteinima pokrivaju 15 318 gena (76%) za koje postoje dostupna protutijela. Podaci o ekspresiji mRNA dobiveni su iz javno dostupnih skupnih podataka sekvenciranja RNA. Konačno, upotrebom navedenih alata odabrano je 12 ciljnih gena proteina GLI za validaciju metodom qPCR. To su: *KRT16*, *KRT17*, *S100A7*, *S100A9*, *GH1*, *SOX9*, *MRAS*, *BIRC7*, *IL1R2*, *EBI3*, *HES1* i *RET*. Kratka shema postupka odabira ciljnih gena za daljnju validaciju prikazana je na Slici 12.



Slika 12. Shematski prikaz postupka odabira 12 ciljnih gena proteina GLI za daljnju validaciju metodom kvantitativne lančane reakcije polimerazom. Korištena je platforma GeneAnalytics, GEPIA server te program *The Human Protein Atlas*.

### 3.2.5. Reverzna transkripcija

Za reakciju reverzne transkripcije, odnosno sintezu cDNA, korišten je komercijalni komplet *High-Capacity cDNA synthesis* (Thermo Fisher Scientific). Za reakciju je korišteno 500 ng RNA otopljene u vodi bez RNAza. Reakcijsku smjesu prema uputama proizvođača su u ukupnom volumenu od 25  $\mu$ L činili pufer za reverznu transkripciju s  $MgCl_2$  (Applied Biosystems), smjesa dNTP ( $c = 4$  mM), smjesa nasumičnih početnica u volumenu 2,5  $\mu$ L te enzim reverzna transkriptaza *MultiScribe* (Applied Biosystems) 62,5 U. Program korišten za reakciju reverzne transkripcije prikazan je Tablicom 3.

Tablica 3. Tablični prikaz programa reakcije reverzne transkripcije.

	temperatura / °C	trajanje ciklusa / minuta
sparivanje početnica	25	10
sinteza DNA	37	120
deaktivacija enzima	85	5

### 3.2.6. Optimizacija početnica za kvantitativnu lančanu reakciju polimerazom (qPCR)

U sklopu ovog rada početnice za qPCR za 12 ciljnih gena dizajnirane su pomoću *on-line* alata *Primer3* (<https://primer3.ut.ee/>, veljača 2020.) i optimizirane za korištenje SYBR Green metodom. Alat *Primer3* na temelju željenog nukleotidnog slijeda i karakteristika početnica (duljina, temperatura taljenja, udio gvanina i citozina) predlaže najbolje parove početnica na temelju unesene sekvence od interesa. Nukleotidni sljedovi korištenih početnica nalaze se u Tablici 4. U svrhu pronalaska najbolje temperature na kojoj početnice umnažaju ciljne gene bilo je potrebno napraviti standardnu krivulju. Za tu potrebu napravljena su serijska razrjeđenja uzoraka cDNA u vodi: nerazrijeđeni uzorak, zatim redom razrjeđenja 1:5, 1:25, 1:125, 1:625 te 1:3125). Reakcijsku smjesu ukupnog volumena 10  $\mu$ L sačinjavale su 3,4  $\mu$ L ultračiste (miliQ) vode, 5  $\mu$ L *SsoAdvanced SYBR Green Supermix* (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, SAD), uzvodna početnica ( $c = 0,03$  mM) te nizvodna početnica ( $c = 0,03$  mM). Temperatura vezanja i elongacije, ovisno o paru početnica, mijenjana je dok nije postignuta optimalna vrijednost parametara koji opisuju uspješnost početnica, a testirani raspon temperatura je bio od 60°C do 65°C. Uspješnost početnica zatim je analizirana u programu *Bio-Rad CFX Manager* (Bio-Rad) pri čemu je promatran nagib pravca iz kojeg se računa uspješnost same



reakcije, vrijednost  $R^2$  te krivulja mekšanja. Dodatno, produkti reakcije qPCR-a provjereni su elektroforezom na agaroznom gelu kako bi se provjerila ispravnost veličine produkta i specifičnost početnica te sekvencirani na uređaju *ABI PRISM 310 Genetic Analyzer* (Applied Biosystems). Za 12 ciljnih gena proteina GLI početnice su optimizirane za korištenje na temperaturi 60°C, dok su početnice za gene *GLI1*, *GLI2*, *GLI3* i *PTCH1* korištene na temperaturi od 61°C. Početnice za gen *RPLP0* mogu biti korištene na obje temperature.

Tablica 4. Popis uzvodnih i nizvodnih početnica koje su korištene u qPCR reakcijama.

ime gena	sekvenca
<i>KRT16</i>	F: 5'- CTGAGACCTGGTTCCTGAGC - 3'
	R: 5'- GTTCTCCAGGGATGCTTTCA - 3'
<i>KRT17</i>	F: 5'- CGGAGACAGAGAACCGCTAC - 3'
	R: 5'- TTCTTCTTGTACTGAGTCAGGTG - 3'
<i>S100A9</i>	F: 5'- CAGCTGGAACGCAACATAGA - 3'
	R: 5'- TCAGCTGCTTGTCTGCATTT - 3'
<i>S100A7</i>	F: 5'- TTCCCAACTCCTTAGTGC - 3'
	R: 5'- CCCAGCAAGGACAGAACTC - 3'
<i>GHI</i>	F: 5'- CCTAGAGGAAGGCATCCAAA - 3'
	R: 5'- GCAGCCCGTAGTTCTTGAGTAG - 3'
<i>SOX9</i>	F: 5'- AGTACCCGCACTTGACAAAC - 3'
	R: 5'- CGTCTTCACCGACTTCCTC - 3'
<i>MRAS</i>	F: 5'- CCTCATCGTCTACTCCGTCA - 3'
	R: 5'- CATTGAGAGGTGGGTCCTTG - 3'
<i>BIRC7</i>	F: 5'- CGTCTGGCCTCCTTCTATGA - 3'
	R: 5'-CAGCAGCTGGGAGTGAGTCT-3'
<i>IL1R2</i>	F: 5'- TGGCACCTACGTCTGCACTA - 3'
	R: 5'- TACCCAGAGGTTGACAAGG - 3'
<i>EBI3</i>	F: 5'- CAGCTTCGTGCCTTTCATAA - 3'
	R: 5'- TCCCCGTAGTCTGTGAGGTC - 3'
<i>HES1</i>	F: 5'- TGAGCCAGCTGAAAACACTG - 3'
	R: 5'- CATTGATCTGGGTCATGCAG - 3'
<i>RET</i>	F: 5'- CCACGCAAAGTGATGTATGG - 3'
	R: 5'- CCGCAAGGTCCAAGTAGTCT - 3'
<i>PTCH1</i>	F: 5'- TCCTCGTGTGCGCTGTCTTCCTC - 3'
	R: 5'- CGTCAGAAAGGCCAAAGCAACGTGA - 3'
<i>GLI1</i>	F: 5'- CTTGTGGTCCCCATGACTCT - 3'
	R: 5'- GTTGGGGCTGGACATATCAC - 3'
<i>GLI2</i>	F: 5'- GCCATCAAGACCGAGAGCTC - 3'
	R: 5'- CGGCCCATGAGCAGGAATCC - 3'
<i>GLI3</i>	F: 5'- CACTACCTCAAAGCGGGAAG - 3'
	R: 5'- TGTTGGACTGTGTGCCATTT - 3'
<i>RPLP0</i>	F: 5'- GGCACCATTGAAATCCTGAGTGATGTG - 3'
	R: 5'- TTGCGGACACCCTCCAGGAAGC - 3'

### 3.2.7. Validacija ciljnih gena metodom qPCR

U svrhu analize relativne genske ekspresije odabranih ciljnih gena proteina GLI korištena je metoda qPCR. Reakcijsku smjesu ukupnog volumena 10  $\mu$ L sačinjavale su 3,4  $\mu$ L ultračiste (miliQ) vode, 5  $\mu$ L *SsoAdvanced SYBR Green Supermix* (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, SAD), uzvodna početnica ( $c = 0,03$  mM) te nizvodna početnica ( $c = 0,03$  mM). U reakcijsku smjesu je dodano 1  $\mu$ L uzorka nerazrijeđene cDNA. Normalizacija je napravljena prema referentnom genu, *RPLP0*. Reakcija qPCR je provedena na instrumentu Bio-Rad CFX96 (Bio-Rad). Uvjeti reakcije prikazani su Tablicom 5.

Tablica 5. Tablični prikaz programa po kojem je provedena metoda qPCR.

	temperatura / °C	trajanje ciklusa / sekunda	broj ciklusa
početna denaturacija	95	30	1
denaturacija	95	10	40
sparivanje početnica	60	30	
krivulja mekšanja	60-95 prirast za 0,5	2	1

Relativna promjena genske ekspresije svih reakcija qPCR-a izračunata je metodom  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ , koristeći jednostavnu formulu gdje  $C_t$  označava ciklus reakcije (eng. *Cycle threshold*). Vrijednost  $C_t$  referentnog gena se oduzima od vrijednosti  $C_t$  gena od interesa, a zatim se vrijednost  $\Delta C_t$  kontrolnog uzorka oduzima od vrijednosti  $\Delta C_t$  promatranog uzorka (transfeciranog ekspresijskim vektorom, tretiranog spojem ili slično).

$$\Delta C_t = C_t (\text{gen od interesa}) - C_t (\text{referentni gen})$$

$$\Delta\Delta C_t = \Delta C_t (\text{promatrani uzorak}) - \Delta C_t (\text{kontrolni uzorak})$$

### 3.3. Primjena tehnologije CRISPR/Cas9 za uklanjanje gena iz genoma stanica

#### 3.3.1. Odabir ciljnih sekvenci

Sekvence sgRNA za navođenje proteina Cas9 na ciljna mjesta u genomu humanih stanica melanoma odabrane su na temelju referentnog ljudskog genoma hg38, pomoću mrežno dostupnih alata (<http://crispor.tefor.net/>, rujan 2019.), a koristeći pritom sekvence *GLI1* NG\_029564 za *GLI1*, *GLI2* NG\_009030.2 za *GLI2* i *GLI3* NG\_008434.2 za *GLI3*. Za svaki od gena *GLI* (*GLI1*, *GLI2* i *GLI3*) odabrane su po četiri sgRNA sekvence. Ovaj alat identificira moguća mjesta vezanja sgRNA na temelju sekvenci PAM te ih rangira prema nizu parametara, uključujući jedinstvenost, specifičnost, postojanje potencijalnih polimorfizama u mjestu vezanja te potencijalno vezanje na druge lokuse u genomu. Uzimajući u obzir dobivene rezultate, odabrane su po četiri sgRNA sekvence za svaki gen *GLI*. Po dvije sgRNA imale su vezna mjesta ispred ATG sekvence svakoga od gena, a po dvije sgRNA vezna mjesta unutar ili u neposrednoj blizini UTR regije na 3'- kraju gena. Ciljne sekvence odabrane su tako da ispunjavaju kriterij duljine od 20 nt, nizvodno (na 3'- kraju) se nalazi PAM-sekvencija NGG te su jedinstvene u genomu. Popis sekvenci svih sgRNA za navođenje pX330-U6-Chimeric\_BB-CBh-hSpCas9 (u daljnjem tekstu skraćeno nazvan pX330-Cas9) nalazi se u Tablici 6.

#### 3.3.2. Priprema oligonukleotidnih sljedova sgRNA

Za svaku sgRNA dizajniran je par oligonukleotida koji međusobnim sparivanjem stvaraju 5' ljepljive krajeve kompatibilne krajevima vektora pX330-Cas9 pocijepanog enzimom *BbsI*. Oligonukleotidi sgRNA naručeni su kao jednolančani sintetizirani sljedovi koje je prije reakcije kloniranja bilo potrebno vezati u dvolančane fragmente. Po 10  $\mu$ L uzvodnog slijeda i 10  $\mu$ L nizvodnog slijeda oligonukleotida ( $c = 10$  mM) zagrijano je na 95°C 1 minutu i zatim ostavljeno da se ohladi 5 minuta na sobnoj temperaturi. Spareni oligonukleotidi su zatim fosforilirani pomoću 1  $\mu$ L 5U T4 PNK enzima (NEB) volumena te 2,4  $\mu$ L pufera 1x *T4 DNA Ligase Buffer* (Takara). Reakcija fosforilacije je provedena na 37°C u trajanju od 30 minuta i potom je enzimska aktivnost inaktivirana inkubacijom na 65°C, 20 minuta.

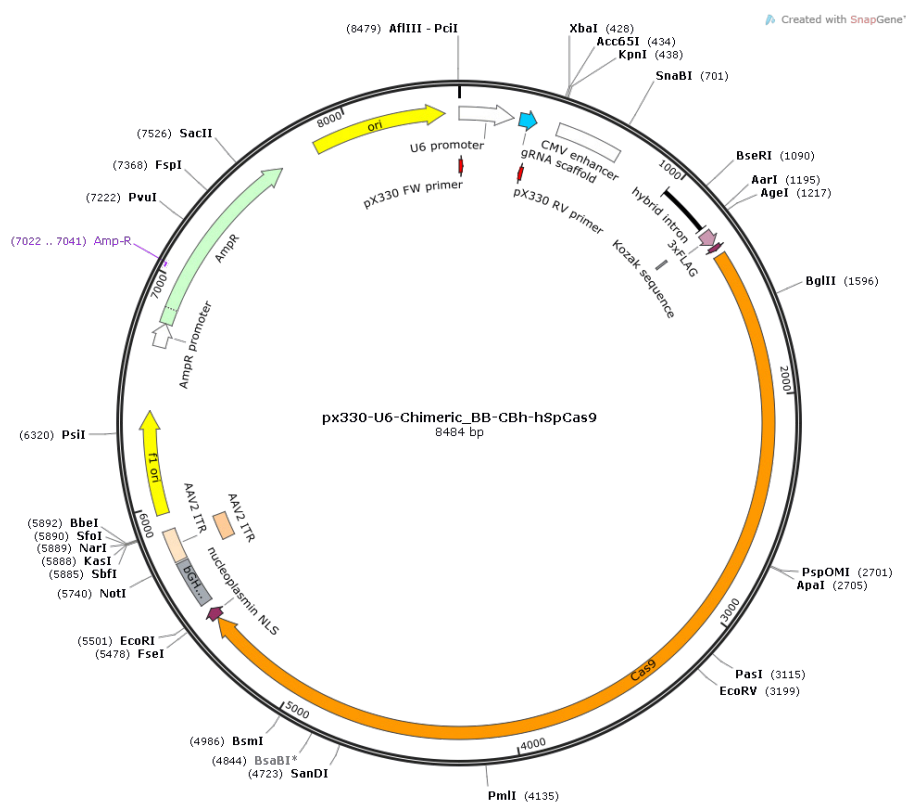
Tablica 6. Popis sekvenci sgRNA za navođenje vektora pX330-Cas9.

ime sgRNA	sekvenca
sgRNA <b>GLI1</b> 469 5'	F: 5' - CACCGTAGGGTAGTCGCCTTTGGTTGG - 3'
	R: 5'- AAACCCAACCAAAGGCGACTACCCTAC - 3'
sgRNA <b>GLI1</b> 887 5'	F: 5'- CACCAAGTTTGCCTTCTCGCGGGTGG - 3'
	R: 5' - AAACCCACCCGCGAGAAGCGCAAACCT - 3'
sgRNA <b>GLI1</b> 542 3'	F: 5' - CACCGTACCCTCCTCCCGAAGGACAGG - 3'
	R: 5'- AAACCCTGTCCTTCGGGAGGAGGGTAC - 3'
sgRNA <b>GLI1</b> 529 3'	F: 5' - CACCTTACATACCTGTCCTTCGGGAGG - 3'
	R: 5'- AAACCCTCCCGAAGGACAGGTATGTAA - 3'
sgRNA <b>GLI2</b> 535 5'	F: 5' - CACCTATTAGTCCTGGGATTCGTCTGG - 3'
	R: 5'- AAACCCAGACGAATCCCAGGACTAATA - 3'
sgRNA <b>GLI2</b> 157 5'	F: 5' - CACCCATATTGTATCTTCCGCACCAGG - 3'
	R: 5'- AAACCCTGGTGCGGAAGATACAATATG - 3'
sgRNA <b>GLI2</b> 585 3'	F: 5'- CACCTGGCCCCTACAGTAAACCTCAGG - 3'
	R: 5'- AAACCCTGAGGTTTACTGTAGGGGCCA - 3'
sgRNA <b>GLI2</b> 569 3'	F: 5'- CACCGCTCCCTGAGGTTTACTGTAGGG - 3'
	R: 5'- AAACCCCTACAGTAAACCTCAGGGAGC - 3'
sgRNA <b>GLI3</b> 422 5'	F: 5'- CACCTCGAGTGGAGCACTTCACTATGG - 3'
	R: 5'- AAACCCATAGTGAAGTGCTCCACTCGA - 3'
sgRNA <b>GLI3</b> 473 5'	F: 5'- CACCTCACCATTAGAAGTGGTGCTGG - 3'
	R: 5'- AAACCCAGCACCACTTCTAATGGTGAG - 3'
sgRNA <b>GLI3</b> 537 3'	F: 5'- CACCCGATAGAAGCCTACTTTATGTGG - 3'
	R: 5'- AAACCCACATAAAGTAGGCTTCTATCG - 3'
sgRNA <b>GLI3</b> 613 3'	F: 5'- CACCTGGAGTGGCTTACGGTAATCTGG - 3'
	R: 5'- AAACCCAGATTACCGTAAGCCACTCCA - 3'

### 3.3.3. Kloniranje sgRNA u vektor pX330-Cas9

Vektor pX330-Cas9 (Slika 13.) služio je kao okosnica za kloniranje sekvenci sgRNA te istovremeno kodirao za nukleazu Cas9. 1 µg vektora podvrgnuto je restrikciji s 0,5 µL enzima *BbsI* u CutSmart puferu, u ukupnom volumenu od 20 µL. Reakcija se odvijala na 37°C u trajanju od 1 sat, a enzimska aktivnost je zatim inaktivirana inkubacijom na 65°C, 20 minuta. 50 ng vektora podvrgnuto je ligaciji sa sgRNA pomoću 1 µL T4 DNA ligaze i T4 DNA ligaznog pufera, u reakcijskom volumenu od 20 µL. 15 µL ligacijske smjese je zatim transformirano u kompetentne DH5α bakterije metodom toplinskog šoka. Ukratko, transformacijska reakcija je inkubirana 10 minuta na ledu, zatim 30 sekundi na 42°C, a nakon

čega je uslijedilo ponovno hlađenje na ledu 2 minute. Dodano je 250  $\mu$ L LB medija (5 g/L ekstrakta kvasca, 10 g/L NaCl, 10 g/L tripton) bez antibiotika i transformirane bakterije su inkubirane na 37°C 1 sat uz miješanje. 350  $\mu$ L kulture je nanoseno na selektivnu LB ploču (5 g/L ekstrakta kvasca, 10 g/L NaCl, 10 g/L tripton, 13 g/L agar) sa rezistencijom na antibiotik ampicilin ( $\gamma = 100$  ng/mL). Nakon prekonoćne inkubacije na 37°C na pločama su narasle bakterijske kolonije od kojih su izabrane po 4 kolonije za svaki sgRNA za analizu PCR metodom kako bi se potvrdila ispravna ugradnja sgRNA u vektor. Početnice korištene za dokazivanje ugradnje sgRNA u vektor prikazane su Tablicom 7., a PCR program korišten za potvrdu uzoraka koji sadrže ispravno ugrađene sgRNA, prikazan je u Tablici 8. Iz kolonija koje su rezultirale pozitivnim signalima na agaroznom gelu izolirana je plazmidna DNA pomoću komercijalnog kompleta *Nucleobond Extra Midi* (Macherey-Nagel) i podvrgnuta sekvenciranju metodom po Sangeru na uređaju *ABI PRISM 310 Genetic Analyzer* (Applied Biosystems).



Slika 13. Mapa vektora px330-Cas9. Promotor U6 (bijelo); mjesto kloniranja oligonukleotida za ekspresiju sgRNA (plavo) pod kontrolom promotora U6; CMV, promotor ljudskog citomegalovirusa (bijelo); gen Cas9 (narančasto) pod kontrolom promotora CMV; AmpR rezistencija na antibiotik ampicilin (svijetlo zeleno), f1 ori, ishodište replikacije (žuto).

Tablica 7. Sekvence početnica korištenih za provjeru uspješnosti ugradnje sgRNA u vektor.

ime početnice	sekvenca
pX330 FW	5'- GAGGGCCTATTTCCCATGAT - 3'
pX330 RV	5' - CGGTGCCACTTTTTCAAGTT - 3'

### 3.3.4. Metoda lančane reakcije polimerazom (eng. *Polymerase Chain Reaction, PCR*)

Metoda lančane reakcije polimerazom (eng. *Polymerase Chain Reaction, PCR*) omogućuje eksponencijalno umnažanje specifičnog fragmenta DNA, uz korištenje para početnica i enzima DNA-polimeraze. U reakcijsku smjesu potrebno je, osim početnica i termostabilne DNA-polimeraze, dodati kalup DNA, dNTP-ove te pufer koji sadrži magnezijeve ione. Svaka PCR reakcija temelji se na ponavljanju ciklusa od tri koraka: termičke denaturacije kalupa DNA kojom se razdvajaju lanci, sljepljivanje početnica na komplementarne slijedove u kalupu te produljenje početnica, odnosno sinteza lanca komplementarnog kalupu. Sastav PCR smjese je bio: c(uzvodna početnica) = 0,5  $\mu$ M, c(nizvodna početnica) = 0,5  $\mu$ M, DNA-polimeraza *Fast Start* 0,01 U/ $\mu$ L, pufer za DNA polimerazu sa magnezijevim ionima *Fast Start*, c(dNPT) = 2 mM. Ukupni volumen reakcijske smjese bio je 10  $\mu$ L. Program reakcije PCR-a korišten za većinu reakcija provjere uspješnosti kloniranja prikazan je u Tablici 7.

Tablica 8. Tablični prikaz PCR programa korištenog za provjeru uspješnosti kloniranja.

	temperatura / °C	trajanje ciklusa / min	broj ciklusa
početna denaturacija	94	4	1
denaturacija	94	0,5	45
sparivanjepočetnica	59	1	
produljenje	72	1	
završno produljenje	72	7	1

### 3.3.5. Izrada vektora HR210PA-1/GFP/Puro

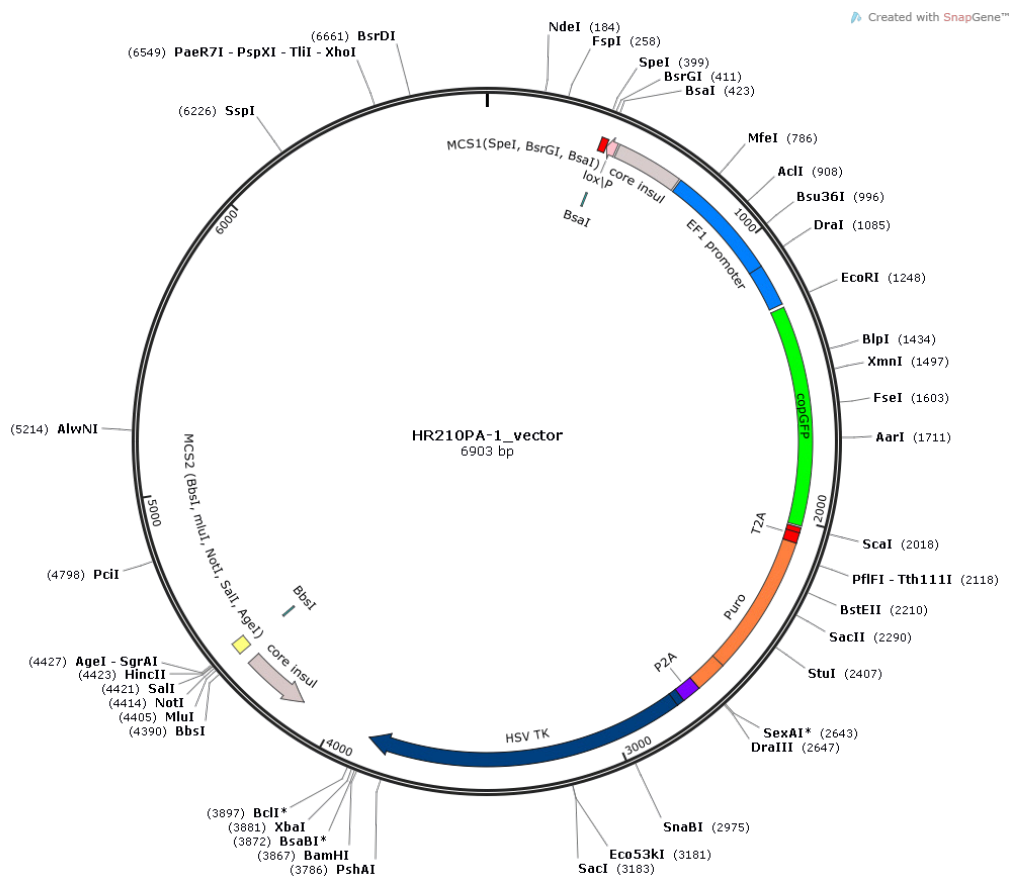
U svrhu uklanjanja gena iz genoma (eng. „*knock-out*“, *KO*), osim vektora koji sadrži Cas9 nukleazu, bilo je potrebno koristiti i vektor donor koji sadrži elemente potrebne za pozitivnu selekciju. U ovom slučaju je bio korišten vektor HR210PA-1/GFP/Puro sa donorskom kazetom koja sadrži gen za rezistenciju na antibiotik puromicin te gen za zeleni fluorescentni biljeg (eng. *Green Fluorescent Protein, GFP*). Ukoliko dođe do homologne rekombinacije i kazeta vektora donora se ugradi na mjesto gena koji se želi ukloniti, pozitivni stanični klonovi mogu se selektirati pretraživanjem na fluorescentnom mikroskopu i/ili uzgojem stanica u letalnoj dozi puromicina. Kako bi se donorska kazeta specifično ugradila na ciljno mjesto metodom homologne rekombinacije, bilo je potrebno u MCS1 i MCS2 (eng. *Multiple Cloning Sites*) mjesta vektora ugraditi regije homologije (eng. *Homology Arms, HA*) čiji sljedovi odgovaraju ciljnim sljedovima u genomu. Regije homologije su činili sintetski sljedovi (eng. *gBlocks, IDT*) otopljeni u 100  $\mu\text{L}$  pufera TE, konačne koncentracije 10  $\text{ng}/\mu\text{L}$ . Duljine svake od regija homologije te njihovi položaji u odnosu na ATG ili STOP kodon gena prikazani su Tablicom 9. Za svaki od gena (*GLI1, GLI2, GLI3*) bilo je potrebno uklonirati po dvije regije homologije u donorski vektor (5' HA i 3' HA), što je napravljeno u dva koraka koji su uključivali restrikciju, ligaciju, transformaciju i analizu kolonija metodom PCR. U tu svrhu je 100 ng inserta (HA) podvrgnuto restrikciji sa 0,5  $\mu\text{L}$  odgovarajućeg enzima, odnosno 10 U (Tablica 9.) u ukupnom volumenu od 15  $\mu\text{L}$  i inkubirano na 37°C 1 sat, a zatim je djelovanje enzima inaktivirano zagrijavanjem 20 minuta na 65°C. 1  $\mu\text{g}$  vektora HR210PA-1/GFP/Puro je također podvrgnuto restrikciji s odgovarajućim enzimima volumena 0,5  $\mu\text{L}$ : BsrGI u svrhu ugradnje regije homologije koja se nalazi ispred gena (MCS1) i enzimima NotI (za *GLI1*), Sall (za *GLI2*), MluI (za *GLI3*) za ugradnju regije homologije iza gena (MCS2). Ukupni reakcijski volumen je iznosio 20  $\mu\text{L}$ , a reakcija restrikcije je provedena na 37°C, u trajanju od 1 sat te je zatim djelovanje enzima inaktivirano zagrijavanjem na 65°C 20 minuta.

Tablica 9. Duljine regija homologije, njihovi položaji u odnosu na gen te restriksijski enzimi potrebni za njihovo kloniranje u vektor.

regija homologije (HA)	<i>GLI1</i>	<i>GLI2</i>	<i>GLI3</i>
	duljine regija (pb)		
HA 5'	1 111	679	1 122
HA 3'	641	836	964
	restriksijski enzimi		
HA 5'	BsrGI	BsrGI	BsrGI
HA 3'	NotI	Sall	MluI
	udaljenosti HA od gena		
HA 5'	-4106 do +5156 od ATG	-624 do -1243 od ATG	-1029 do +22 od ATG
HA 3'	-199 do +372 od STOP	+2426 do +3200 od STOP	+3897 do +4785 od STOP

Nakon restrikcije enzimima, regije homologije su ugrađene ligacijom u vektor. U svrhu ligacije 1  $\mu$ L pocijepanog vektora je pomiješano sa 4  $\mu$ L inserta te je dodano 1  $\mu$ L enzima T4 DNA ligaze u ukupnom volumenu od 20  $\mu$ L. Reakcija je inkubirana na sobnoj temperaturi 1 sat. Nakon toga je uslijedila transformacija DH5 $\alpha$  bakterija metodom toplinskog šoka, opisanom u poglavlju 3.3.3. te zatim PCR na bakterijskim kolonijama i sekvenciranje po Sangeru u svrhu potvrde ispravne ugradnje regije homologije na željeno mjesto, također na način opisan u poglavlju 3.3.3. Shema vektora na kojem su naznačeni položaji ugrađenih regija homologije ispred i iza gena prikazana je na Slici 14. Početnice za provjeru ugradnje regija homologije metodom PCR na bakterijskim kolonijama prikazane su u Tablici 10. U slučajevima kada nije došlo do ugradnje, početnice su davale produkt veličine 144 pb za 5'-kraj ili 381 pb za 3'-kraj, dok se u slučaju uspješne ugradnje vektor veličine 6 903 pb uvećao za veličinu ugrađene regije homologije, prema Tablici 9.





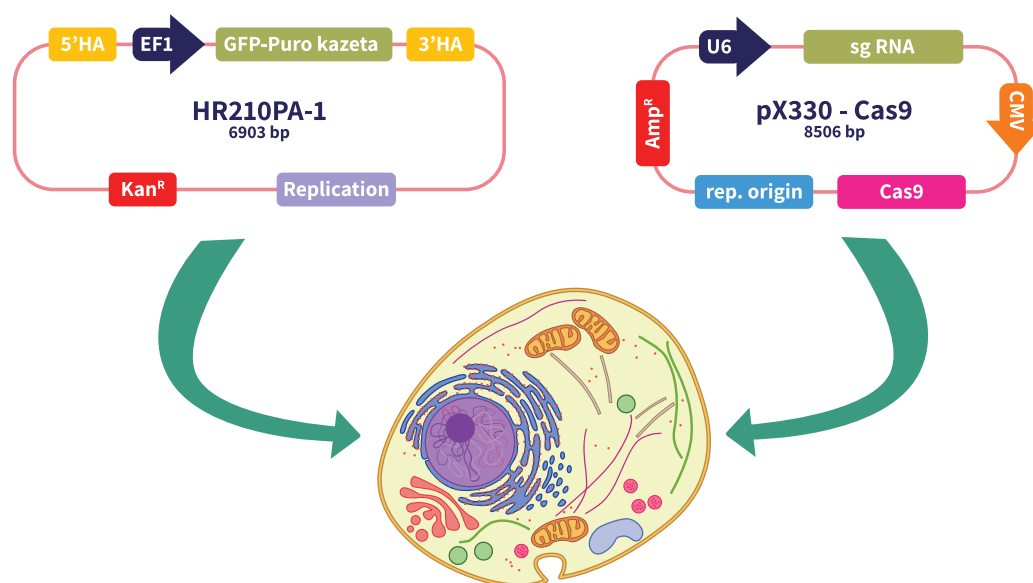
Slika 14. Mapa vektora HR210PA-1/GFP/Puro. EF1 promotor (plavo); GFP, zeleni fluorescentni protein (eng. Green Fluorescent Protein) (zeleno); Puro, rezistencija na antibiotik puromicin (narančasto).

Tablica 10. Popis početnica korištenih za provjeru ugradnje regija homologije metodom PCR.

ime početnice	sekvenca
Clon-ctrl-210PA 5' F	5' - GTGCTGCAAGGCGATTAAGT - 3
Clon-ctrl-210PA 5' R	5' - CCCTCGCTAGCATAACTTCG - 3'
Clon-ctrl-210PA 3' F	5' - GGGAGGATTGGGAAGAGAAT - 3'
Clon-ctrl-210PA 3' R	5' - CTTGGCGTAATCATGGTCAT - 3'

### 3.3.6. Transfekcija staničnih linija s vektorima sgRNA-pX330 i HR210PA-1/GFP/Puro

Transfekcija je provedena u pločicama formata 6 bunarića, prema istom protokolu opisanom u poglavlju 3.1.4. Jedina iznimka u sastavu transfekcijskog sadržaja je bila mješavina DNA koju ovdje čine pet različitih vektora: vektor HR210PA-1/GFP/Puro u količini od 1 µg, po dva sgRNA vektora (pX330-Cas9) koji navode Cas9 na mjesto ispred gena i po dva sgRNA vektora (pX330-Cas9) koji navode Cas9 nukleazu na mjesto iza gena od interesa, u količini od 1 µg za svaku (shematski prikazano na Slici 13.)

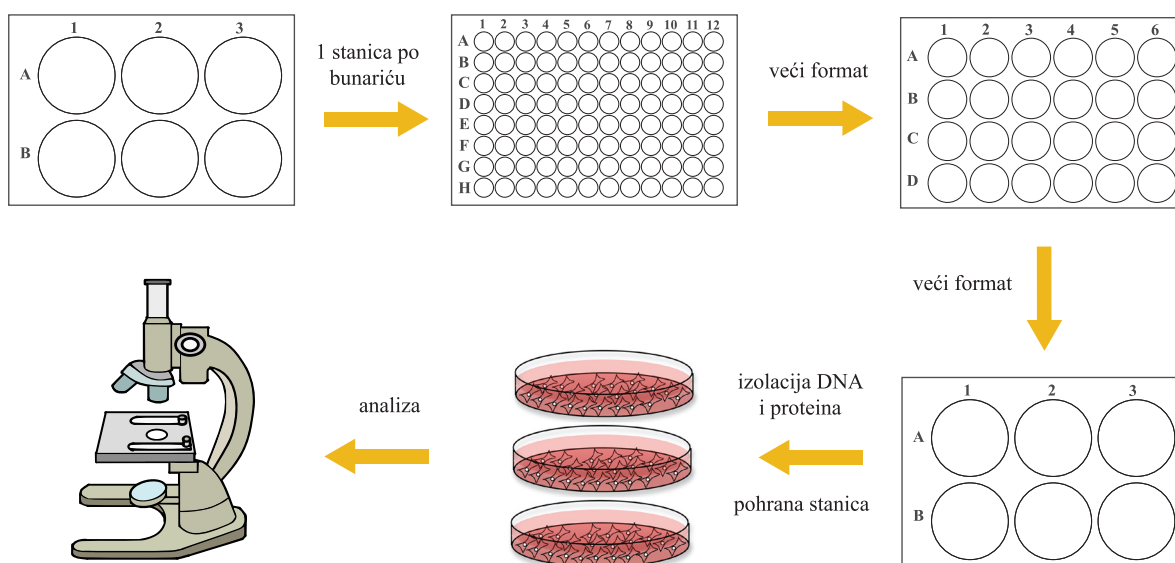


Slika 15. Shematski prikaz transfekcije različitih vektora u svrhu uklanjanja gena iz genoma stanica metodom CRISPR/Cas9. Lijevo je shema vektora HR210PA-1/GFP/Puro koji sadrži gen za rezistenciju na antibiotik i zeleni fluorescentni biljeg GFP, a desno vektor pX330-Cas9 koji sadrži sgRNA.

### 3.3.7. Probir i propagacija pozitivnih staničnih klonova monoklinalnom selekcijom

Dva dana nakon transfekcije stanica, dodan im je antibiotik puromicin u koncentraciji od 2 µg/mL koja je letalna za stanice koje nemaju rezistenciju na taj antibiotik. Nakon 5-7 dana u bunarićima je bilo vidljivo da većina stanica nije preživjela selekciju, no preživjele stanice su počele formirati kolonije. Stanice su svaki dan promatrane i slikane pod fluorescentnim mikroskopom kako bi se provjerile eksprimiraju li zeleni fluorescentni biljeg GFP. Svakih nekoliko dana promijenjen im je medij sa puromicinom, a kada su popunile otprilike 70%

površine bunarića, stanice su tripsinizirane i razrijeđene na koncentraciju od 5 stanica po mL. Kako bi se osigurala uspješnost monoklonalne selekcije, tako razrijeđene stanice su nasađene u pločice formata 96 bunarića u nastojanju da se izolira jedna stanica po bunariću. Neki od bunarića nisu sadržavali niti jednu stanicu, a u nekima se nalazilo i po nekoliko stanica te su takvi bunarići odmah odbačeni iz daljnje analize zbog mogućnosti razvijanja poliklonalne populacije stanica s različitim genetskim svojstvima. Bunarići u kojima se nalazila po jedna stanica označeni su za daljnje praćenje i promatrani pod fluorescentnim mikroskopom. Iz bunarića u kojima bi cijela populacija stanica bila zelena stanice bi se prebacivale u veći format, prvo u pločicu formata 24, a zatim i u pločicu formata 6 bunarića. U trenutku kada bi određena kolonija bila dovoljno velika da se razdvoji na nekoliko bunarića osiguralo bi se da se ista populacija stanica može testirati na proteinskoj razini, kao i na PCR-u (početnice za provjeru uspješnosti uklanjanja gena *GLI2* prikazane Tablicom 11.) te bi se po jedan bunarić stanica zamrznuo i pohranio kratkoročno na  $-80^{\circ}\text{C}$ .



Slika 16. Shematski prikaz metode graničnog razrjeđenja za razvijanje monoklonalne linije stanica. Stanice su uzgajane u pločicama formata 6 bunarića, zatim su razrijeđene kako bi se dobila 1 stanica po bunariću u 96 bunarića te su stanice uzgajane u selekcijskom mediju. Kada dođe do razvoja kolonija stanica iz jedne stanice, one se prebacuju u veći format za uzgoj – prvo format 24 bunarića, zatim 6 bunarića. Iz formata 6 bunarića uzima se talog stanica za analizu DNA te za proteinsku analizu, a dio stanica se pohranjuje kratkoročno na  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Tablica 11. Sekvence početnica korištenih za umnažanje odsječka DNA u svrhu provjere uspješnosti uklanjanja gena GLI2 te ugradnje donorske kazete.

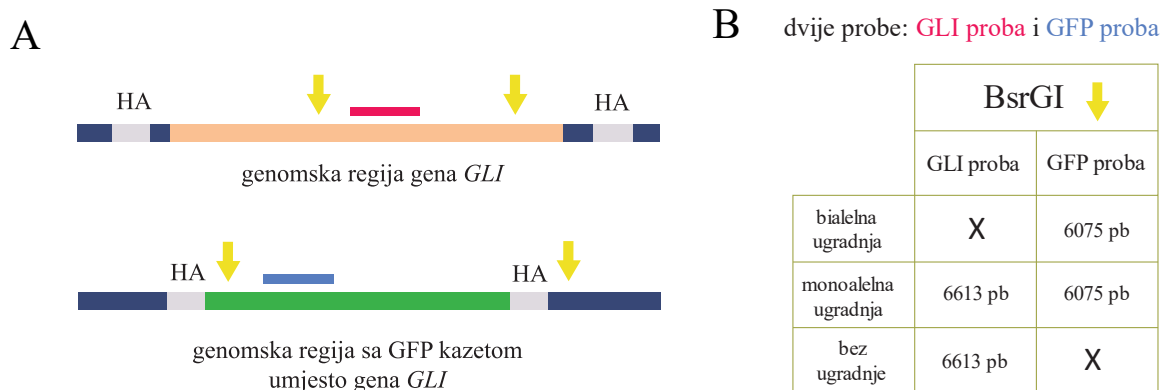
ime početnice	sekvenca
GLI2 FW	5' - GTTGCGGTGAGCCAAGAT - 3'
GFP RV	5' - GTACTTCTCGATGCGGGTGT - 3'

### 3.3.8. Hibridizacija DNA metodom po Southernu

Metodom hibridizacije DNA po Southernu utvrđuje se postojanje određenog nukleotidnog slijeda DNA u cjelokupnom uzorku (npr. genomskoj DNA ili plazmidnoj DNA). Temelji se na detekciji slijeda DNA koji je komplementaran slijedu obilježene sonde (DNA probe). Sama tehnika se sastoji od pet glavnih koraka: 1) obilježavanja probe 2) restrikcije DNA 3) elektroforeze odsječaka DNA na agaroznom gelu, 4) prijenosa odsječaka DNA s gela na membranu, 5) hibridizacije DNA na membrani s obilježenom sondom te 6) detekcije.

Probe GLI2 i GFP čine fragmenti duljina 678 pb i 653 pb koji su umnoženi u PCR reakciji iz genomske, odnosno plazmidne DNA, a koristeći početnice navedene u Tablici 12. Po 1 µg probe je neradioaktivno obilježeno pomoću nukleotida dUTP obilježenog dioksigeninom (DIG-dUTP) koji se ugrađuje u DNA kao analog dTTP. U ovom doktorskom radu je za obilježavanje korišten reagens iz komercijalnog kompleta *DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II* (Roche Diagnostics GmbH, Njemačka) te su praćene detaljne upute proizvođača. Obilježene i neobilježene probe su analizirane elektroforezom na agaroznom gelu kako bi se uočio pomak koji nastaje zbog sporijeg putovanja obilježene DNA. 20 µg DNA koja je prethodno podvrgnuta restrikciji s enzimom BsrGI (5U)), nanoseno je na agarozni gel ( $w(\text{agaroz}) = 0,6\%$ ). Elektroforeza je provedena na 40 V, preko noći uz hlađenje. Fragmenti DNA su vizualizirani na UV-transiluminatoru. Prije samog prijenosa DNA na membranu, gel je podvrgnut predtretmanu. Predtretman je uključivao depurinaciju pomoću klorovodične kiseline ( $c(\text{HCl}) = 250 \text{ mM}$ ) u trajanju od 10 minuta te denaturaciju fragmenata inkubacijom 10 minuta u otopini amonijevog acetata i natrijeve lužine (0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl). DNA se u alkalnim uvjetima denaturira što je neophodno kako bi došlo do hibridizacije DNA s jednolančanom obilježenom sondom. Neposredno prije prijenosa gel je ispran u vodi. Fragmenti DNA su nakon toga podvrgnuti kapilarnom transferu s gela na pozitivno nabijenu najlonsku membranu (Amersham, Engleska), u trajanju od 48 sati na sobnoj temperaturi.

Fragmenti su zatim fiksirani na membranu pomoću UV lampe uređaja transiluminatora (TFX-20.MC, Vilber Lourmat, Francuska), na valnoj duljini od 254 nm u trajanju od 1 minute. Takva fiksacija se temelji na stvaranju kovalentnih veza između timidina u lancu DNA i pozitivno nabijenih amino skupina na membrani od najlona [110]. Membrana na koju je fiksirana DNA je potom podvrgnuta predhibridizaciji i hibridizaciji, uz korištenje pufera *DIG Easy Hyb* iz već spomenutog komercijalnog kompleta. Ukratko, membrana je predhibridizirana 3 sata u hibridizacijskoj cijevi na 42°C, a zatim inkubirana u hibridizacijskom puferu koji je sadržao 10 µL obilježene probe, na 42°C preko noći. Sljedeći dan membrana je isprana dva puta po 5 minuta u puferu 2X SSC + 0.1% SDS na sobnoj temperaturi uz miješanje, zatim dva puta po 15 minuta u puferu 0.5X SSC + 0.1% SDS na 65°C u hibridizacijskoj peći te naposljetku 5 minuta u puferu za ispiranje (1 M maleinska kiselina, 1,5 M NaCl, 0,3% Tween-20, pH 7,5). Membrana je zatim inkubirana 1 sat u puferu za blokiranje, na sobnoj temperaturi. Zatim je otopina za blokiranje zamijenjena otopinom koja sadrži protutijelo Anti-Digoxigenin-AP razrjeđenja 1:10 000 koje je sastavni dio komercijalnog kompleta. Membrana je inkubirana u otopini protutijela 2 sata na sobnoj temperaturi, uz miješanje. Prije detekcije membrana je isprana u puferu za ispiranje i zatim u puferu za detekciju (0,1 M Tris-HCl, 0,1 M NaCl, pH 9,5). Detekcija je provedena pomoću kemiluminiscentnog reagensa CSPD iz komercijalnog kompleta, prema uputama proizvođača. Membrana je uslikana na uređaju *UVitec Alliance Q9 Mini* (UVitec, Cambridge, Engleska, UK).



*Slika 17. A) Shematski prikaz eksperimenta Southern blot. Označena su mjesta cijepanja restriktivskog enzima BsrGI (žute strelice) te mjesta na koja se vežu proba za GLI2 (crveno) ili proba za GFP (plavo). B) Tablični prikaz na kojim veličinama bi se trebali pojaviti signali na membrani ukoliko je došlo do vezanja odgovarajuće probe, a prikazano je za situaciju u kojoj se dogodila bialelna ugradnja donorske kazete na mjesto uklonjenog gena, monoalelna ugradnja ili gdje nije došlo do ugradnje donorske kazete.*

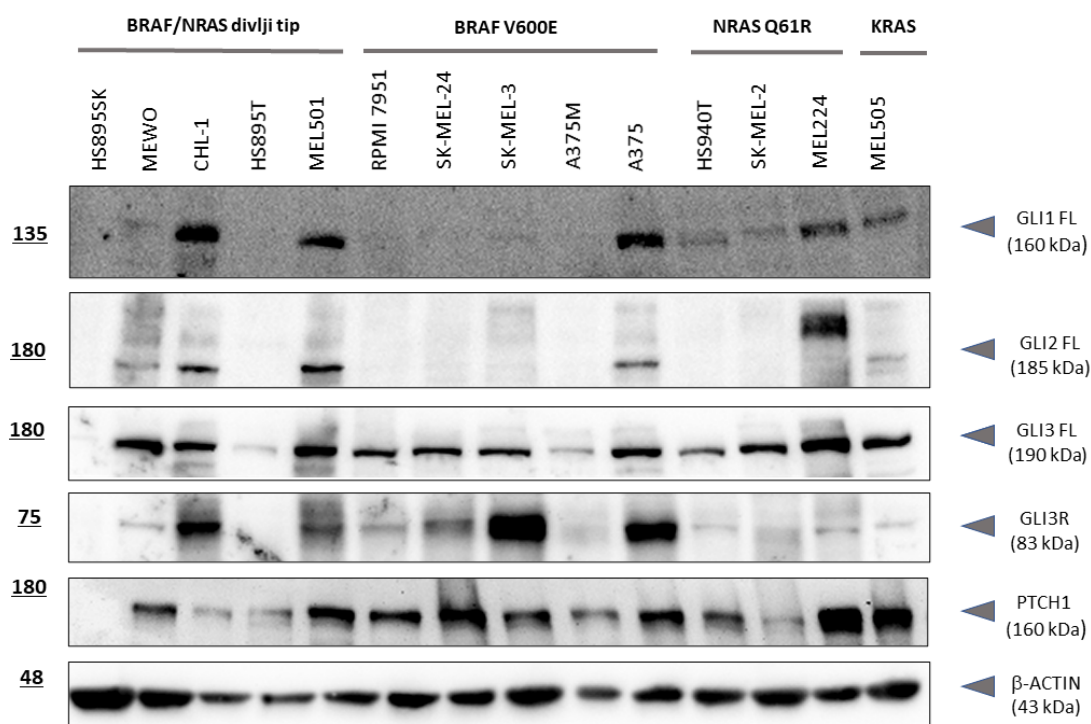
Tablica 12. Popis početnica korištenih za umnažanje odsječaka gena *GLI2* i *GFP*.

<b>ime početnice</b>	<b>sekvenca</b>
GLI2 FW	5' - CGTGGTGCAGTACATCAAGG - 3'
GLI2 RV	5' - TCAGGTGCCACTTCTGTCTG - 3'
GFP RF	5' - GTGATGGGCTACGGCTTCTA - 3'
GFP RV	5' - GTGGGCTGTACTCGGTCAT - 3'

## 4. Rezultati

#### 4.1. Odabir staničnih modela

U ovom doktorskom radu su kao glavni model za većinu eksperimenata odabrane tri stanične linije melanoma čovjeka. Odabir staničnih modela temeljio se na ekspresiji proteina iz signalnog puta HH-GLI, analiziranoj na panelu od 14 staničnih linija melanoma. Pokus analize ekspresije proteina napravila je kolegica dr.sc. Nikolina Piteša u sklopu svog doktorskog rada [111] (Slika 18.). Iz prikazanih rezultata je vidljivo da su stanične linije CHL-1, A375 i MEL224 odabrane jer imaju najjaču ekspresiju proteina GLI1, GLI2 i GLI3 istovremeno. CHL-1 stanična linija je divlji tip za gene *BRAF* i *NRAS*, A375 ima mutaciju V600E u *BRAF*, a linija MEL224 ima mutaciju Q61R u *NRAS*. Na slici je također vidljivo da od 14 staničnih linija njih čak 13 ima ekspresiju proteina GLI3 te *PTCH1*. Samo za staničnu liniju Hs895.SK, koju čine zdravi fibroblasti kože, nije utvrđena ekspresija ni jedne komponente signalnog puta HH-GLI na razini proteina, usprkos tome što je nanosena dovoljno velika količina proteina, a što je vidljivo iz jačine signala proteina  $\beta$ -aktina za taj uzorak.



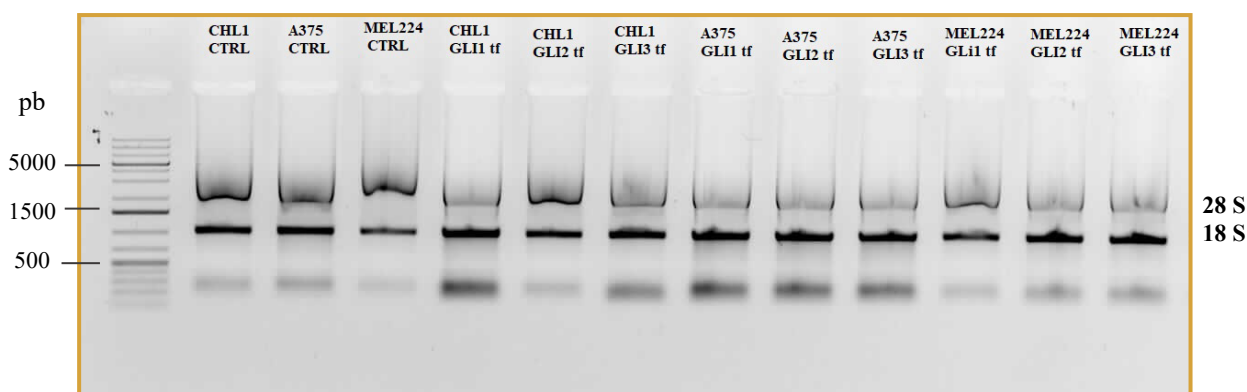
Slika 18. Prikaz relativne ekspresije proteina signalnog puta HH-GLI: *GLI1*, *GLI2*, *GLI3* te *PTCH1*. Kao kontrola količine nanesenih proteina korišten je  $\beta$ -aktin. Na slici kratica FL označava „full length“ protein, a R označava represorski oblik proteina [111].



## 4.2. Sekvenciranje RNA

### 4.2.1. Kvaliteta i čistoća uzoraka RNA za sekvenciranje

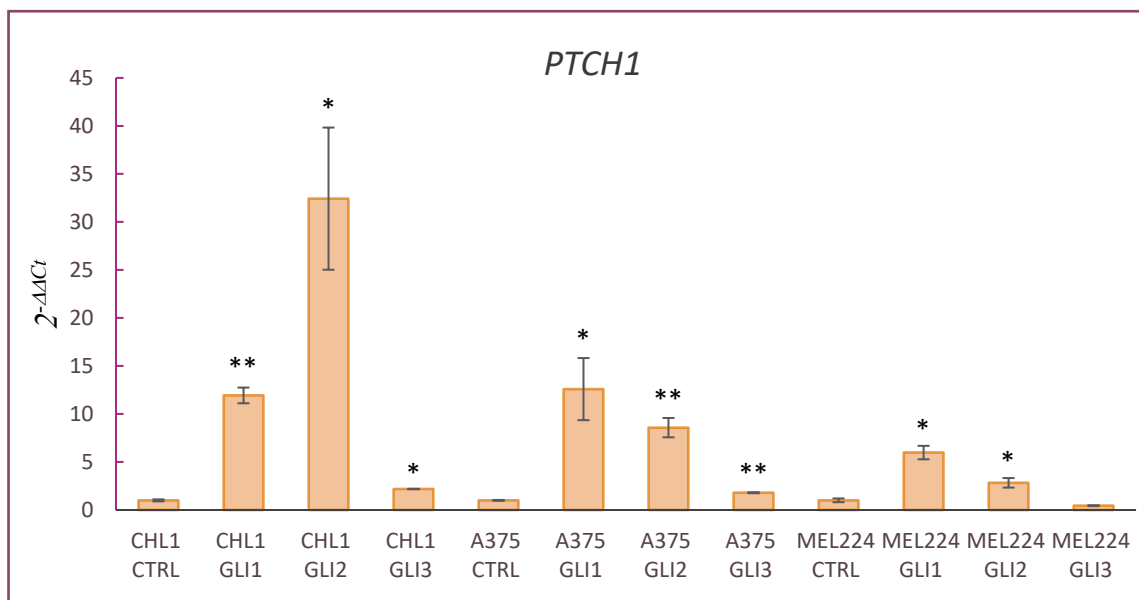
Za potrebe sekvenciranja RNA stanične linije melanoma CHL-1, A375 i MEL224 transfecirane su ekspresijskim vektorima za GLI1, GLI2 ili GLI3 u dva neovisna eksperimenta. Netransfecirane linije su korištene kao kontrole. Prije sekvenciranja uspješnost izolacije i čistoća RNA provjerena je elektroforezom na agaroznom gelu. Rezultati za jednu biološku repliku prikazani su Slikom 19. Iz prikaza je vidljivo da svih 12 uzoraka koji su predviđeni za sekvenciranje RNA imaju dobru čistoću RNA jer pokazuju dva signala koja potječu od 28S i 18S podjedinice rRNA.



Slika 19. Rezultati elektroforeze RNA na agaroznom gelu u svrhu provjere uspješnosti izolacije i čistoće uzoraka. Prikazani su redom kontrolni uzorci sve tri stanične linije (CHL-1, A375 i MEL224), označeni s CTRL, zatim stanična linija CHL-1 transfecirana s GLI1, GLI2 i GLI3, linija A375 transfecirana s GLI1, GLI2 i GLI3 te MEL224 transfecirana s GLI1, GLI2 i GLI3.

Prije slanja uzoraka RNA u komercijalnu kompaniju *DNA Link* u svrhu priprema knjižnica cDNA i samog sekvenciranja, metodom qPCR provjerena je ekspresija mRNA gena *PTCH1* u uzorcima nakon transfekcije stanica proteinima GLI1, GLI2 i GLI3. Gen *PTCH1* je izravni ciljani gen proteina GLI1 i GLI2 te ukoliko je transfekcija bila uspješna to bi se trebalo odraziti i na njegovu ekspresiju, u obliku povećanja razine ekspresije mRNA u uzorcima transfeciranim sa GLI1 i GLI2. Na Slici 20. je vidljivo da je u uzorcima transfeciranim s ekspresijskim vektorima za GLI1, GLI2 i GLI3 zaista došlo do povećanja ekspresije mRNA gena *PTCH1*.

Promjena u ekspresiji gena *PTCH1* je bila statistički značajna u svim uzorcima, s iznimkom GLI3 transfekcije u liniji MEL224. Najveći porast ekspresije je zabilježen u liniji CHL-1, zatim u liniji A375, a najmanja u liniji MEL224.

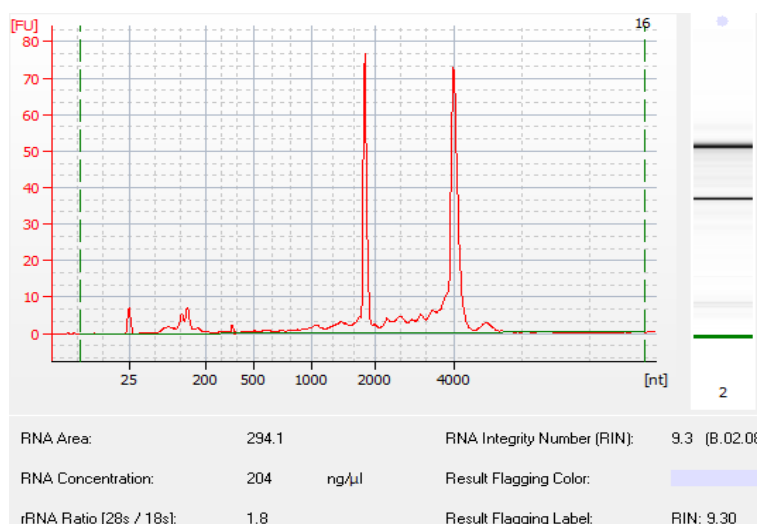


Slika 20. Relativna ekspresija mRNA gena *PTCH1* u stanicama transfeciranim s proteinima *GLI* u svrhu sekvenciranja RNA. Prikazani su uzorci staničnih linija CHL-1, A375 i MEL224 transfeciranih s *GLI1*, *GLI2* i *GLI3* te kontrolni uzorak netransfeciranih stanica (označen s CTRL). Na y-osi je prikazana relativna ekspresija mRNA dobivena izračunom  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  vrijednosti. \*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ .

U Tablici 13. su prikazane koncentracije i OD 260/230, odnosno 260/280 vrijednosti sva 24 uzorka RNA poslana na sekvenciranje u kompaniju *DNA Link*. Koncentracije su izmjerene Bioanalyzerom, a primjer elektroforegrama je prikazan za uzorak A375 GLI3TF na Slici 21. Sa elektroforegrama se može vidjeti da postoje samo 2 signala koja potječu od 18S rRNA i 28S rRNA. Također se može vidjeti integritet uzorka RNA, odnosno RIN broj koji govori o očuvanosti/raspadnutosti RNA. Što je RIN broj bliži 10 to je bolji integritet RNA, a koliko su vrijednosti RIN brojeva veće od 8, integritet RNA je dobro očuvan i takva RNA se može koristiti za sekvenciranje sljedeće generacije.

Tablica 13. Koncentracije RNA za pripremu cDNA knjižnica dobivene Bioanalyzerom.

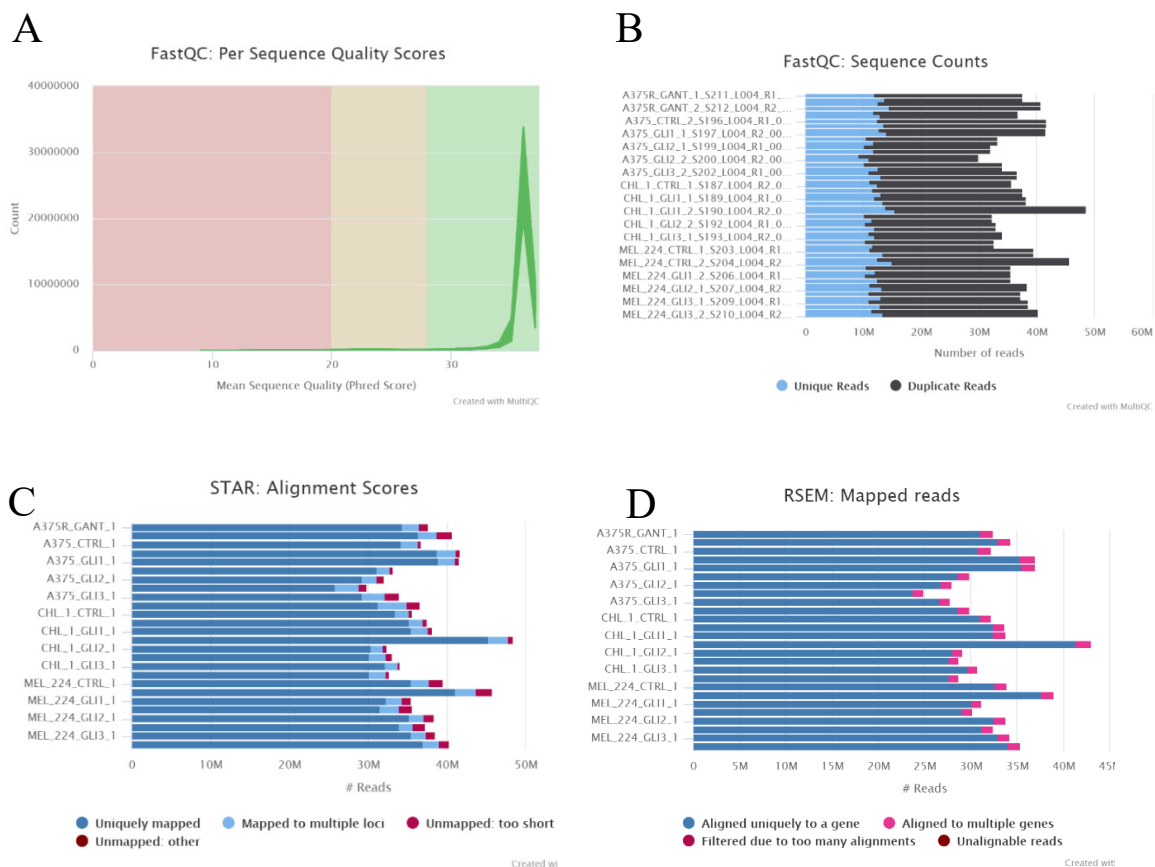
	ime uzorka	koncentracija ng/ $\mu$ L	OD		RIN
			260/230	260/280	
1	CHL-1 CTRL (1)	346,6	2.11	2.27	9.1
2	CHL-1 CTRL (2)	468,5	2.12	2.27	8.9
3	CHL-1 GLI1 (1)	208	2.07	2.28	9.3
4	CHL-1 GLI1 (2)	585,9	2.03	2.29	9.1
5	CHL-1 GLI2 (1)	278,9	1.99	2.27	9.2
6	CHL-1 GLI2 (2)	148,5	1.98	2.28	9.0
7	CHL-1 GLI3 (1)	210,9	1.72	2.28	9.1
8	CHL-1 GLI3 (2)	200,4	1.94	2.29	9.4
9	A375 CTRL (1)	318,4	2.18	2.54	9.0
10	A375 CTRL (2)	253,3	2.00	2.27	9.3
11	A375 GLI1 (1)	180,4	2.23	2.21	9.0
12	A375 GLI1 (2)	457	2.14	2.29	9.2
13	A375 GLI2 (1)	217	2.09	2.26	9.2
14	A375 GLI2 (2)	361,6	1.86	2.26	9.0
15	A375 GLI3 (1)	261,6	2.15	2.21	9.2
16	A375 GLI3 (2)	271	1.45	2.29	9.3
17	MEL-224 CTRL (1)	68	1.76	2.24	9.0
18	MEL-224 CTRL (2)	95	1.13	2.27	9.2
19	MEL-224 GLI1 (1)	170	2.08	2.25	8.9
20	MEL-224 GLI1 (2)	230,9	2.14	2.25	8.0
21	MEL-224 GLI2 (1)	129	2.1	2.28	9.2
22	MEL-224 GLI2 (2)	212	2.1	2.26	8.7
23	MEL-224 GLI3 (1)	247	2.17	2.28	8.9
24	MEL-224 GLI3 (2)	189,8	2.18	2.27	8.6



Slika 21. Primjer elektroferograma za uzorak A375 GLI3TF. Na slici su vidljiva dva oštra signala koja potječu od 18S i 28S podjedinice rRNA. Navedene su i vrijednosti koncentracije RNA, omjer podjedinica i RIN broj.

#### 4.2.2. Kvaliteta podataka dobivenih sekvenciranjem RNA

Prije daljnje analize kvaliteta sirovih sekvenci dobivenih sekvenciranjem RNA provjerena je pomoću softvera *FastQC*. Slika 22. prikazuje da su svi uzorci vrlo visoke kvalitete jer se nalaze u zelenom području (A). Broj očitavanja po uzorku nakon filtriranja je veći od 30 milijuna, a omjer jedinstvenih očitavanja i duplih očitavanja pokazuje da nema neočitanih očitavanja (B). Nakon što su očitavanja mapirana na ljudski genom hg38 pomoću alata *STAR Aligner* vidljivo je na slici (C) da je većina očitavanja jedinstveno povezana s određenim lokusima u genomu (tamnije plava boja), dok je vrlo mali udio očitavanja povezan s više lokusa (svijetlo plava boja), a samo vrlo maleni dio nije uspješno mapiran zbog prekratke dužine fragmenata (crveno). Analiza RSEM pokazuje da je veliki broj očitavanja ispravno povezan s genima (plavo) te da je vrlo mali dio sekvenci koje mogu biti povezane s više od jednog gena (ružičasto, D).

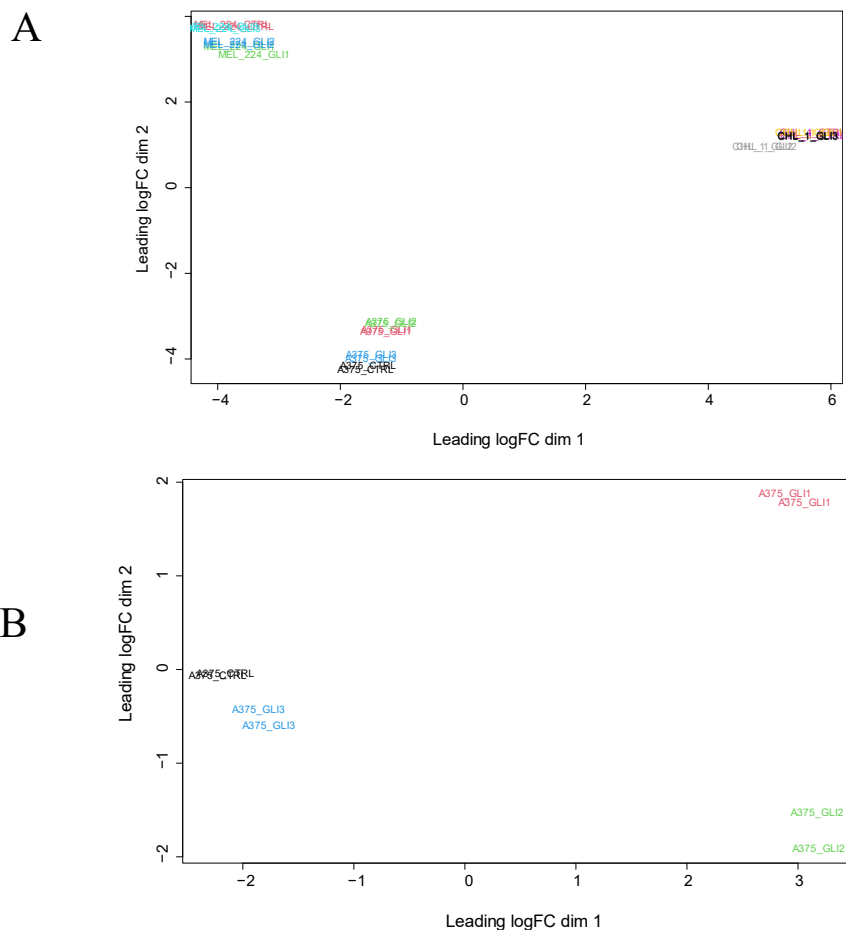


Slika 22. Prikaz kvalitete sirovih sekvenci dobivenih sekvenciranjem RNA. A) „Per sequence Quality Scores“ prikazuje prosječnu kvalitetu sekvenci. Vidljivo je da najveći udio uzoraka ima sekvence visoke kvalitete (zeleno polje). B) „Sequence counts“ prikazuje broj očitavanja po uzorku te broj jedinstvenih očitavanja (plavo) i duplih očitavanja (crno). C) „Alignment Scores“ prikazuje

koliko je udio očitavanja jedinstveno povezano s određenim lokusom u genomu (tamno plavo) i koliko očitavanja nije uspješno mapirano zbog premale dužine fragmenata (crveno). D) „Mapped reads“ prikazuje udio očitavanja koji su povezani s genima (plavo) te udio očitavanja koji može biti povezan s više od jednog gena (ružičasto).

#### 4.2.3. Analiza glavnih komponenti (PCA)

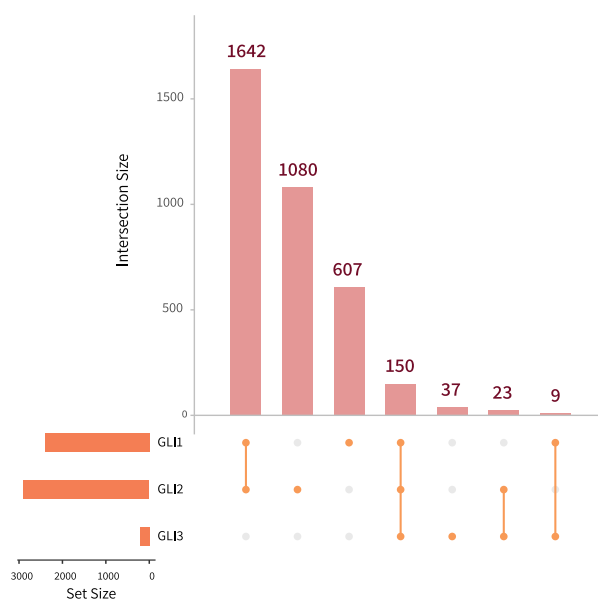
MDS dijagram je vizualizacija analize glavnih komponenti (eng. *Principal Component Analysis*, PCA) koja određuje najveće izvore varijacija u podacima. Ukoliko je eksperiment dobro proveden, najveći izvori varijacija u podacima su različite skupine koje nas zanimaju. U našem slučaju najviše je bilo razdvajanje među staničnim linijama (Slika 23., A) te unutar pojedine linije među svakim od proteina GLI (Slika 23., B).



Slika 23. MDS analiza grupiranja uzoraka sekvenciranja RNA. Ova analiza uzima top 200 gena za grupiranje. Na slici A vidljivo je grupiranje među različitim staničnim linijama. Na slici B je prikazano grupiranje uzoraka unutar stanične linije A375.

### 4.3. Bioinformatička analiza

Kada se sve tri stanične linije uzmu u obzir zajedno, pronađena su 1 642 ciljna gena koji su preklapajući za GLI1 i GLI2, 23 preklapajuća ciljna gena za GLI2 i GLI3 i samo 9 preklapajućih ciljnih gena za GLI1 i GLI3. Ukupno je pronađeno 150 ciljnih gena koji su preklapajuća za sva tri GLI proteina, 607 jedinstvenih gena za GLI1, 1 080 jedinstvenih gena za GLI2 i 37 jedinstvenih gena za GLI3. Rezultati su grafički prikazani na Slici 24.



Slika 24. Dijagram prikaza jedinstvenih i preklapajućih ciljnih gena proteina GLI1, GLI2 i GLI3. Stupci predstavljaju broj gena, a točke povezane crtama označavaju koji od proteina GLI se preklapaju u navedenom setu gena.

Nakon filtriranja prema statističkoj značajnosti, odnosno vrijednostima  $FDR < 0,01$ , kada se rezultati za sve tri stanične linije uzmu u obzir, identificirano je za GLI1 ukupno 814 gena sa značajno promijenjenom razinom ekspresije (eng. *Differentially Expressed Genes*, *DEG*). Od toga 631 gen s povećanom ekspresijom u odnosu na netransfeciranu kontrolu, a 183 gena sa smanjenom ekspresijom u odnosu na kontrolu. Za GLI2 je pronađen 941 DEG (711 s povećanom ekspresijom, a 230 sa smanjenom ekspresijom). Za GLI3 ovom je metodom pronađeno samo 58 DEG (35 s povećanom ekspresijom i 23 sa smanjenom ekspresijom). Broj identificiranih ciljnih gena za svaku pojedinu liniju prikazan je u Tablici 14. gdje zelene strelice označavaju broj gena s povećanom ekspresijom, a sive strelice broj gena sa smanjenom ekspresijom.

Tablica 14. Broj diferencijalno eksprimiranih ciljnih gena proteina GLI, u svakoj od analiziranih staničnih linija, nakon filtriranja prema statističkoj značajnosti.

stanična linija	GLI1		GLI2		GLI3	
	↑	↓	↑	↓	↑	↓
sve zajedno	631	183	711	230	35	23
CHL-1	1 021	1 154	1 102	914	421	853
A375	1 218	246	1 007	70	69	20
MEL224	345	79	834	651	43	145

Tablica 15. Tablični prikaz 20 ciljnih gena proteina GLI1 s najviše povećanom ekspresijom, nakon filtriranja prema vrijednostima logFc.

GEN	puno ime proteina	logFC	FDR
<i>KRT16</i>	Keratin 16	12.21	1.69E-06
<i>KRT17</i>	Keratin 17	12.13	5.35E-07
<i>S100A9</i>	S100 calcium binding protein A9	11.70	1.29E-10
<i>PRB3</i>	Proline Rich Protein BstNI Subfamily 3	11.52	1.09E-05
<i>IL3</i>	Interleukin 3	11.20	0.000738
<i>PRSS22</i>	serine protease 22	10.82	2.93E-09
<i>DBH</i>	Dopamine Beta-Hydroxylase	10.80	0.002026
<i>PRB2</i>	proline rich protein BstNI subfamily 2	10.67	6.16E-09
<i>LILRA2</i>	Leukocyte Immunoglobulin Like Receptor A2	10.63	7.22E-05
<i>FAM30A</i>	Family With Sequence Similarity 30 Member A	10.62	0.002527
<i>MB</i>	Myoglobin	10.41	8.45E-08
<i>PDCD1</i>	Programmed Cell Death 1	10.30	3.34E-05
<i>FOXS1</i>	Forkhead box S1	10.28	4.92E-11
<i>RNF223</i>	Ring Finger Protein 223	10.27	1.03E-05
<i>GLI1</i>	GLI familij zinc finger 1	10.22	1.89E-09
<i>TGM3</i>	Transglutaminase 3	10.12	0.000177
<i>KCNT1</i>	Potassium Sodium-Activated Channel Subfamily T Member 1	9.99	1.68E-05
<i>S100A7</i>	S100 Calcium Binding Protein A7	9.98	4.52E-05
<i>SIGLEC1</i>	sialic acid binding Ig like lectin 1	9.88	1.39E-06
<i>MUC5AC</i>	mucin 5AC	9.82	159.887

Tablica 16. Tablični prikaz 20 ciljnih gena proteina GLI2 s najviše povećanom ekspresijom, nakon filtriranja prema vrijednostima logFc.

<b>GEN</b>	<b>puno ime proteina</b>	<b>logFC</b>	<b>FDR</b>
<i>KRT17</i>	Keratin 17	13.38	4.99E-08
<i>KRT16</i>	Keratin 16	12.54	6.70E-07
<i>DBH</i>	Dopamine Beta-Hydroxylase	12.40	0.000579
<i>FAM30A</i>	Family With Sequence Similarity 30 Member A	12.20	0.000725
<i>PRB3</i>	Proline Rich Protein BstNI Subfamily 3	11.75	5.44E-06
<i>GALNT9</i>	Polypeptide N-Acetylgalactosaminyltransferase 5	11.67	1.32E-06
<i>LILRA2</i>	Leukocyte Immunoglobulin Like Receptor A2	11.55	2.60E-05
<i>PDCD1</i>	Programmed Cell Death 1	11.47	7.40E-06
<i>PRB2</i>	proline rich protein BstNI subfamily 2	11.36	1.57E-09
<i>KCNT1</i>	Potassium Sodium-Activated Channel Subfamily T Member 1	11.32	1.63E-06
<i>RNF223</i>	Ring Finger Protein 223	10.94	3.31E-06
<i>PRSS56</i>	serine protease 56	10.88	2.48E-07
<i>TGM3</i>	Transglutaminase 3	10.84	5.73E-05
<i>LILRA1</i>	Leukocyte Immunoglobulin Like Receptor A1	10.82	0.000408
<i>LILRB2</i>	Leukocyte Immunoglobulin Like Receptor B2	10.67	1.00E-05
<i>DPEP1</i>	dipeptidase 1	10.50	1.23E-08
<i>S100A7</i>	S100 Calcium Binding Protein A7	10.44	2.03E-05
<i>IL3</i>	Interleukin 3	10.28	0.001417
<i>ALPI</i>	Alkaline Phosphatase, Intestinal	10.27	1.98E-05
<i>SIGLEC1</i>	Sialic Acid Binding Ig Like Lectin 1	10.20	4.80E-07

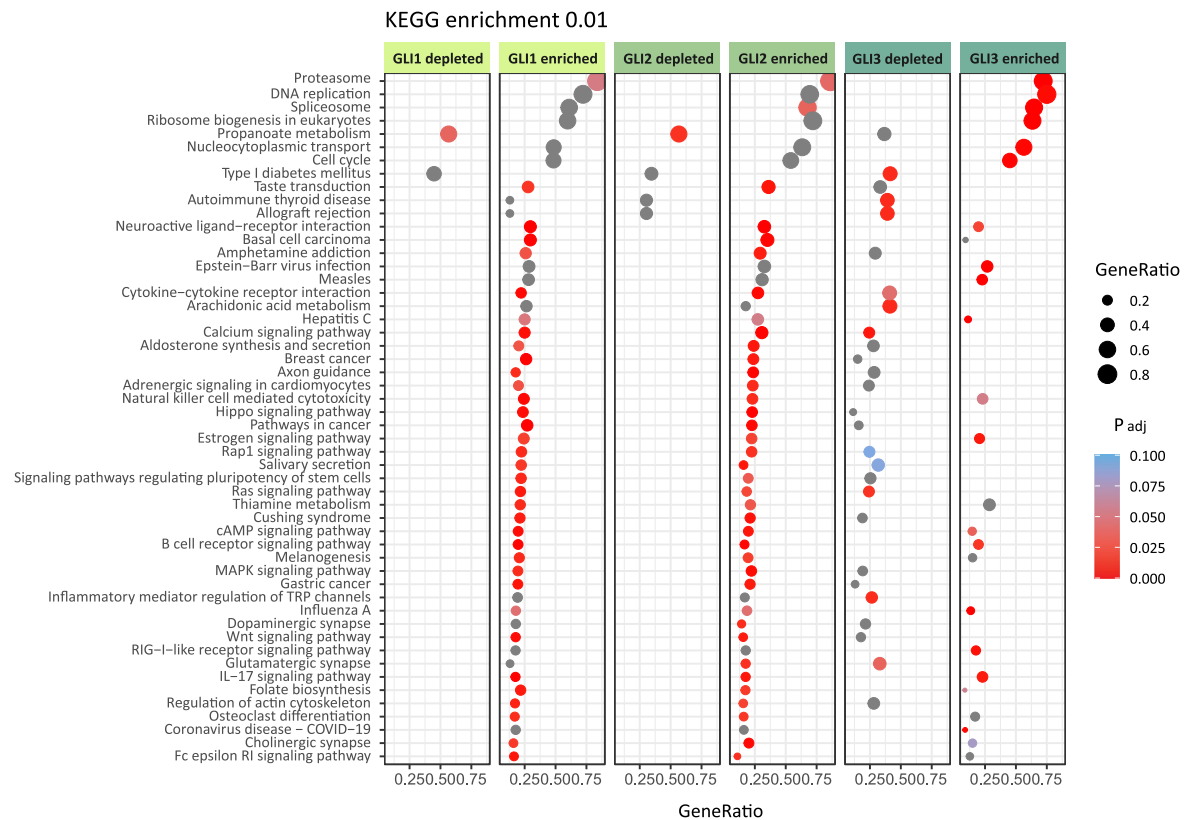


Tablica 17. Tablični prikaz 20 ciljnih gena proteina GLI3 s najviše povećanom ekspresijom, nakon filtriranja prema vrijednostima logFc.

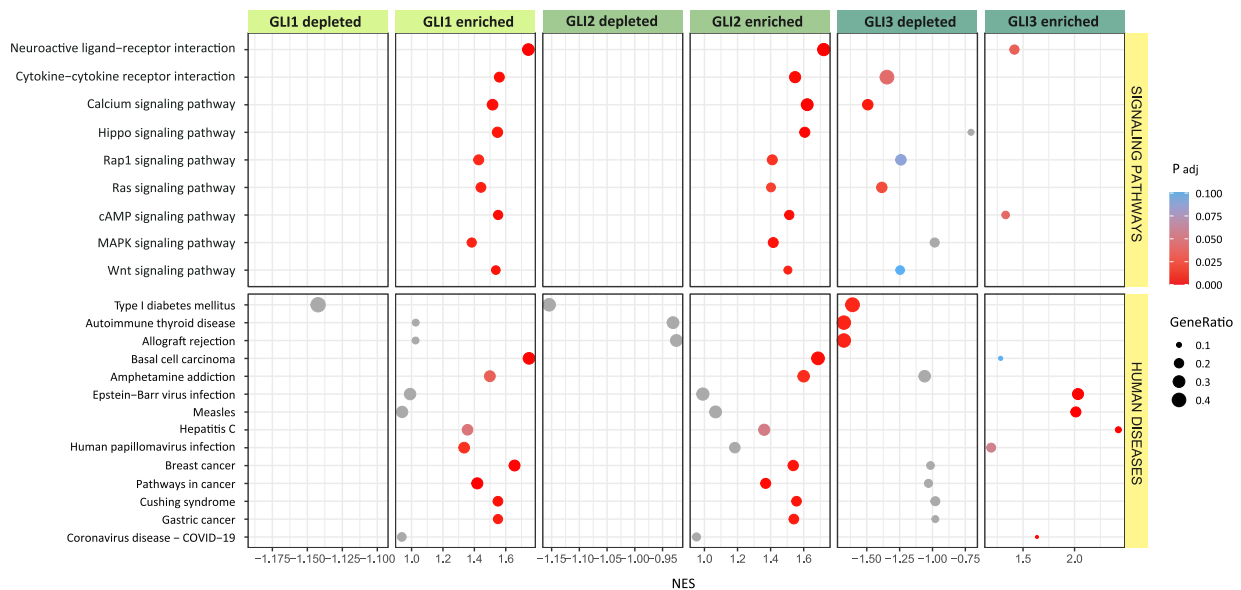
<b>GEN</b>	<b>puno ime proteina</b>	<b>logFC</b>	<b>FDR</b>
<i>GLI3</i>	GLI Family Zinc Finger 3	6.20	1.38E-06
<i>FLG</i>	Filaggrin	5.38	9.03E-05
<i>RSAD2</i>	Radical S-Adenosyl Methionine Domain Containing 2	5.30	0.00061
<i>XAF1</i>	XIAP Associated Factor 1	5.13	0.003045
<i>MMP13</i>	Matrix Metalloproteinase 13	4.12	0.005245
<i>OAS2</i>	2'-5'-Oligoadenylate Synthetase 2	4.0	0.000518
<i>CXCL10</i>	C-X-C Motif Chemokine Ligand 10	3.85	0.000518
<i>HRH3</i>	Histamine Receptor H3	3.76	0.003003
<i>IFI44L</i>	Interferon Induced Protein 44 Like	3.73	0.000979
<i>OASL</i>	2'-5'-Oligoadenylate Synthetase Like	3.49	0.008231
<i>IFI27</i>	Interferon Alpha Inducible Protein 27	3.35	0.005819
<i>MMP10</i>	Matrix Metalloproteinase 10	3.18	0.007437
<i>IFIT1</i>	Interferon Induced Protein With Tetratricopeptide Repeats 1	3.06	0.002696
<i>P2RY6</i>	Pyrimidinergic Receptor P2Y6	2.76	0.003475
<i>OAS1</i>	2'-5'-Oligoadenylate Synthetase 1	2.49	0.001433
<i>UCA1</i>	Urothelial Cancer Associated 1	2.27	0.002748
<i>IFIT3</i>	Interferon Induced Protein With Tetratricopeptide Repeats 3	2.17	0.009186
<i>ADGRF1</i>	Adhesion G Protein-Coupled Receptor F1	2.10	0.0072
<i>PTH1H</i>	Parathyroid Hormone Like Hormone	1.83	0.005627
<i>ANGPTL4</i>	Angiopoietin Like 4	1.80	0.001216

Kako bi se provjerila uloga gena čija je ekspresija promijenjena u stanicama s prekomjernom ekspresijom proteina GLI, napravljena je analiza obogaćivanja seta gena (eng. *Gene Set Enrichment Analysis, GSEA*). Rezultati analize pokazuju da su u slučaju uzoraka s prekomjernom ekspresijom GLI1 i GLI2, geni sa značajno promijenjenom ekspresijom uključeni u signalne puteve Wnt, MAPK i RAS (oko 20-30 % gena). U slučaju uzoraka koji imaju prekomjernu ekspresiju GLI3, geni sa značajno promijenjenom ekspresijom su uključeni u procese regulacije staničnog ciklusa, u proces DNA replikacije, biogeneze ribosoma, proteasom i spliceosom (Slika 25.).

Također postoji značajna uključenost gena sa promijenjenom ekspresijom u različite vrste tumora, poput karcinoma bazalnih stanica, raka dojke te raka želuca. Zbog toga su na Slici 26. izdvojeno prikazane KEGG kategorije *Signalni putevi* i *Bolesti*.

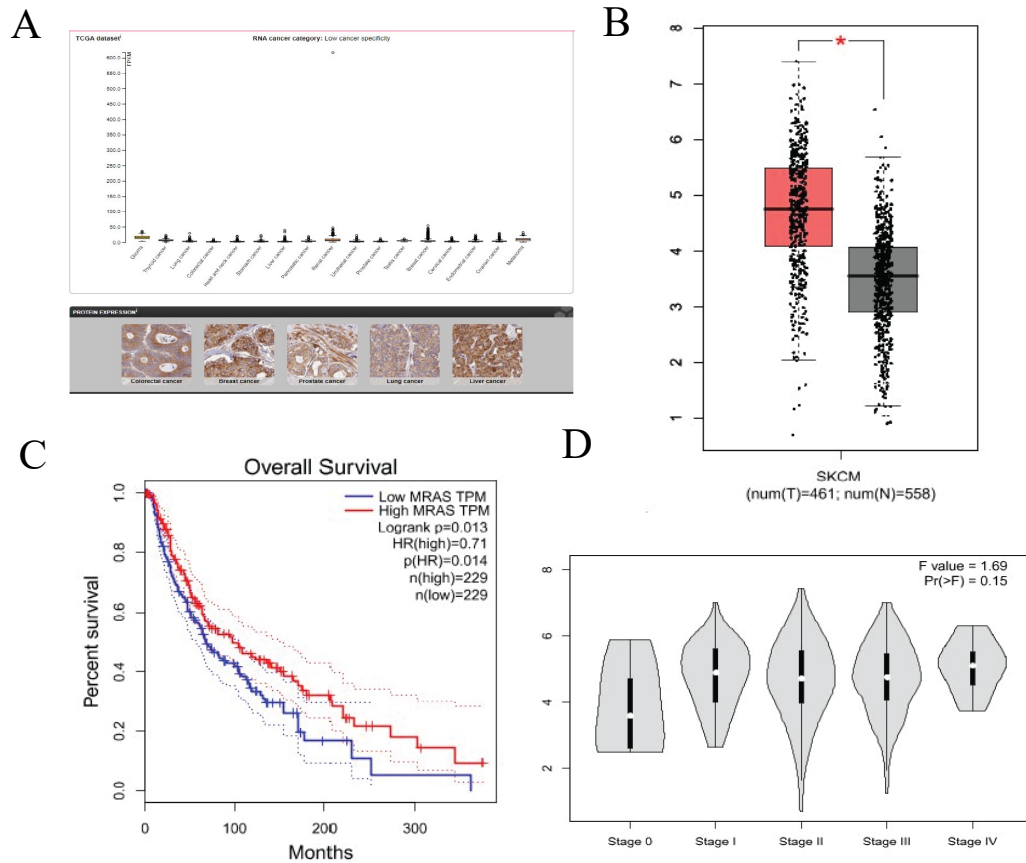


Slika 25. Analiza obogaćivanja seta gena u staničnim linijama transfeciranim s *GLI1*, *GLI2* i *GLI3*, s prikazom svih kategorija. Na y-osi su prikazane sve KEGG kategorije u kojima su geni sa značajno promijenjenom ekspresijom. Na x-osi se nalaze normalizirani rezultati obogaćivanja. Veličina kružića označava udio gena koji su značajno promijenjeni u ovim kategorijama. Boja kruga indicira statističku značajnost, gdje sivi i plavi krugovi označavaju statistički neznačajna obogaćenja, a crveni označavaju značajno obogaćivanje.



Slika 26. Analiza obogaćivanja seta gena u staničnim linijama transfeciranim s *GLI1*, *GLI2* i *GLI3*, s prikazom dvije odabrane kategorije. Gornja polovica grafikona prikazuje analizu signalnih puteva, dok donja polovica prikazuje kategorije bolesti. Na x-osi se nalaze normalizirani rezultati obogaćivanja. Veličina kružića označava udio značajno promijenjenih gena u putevima. Boja kruga indicira statističku značajnost, gdje sivi i plavi krugovi označavaju statistički neznačajna obogaćenja, a crveni označavaju značajno obogaćivanje.

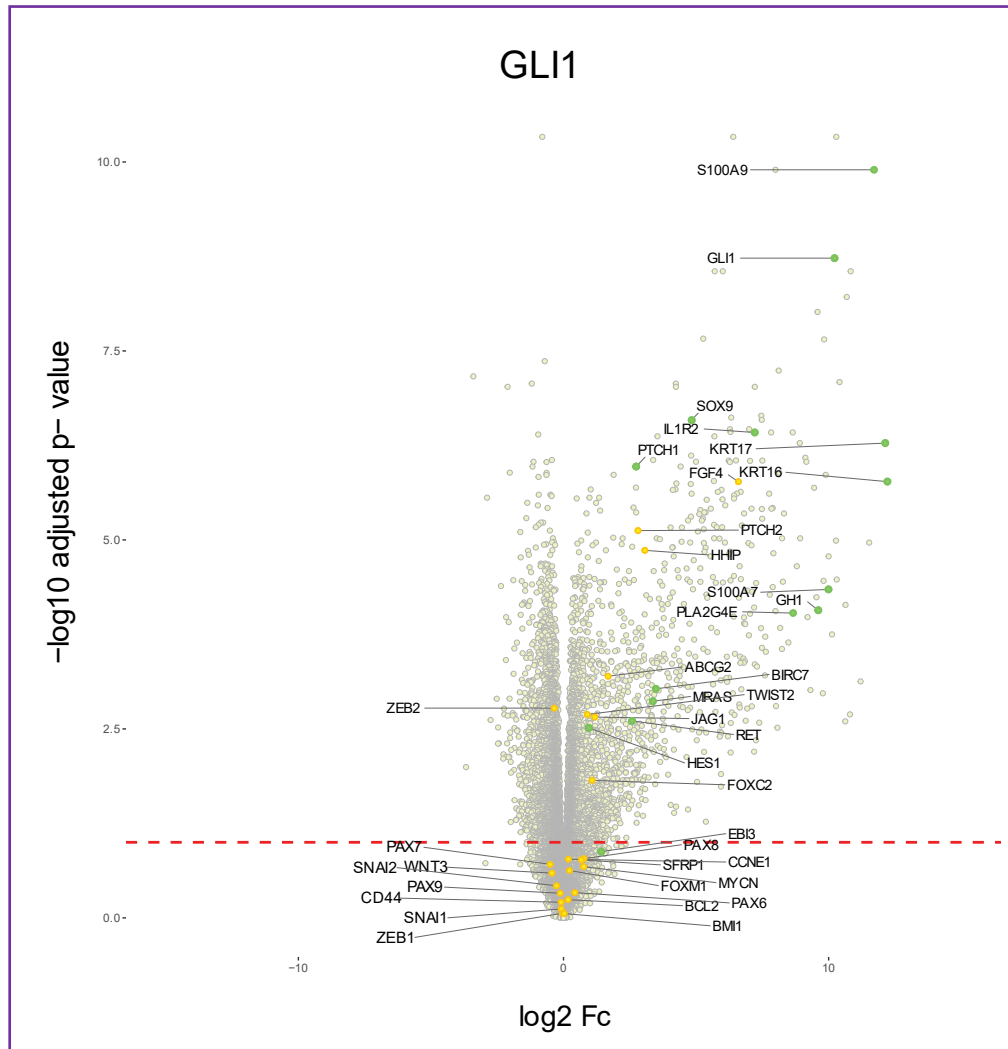
Filtracijom i probirom diferencijalno eksprimiranih gena dobivenih sekvenciranjem RNA te upotrebom online dostupnih alata navedenih i opisanih u poglavlju 3.2.4., odabrano je 12 ciljnih gena za daljnju bioinformatičku analizu. Primjer takvog probira na temelju analiza podataka iz dostupnih baza prikazan je Slikom 27. za gen *MRAS*.



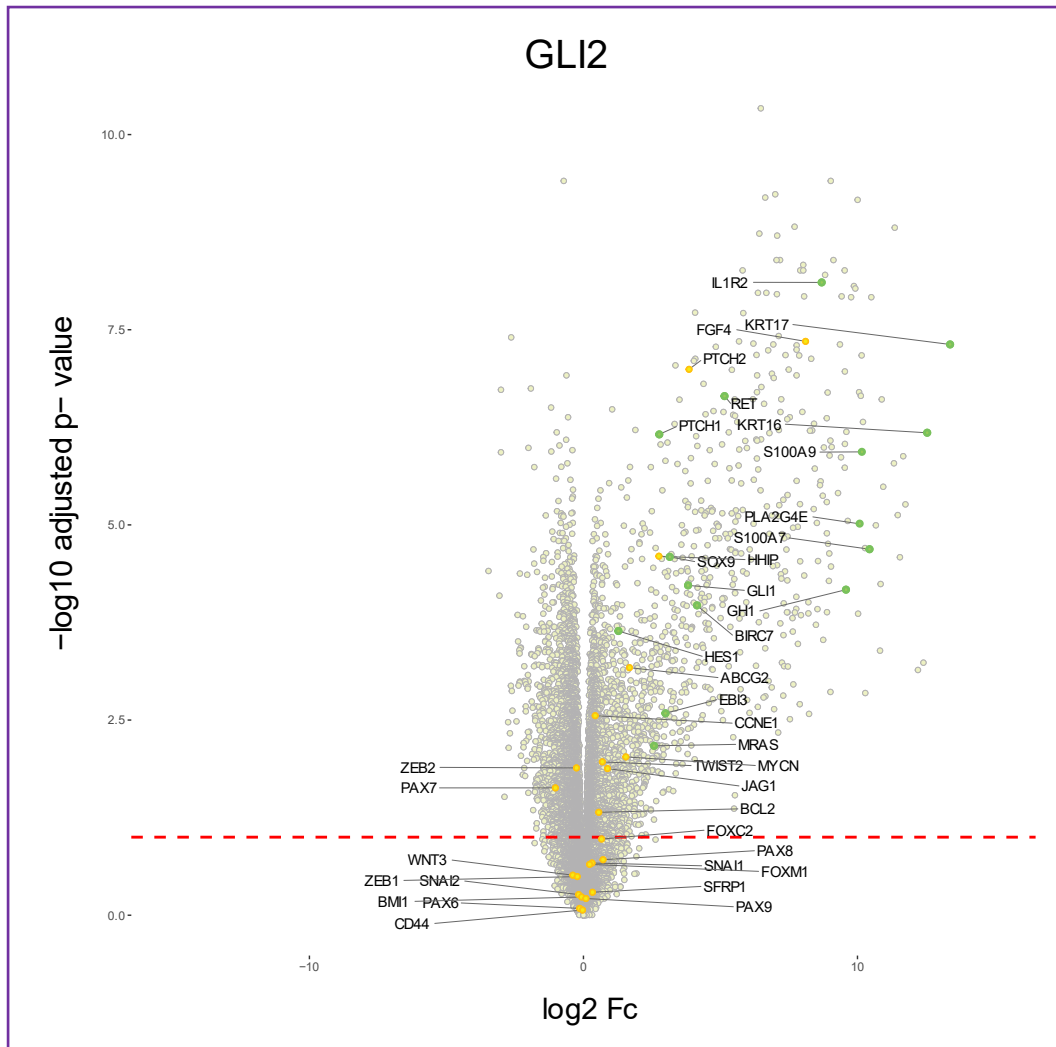
Slika 27. Primjer analiza podataka iz javnih baza za gen MRAS. A) Primjeri ekspresije RNA i imunohistokemijskog bojanja MRAS u različitim tipovima tumora (melanom je predstavljen zadnjim stupcem) iz baze The Human Protein Atlas. B) Ekspresija gena MRAS u melanomu (crveno) u usporedbi sa ekspresijom u zdravoj koži (sivo) iz baze GEPIA. C) Krivulja preživljenja pacijenata s melanomom iz baze GEPIA. D) Prikaz ekspresije gena MRAS po stadijima melanoma iz baze GEPIA.

Dijagrami „vulkana“ prikazuju rezultate diferencijalne ekspresije gena za svaki protein GLI zasebnim grafom. Na dijagramu se statistički najznačajnije promjene nalaze u gornjoj desnoj ili gornjoj lijevoj polovici (ovisno je li došlo do povećanja ili smanjenja u ekspresiji). Sa dijagrama su vidljivi položaji odabranih 12 ciljnih gena proteina GLI u odnosu na ostale gene dobivene sekvenciranjem RNA te u odnosu na gene koji se u literaturi spominju kao ciljani geni proteina GLI. U slučaju GLI1 (Slika 28.) značajne promjene u ekspresiji utvrđene su za gene *S100A9*, *GLI1*, *SOX9*, *IL1R2*, *KRT16*, *KRT17*, *PTCH1*, *PTCH2*, *S100A7*, *GHI*, *PLA2G4E*. U slučaju GLI2 (Slika 29.) značajne promjene u ekspresiji utvrđene su za gene *IL1R2*, *KRT17*, *FGF4*, *PTCH2*, *RET*, *KRT16*, *S100A7*, *PTCH1*, *PLA2G4E*, *S100A7*, *SOX9*, *GLI1*, *GHI*,

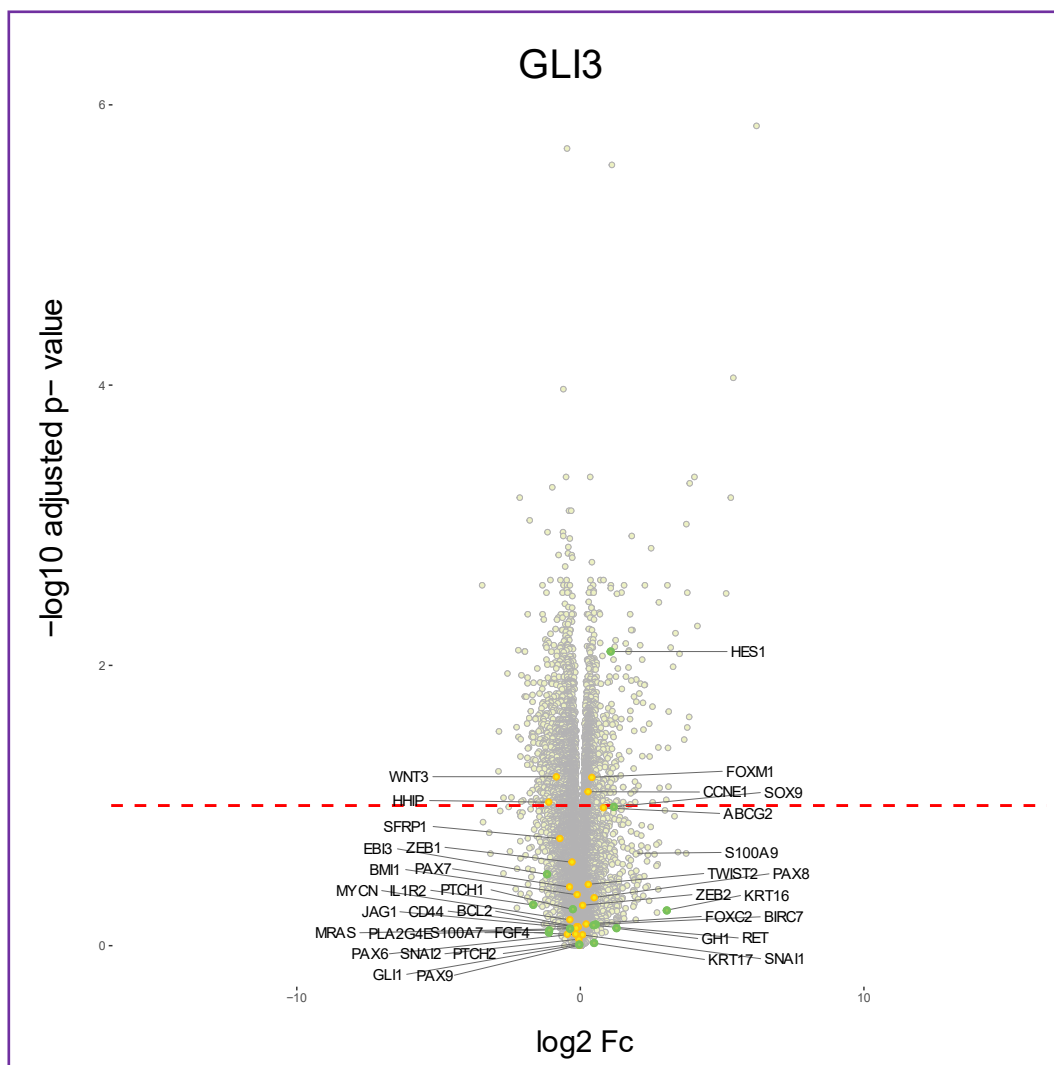
*BIRC7*. Usporedbom ova dva dijagrama vidljivo je da je većina identificiranih gena za GLI1 i GLI2 preklapajuća te da GLI2 ima nešto više ciljnih gena od GLI1. U slučaju GLI3 (Slika 30.) značajnu promjenu u ekspresiji ima novo identificirani ciljni gen *HES1*. Vidljivo je s dijagrama da GLI3 ima znatno manje ciljnih gena od GLI1 i GLI2.



Slika 28. Prikaz rezultata diferencijalne ekspresije gena za GLI1 u obliku dijagrama „vulkana“. Na x-osi su prikazane vrijednosti promijenjene ekspresije gena ( $\log_2 F_c$ ), a na y-osi prilagođene p-vrijednosti na logaritamskoj skali po bazi 10. Ciljni geni GLI1 identificirani našim sekvenciranjem RNA i odabrani za validaciju označeni su zelenim točkama, dok su prethodno identificirani geni (geni poznati iz literature) označeni žutim točkama. Geni koji se nalaze na lijevoj strani dijagrama imaju sniženu razinu ekspresije u odnosu na kontrolu, a geni sa desne strane dijagrama imaju povećanu ekspresiju u odnosu na kontrolu. Točke koje se nalaze ispod crvene isprekidane crte predstavljaju gene čija razina ekspresije nije statistički značajno promijenjena, odnosno nalazi se ispod postavljene granične vrijednosti.



Slika 29. Prikaz rezultata diferencijalne ekspresije gena za *GLI2* u obliku dijagrama „vulkana“. Na x-osi su prikazane vrijednosti promijenjene ekspresije gena ( $\log_2FC$ ), a na y-osi prilagođene p-vrijednosti na logaritamskoj skali po bazi 10. Ciljni geni *GLI2* identificirani našim sekvenciranjem RNA i odabrani za validaciju označeni su zelenim točkama, dok su prethodno identificirani geni (geni poznati iz literature) označeni žutim točkama. Geni koji se nalaze na lijevoj strani dijagrama imaju sniženu razinu ekspresije u odnosu na kontrolu, a geni sa desne strane dijagrama imaju povećanu ekspresiju u odnosu na kontrolu. Točke koje se nalaze ispod crvene isprekidane crte predstavljaju gene čija razina ekspresije nije statistički značajno promijenjena, odnosno nalazi se ispod postavljene granične vrijednosti.

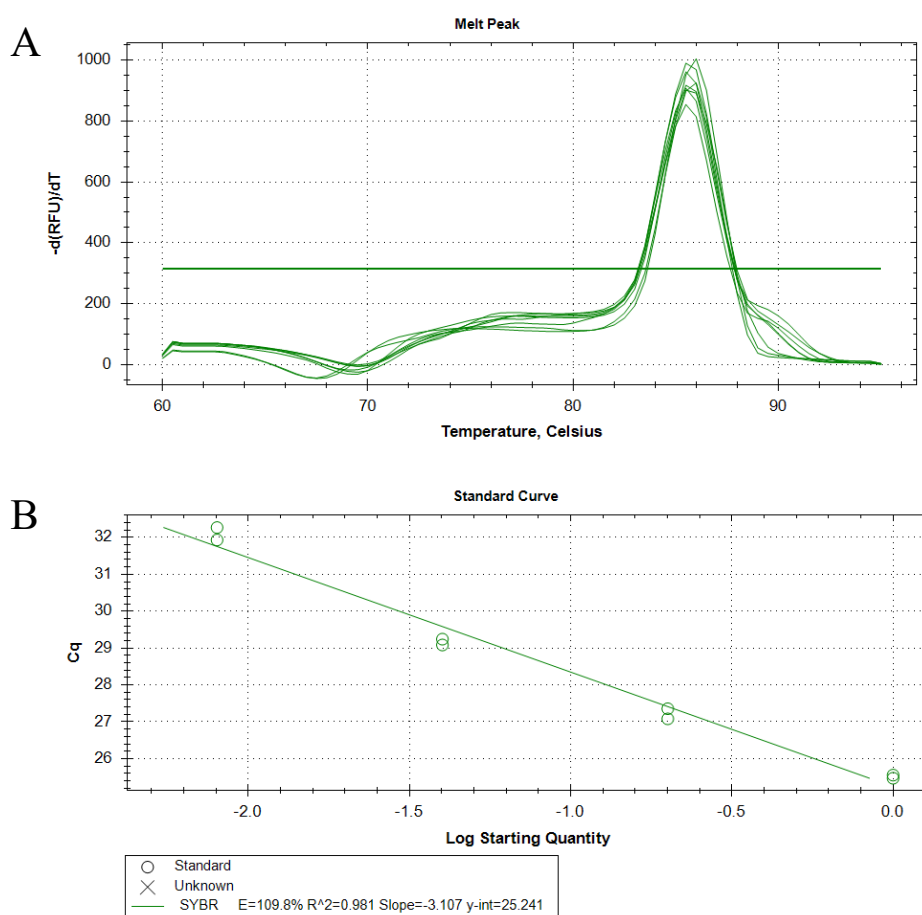


Slika 30. Prikaz rezultata diferencijalne ekspresije gena za *GLI3* u obliku dijagrama „vulkana“. Na x-osi su prikazane vrijednosti promijenjene ekspresije gena ( $\log_2FC$ ), a na y-osi prilagođene p-vrijednosti na logaritamskoj skali po bazi 10. Ciljni geni *GLI3* identificirani našim sekvenciranjem RNA i odabrani za validaciju označeni su zelenim točkama, dok su prethodno identificirani geni (geni poznati iz literature) označeni žutim točkama. Geni koji se nalaze na lijevoj strani dijagrama imaju sniženu razinu ekspresije u odnosu na kontrolu, a geni sa desne strane dijagrama imaju povećanu ekspresiju u odnosu na kontrolu. Točke koje se nalaze ispod crvene isprekidane crte predstavljaju gene čija razina ekspresije nije statistički značajno promijenjena, odnosno nalazi se ispod postavljene granične vrijednosti.

## 4.4. Validacija ciljnih gena proteina GLI

### 4.4.1. Validacija ciljnih gena metodom qPCR

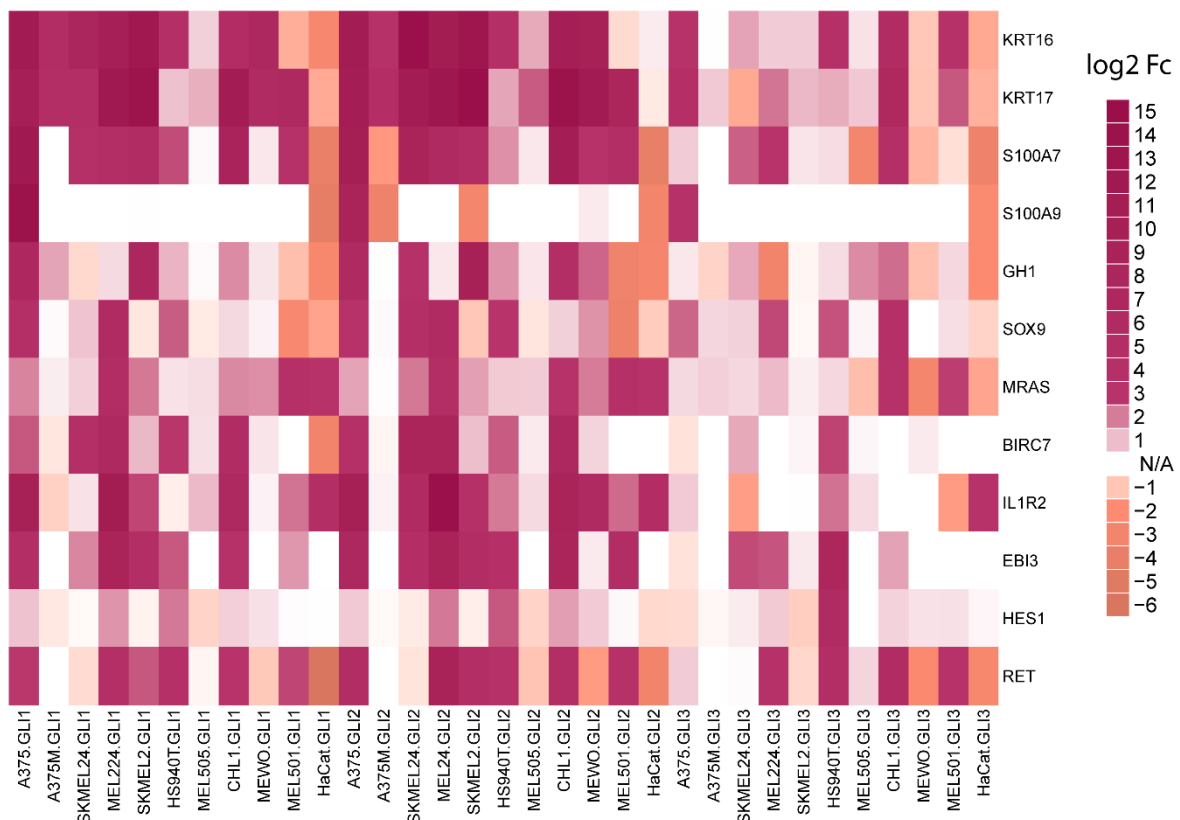
Odabranih 12 ciljnih gena proteina GLI su validirani metodom qPCR. U tu svrhu je 12 parova početnica za 12 ciljnih gena dizajnirano i optimizirano za korištenje *SYBR Green* metodom. Uspješnost početnica zatim je analizirana u programu *Bio-Rad CFX Manager (Bio-Rad)* pri čemu je promatran nagib pravca iz kojeg se računa učinkovitost same reakcije, vrijednost  $R^2$  te krivulja mekšanja. Na Slici 31. su prikazane krivulja mekšanja i baždarni pravac za gen *MRAS*.



Slika 31. Rezultati optimizacije početnica za qPCR za ciljni gen *MRAS*. A) Primjer krivulje mekšanja analizirane u programu *Bio-Rad CFX Manager*. Krivulja ima oblik jedinstvenog vrha bez popratnih vrhova koje mogu upućivati na nespecifične produkte. B). Prikaz standardnog (baždarnog) pravca dobivenog na temelju serijskih razrjeđenja cDNA.



Slika 32. prikazuje rezultate validacije 12 ciljnih gena proteina GLI: *KRT16*, *KRT17*, *S100A7*, *S100A9*, *GH1*, *SOX9*, *MRAS*, *BIRC7*, *IL1R2*, *EBI3*, *HES1* i *RET*. Ciljni geni su validirani na 11 staničnih linija (od toga 10 melanomskih i jedne linije keratinocita) s prekomjerno eksprimiranim proteinima GLI1, GLI2, GLI3, u odnosu na netransfecirane stanice: A375, A375M, SKMEL24, MEL224, SKMEL2, HAS940.T, MEL505, CHL-1, MEWO, MEL501 i HaCaT. Rezultati validacije metodom qPCR su prikazani u obliku toplinske mape napravljene u programu R.



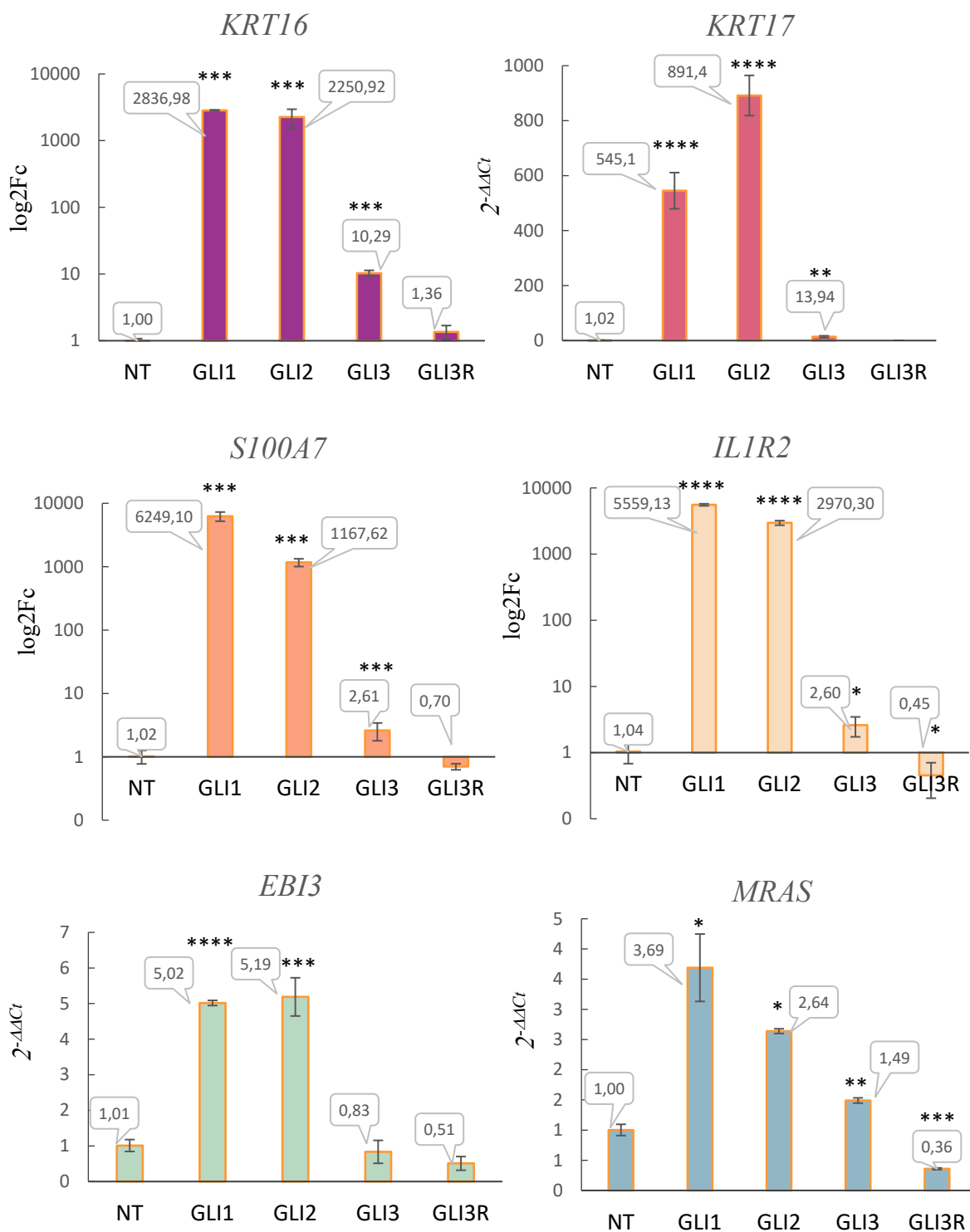
Slika 32. Validacija 12 ciljnih gena proteina GLI na 11 staničnih linija transfeciranih sa ekspresijskim vektorima za GLI1, GLI2 i GLI3. Validacija je provedena metodom qPCR i prikazana toplinskom mapom. Razina relativne ekspresije gena je određena koristeći metodu  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ , a prikazane su vrijednosti  $\log_2 F_c$ . Gradijentom ljubičaste boje su prikazani geni sa povećanom ekspresijom, a gradijentom narančaste geni sa smanjenom ekspresijom. N/A označava razine ekspresije koje nisu mogle biti zabilježene nakon 37. ciklusa. Kao referentni gen je korišten RPLP0.

Identificirani geni poput gena *KRT16*, *KRT17*, *S100A7*, *MRAS*, *IL1R2* i *EBI3*, pokazali su vrlo dosljedan i ujednačen uzorak ekspresije. Ekspresija gena *KRT16*, *KRT17* i *S100A7* je utvrđena u svih 11 staničnih linija. *S100A7* nije utvrđen kao ciljani gen GLI1 u linijama A375M i MEL501. Geni *BIRC7*, *GHI*, *SOX9* i *RET* u većini staničnih linija imaju povišenu ekspresiju, ali je ona nešto manje ujednačena. Ekspresija gena *RET* u staničnoj liniji A375M nije mogla biti utvrđena, a u linijama MEWO i HaCaT ovaj gen ima sniženu razinu ekspresije. Zanimljivo, iako pripadaju istoj obitelji proteina S100, gen *S100A7* ima vrlo ujednačenu ekspresiju kroz stanične linije, dok rezultati validacije pokazuju da je gen *S100A9* eksprimiran u samo jednoj staničnoj liniji melanoma, A375. U većini naših staničnih linija melanoma ekspresija *S100A9* nije mogla biti utvrđena.

Geni *KRT16*, *KRT17*, *S100A7*, *IL1R2*, *EBI3* i *MRAS* odabrani su za validaciju na drugim staničnim modelima. U Tablici 18. navedene su njihove funkcije i dosad opisane uloge u karcinomima. Kako bi se naglasilo koliko je ekspresija navedenih gena zaista visoka, na Slici 34. su prikazane relativne ekspresije u staničnoj liniji A375. Na istoj slici je ujedno prikazana ekspresija tih gena uslijed prekomjerne ekspresije stanica s represorskim oblikom proteina GLI3 (GLI3R). Rezultati pokazuju da su povećanja u razinama ekspresija svih ispitanih gena statistički značajne, s iznimkom promjene ekspresije gena *EBI3* u slučaju prekomjerne ekspresije GLI3.

Tablica 18. Prikaz funkcija i dosad poznatih uloga u karcinomu za 6 ciljnih gena proteina GLI pronađenih u literaturi.

Gen	Funkcija	Poznate uloge u karcinomu
<i>KRT16</i>	keratin tipa I koji regulira urođeni imunitet kao odgovor na probijanje kožne barijere	regulira imunološki odgovor, metastaziranje, otpornost na lijekove kod melanoma, SCC i raka dojke
<i>KRT17</i>	keratin tipa I uključen u regulaciju sinteze proteina i rasta epitelnih stanica	regulira otpornost na terapiju, proliferaciju, migraciju i invaziju kod CRC-a, raka gušterače i NSCLC-a
<i>S100A7</i>	član obitelji proteina S100 uključenih u regulaciju staničnog ciklusa i diferencijaciju	regulira invaziju tumora, angiogenezu, migraciju, EMT i kemorezistenciju kod melanoma, raka vrata maternice i jajnika
<i>IL1R2</i>	citokinski receptor koji pripada obitelji receptora interleukina 1	regulira proliferaciju, angiogenezu i inicijaciju tumorigeneze kod raka dojke, melanoma, raka želuca
<i>EBI3</i>	sekretorni glikoprotein koji pripada obitelji receptora hematopoetina	prekomjerna ekspresija <i>EBI3</i> povezana je s lošom prognozom raka dojke i raka vrata maternice te oslabljenim imunološkim odgovorom kod melanoma
<i>MRAS</i>	Ras GTPaza koja funkcionira kao pretvarač signala ustaničnom rastu i diferencijaciji	regulira put MAPK i pokreće tumorigenezu kod raka želuca i raka prostate



Slika 33. Relativne ekspresije gena *KRT16*, *KRT17*, *S100A7*, *IL1R2*, *EBI3* i *MRAS* u staničnoj liniji A375 dobivene metodom qPCR. Ekspresije gena *KRT16*, *S100A7* i *IL1R2* su prikazane logaritamskom skalom. \*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*,  $p < 0,0001$ .

#### 4.4.2. Validacija ciljnih gena imunofluorescentnim bojanjem stanica

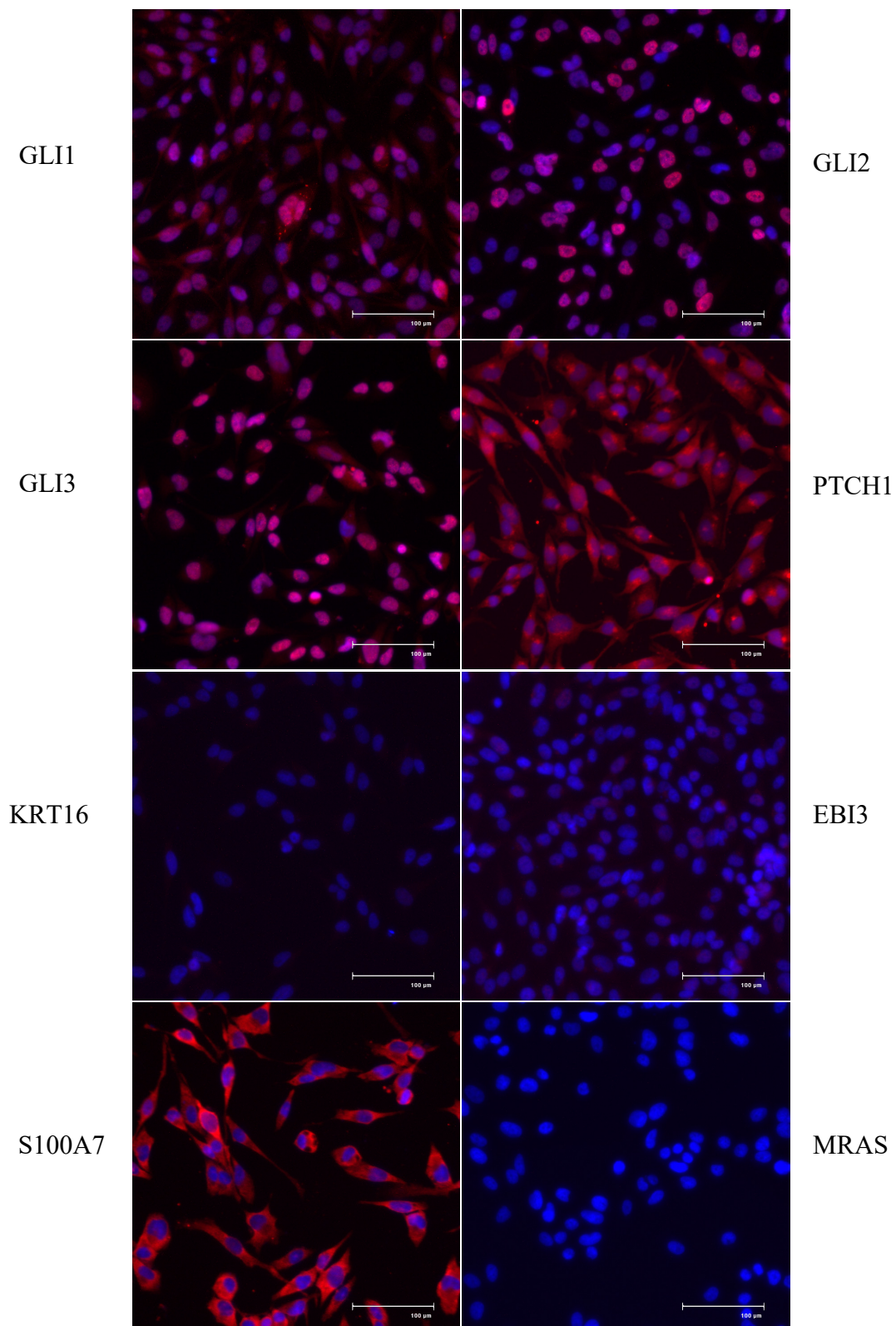
Ekspresija proteina KRT16, EBI3, S100A7 i MRAS određena je u staničnim linijama A375, CHL-1, MEL224 i HaCaT metodom imunofluorescentnog bojanja stanica. U staničnoj liniji A375 (Slika 34.) ekspresija proteina GLI1 i GLI2 je nejednolika među pojedinim stanicama te je vidljivo da su oba proteina lokalizirana u jezgri. Protein GLI3 je također lokaliziran u jezgri, a njegova je ekspresija nešto jača od proteina GLI1 i GLI2. Od komponenti signalnog puta HH-GLI najjača je ekspresija proteina PTCH1. On je eksprimiran na staničnoj membrani te jače lokaliziran na strukturi uz jezgru koja odgovara Golgijevom aparatu. Ekspresija ciljnih proteina KRT16, EBI3 i MRAS nije uočena, dok najjaču ekspresiju ima S100A7, a lokaliziran je u citoplazmi.

U staničnoj liniji CHL-1 (Slika 35.) najslabiju ekspresiju ima GLI1, znatno je jače eksprimiran GLI2, a najjaču ekspresiju imaju ponovno GLI3 i PTCH1. Ekspresije KRT16 i MRAS nisu uočene, dok je ekspresija EBI3 vrlo slaba, ali vidljiva u citoplazmi. I u ovoj staničnoj liniji S100A7 ima vrlo jaku ekspresiju u citoplazmi.

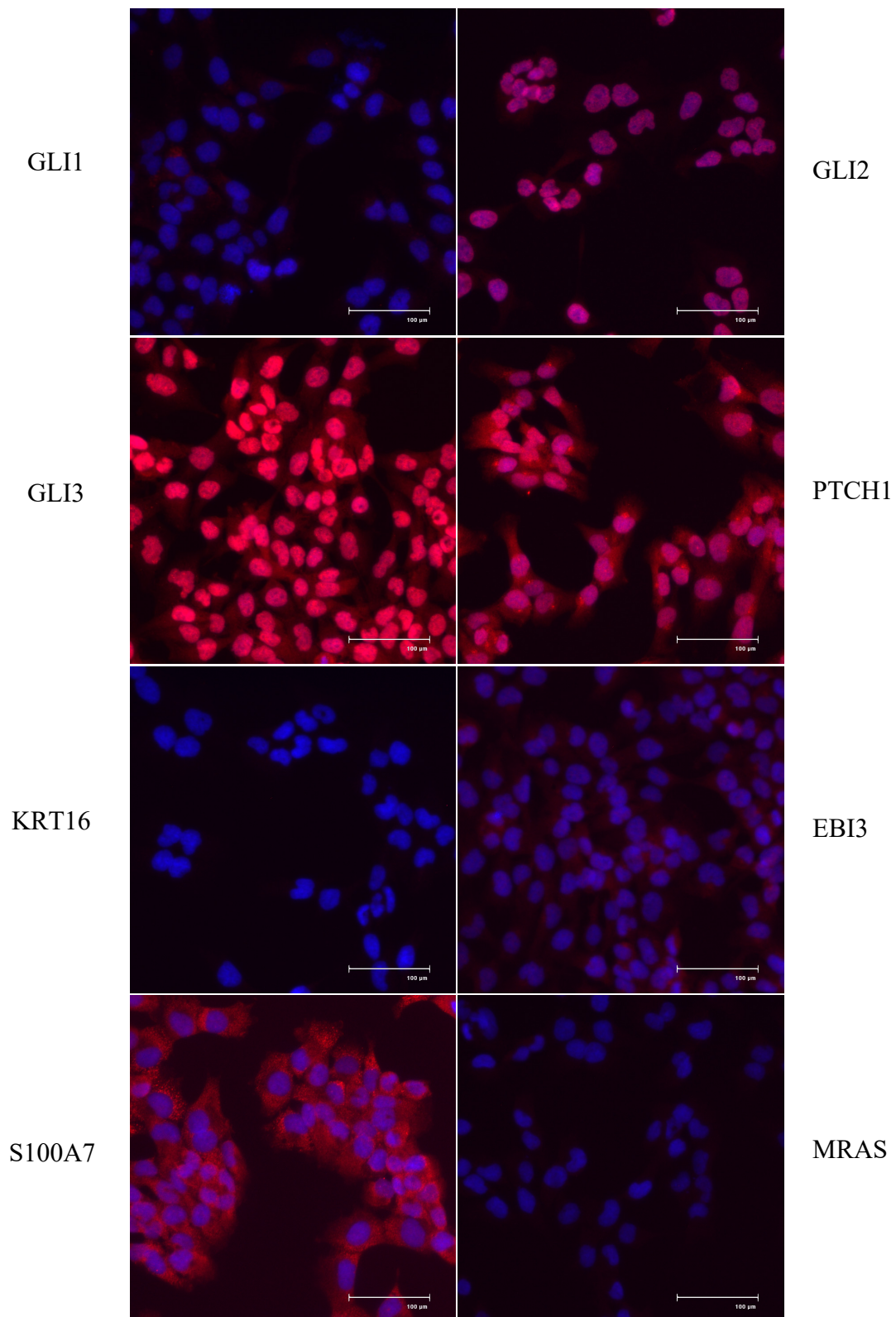
U staničnoj liniji MEL224 (Slika 36.) najslabija je ekspresija proteina GLI1, dok je ekspresija GLI2 nešto jača, ali nejednolika među pojedinim stanicama. Najjače su ekspresije proteina GLI3 i PTCH1. Protein GLI3 je lokaliziran u jezgrama stanica dok PTCH1, kao i u prethodne dvije linije, pokazuje membransko bojanje s jačim signalom u Golgijevom aparatu. Ekspresije KRT16, EBI3 i MRAS nisu uočene, dok nešto jaču ekspresiju ima S100A7 u citoplazmi.

U staničnoj liniji imortaliziranih keratinocita, HaCaT, (Slika 37.) proteini GLI1 i GLI3 imaju nešto jaču ekspresiju od GLI2 koji je gotovo neprimjetan. Zanimljivo, ekspresija proteina PTCH1 nije jaka kao u ostalim staničnim linijama. Također, ne postoje nikakve naznake ekspresije KRT16, EBI3 i MRAS, no ekspresija S100A7 je jaka i u ovoj staničnoj liniji.

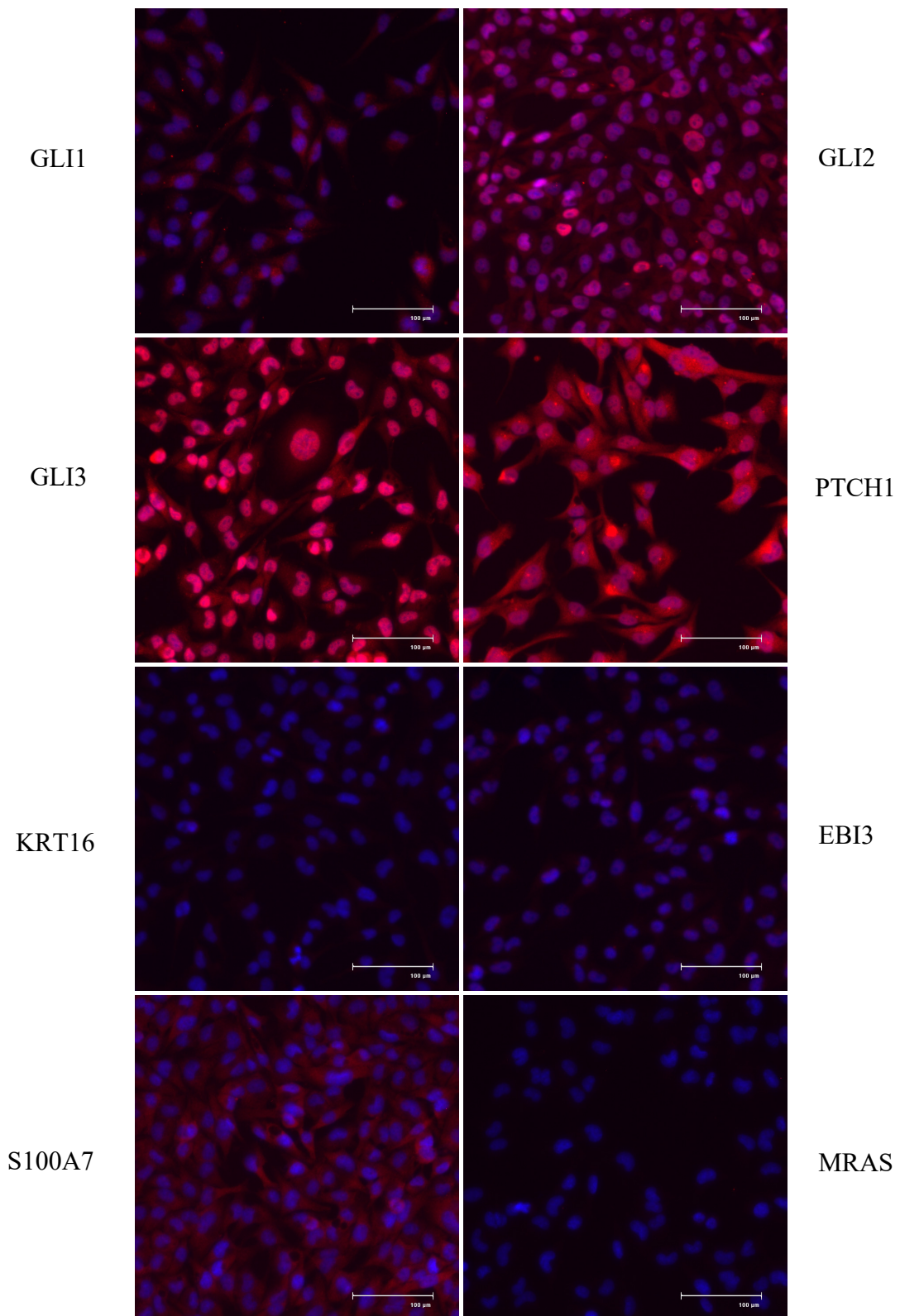
Gledajući sve četiri linije zajedno, može se zaključiti da od proteina GLI najjaču ekspresiju u svim staničnim linijama ima GLI3, dok od njihovih ciljnih proteina S100A7 ima ujednačenu i uvijek poprilično jaku ekspresiju, kao i PTCH1 s iznimkom u liniji HaCaT. Ekspresija proteina KRT16, EBI3 i MRAS nije primijećena ni u jednoj liniji, osim vrlo slabe ekspresije EBI3 u liniji A375.



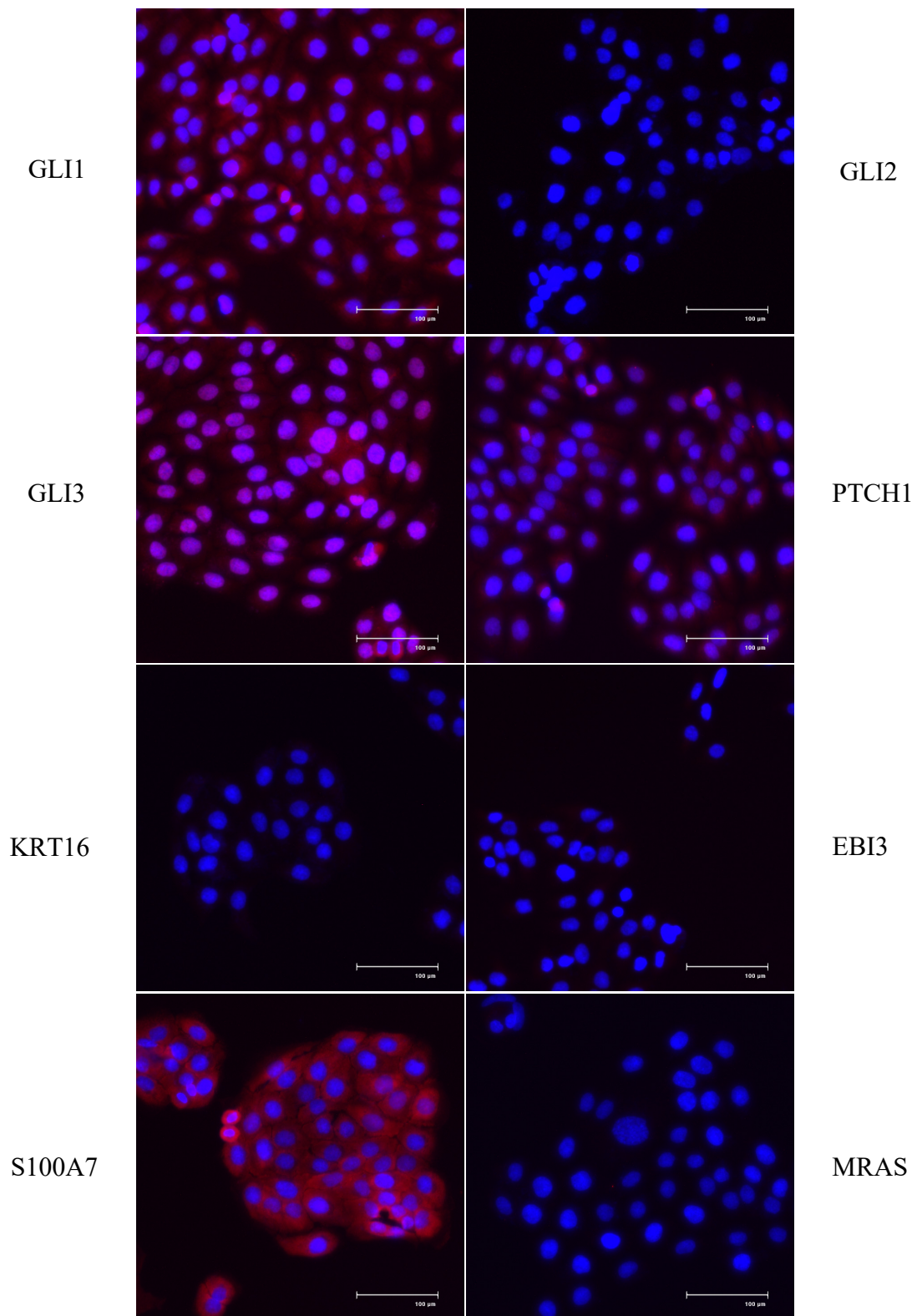
*Slika 34. Imunofluorescentno bojanje stanica na staničnoj liniji A375. Proteini od interesa obilježeni su crvenom bojom, dok su jezgre obojane plavom. Skala predstavlja 100 µm.*



*Slika 35. Imunofluorescentno bojanje stanica na staničnoj liniji CHL-1. Proteini od interesa obilježeni su crvenom bojom, dok su jezgre obojane plavom. Skala predstavlja 100 µm.*



*Slika 36. Imunofluorescentno bojanje stanica na staničnoj liniji MEL224. Proteini od interesa obilježeni su crvenom bojom, dok su jezgre obojane plavom. Skala predstavlja 100 µm.*

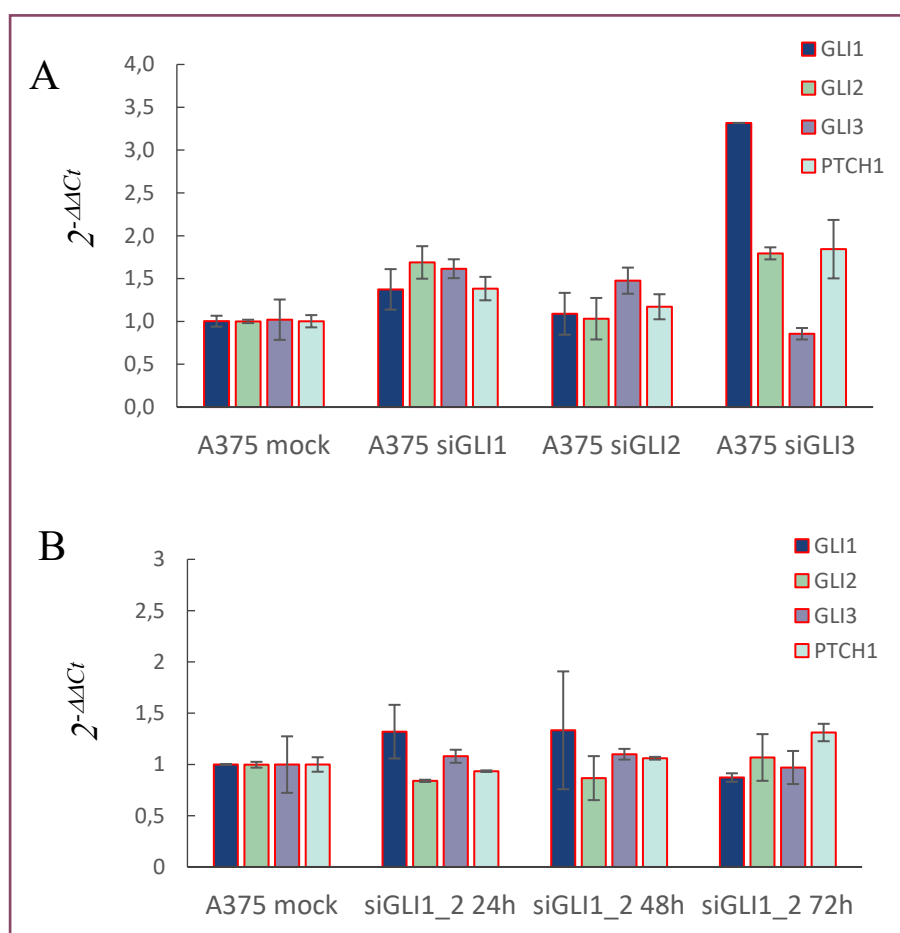


*Slika 37. Imunofluorescentno bojanje stanica na liniji HaCaT. Proteini od interesa obilježeni su crvenom bojom, dok su jezgre obojane plavom. Skala predstavlja 100 µm.*



#### 4.5. Utišavanje ekspresije gena *GLI* pomoću siRNA

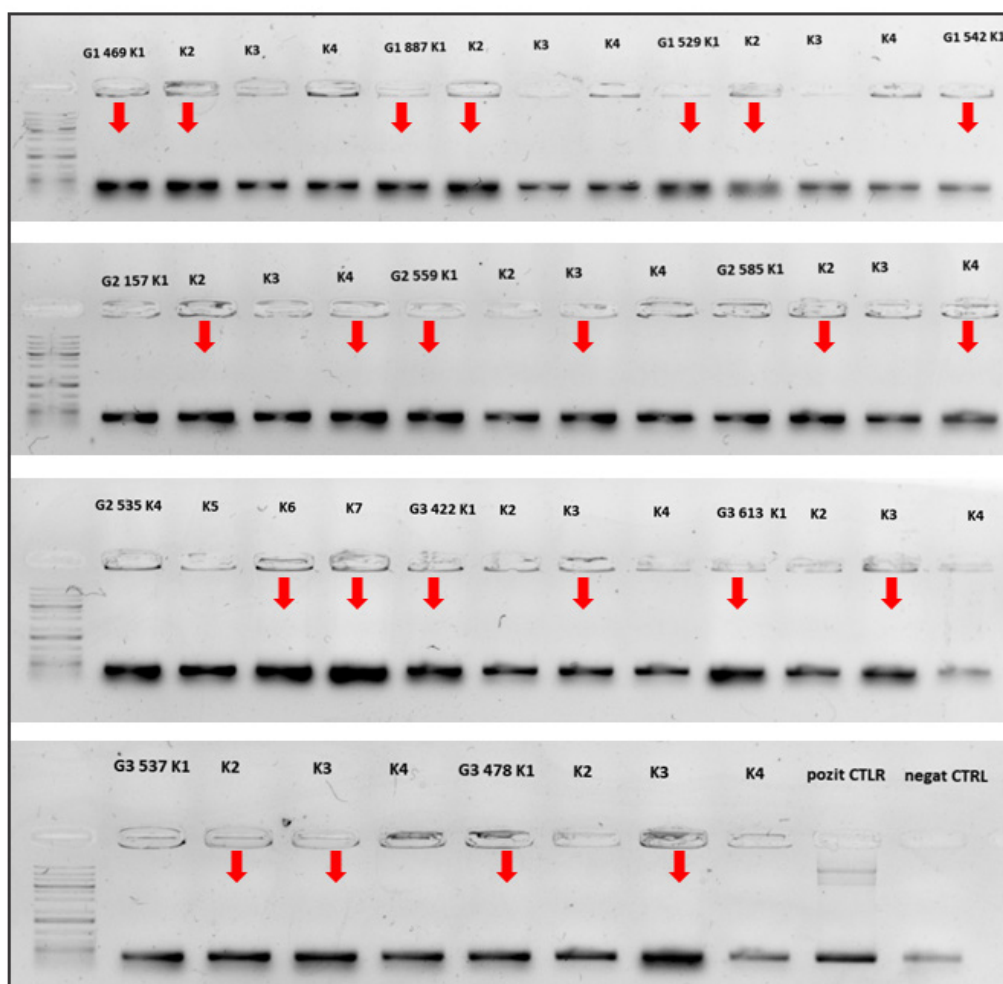
Utišavanje ekspresije gena *GLI* napravljeno je pomoću molekula malih interferirajućih RNA (eng. *Small Interfering RNA, siRNA*), u staničnoj liniji A375. Nakon provjere razina ekspresije gena *GLI1*, *GLI2* i *GLI3* primijećeno je da utišavanje nije bilo uspješno (Slika 38., A). Moguće objašnjenje je međuodnos i interakcija između GLI proteina zbog koje, uslijed inaktivacije ili nedostatka jednog od njih, preostali proteini GLI kompenziraju i potiču njegovu transkripciju. Iz tog je razloga pokušano utišavanje sva tri gena *GLI* odjednom (nije prikazano) te utišavanje gena *GLI1* i *GLI2* u istoj reakciji (Slika 38., B), budući da su *GLI1* i *GLI2* glavni transkripcijski aktivatori. Međutim niti kombinirano utišavanje nije rezultiralo sniženjem razine ekspresije gena *GLI*, tako da ovaj eksperimentalni model nije dalje korišten za validaciju.



Slika 38. Relativne ekspresije gena *GLI* nakon utišavanja pomoću siRNA u staničnoj liniji A375. A) rezultati utišavanja pojedinačnih gena *GLI* nakon 72 sata. B) Kombinirano utišavanje gena *GLI1* i *GLI2*.

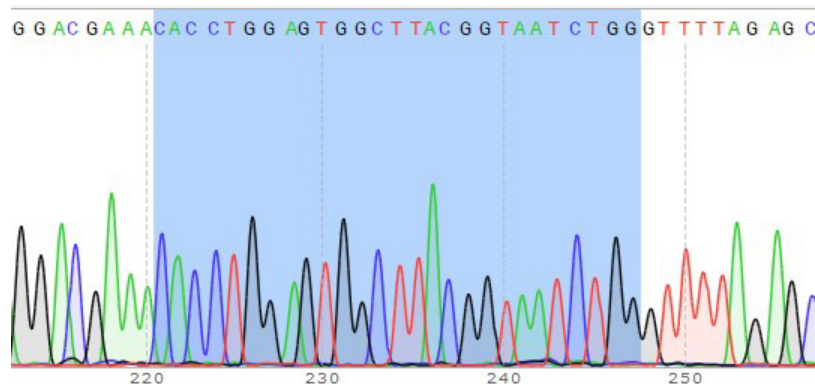
#### 4.6. Primjena tehnologije CRISPR/Cas9 za potpuno uklanjanje gena *GLI*

Budući da se nije moglo provesti utišavanje gena *GLI* pomoću siRNA, odlučeno je da će se pokušati potpuno ukloniti geni *GLI* iz genoma stanica, korištenjem tehnologije CRISPR/Cas9. Po četiri sekvence sgRNA za svaki od gena *GLI* (*GLI1*, *GLI2* i *GLI3*) odabrane su za navođenje pX330-Cas9 na ciljna mjesta u genomu stanica melanoma čovjeka. Po dvije sgRNA imale su vezna mjesta ispred sekvence ATG svakoga od gena, a po dvije sgRNA imale vezna mjesta unutar ili u neposrednoj blizini UTR regije na 3'- kraju gena. Popis sekvenci svih sgRNA nalazi se u Tablici 6. Na Slici 39. je prikazan agarozni gel nakon PCR-a na 45 bakterijskih kolonija kako bi se ispitala ispravna ugradnja sgRNA u vektor pX330-Cas9.



Slika 39. Prikaz agaroznog gela nakon PCR-a na kolonijama u svrhu potvrde ispravne ugradnje sgRNA u vektor pX330-Cas9. Crvenim strjelicama su označene kolonije koje su odabrane za sekvenciranje po Sangeru.

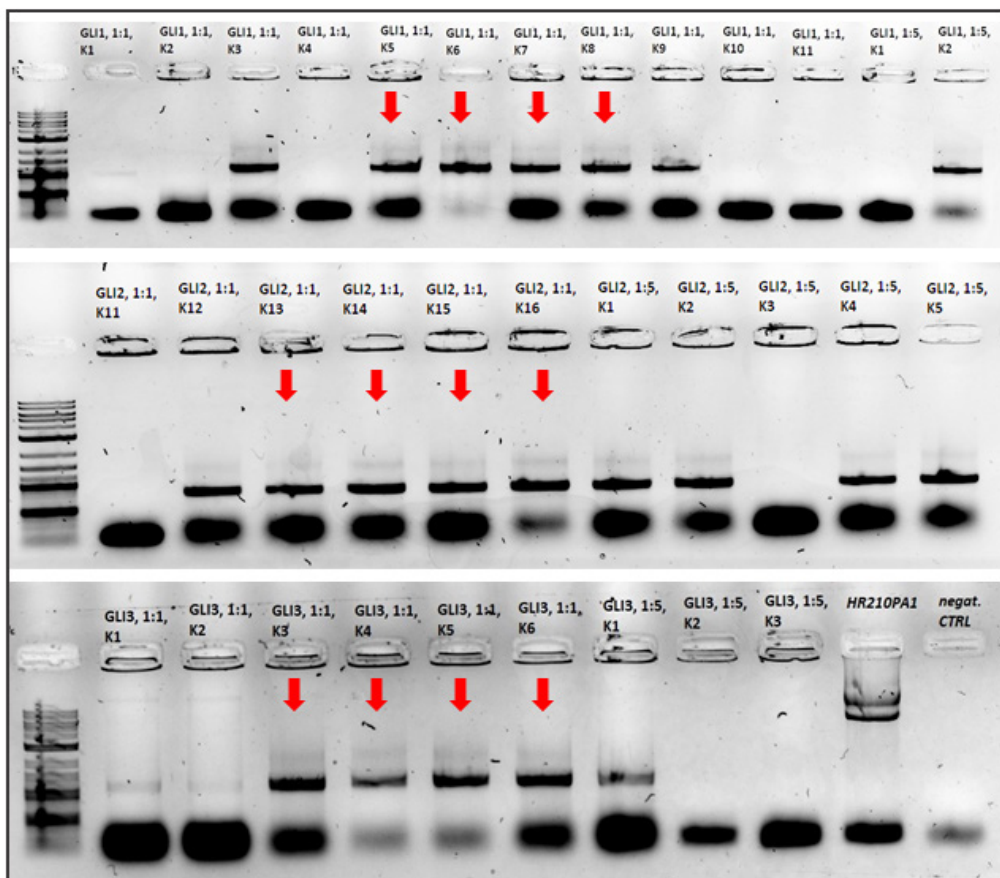
23 kolonije vidljive na gelu odabrane su za sekvenciranje po Sangeru te je iz njih izolirana plazmidna DNA.



Slika 40. Primjer kromatograma jedne od sgRNA za gen *GLI3* (sgRNA *GLI3* 613 K1) prikazane u programu Snap Gene nakon sekvenciranja po Sangeru. Plavom bojom je obilježena sekvenca sgRNA omeđena okosnicom vektora.

Od 23 kolonije koje su sekvencirane, ispravne sljedove i orijentaciju u vektoru pX330-Cas9 nakon ugradnje imale su sgRNA: *GLI1* 469 K1, *GLI1* 529 K3, *GLI1* 887 K2, *GLI1* 542 K1, *GLI2* 157 K4, *GLI2* 569 K3, *GLI2* 585 K2, *GLI2* 535 K6, *GLI3* 422 K1, *GLI3* 537 K2, *GLI3* 613 K1, *GLI3* 473 K3.

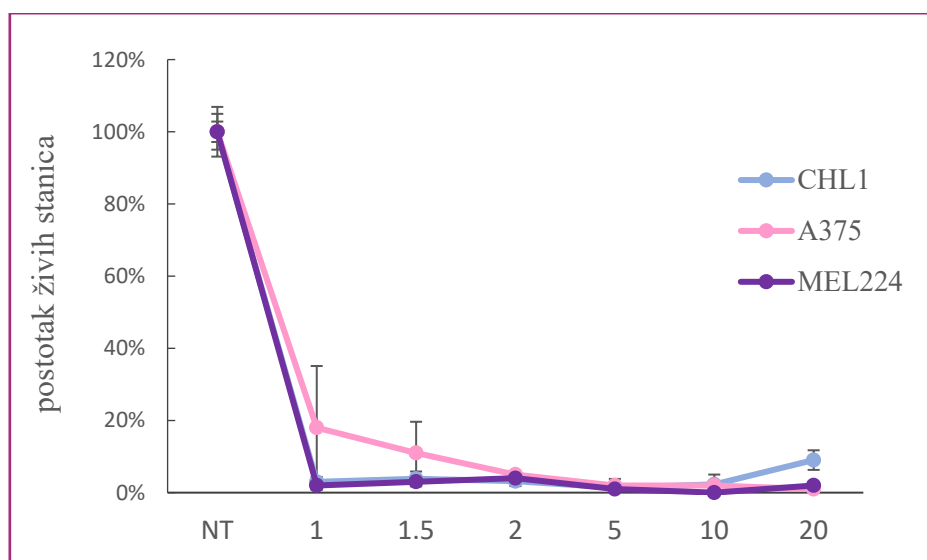
Nakon uspješnog kloniranja sgRNA u vektor pX330-Cas9 bilo je potrebno osigurati specifičnost ugradnje donorske kazete vektora HR210PA-1/GFP/Puro na mjesto gena koji se želi izrezati iz genoma. Kako bi došlo do homologne rekombinacije, u vektor su metodom restrikcije i ligacije ugrađene dvije regije homologije čiji sljedovi odgovaraju ciljnim sljedovima u genomu, ispred i iza završetka gena. Nakon transformacije *DH5α* bakterija gotovim vektorom, napravljen je PCR na bakterijskim kolonijama. Očekivane veličine ugrađenih 5'- regija bile su 1255 pb za *GLI1*, 823 pb za *GLI2* te 1266 pb za *GLI3*. U svrhu provjere ispravne orijentacije tih regija, za svaki protein *GLI* po četiri kolonije koje su rezultirale pozitivnim signalima na agaroznom gelu, odabrane su za sekvenciranje po Sangeru (Slika 41.) Prikazan je primjer za ugradnju regija homologije na 5'-kraju gena *GLI1*, *GLI2* i *GLI3*.



Slika 41. Agarozni gel nakon PCR-a na bakterijskim kolonijama u slučaju ugradnje regije homologije na 5'-kraju gena. Za svaki protein GLI po četiri kolonije koje su rezultirale pozitivnim signalima na gelu, odabrane su za sekvenciranje po Sangeru.

Sekvenciranje po Sangeru je pokazalo da je insert ugrađen u vektor u ispravnoj orijentaciji kod kolonije K7 za GLI1, kolonija K15 i K16 za GLI2 te kolonija K3, K4 i K6 za GLI3. Za svaki protein GLI odabrana je po jedna bakterijska kolonija iz koje je izolirana plazmidna DNA i koja je zatim podvrgnuta restrikciji i ligaciji kako bi se na isti način ugradila 3' - regija homologije. Ispravnost ugradnje regije homologije na 3'- kraju gena je testirana jednako, a rezultati nisu prikazani zasebno slikom.

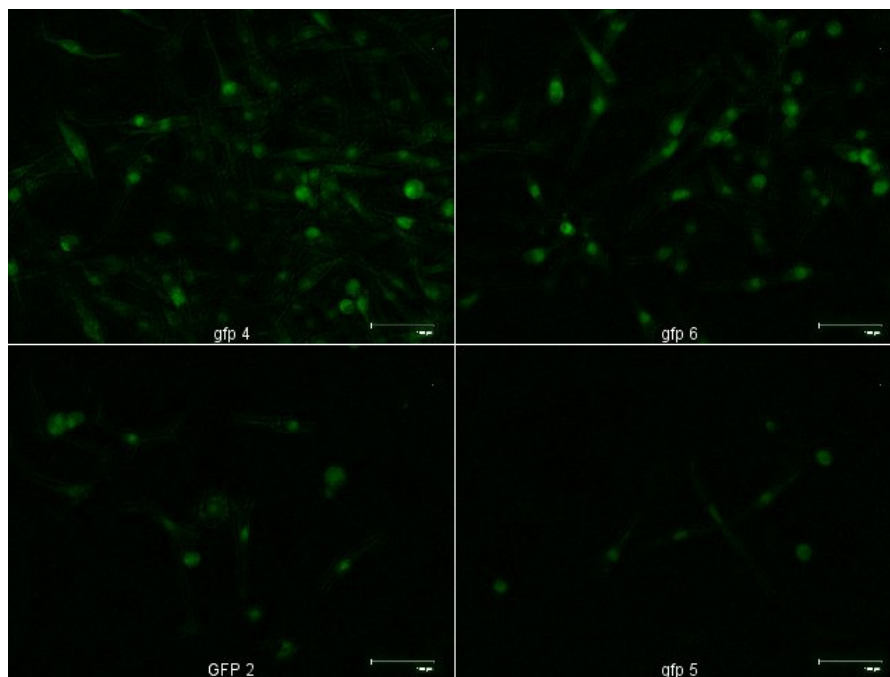
Prije unosa vektora potrebnih za potpuno uklanjanje gena *GLI* iz genoma stanica, bilo je potrebno odrediti dozu antibiotika puromicina koja će se koristiti za selekciju stanica kojima je uspješno uklonjen gen te umjesto njega ugrađena kazeta sa genom za rezistenciju na puromicin. Za selekciju je potrebno koristiti dozu koja ubija sve stanice, budući da je cilj da nijedna stanica koja nema rezistenciju na puromicin ne preživi. Iz krivulje utjecaja puromicina na preživljenje stanica linija CHL-1, A375 i MEL224 (Slika 42.) vidljivo je da je najmanja doza koja ubija sve stanice bila 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  i to za sve tri stanične linije. Ta je doza izabrana za korištenje u daljnjim eksperimentima selekcije.



Slika 42. Krivulje utjecaja antibiotika puromicina na preživljenje stanica. Plavom bojom je označena krivulja stanične linije CHL-1, narančastom A375, a zelenom stanične linije MEL224. Ispitane su doze puromicina od 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 1,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  i 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

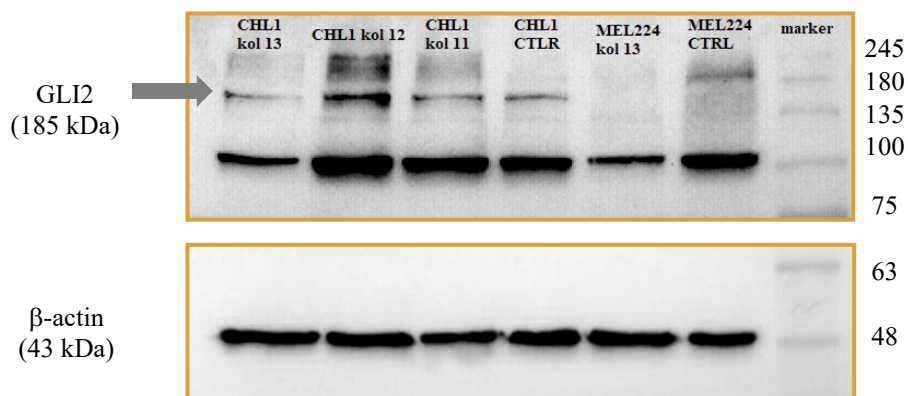
Osim rezistencije na puromicin, stanice kojima je uspješno uklonjen gen *GLI* imale su i fluorescentni biljag GFP te su stoga mogle biti promatrane na fluorescentnom mikroskopu. U svrhu monoklonalne selekcije stanica, stanice su bile rasađene u pločice formata 96 bunarića metodom graničnog razrjeđenja. Bunarići u kojima se nalazila po jedna stanica označeni su za daljnje praćenje. Iz bunarića u kojima bi cijela populacija stanica bila zelena stanice bi se prebacivale u veći format, prvo u pločicu formata 24, a zatim i u pločicu formata 6 bunarića. Slika 43. prikazuje bunariće u kojima je cijela populacija stanica zelena za slučaj *GLI2ko* u

staničnoj liniji MEL224. Prilikom izrade staničnih linija s uklonjenim genom *GLI1*, stanice u većini pokušaja nisu preživjele samu transfekciju, što može upućivati na to da stanice ne mogu preživjeti bez gena *GLI1*, a u nekim slučajevima nisu preživjele selekciju puromicinom. Tako za staničnu liniju MEL224, na primjer, nije dobivena ni jedna populacija stanica koja potencijalno ima uklonjen gen *GLI1*, a koja bi se mogla testirati metodom western blot ili PCR. U staničnoj liniji CHL-1 testirana je 21 kolonija stanica, a kod stanične linije A375 samo dvije kolonije stanica, od kojih niti jedna nije imala uklonjen gen *GLI1*.



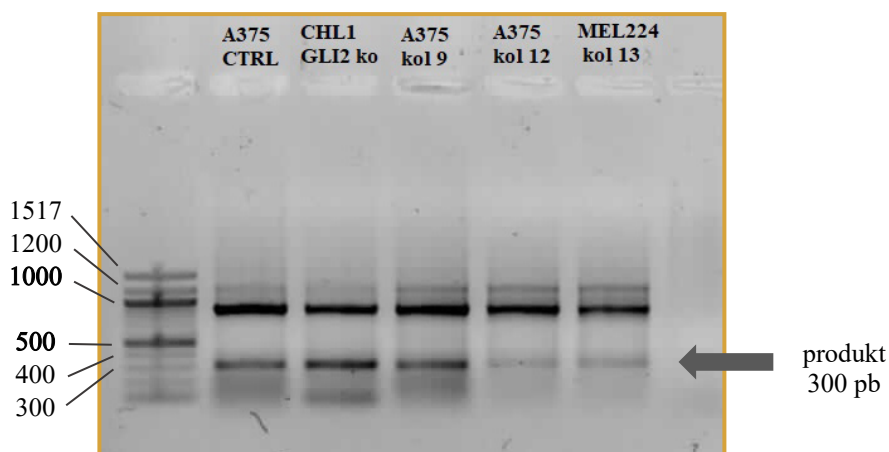
Slika 43. Probir stanica koje imaju zeleni fluorescentni biljeg GFP kod stanične linije MEL224 na fluorescentnom mikroskopu EVOS Floid.

Nakon dvostruke selekcije stanica, iz izabranih populacija staničnih klonova GLI2ko izolirani su proteini i DNA. Slika 44. prikazuje rezultate provjere ekspresije proteina GLI2 nakon uklanjanja gena *GLI2* iz genoma staničnih linija CHL-1 i MEL224. Na slici je vidljivo da u uzorku MEL224 kol13 nedostaje signal na odgovarajućoj veličini od 180 kDa koji potječe od proteina GLI2, a koji se nalazi u kontrolnom uzorku te u preostalim uzorcima kod kojih uklanjanje gena *GLI2* nije bilo uspješno. Kao kontrola količine nanesenih uzoraka proteina korišten je  $\beta$ -aktin.



Slika 44. Provjera ekspresije proteina *GLI2* nakon uklanjanja gena metodom *CRISPR/CAS9* u staničnim linijama *CHL-1* i *MEL224*. Signal na 185 kDa potječe od proteina *GLI2* pune veličine (označen sivom strelicom), a jaki signal na veličini 100 kDa ne odgovara veličini niti jedne izoforme *GLI2*, *GLI2ΔN* ili *GLI2 R* (138 kDa ili 78 kDa) te bi mogao označavati nespecifični signal. Kao kontrola količine nanesenih uzoraka proteina korišten je  $\beta$ -aktin.

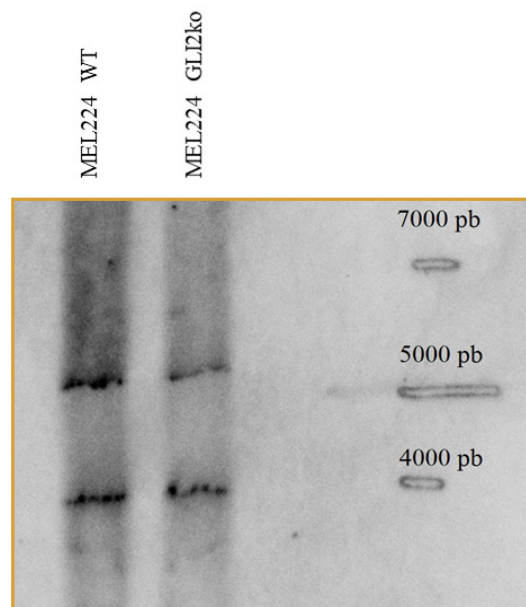
Osim provjerom ekspresije proteina, prisutnost *GLI2* je provjerena i metodom PCR na DNA izoliranoj iz odabranih staničnih kolonija (Slika 45.). Iz slike je vidljivo da je kod uzoraka A375 kol12 i MEL224 kol13 smanjen signal na očekivanoj veličini od 300 pb koji potječe od odsječka *GLI2*, iako nije potpuno izgubljen.



Slika 45. Rezultati umnažanja odsječka gena *GLI2* metodom PCR u svrhu provjere uspješnosti uklanjanja gena iz genoma stanica.

Budući da dobivenim rezultatima nije sa sigurnošću utvrđeno je li gen *GLI2* zaista potpuno uklonjen iz genoma, dodatno je napravljena provjera metodom Southern blot. Eksperiment je zamišljen tako da se dobiju informacije za različite situacije ugradnje donorske kazete na mjesto uklonjenog gena: u kojoj se dogodila bialelna ugradnja, monoalelna ugradnja ili gdje nije došlo do ugradnje (Slika 17.,B poglavlje 3.3.8.).

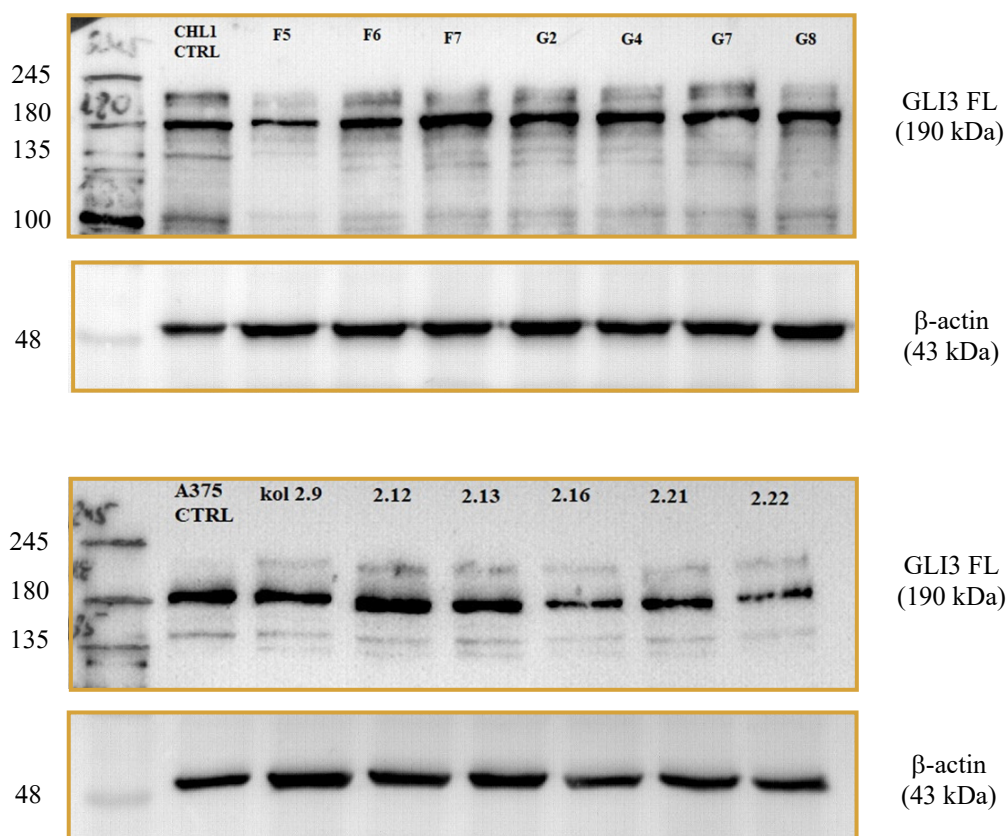
Ukoliko je došlo do ugradnje donorske kazete koja ima gen za biljeg GFP tada će na membrani biti uočljivi signali koji su posljedica vezanja obilježene probe za GFP, na očekivanoj veličini od 6 075 pb (za slučaj restrikcije sa BsrGI). Nakon nekoliko pokušaja nije uspješno izveden pokus hibridizacije GFP probe na membranu, no uspješno je izveden za probu *GLI2* (Slika 46.) u slučaju restrikcije sa BsrGI enzimom. Iako je očekivana veličina za pojavu signala na membrani bila na 6 613 pb, dobivena su dva signala na oko 4 000 pb i oko 5 500 pb. Budući da se signal koji potječe od vezanja probe za *GLI2* odsječak pojavio u uzorku MEL224 *GLI2ko* kao i u MEL224 wt zaključeno je da ipak nije došlo do potpunog uklanjanja gena *GLI2* iz genoma, odnosno da je vrlo vjerojatno došlo do uklanjanja gena na jednom alelu dok je na drugom alelu gen *GLI2* i dalje prisutan. Dodatni signal na 4 000 pb mogao bi značiti i postojanje dodatnih kopija gena *GLI2* u genomu ili nespecifično vezanje probe, ali to ovim pokusom nije bilo moguće ustanoviti. Iz tog razloga stanične linije s djelomično uklonjenim genima *GLI2* nisu razmatrane u daljnjim eksperimentima.



Slika 46. Southern blot na DNA iz uzoraka MEL224 divljeg tipa (WT) i MEL224 s uklonjenim genom *GLI2* (MEL224 *GLI2ko*), nakon cijepanja restrikcijским enzimom BsrGI.



Prilikom pokušaja izrade staničnih linija s uklonjenim genom *GLI3*, sve tri stanične linije su rezultirale s mnogo zelenih kolonija stanica pod fluorescentnim mikroskopom, istovremeno otpornih na puomicin: u slučaju stanične linije CHL-1 testirano je 37 kolonija stanica metodom western blot, u slučaju stanične linije A375 testirane su 32 kolonije stanica, a u slučaju stanične linije MEL224 testirano je 28 kolonija stanica. Niti jedna od testiranih 97 kolonija nije imala uklonjen gen *GLI3*. Primjer rezultata analize ekspresije proteina *GLI3* metodom western blot za stanične linije CHL-1 i A375 je prikazan Slikom 47.



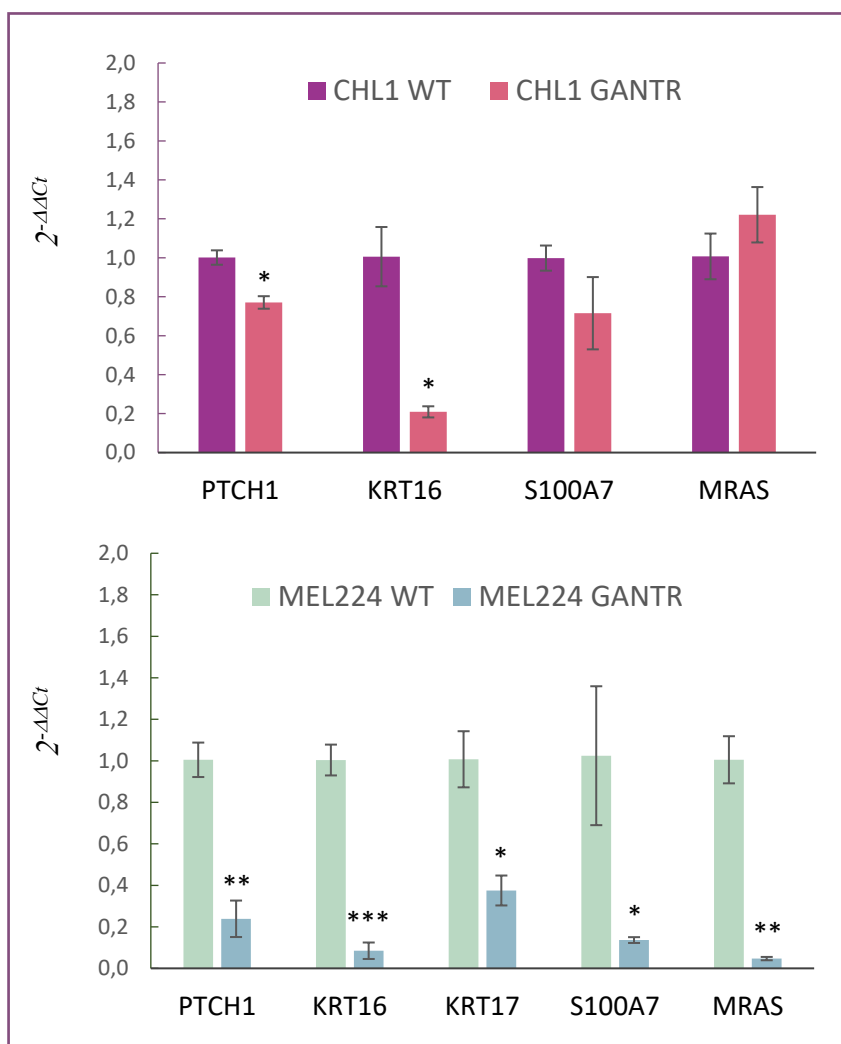
Slika 47. Provjera ekspresije proteina *GLI3* nakon uklanjanja gena metodom *CRISPR/CAS9* u staničnim linijama CHL-1 i A375. Kao kontrola količine nanesenih uzoraka proteina korišten je  $\beta$ -aktin.

## 4.7. Validacija ciljnih gena proteina GLI na različitim staničnim modelima

### 4.7.1. Ekspresija ciljnih gena u staničnim linijama rezistentnim na GANT61

Kako uklanjanje gena GLI iz staničnih linija nije bilo uspješno, a ekspresiju nije bilo moguće utišati pomoću siRNA, kao model za smanjenu aktivnost signalnog puta korištene su stanične linije melanoma rezistentne na GANT61, koje su izrađene u sklopu doktorskog rada dr.sc. Nikoline Piteše [111]. Rezultati dobiveni tijekom karakterizacija tih linija pokazuju da je signalni put HH-GLI u rezistentnim linijama suprimiran u odnosu na parentalne linije.

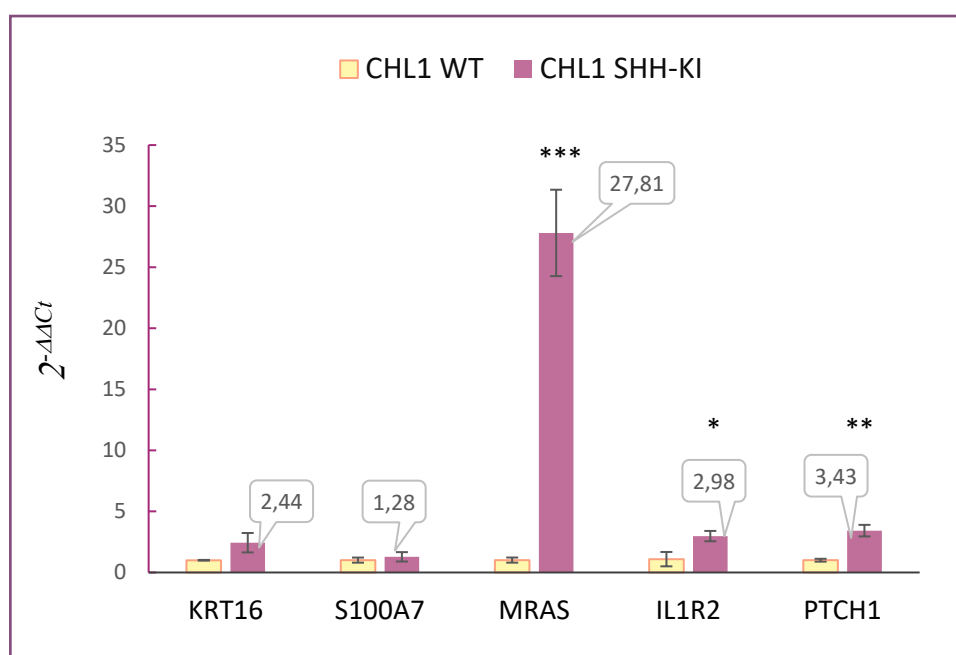
Rezultati analize ekspresije ciljnih gena *PTCH1*, *KRT16*, *KRT17*, *S100A7* i *MRAS* prikazani su Slikom 48. Vidljivo je da su u staničnoj liniji MEL224 rezistentnoj na GANT61 (MEL224 GANTR) ekspresije svih ispitanih ciljnih gena proteina GLI statistički značajno smanjene. Taj učinak je vidljiv i u liniji CHL-1 rezistentnoj na GANT61 (CHL-1 GANTR), no statistički je značajan samo za ciljni gen *KRT16* i već od ranije poznatu transkripcijsku metu signalnog puta, *PTCH1*. Ekspresije gena *EBI3* i *IL1R2* se nisu mogle utvrditi u reakciji qPCR-a u obje stanične linije, a ekspresija gena *KRT17* se nije mogla utvrditi u liniji CHL-1.



Slika 48. Ekspresija ciljnih gena proteina GLI: PTCH1, KRT16, KRT17, S100A7 i MRAS u staničnim linijama CHL-1 i MEL224 rezistentnim na inhibitor GANT61. Stanične linije su označene kao CHL1 WT ili CHL1 GANTR te MEL224 WT ili MEL224 GANTR. Ekspresije gena EBI3 i IL1R2 se nisu mogle utvrditi u reakciji qPCR-a u obje stanične linije, a ekspresija gena KRT17 se nije mogla utvrditi u liniji CHL-1 rezistentnoj na GANT61. Eksperiment je ponovljen tri puta, u tehničkim triplikatima. \*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$ .

#### 4.7.2. Ekspresija ciljnih gena u staničnoj liniji CHL-1 s prekomjernom ekspresijom SHH

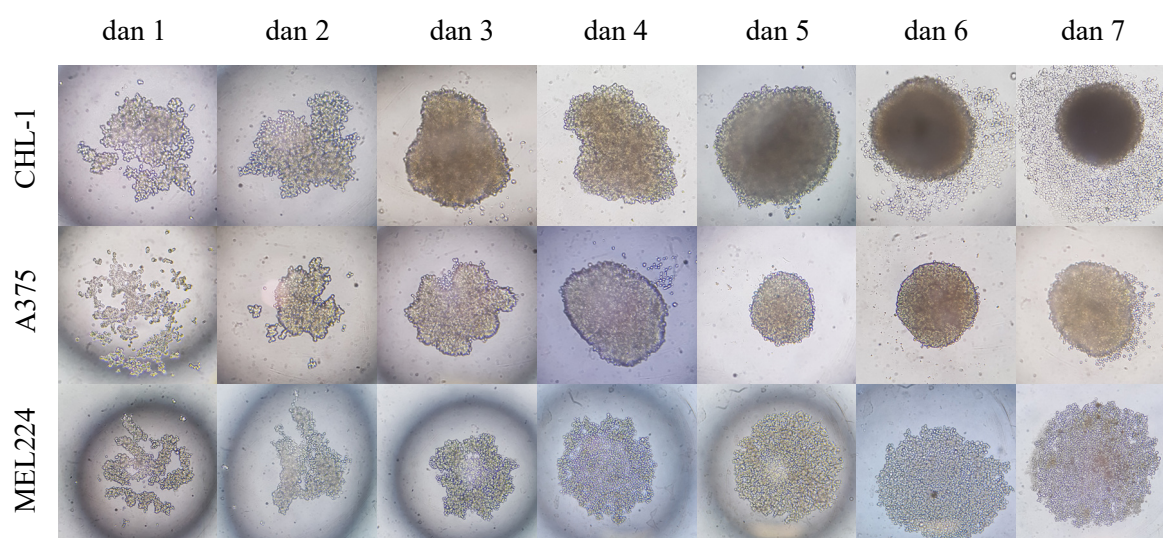
Drugi model koji je korišten za validaciju ciljnih gena proteina GLI bila je stanična linija CHL-1 sa stabilnom prekomjernom ekspresijom proteina SHH. Ova stanična linija napravljena je na način da je gen za SHH stabilno ugrađen u genom u AAVS1 lokus metodom CRISPR/Cas9 [112]. Rezultati pokazuju da je s prekomjernom ekspresijom SHH povećana i relativna genska ekspresija gena *KRT16*, *S100A7*, *MRAS* i *IL1R2* te također i gena *PTCH1* koji je poznat ciljni gen signalnog puta (Slika 49.). Promjene u ekspresijama gena *MRAS*, *IL1R2* i *PTCH1* su statistički značajne, dok promjene ekspresije *KRT16* i *S100A7* nisu statistički značajne. Iz dobivenog se može zaključiti da kanonska aktivacija signalnog puta ligandom SHH potiče ekspresiju ciljnih gena *MRAS* i *IL1R2*, kao i poznate transkripcijske mete, gena *PTCH1*, s time da je ekspresija gena *MRAS* najviše promijenjena.



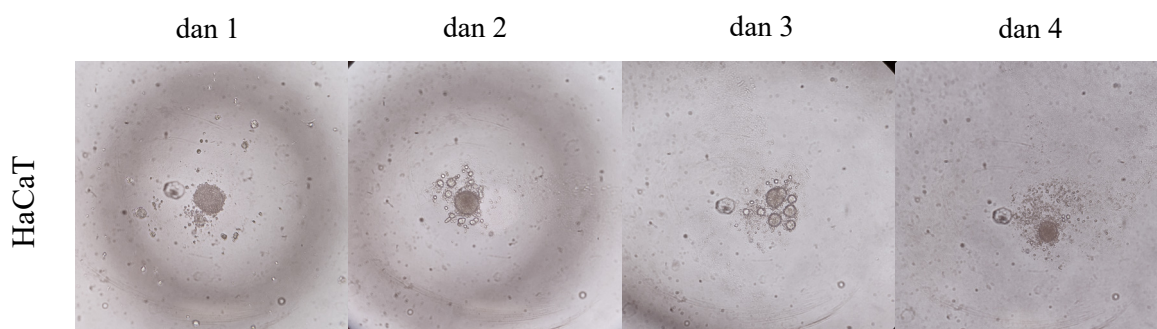
Slika 49. Ekspresija ciljnih gena proteina GLI: *KRT16*, *S100A7*, *MRAS* i *IL1R2* u staničnoj liniji CHL-1 sa stabilnom prekomjernom ekspresijom SHH. Stanične linije su označene kao CHL1 WT ili CHL1 SHH-KI. Ekspresije gena *KRT17* i *EBI3* se nisu mogle utvrditi u reakciji qPCR-a. Eksperiment je ponovljen dva puta, u tehničkim triplikatima. Na y-osi je prikazana relativna ekspresija mRNA dobivena izračunom  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  vrijednosti. \*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$ .

#### 4.7.3. Validacija na sferoidnim kulturama staničnih linija melanoma

Nekoliko odabranih gena je dodatno istraženo u uspostavljenim sferoidnim kulturama melanoma. Sfere staničnih linija CHL-1, A375 i MEL224 su uzgajane 7 dana, a njihov izgled, oblik i veličina praćeni su pod mikroskopom i fotografirani (Slika 50.). Vidljivo je da stanična linija CHL-1 tvori vrlo guste i kompaktne sfere, no nakon petog dana stanice se počinju „rasipati“ iz agregata. Stanična linija MEL224 tvori veće sfere od ostalih linija, ali nisu guste i kompaktne kao CHL1 i A375. Sfere stanične linije imortaliziranih keratinocita, HaCaT, nije bilo moguće izraditi na isti način (Slika 51.). Sfere ove stanične linije ne napreduju i ne rastu te su vrlo sitne. Iz tog razloga sfere linije HaCaT nisu uzgajane duže od 4 dana, a nisu ni uzete u obzir za druge eksperimente.

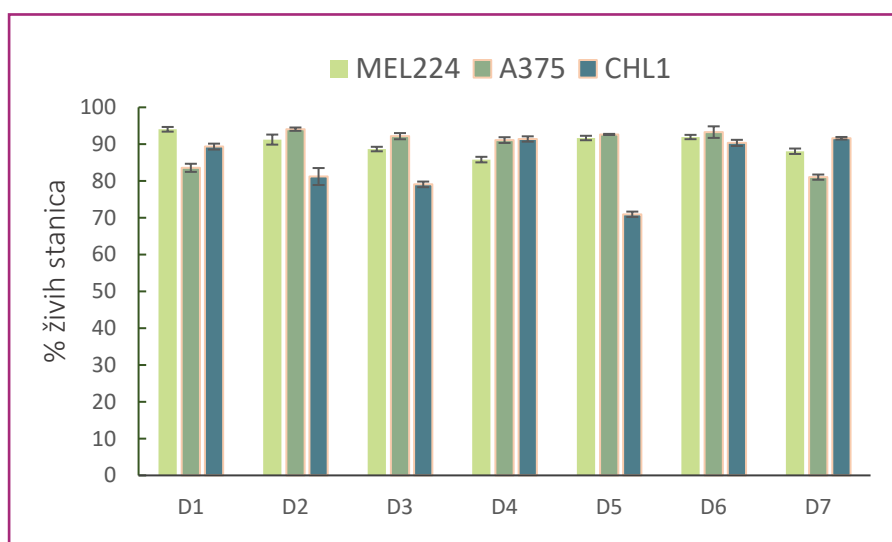


Slika 50. Fotografije sfera staničnih linija CHL-1, A375 i MEL224. Fotografije su slikane na svjetlosnom mikroskopu tijekom perioda od 7 dana.

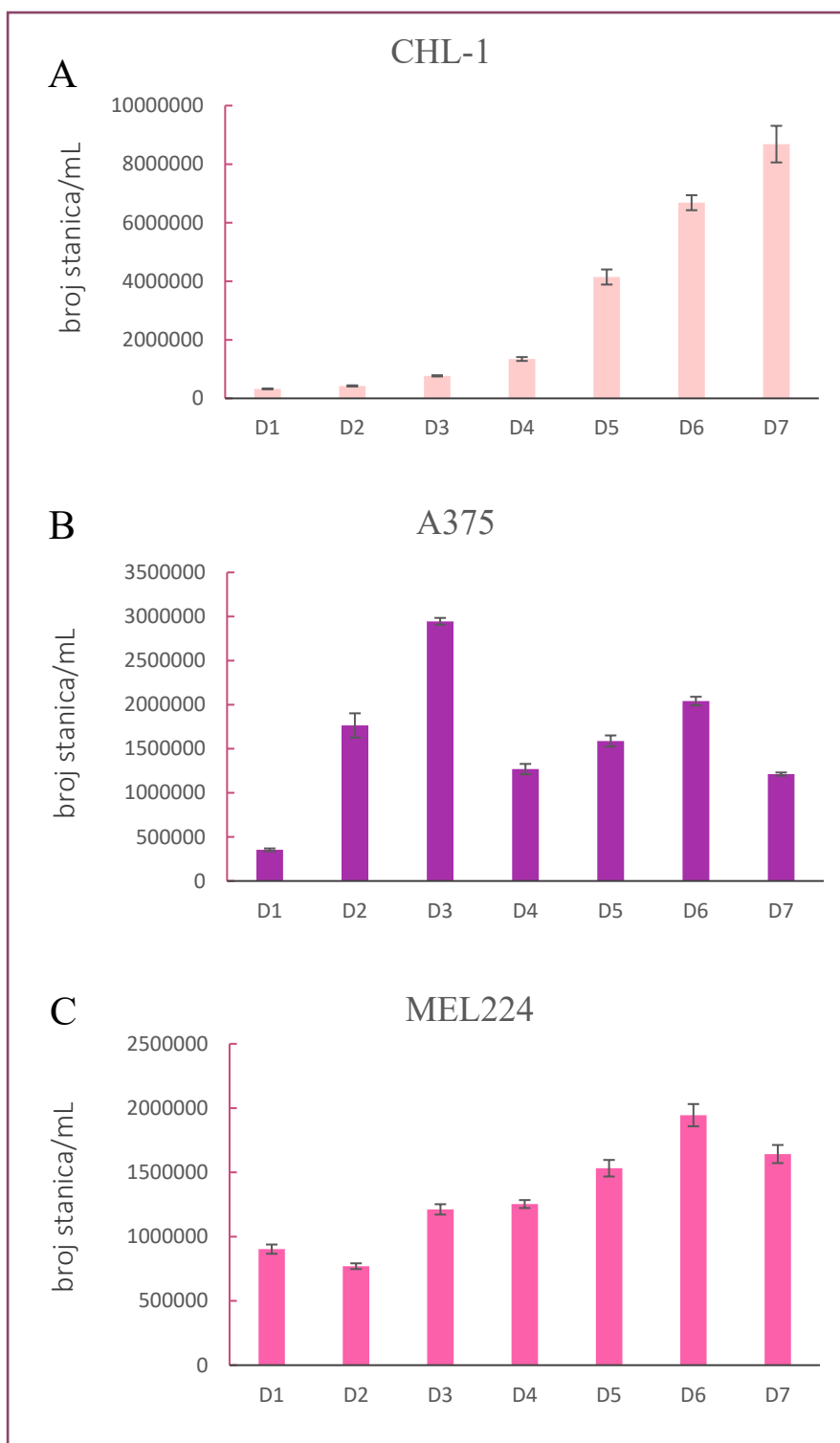


Slika 51. Fotografije sfera stanične linije HaCaT. Fotografije su slikane na svjetlosnom mikroskopu tijekom perioda od 4 dana.

Kako bi se dobila informacija o vijabilnosti stanica koje se nalaze unutar formiranih sfera, sfere staničnih linija CHL-1, A375 i MEL224 su sakupljane tijekom sedam dana te im je vijabilnost izmjerena stolnim protočnim citometrom *Guava Muse Cell Analyzer*, koristeći komercijalni komplet *Muse Cell Count & Viability Assay*. Dobiveni podaci o vijabilnosti su prikazani Slikom 52. Iz podataka o broju stanica po volumenu od 1 mL izračunata je i proliferacija stanica za sve tri linije te su rezultati prikazani Slikom 53.



Slika 52. Vijabilnost stanica u sferama staničnih linija CHL-1, A375 i MEL224. Na y-osi je prikazan postotak živih stanica, a na x-osi vremenski period od 7 dana (D1-D7) tijekom kojeg su napravljena mjerenja.

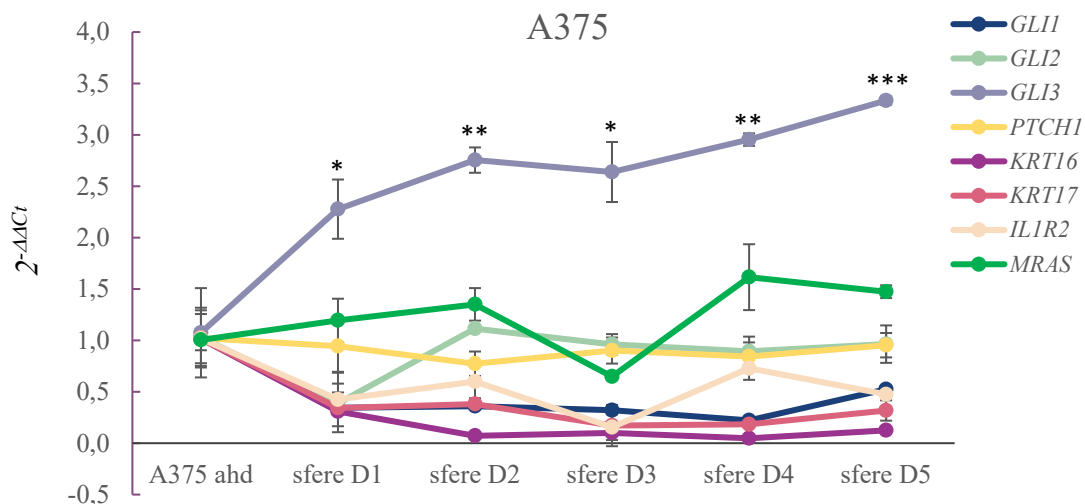


Slika 53. Proliferacija stanica u sferama staničnih linija CHL-1 (A), A375 (B) i MEL224 (C). Na y-osi je prikazan broj živih stanica u volumenu od 1 mL, a na x-osi vremenski period od 7 dana (D1-D7).

Iz Slike 52. je vidljivo da se vijabilnost stanica u sferama staničnih linija A375 i MEL224 kreće između 80 i 90% tijekom svih 7 dana mjerenja. Kod stanične linije CHL-1 je vijabilnost oko petog dana 70%, no sve ostale dane je iznad 80%. Proliferacija ima najbolji trend upravo u staničnoj liniji CHL-1, iako je, gledajući pod svjetlosnim mikroskopom, vidljivo da stanice nakon petog dana u sferama izlaze iz agregata.

Zbog jednostavnosti uzgoja ovog 3D modela, dobre vijabilnosti stanica unutar sfera tijekom 7 dana i njihovog morfološki zdravog izgleda, zaključeno je da su sfere dobar model za potencijalnu validaciju odabranih ciljnih gena proteina GLI.

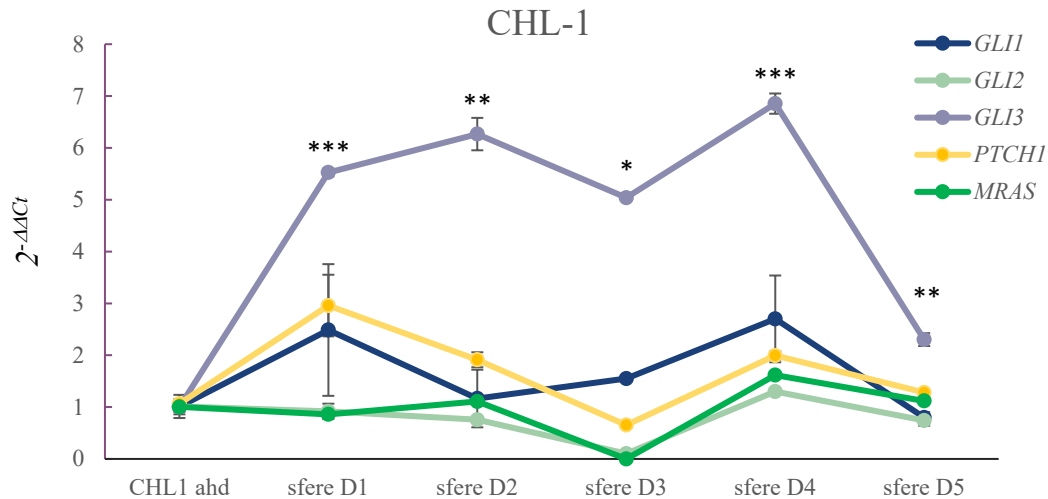
Ispitana je relativna genska ekspresija signalnog puta HH-GLI (geni *GLI1*, *GLI2*, *GLI3* i *PTCH1*) u sferama, a zatim i 6 ciljnih gena proteina GLI: *KRT16*, *KRT17*, *S100A7*, *IL1R2*, *EBI3* i *MRAS* (Slike 54., 55., 56.). Gen *GLI3* ima statistički značajan porast u ekspresiji kroz svih 5 dana (u odnosu na adherentnu kontrolu) u sferama sve tri stanične linije. Iako je eksperiment proveden za sve tri stanične linije tijekom perioda od 7 dana, zbog činjenice da u sferama linije CHL-1 stanice napuštaju agregate nakon petog dana, odlučeno je prikazivati rezultate samo do petog dana. U sferama stanične linije A375 utvrđena je ekspresija ciljnih gena *KRT16*, *KRT17*, *IL1R2* i *MRAS*, dok se razine ekspresija gena *S100A7* i *EBI3* nisu mogle utvrditi u reakciji qPCR.



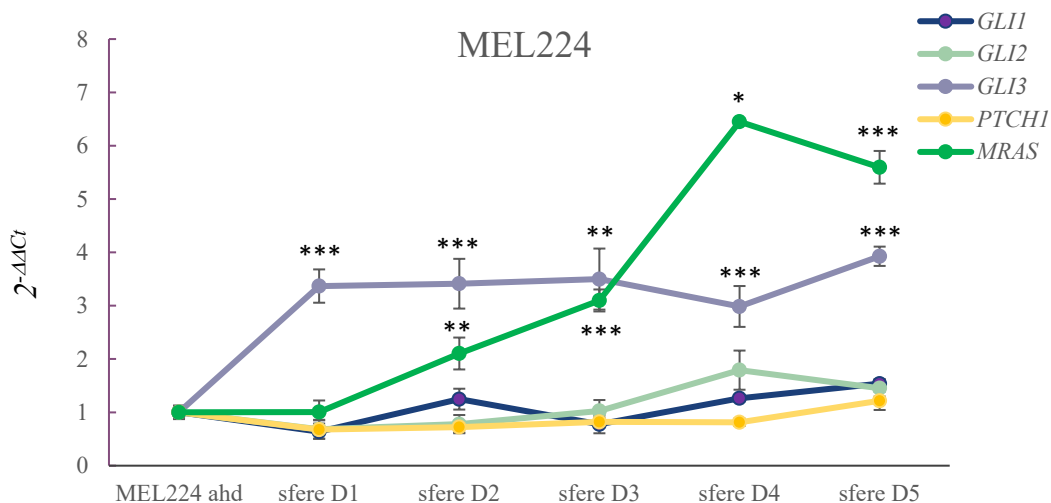
Slika 54. Relativna genska ekspresija komponenti signalnog puta HH-GLI i ciljnih gena proteina GLI: *KRT16*, *KRT17*, *IL1R2* i *MRAS* u sferama stanične linije A375 tijekom 5 dana. Razina ekspresije gena *S100A7* i *EBI3* nije se mogla utvrditi u qPCR reakciji, stoga njihove krivulje nedostaju na grafu. \*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$ .



U sferama staničnih linija CHL-1 i MEL224, razina ekspresije gena *KRT16*, *KRT17*, *S100A7*, *IL1R2* i *EBI3* se nije mogla utvrditi u reakciji qPCR te je od ciljnih gena proteina GLI utvrđena samo ekspresija gena *MRAS*, čiji je porast i statistički značajan.

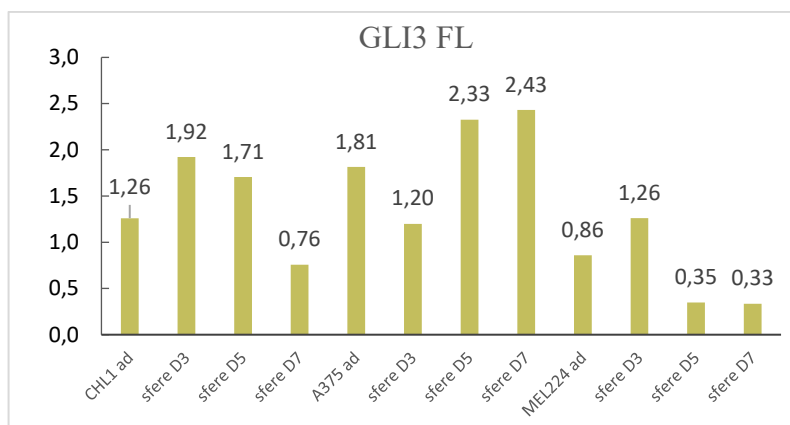
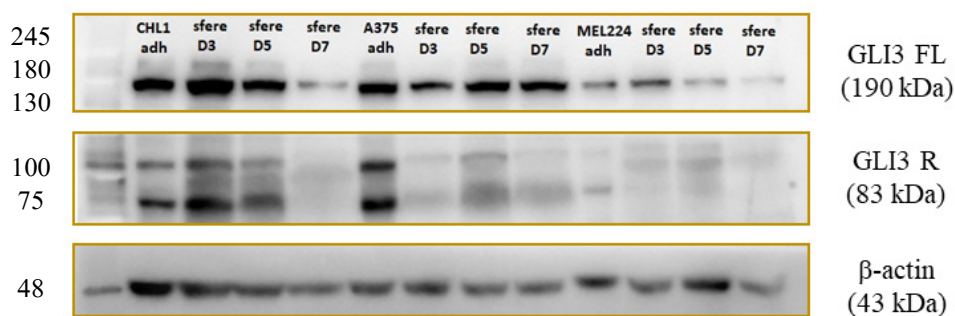


Slika 55. Relativna genska ekspresija komponenti signalnog puta HH-GLI i ciljnog gena *MRAS* u sferama stanične linije CHL-1 tijekom 5 dana. Razina ekspresije gena *KRT16*, *KRT17*, *S100A7*, *IL1R2* i *EBI3* nije se mogla utvrditi u reakciji qPCR, stoga njihove krivulje nedostaju na grafu. \*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$ .



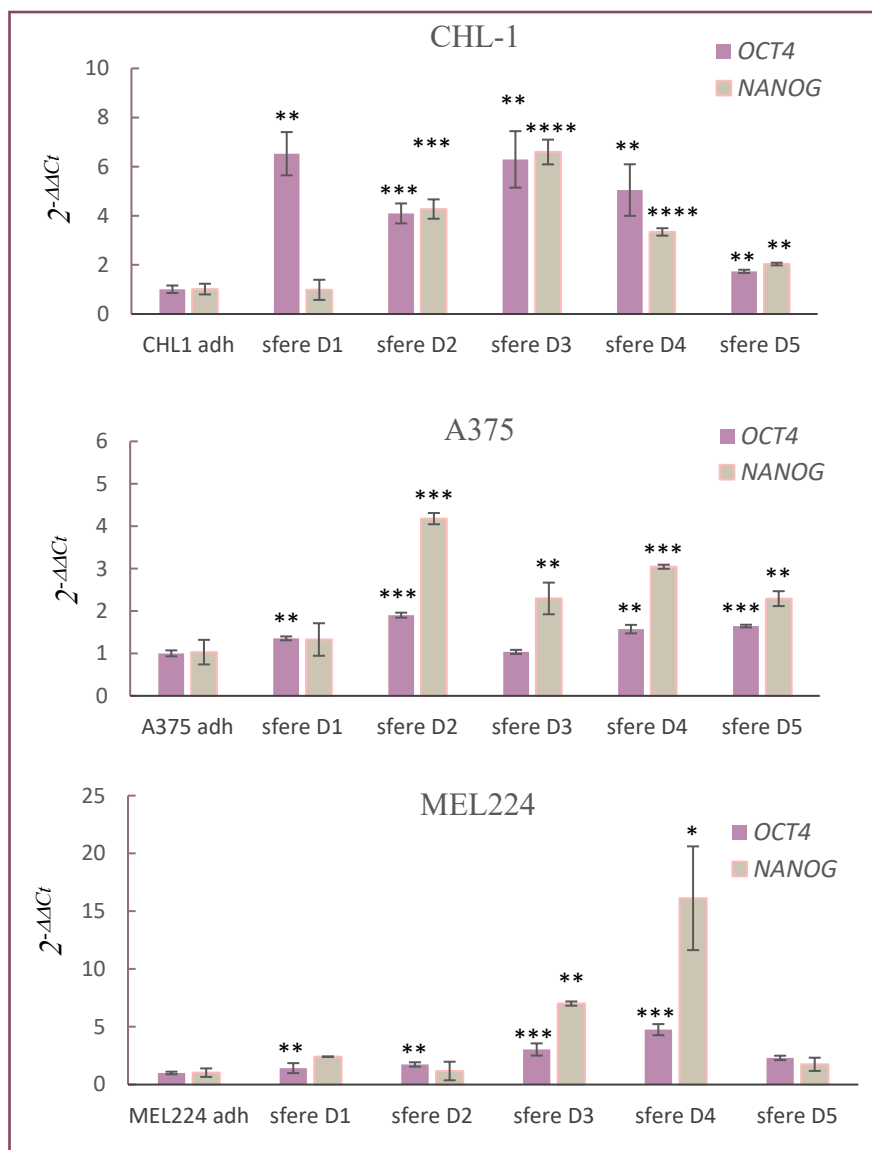
Slika 56. Relativna genska ekspresija komponenti signalnog puta HH-GLI i ciljnog gena *MRAS* u sferama stanične linije MEL224 tijekom 5 dana. Kao i u liniji CHL-1, razina ekspresije gena *KRT16*, *KRT17*, *S100A7*, *IL1R2* i *EBI3* nije se mogla utvrditi u reakciji qPCR, stoga njihove krivulje nedostaju na grafu. \*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$ .

Budući da se pokazalo da od komponenti signalnog puta HH-GLI najveću razinu relativne genske ekspresije u sferama kod svih staničnih linija ima gen *GLI3*, provjerena je i razina proteinske ekspresije GLI3 u sferama (Slika 57.). Kod sfera stanične linije CHL-1 ekspresija GLI3 je najjača treći dan od formiranja sfera, dok sedmi dan od formiranja sfera ekspresija GLI3 znatno slabi. Također, u liniji CHL-1 represorski oblik proteina GLI3 (GLI3 R) je gotovo jednako eksprimiran kao i GLI3 u punoj veličini (GLI3 FL). Kod stanične linije A375 ekspresija GLI3 je također jača u sferama nego u kontrolnom uzorku i to peti i sedmi dan od formiranja sfera. Najveću ekspresiju represorskog oblika GLI3 ima adherentna kontrola, dok je u sferama ekspresija GLI3 R gotovo neprimjetna. U staničnoj liniji MEL224 je ekspresija proteina GLI3 najslabija (i GLI3 FL i GLI3 R), no također je nešto jača u trećem danu od formiranja sfera nego u adherentnoj kontroli. Rezultati proteinske ekspresije GLI3 u sferama se vrlo dobro slažu s rezultatima genske ekspresije za sve tri stanične linije.



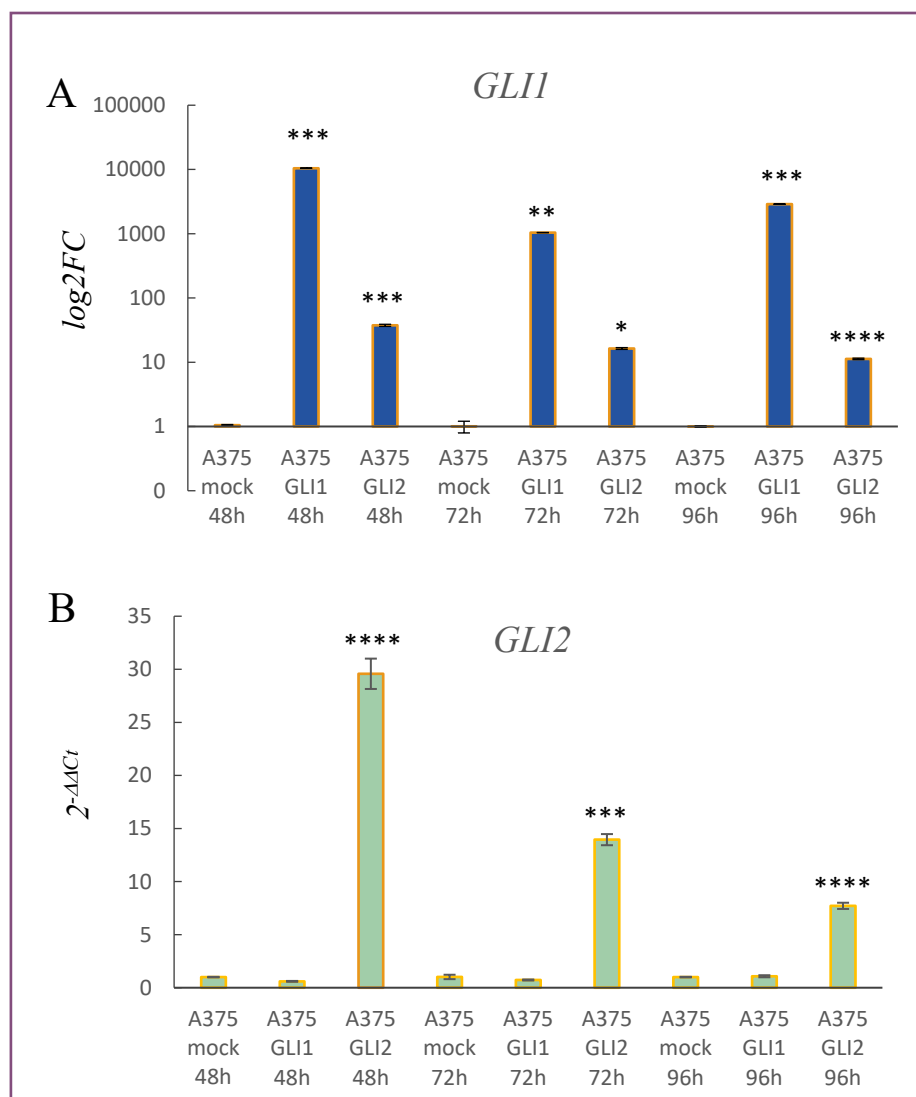
Slika 57. Ekspresija proteina *GLI3* u sferama staničnih linija CHL-1, A375 i MEL224. Ekspresija je izmjerena u trećem, petom i sedmom danu nakon formiranja sfera. Kratica FL označava „full length“ protein, a R označava represorski oblik proteina. Kao kontrola količine nanesenih proteina korišten je β-aktin. Donja slika prikazuje rezultate kvantifikacije *GLI3 FL* normalizirane prema β-aktinu.

U sferama je provjerena i ekspresija gena *OCT4* i *NANOG* (Slika 58.). Oni su regulatorni geni koji održavaju pluripotentnost i svojstva samoobnavljanja embrionalnih matičnih stanica. Kod sfera staničnih linija A375 i CHL-1 povećanje u ekspresiji gena *NANOG* je statistički značajno od 2. do 5. dana, dok je u liniji MEL224 ta promjena značajna samo 3. i 4. dan. U slučaju stanične linije CHL-1 povećanje u ekspresiji gena *OCT4* je statistički značajno svih 5 dana, u slučaju A375 je iznimka samo 3. dan, dok je u slučaju linije MEL224 povećanje u ekspresiji *OCT4* značajno od 2. do 5. dana. Na temelju ovih rezultata može se zaključiti da sferoidi pojačano ekspimiraju markere pluripotentnosti i samoobnavljanja matičnih stanica.



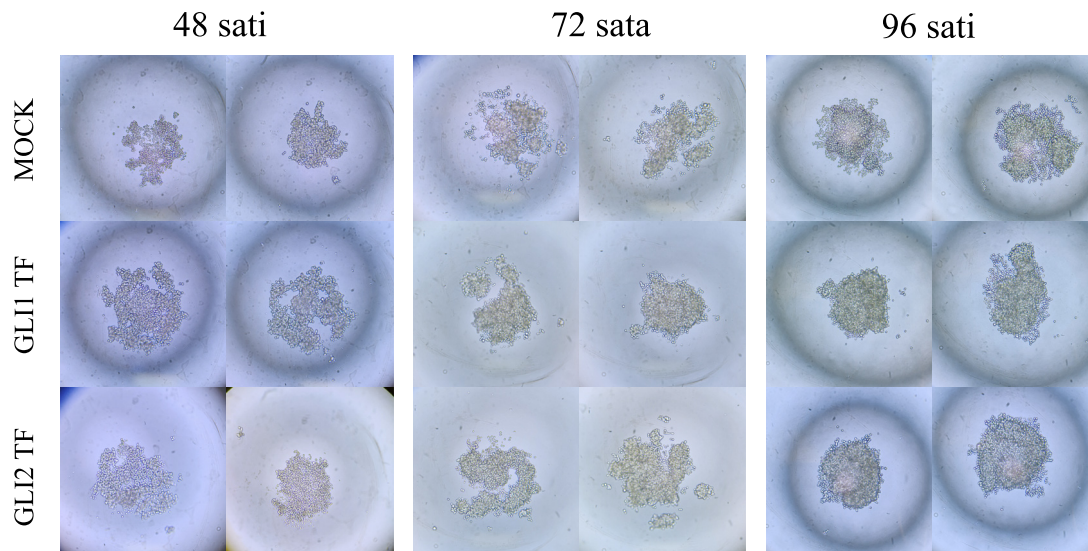
Slika 58. Relativna ekspresija gena *OCT4* i *NANOG* u sferama staničnih linija CHL-1, A375, MEL224 tijekom 5 dana (D1-D1) u odnosu na adherentnu kontrolu (adh). \*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ .

Nakon što je određena endogena ekspresija komponenti signalnog puta HH-GLI i njihovih ciljnih gena u sferama, napravljena je i prekomjerna ekspresija GLI1 i GLI2 u sferoidnim kulturama linije A375 kroz tri dana, odnosno nakon 48, 72 i 96 sati od ekspresije (Slika 59.). Rezultati pokazuju da je razina genske ekspresije *GLI1* znatno povećana u slučajevima prekomjerne ekspresije GLI1 i GLI2, u odnosu na kontrolu i to za sve tri vremenske točke (Slika 59., A). Razina genske ekspresije *GLI2* je znatno povećana u slučaju prekomjerne ekspresije GLI2 (Slika 59., B). Sve promjene u ekspresijama *GLI1* i *GLI2* su statistički značajne, osim promjene ekspresije *GLI2* nakon 72 sata i 96 sati od transfekcije s GLI1.



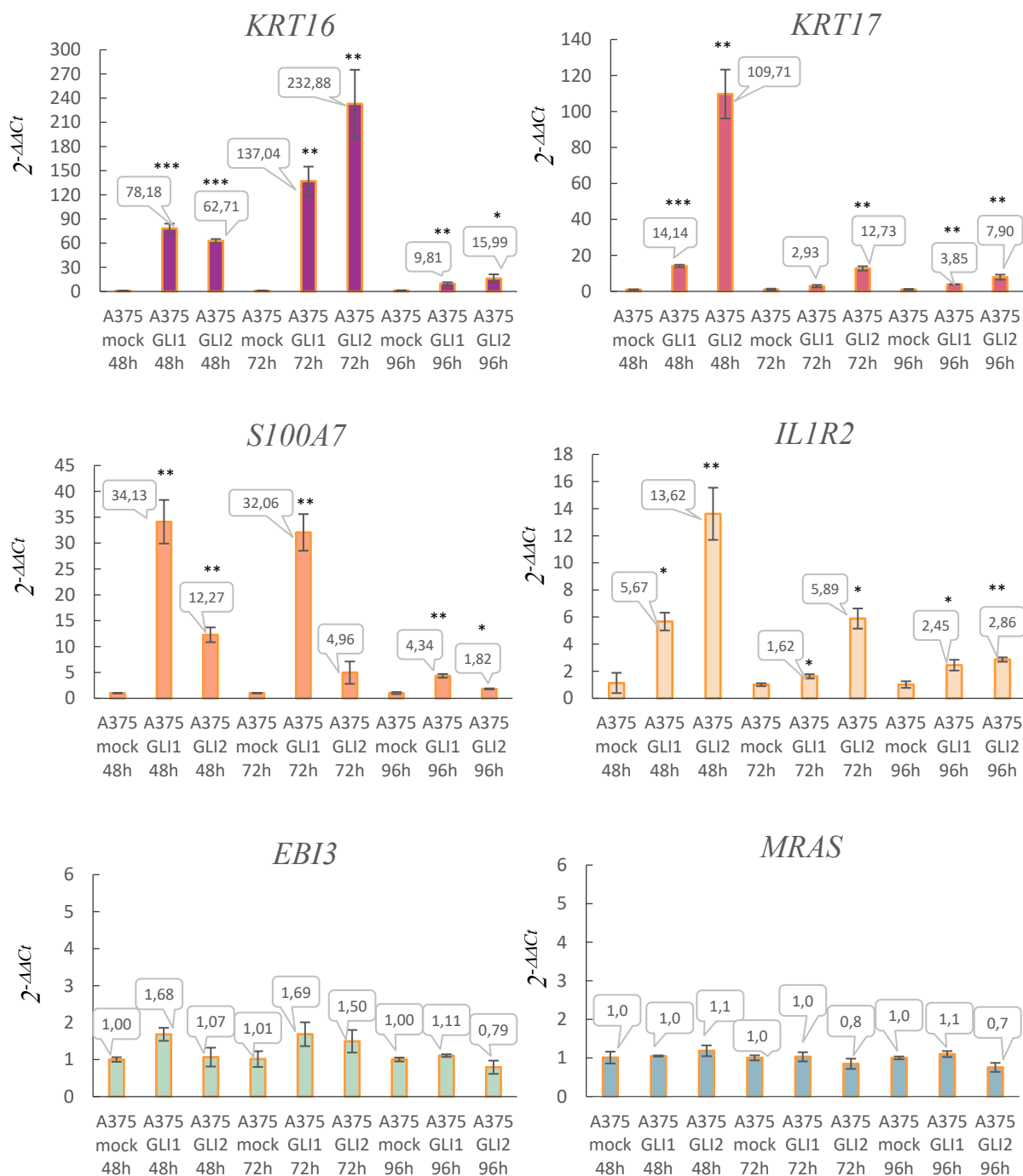
Slika 59. Relativna genska ekspresija *GLI1* (A) i *GLI2* (B) nakon prekomjerne ekspresije *GLI1* i *GLI2* potaknute transfekcijom ekspresijskih vektora u sferama kroz tri dana, odnosno 48, 72 i 96 sati od ekspresije. \*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ .

Također je praćen i fotografiran izgled sfera u kojima stanice imaju prekomjernu ekspresiju GLI1 i GLI2 kako bi se zabilježilo utječe li sam proces transfekcije ekspresijskim vektorima na sposobnost formiranja sfera te na njihov oblik (Slika 60.). Nisu primijećene značajne razlike u obliku, veličini i izgledu sfera iz transfeciranih stanica u odnosu na stanice transfecirane praznim vektorom (mock).



Slika 60. Fotografije sfera stanične linije A375 transfecirane ekspresijskim vektorima za GLI1 i GLI2 te „mock“ kontrolom (prazni ekspresijski vektor). Fotografije su slikane na svjetlosnom mikroskopu tijekom perioda od 3 dana, odnosno 48, 72 i 96 sati od ekspresije. Prikazane su slike po dvije različite sfere za svaki uzorak kako bi se bolje uočile razlike u izgledu sfera koje nastaju uslijed transfekcije.

Zatim je određena ekspresija šest ciljnih gena proteina GLI u sferama stanične linije A375 s prekomjernom ekspresijom GLI1 i GLI2 kroz tri dana (Slika 61.). Rezultati pokazuju da su povećanja ekspresije svih ispitanih gena statistički značajna u slučajevima 48 sati i 96 sati od transfekcije s GLI1 i GLI2, a u slučaju 72 sata od transfekcije nisu uočene statistički značajne promjene u ekspresiji gena *KRT17* za GLI1 te promjena ekspresije *S100A7* za GLI2. Najveću ekspresiju nakon transfekcije s GLI1 ili GLI2 imao je gen *KRT16* te je ekspresija ovog gena najjača 72 sata nakon transfekcije. *KRT17* je također imao visoku razinu ekspresije nakon transfekcije s genima GLI, a ona je bila najjača nakon 48 sati. Geni *S100A7* i *IL1R2* su također pojačano ekspimirani nakon transfekcije s GLI1 i GLI2, a u slučaju *S100A7* puno je jača ekspresija s transfekcijom GLI1. Ekspresije gena *EBI3* i *MRAS* nisu bile statistički značajno promijenjene.



Slika 61. Ekspresija ciljnih gena proteina GLI u sferama stanične linije A375 sa prekomjernom ekspresijom GLI1 i GLI2 kroz tri dana, odnosno nakon 48, 72 i 96 sati od ekspresije. Na y-osi je prikazana relativna ekspresija mRNA dobivena izračunom  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  vrijednosti. \*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$ .

## 5. Rasprava

Zabrinjavajuće je da je incidencija melanoma u Republici Hrvatskoj posljednjih desetljeća u kontinuiranom porastu. Iako je u melanomu ciljana terapija koja djeluje na sastavnice signalnog puta MAPK imala veliki uspjeh, pokazalo se da pacijenti nakon nekog vremena razvijaju otpornost na lijek. Osim što je potrebno razumijevanje uzroka zbog kojih dolazi do razvoja rezistencije, potrebno je istraživanje drugih signalnih puteva koji su aktivni u melanomu te s kojima je put MAPK u interakciji.

Povezanost signalnog puta Hedgehog-GLI s nastankom raka već je dobro opisana u literaturi. Iako se najviše povezuje s utjecajem na razvoj bazocelularnog karcinoma i meduloblastoma, u kojima je dokazano da postoje mutacije signalnog puta (u genima *PTCH1*, *SMO* ili *SUFU*) [82], [92], [113], [114], poremećaj u regulaciji puta povezan je i s nastankom tumora gušterače [95], prostate [96], debelog crijeva [77], [97], dojke [70], jajnika [101], [102] i pluća [98], [99]. Sve se češće istražuje i njegova uloga u melanomima te otpornosti na terapiju. Pokazano je da je signalni put Hedgehog potreban za normalnu proliferaciju melanocita čovjeka *in vitro* i da su *GLI1* i *PTCH1* pojačano eksprimirani u metastazama kože u odnosu na primarne melanome [64]. Također, stanične linije melanoma s visokom ekspresijom *GLI2* lakše metastaziraju u kosti u odnosu na linije s niskom razinom *GLI2* [59]. Melanomasfere također ovise o aktivnom signalnom putu HH-GLI, a broj i veličina sfera se smanjuje inhibicijom ciklopaminom ili GANT61 [115]. Rast melanoma *in vitro* i *in vivo* smanjuje inhibitor proteina *SMO*, sonidegib [81], [103], a povećane razine komponenti signalnog puta koreliraju s lošim preživljenjem bolesnika oboljelih od melanoma [103].

Proteini GLI mogu djelovati kao aktivatori ili represori signalnog puta, ovisno o kontekstu. GLI je stalni aktivator, dok *GLI2* i *GLI3* mogu biti skraćeni u represorski oblik kada signalni put nije aktivan. Omjer između aktivatora i represora proteina GLI naziva se GLI kod. U literaturi je također pokazano, pokusima koimunoprecipitacije, da *GLI1* i *GLI2* fizički i funkcionalno interagiraju u stanicama raka gušterače PANC1 i stanicama rabdomiosarkoma RMS13. Analiza mapiranja je pokazala da su domene cinkovog prsta oba proteina potrebne za njihovu heterodimerizaciju. Dodatno, imunoprecipitacija kromatina je pokazala da *GLI1* i *GLI2* zauzimaju ista područja na promotorima njihovih ciljnih gena *BCL2*, *MYCN* i *CCND1*. [116]. Usprkos velikom napretku u razumijevanju uloge puta HH-GLI, uloge svakog pojedinog

proteina GLI još uvijek nisu detaljno razjašnjene. Dodatni je problem nedovoljna istraženost proteina GLI3 koji se smatra dominantno transkripcijskim represorom. Većina istraživanja proučava transkripcijske mete proteina GLI1, budući da je on isključivi aktivator. Samo jedno istraživanje je pokazalo da je GLI3 efektor signalnog prijenosa KRAS/PI3K/AKT1 u stanicama raka [117].

Uzevši u obzir sve navedeno, jasno je da je potrebno dodatno istražiti uloge proteina GLI. Hipoteza ovog istraživanja je da transkripcijski faktori GLI1, GLI2 i GLI3 imaju jedinstvene i preklapajuće funkcije u stanicama melanoma te da identifikacija novih ciljnih gena proteina GLI može dovesti do karakterizacije do sada neopisanih nekanonskih interakcija s drugim signalnim putevima. Djelovanje na proteine GLI i na nizvodnu aktivnost signalnog puta može biti potencijalni novi pristup u liječenju melanoma ciljanom terapijom.

Zbog navedenog, cilj ovog doktorskog rada je bio identifikacija gena koji su pod transkripcijskom kontrolom proteina GLI1, GLI2 i GLI3 u staničnim linijama melanoma te njihova validacija na različitim staničnim modelima.

Prvi korak u identifikaciji novih ciljnih gena proteina GLI bio je sekvenciranje RNA na tri stanične linije melanoma čovjeka s prekomjernom ekspresijom proteina GLI1, GLI2 i GLI3. Sekvenciranje RNA je napravljeno na ukupno 12 uzoraka u duplikatima. Nakon koraka provjere kvalitete rezultata sekvenciranja te mapiranja očitavanja na ljudski genom, zaključeno je da je većina očitavanja jedinstveno povezana s određenim lokusima u genomu te da su dobivena očitavanja vrlo visoke kvalitete (Slika 22.). Kada se sve tri stanične linije uzmu u obzir zajedno, pronađeno je 1 642 ciljna gena koji su preklapajući za GLI1 i GLI2, 23 preklapajuća ciljna gena za GLI2 i GLI3 i samo 9 preklapajućih ciljnih gena za GLI1 i GLI3. Ukupno je pronađeno 150 ciljnih gena koji su preklapajuća za sva tri GLI proteina, 607 jedinstvenih gena za GLI1, 1 080 jedinstvenih gena za GLI2 i 37 jedinstvenih gena za GLI3 (Slika 24.). Dijagrami „vulkana“ (Slike 28., 29., 30.) pokazuju da prisutnost GLI1 i GLI2 značajno povećava ekspresiju velikog broja gena, što se vidi iz povećanog broja točaka na desnoj polovici grafa. Suprotno tome, GLI3 ima veći broj točaka s lijeve strane, gdje se nalaze smanjeno eksprimirani geni, što govori u prilog tome da je njegova funkcija u većoj mjeri inhibitorna, iako postoji manji broj točaka koje odgovaraju genima s povećanom ekspresijom. Veliki broj gena poput *PAX6*, *PAX8*, *PAX9*, *FOXM1*, *BM11*, *SNAI1*, *SNAI2*, *SFRP1*, *WNT3*, *CD44*, *ZEB1* koje su drugi istraživači identificirali kao ciljne gene ovog signalnog puta [118]–[128] (žute točke na dijagramu vulkana) pada ispod granice značajnosti u našoj studiji. To može značiti da se radi



o tkivno/stanično specifičnim ciljnim genima, budući da ti ciljni geni nisu identificirani u melanomima, kao što je slučaj u našem istraživanju, već u drugim tipovima tkiva. Međutim, ciljni geni koji su opetovano potvrđeni u brojnim studijama [128], točnije *PTCH1*, *GLI1* i *HHIP*, identificirani su i u našoj studiji sa velikom značajnošću.

Nakon filtriranja prema statističkoj značajnosti, dobivene liste gene filtrirane su prema vrijednostima logFC gdje se promjena logFC veća od 2 smatrala značajnom pri probiru gena s povećanom ekspresijom. Probirom na ovaj način je identificirano ukupno 814 ciljnih gena GLI1 sa značajno promijenjenom razinom ekspresije (eng. *Differentially Expressed Genes, DEG*). Od toga 631 gen s povećanom ekspresijom u odnosu na netransfeciranu kontrolu, a 183 gena sa smanjenom ekspresijom u odnosu na kontrolu. Za GLI2 je pronađen 941 DEG (711 s povećanom ekspresijom, a 230 sa smanjenom ekspresijom). Za GLI3 ovom je metodom pronađeno samo 58 DEG (35 s povećanom ekspresijom i 23 sa smanjenom ekspresijom) (Tablica 14.). Koliko je poznato, do sada nije provedeno ovako sveobuhvatno istraživanje ciljnih gena proteina GLI te je ovo prvo takvo istraživanje sva tri proteina GLI istovremeno, napravljeno u staničnim linijama melanoma.

2006. godine u istraživanju Eichbergera i suradnika napravljena je analiza ciljnih gena GLI1 te konstitutivno aktivnog GLI2 (izoforme GLI2 $\Delta$ N), profiliranjem globalne ekspresije u stanicama keratinocita HaCaT. Identificirano je 456 gena s povećanom ili sniženom ekspresijom. Većina gena čije je povećanje u ekspresiji uzrokovano ekspresijom GLI2 $\Delta$ N također bilježi povećanje u ekspresiji uslijed ekspresije GLI1. Njihov je zaključak da postoji vrlo mali broj gena koji su jedinstveni, odnosno specifični ciljni geni samo za GLI1 ili GLI2 [129]. Rezultati ovog doktorskog rada slažu se s tim rezultatima, jer su i ovdje identificirana velika preklapanja u transkripcijskim metama GLI1 i GLI2. Drugo istraživanje se također temeljilo na pronalasku transkripcijskih meta GLI1 i GLI2 u primarnim neoplastičnim hondrocitima, metodom ChIP sekvenciranja i mikročipova, ali u ovoj su studiji samo tri ciljna gena validirana qPCR-om [130]. Ne postoji niti jedna studija koja je u obzir uzela i protein GLI3 te je naše istraživanje prvo koje uspoređuje sva tri transkripcijska faktora uključena u GLI kod. Uključivanje GLI3 u studije je izrazito važno jer se u posljednje vrijeme mijenja percepcija tog proteina kao isključivog inhibitora signalnog puta. Neka novija istraživanja pokazala su njegovu aktivatorsku ulogu i ekspresiju aktivatorskog oblika proteina GLI3 [131]–[133].

U ovom doktorskom radu je, koristeći GSEA analizu, istražena i uloga gena čija je ekspresija promijenjena u stanicama s prekomjernom ekspresijom proteina GLI. Rezultati analize su pokazali da je, u slučaju uzoraka s prekomjernom ekspresijom GLI1 i GLI2, oko 20-30 % gena sa značajno promijenjenom ekspresijom uključeno u signalne puteve Wnt, MAPK i RAS te u nekoliko vrsta raka (bazocelularni karcinom, rak dojke, rak želuca). U slučaju uzoraka koji imaju prekomjernu ekspresiju GLI3, geni sa značajno promijenjenom ekspresijom su uključeni u procese regulacije staničnog ciklusa, u proces DNA replikacije, biogeneze ribosoma, proteasom i spliceosom (Slike 25. i 26.). To je dodatan dokaz da protein GLI3 regulira neovisan set gena i time utječe na procese u stanici različite od GLI1 i GLI2 te da bi se u budućim istraživanjima trebalo posvetiti proučavanju autonomnih funkcija ovog proteina.

Kako bi se napravila selekcija dobivenih gena prema njihovim ulogama u signalnim putevima i bolestima, korištene su razne javno dostupne baze podataka i alati, poput platforme *GeneAnalytics* (GeneCards), servera GEPIA te *The Human Protein Atlas* (Slika 27.). Prednosti ovakvih alata i baza su što na jednostavan i brz način generiraju grafove i statističke prikaze za promatrani set podataka ili gen od interesa. Ovakav probir koji se temelji na uvidu u već postojeće literaturne podatke ipak ima za nedostatak mogućnost da će se iz analiza izostaviti geni koji su potencijalno jednako bitni, ali nemaju do sada nigdje zabilježene podatke o ekspresiji u tkivima, tumorima ili se ne spominju u bolestima. Razlog tome može biti nedostupnost podataka za neke tipove tkiva ili ne postoji dovoljan broj prikladnih kontrolnih uzoraka za usporedbu. Stoga, iako se ovo istraživanje fokusiralo na komunikaciju signalnih puteva u melanomu, javna dostupnost naših sirovih podataka sekvenciranja RNA daje temelj za buduća istraživanja niza različitih staničnih procesa i bolesti koje nisu obrađivane u sklopu ovog doktorskog rada.

Upotrebom navedenih alata odabrano je 12 ciljnih gena proteina GLI za validaciju metodom qPCR. To su bili: *KRT16*, *KRT17*, *S100A7*, *S100A9*, *GHI*, *SOX9*, *MRAS*, *BIRC7*, *IL1R2*, *EBI3*, *HES1* i *RET* (Slika 12.). Validacija 12 gena je napravljena na 11 staničnih linija s prekomjerno eksprimiranim proteinima GLI1, GLI2, GLI3, u odnosu na netransfecirane stanice: A375, A375M, SKMEL24, MEL224, SKMEL2, HAS940.T, MEL505, CHL-1, MEWO, MEL501 i HaCaT (Slika 32.). Iako je prošireni panel uključivao uglavnom linije melanoma čovjeka (10 linija), radi usporedbe je za validaciju dodana i linija imortaliziranih keratinocita HaCaT. Veliki broj staničnih linija na kojima su validirani rezultati dobiveni sekvenciranjem daje dodatnu robusnost ovom istraživanju. Mnoge studije validaciju qPCR-om provode na vrlo

malom broju uzoraka ili staničnih linija. Korištenjem većeg broja staničnih linija za validaciju bilo je moguće identificirati koji od odabranih ciljnih gena pokazuju ujednačeni trend, a koji su potencijalno specifični samo za uzorak/staničnu liniju. Ekspresija gena *KRT16*, *KRT17* i *S100A7* je utvrđena u svih 11 staničnih linija. Ekspresije gena *GHI*, *SOX9*, *BIRC7*, *HES1* i *RET* nisu bile toliko ujednačene među staničnim linijama te su varirale od smanjenih do povišenih, stoga ovi geni nisu izabrani za daljnju validaciju. U literaturi 5 od 12 spomenutih ciljnih gena proteina GLI, koji su validirani metodom qPCR u ovom radu (*KRT16*, *S100A9*, *SOX9*, *BIRC7*, *EBI3*), ima već djelomično opisane uloge u patogenezi melanoma [134]–[140].

U sljedećem će odlomku biti ukratko opisane uloge gena koji nisu izabrani za validaciju na dodatnim staničnim modelima, a to su redom *GHI*, *BIRC7*, *HES1*, *RET*, *SOX9*, i *S100A9*.

GH1 (eng. *Growth Hormone 1*) je član obitelji somatotropina/prolaktina - hormona važnih za kontrolu rasta, a regulira aktivaciju puteva SRC, RAS/ERK, PI3K, NF- $\kappa$ B te aktivira onkogene STAT, STAT3 i STAT5 [141]–[143]. *BIRC7* (drugo ime livin) je član obitelji inhibitora proteina apoptoze, a regulira kemorezistenciju i spominje se u literaturi kao potencijalni biomarker kod raka prostate, melanoma i raka pluća [74], [144]–[150]. *HES1* je transkripcijski represor uključen u diferencijaciju stanica, stanični ciklus i apoptozu. U literaturi je zabilježeno da regulira procese proliferacije i invazije u raku dojke te glioblastomu [151]–[153]. Nedavno istraživanje povezuje *HES1* sa *GLI3* u slučajevima preaksijalne polidaktilije [154]. *RET* je receptorska tirozin-protein kinaza uključena u staničnu proliferaciju, migraciju i diferencijaciju, a fuzije ovog gena povezane su s tumorigenezom kronične mijelomonocitne leukemije [155]. *SOX9* je jedan od 12 ciljnih gena izabranih za validaciju čija se ekspresija u literaturi već povezuje s komponentama signalnog puta HH-GLI. Jedno istraživanje bilježi negativnu korelaciju između ekspresija *GLI1* i *SOX9* u stanicama C3H10T1/2 [156]. Drugo je istraživanje, u prehipertrofičnim hondrocitima, pokazalo da interakcija *SOX9*-*GLI* izravno i kooperativno regulira mnoge gene kao što su *TRPS1*, *SOX5*, *SOX6*, *COL2A1*, *PTCH1*, *GLI1* i *GLI2* [157]. Osim toga, pokazano je da prekomjerna ekspresija *SOX9* može potaknuti invazivnost stanica melanoma [158]. *S100A9* je protein koji veže kalcij i cink, a koji igra istaknutu ulogu u regulaciji upalnih procesa i imunološkog odgovora. Pretpostavlja se da *S100A9* ima ulogu u stečenoj rezistenciji na inhibitore BRAF-a [159] i u metastazama melanoma [160]. Naši rezultati pokazuju da je ekspresija *S100A9* zabilježena samo u jednoj od 11 ispitanih staničnih linija, A375. U većini naših staničnih linija melanoma ekspresija *S100A9* se nije mogla utvrditi, stoga nije izabran za daljnju validaciju.

Odabrano je 6 gena za užu validaciju na drugim staničnim modelima: *KRT16*, *KRT17*, *S100A7*, *IL1R2*, *EBI3* te *MRAS*. Korištenjem baze *UCSC Genome Browser* [161] kod svih 6 odabranih gena pronađena su vezna mjesta za GLI1 ili GLI2 u njihovim promotorskim regijama.

Keratini su, kao članovi superporodice intermedijarnih filamenata, uz aktinske mikrofilamente i mirkotubule, važan dio citoskeleta. Intermedijarni filamenti koji grade citoskelet epitela sisavaca najčešće su po sastavu keratini tipa I i tipa II. Ove dvije velike obitelji čini ukupno 56 gena. *KRT16*, keratin tipa I, koji je poznat kao regulator urođenog imuniteta u koži, značajno je smanjen u metastatskom melanomu. U istraživanju iz 2017. godine je utvrđeno da je njegova ekspresija najveći diskriminacijski čimbenik između prognostičkog i metastatskog melanoma [162]. *In silico* istraživanje Wanga i suradnika iz 2018. godine je napravljeno na javno dostupnim podacima iz 471 uzorka (103 primarna tumora i 368 metastatska melanoma). Među 206 gena sa značajno smanjenom ekspresijom (srednja vrijednost logFC -4,02) identificirani su geni iz porodice keratina, uključujući *KRT2*, *KRT5*, *KRT6*, *KRT14*, *KRT16*, *KRT37*, *KRT75*, *KRT78* i *KRT80*. Daljnjim bioinformatičkim analizama za 24 gena, a među kojima su bili *KRT14*, *KRT78* te *KRT16*, pretpostavljeno je da su važni čimbenici u imunološkom odgovoru i razvoju melanomskih stanica [163].

*KRT17* je također keratin tipa I, a obično je eksprimiran u epitelnim stanicama te nije eksprimiran u normalnoj koži, ali se njegova ekspresija može inducirati u uvjetima stresa. Posljednjih su godina pronađene povišene razine ekspresije *KRT17* u brojnim tumorima poput raka pluća, raka gušterače, raka želuca, kolorektalnog karcinoma te raka štitnjače [164]–[166].

*S100A7* je član obitelji proteina *S100* koji sadrže dvije EF-ruke motiva vezanja kalcija. Proteini *S100* lokalizirani su u citoplazmi i/ili jezgri širokog spektra stanica i uključeni su u regulaciju niza staničnih procesa kao što su napredovanje i diferencijacija staničnog ciklusa. Geni *S100* uključuju najmanje 13 članova koji su smješteni kao klaster na kromosomu 1q21. *S100A7* se razlikuje od ostalih *S100* proteina po nedostatku sposobnosti vezanja kalcija u jednoj EF-ruci na N-kraju. Protein je prekomjerno izražen u hiperproliferativnim kožnim bolestima, pokazuje antimikrobno djelovanje protiv bakterija i potiče imunomodulatorno djelovanje. Iako su iz iste obitelji *S100A*, gen *S100A7* u našoj studiji pokazuje mnogo širi obrazac ekspresije od *S100A9*. U literaturi je opisana njegova sposobnost da potiče proliferaciju, migraciju te invaziju tumorskih stanica kod raka grlića maternice, dojke i jajnika [167]–[170], ali uloga *S100A7* do sada nije opisana u patogenezi melanoma.

Interleukin-1 receptor tipa II (IL1R2), također poznat pod nazivom CD121b, član je obitelji receptora IL-1. IL1R2 djeluje kao negativni regulator sustava IL-1, modulirajući njegovu dostupnost [171]. IL1R2 se abnormalno eksprimira u mnogim upalnim bolestima i karcinomima te ima važan klinički značaj. Tako je u literaturi opisana njegova uloga u raku dojke i raku želuca [171], [172], a njegovi polimorfizmi su povezani s rizikom od razvoja raka jednjaka te s lošijom prognozom pacijenata oboljelih od kožnog melanoma [173], [174].

*EBI3* (eng. *Epstein-Barr virus-induced gene 3*) je gen koji ima imunomodulacijsku ulogu. Bioinformatička analiza Yonekure [175] imala je za cilj procijeniti može li ekspresija gena *EBI3* biti potencijalni biomarker u melanomu. Korištenjem javne baze podataka, pronašli su da je veća ekspresija *EBI3* u tumorima bila značajno povezana s dužim ukupnim preživljenjem pacijenata.

MRAS je najbliži srodnik klasičnim onkoproteinima RAS (KRAS, HRAS NRAS) i s njima dijeli većinu regulatornih i efektorskih interakcija. Međutim, ima i jedinstvene funkcije. MRAS je visoko očuvan među kralješnjacima i ima znatnu sličnost s Ras-2 genom u *C. elegansu*. U literaturi je MRAS opisan kao slab aktivator ERK puta u usporedbi s RAS-om, što se djelomično može pripisati nižem afinitetu MRAS-a za RAF u usporedbi s RAS-om. Dodatno, mutacije u genu MRAS se rijetko nalaze u raku. Istraživanja pokazuju da MRAS koordinira dinamiku signalnog puta ERK te da kompleks MRAS–SHOC2–PP1 ima bitnu ulogu u tumorigenezi [176], [177].

Metodom imunofluorescentnog bojanja stanica određena je ekspresija i lokalizacija proteina KRT16, *EBI3*, S100A7 i MRAS, kao i ekspresija GLI1, GLI2, GLI3 te PTCH1 u staničnim linijama A375, CHL-1, MEL224 i HaCaT (Slike 32. - 35.). Gledajući sve četiri linije zajedno, može se zaključiti da od tri proteina GLI najjaču ekspresiju u svim staničnim linijama ima GLI3, dok od njihovih ciljnih proteina S100A7 ima konzistentnu i uvijek poprilično jaku ekspresiju, kao i PTCH1 s iznimkom u liniji HaCaT. Ekspresija proteina KRT16, *EBI3* i MRAS nije primijećena ni u jednoj liniji, osim vrlo slabe ekspresije *EBI3* u liniji A375. Treba naglasiti da se ovdje radi o endogenoj ekspresiji tih proteina u stanicama koje nisu transfecirane sa proteinima GLI. Moguće je da je zbog toga prag detekcije prenizak. Ova analiza mogla bi se dodatno poboljšati transfekcijom GLI1, GLI2 ili GLI3 u stanične linije te zatim istovremenom detekcijom proteina GLI i ciljnog proteina. Međutim ova analiza nije bila u opsegu ovog doktorskog rada.

Kako bi se odabrani ciljni geni proteina GLI validirali na staničnom modelu koji ima sniženu ili utišanu aktivnost signalnog puta HH-GLI, napravljeno je utišavanje gena *GLI* pomoću siRNA u staničnoj liniji A375. Iako su neki autori u svojim istraživanjima uspješno utišali gen *GLII* koristeći isti *ON-Target PlusSMARTpool Human GLII* kao i mi [103], [178], [179] (za *GLI2* i *GLI3* nema podataka u literaturi), u našem slučaju nije došlo do uspješnog utišavanja (Slika 38.) Utišavanja gena *GLII* navedenih publikacija su napravljena u stanicama karcinoma štitnjače, glioma te stanicama primarnih melanoma WM3248 i WM278. Moguće objašnjenje za našu nemogućnost utišavanja je međuodnos i interakcija između proteina GLI zbog koje, uslijed inaktivacije ili nedostatka jednog od njih, preostali proteini GLI kompenziraju i potiču njegovu transkripciju (GLI kod). Budući da se nije moglo provesti utišavanje, odlučeno je da će se pokušati potpuno ukloniti geni *GLII/2/3* iz genoma stanica, korištenjem tehnologije CRISPR/Cas9 u staničnim linijama CHL-1, A375 i MEL224. Prilikom izrade staničnih linija s uklonjenim genom *GLII*, stanice u većini pokušaja nisu preživjele samu transfekciju, što može upućivati na to da stanice ne mogu preživjeti bez gena *GLII*, a u nekim slučajevima nisu preživjele selekciju u puromicinu. Prilikom pokušaja izrade staničnih linija s uklonjenim genom *GLI3*, sve tri stanične linije su rezultirale s mnogo zelenih kolonija stanica pod fluorescentnim mikroskopom, istovremeno otpornih na puromicin. Prilikom provjere ekspresije *GLI3* metodom western blot pokazano je da niti jedna od testiranih 97 kolonija (u slučaju CHL-1 testirano je 37 kolonija stanica, u slučaju A375 32 kolonije stanica, a u slučaju MEL224 28 kolonija stanica) nije imala uklonjen gen *GLI3* (Slika 47.). Iako je uklanjanje gena *GLI2* u staničnoj liniji MEL224 naizgled bilo uspješno (Slika 44.), nakon višestrukih potvrda i provjera zaključeno je da je vrlo vjerojatno došlo do uklanjanja gena *GLI2* samo na jednom alelu jer su rezultati metoda PCR i Southern blot i dalje davali signale koji su potjecali od *GLI2* (Slike 45. i 46.). Stoga u daljnjem provođenju eksperimenata u svrhu validacije ciljnih gena, niti ovaj model nije bilo moguće koristiti jer bi mogao dati nepouzdan rezultate.

Kao model za smanjenu aktivnost signalnog puta korištene su dvije stanične linije melanoma rezistentne na inhibitor GANT61 (CHL-1 GANTR i MEL224 GANTR), koje su izrađene u sklopu doktorskog rada dr.sc. Nikoline Piteše [111]. U ovom se modelu očekuje smanjena ekspresija ciljnih gena HH-GLI. Rezultati analize ekspresije 6 ciljnih gena proteina GLI pokazuju da je u staničnoj liniji MEL224 GANTR razina ekspresije gena *KRT16*, *KRT17*, *S100A7* i *MRAS* statistički značajno smanjena. Taj učinak je vidljiv i u liniji CHL-1 GANTR, no ta je razlika statistički značajna samo za ciljni gen *KRT16* te poznati ciljni gen *PTCHI* (Slika 48.).

Drugi model koji je korišten za validaciju ciljnih gena proteina GLI bila je stanična linija CHL-1 sa stabilnom prekomjernom ekspresijom proteina SHH [106]. Ovo je primjer modela melanoma s autokrinom kanonskom aktivacijom signalnog puta HH-GLI kod kojeg stanice proizvode povećanu količinu liganda, kojeg onda povratno vežu i stimuliraju nizvodni prijenos signala. U ovom modelu se očekuje povećanje ekspresije ciljnih gena. Rezultati pokazuju da su povećanja u razinama ekspresija gena *MRAS*, *IL1R2* i *PTCH1* statistički značajna, dok promjene ekspresije *KRT16* i *S100A7* nisu statistički značajne (Slika 49.). Ekspresije gena *KRT17* i *EBI3* se nisu mogle utvrditi u reakciji qPCR-a. Dobiveni rezultati ukazuju da kanonska aktivacija signalnog puta ligandom SHH potiče ekspresiju ciljnih gena *MRAS* i *IL1R2*, kao i poznate transkripcijske mete, gena *PTCH1*, s time da je ekspresija gena *MRAS* najviše promijenjena.

Za potrebe ovog rada, uspostavljene su sferoidne kulture staničnih linija melanoma čovjeka, kao dodatni model za validaciju ciljnih gena. Sve je veći broj istraživanja koja upućuju da se korištenjem 3D modela, dobivaju relevantniji rezultati u usporedbi s rezultatima dobivenim u 2D jednoslojnoj staničnoj kulturi. Iako su 2D stanične kulture i dalje najčešće korišten model, ne mogu dosljedno oponašati složenost tumora i njegovog mikrookoliša *in vivo*. Složene interakcije, međustanični kontakt te sastav izvanstaničnog matriksa, utječu na svojstva i ponašanje tumorskih stanica, ekspresiju gena, raspodjelu proteina i konačno odgovor na terapiju. Modeli sferoida imaju strukturu sa brzo proliferirajućim stanicama koje okružuju hipoksičnu, nekrotičnu jezgru. Takva struktura stvara gradijent hranjivih tvari, metabolita i kisika u sferoidu, važnih atributa za procjenu rezistencije na lijekove [180], [181].

Sfere linija CHL-1, A375 i MEL224 su uzgajane 7 dana i okarakterizirane (Slika 50.). Na temelju morfoloških karakteristika, praćenja vijabilnosti i proliferacije kroz 7 dana u kulturi (Slika 52.), ustanovljeno je da su sferoidne kulture melanoma vijabilne, stabilne, imaju pravilan trend proliferacije te da je optimalno vrijeme praćenja do 5 dana. Također, praćenjem ekspresije markera matičnosti i samoobnavljanja, gena *OCT4* i *NANOG*, vidljivo je da u sferama dolazi do povećanja razine tih markera, što je u literaturi već pokazano kao odlika sfera staničnih linija tumora jajnika i kolorektalnog karcinoma [182], [183]. Za razliku od sve tri stanične linije melanoma, stanična linija imortaliziranih keratinocita nije bila pogodna za razvoj sferoidnih kultura metodom viseće kapljice (Slika 51.). Tijekom perioda od 5 dana u sferama je ispitana relativna ekspresija gena signalnog puta HH-GLI (*GLI1*, *GLI2*, *GLI3* i *PTCH1*) te 6 ciljnih gena proteina GLI: *KRT16*, *KRT17*, *S100A7*, *IL1R2*, *EBI3* i *MRAS* (Slike

54., 55., 56.). U sve tri stanične linije melanoma je primijećena blago snižena razina ekspresije *GLI1*, dok je ekspresija *GLI2* i *PTCH1* uglavnom nepromijenjena. Iznenadujuće, primijećeno je znatno povećanje ekspresije gena *GLI3* tijekom uzgoja u sferama. Međutim, povezanost *GLI3* sa matičnošću je pokazana i u staničnim linijama tumora glave i vrata. Rezultati dobiveni u istraživanju Rodrigues i suradnika upućuju da je utišavanje ekspresije *GLI3* povezano sa značajnim smanjenjem regulacije gena *CD44*, *OCT4* i *BM11* [184].

Kako bismo ispitali radi li se o aktivatorskoj ili represorskoj aktivnosti proteina *GLI3*, napravljena je analiza proteinske ekspresije *GLI3* metodom western blot, a koja je potvrdila rezultat qPCR-a te dodatno pokazala da se radi o povećanju aktivatorske forme *GLI3*, a ne *GLI3R*. U sferama stanične linije A375 utvrđena je ekspresija gena *KRT16*, *KRT17*, *IL1R2* i *MRAS*, dok se razine ekspresija gena *S100A7* i *EBI3* nisu mogle utvrditi u reakciji qPCR. Iako u sferama sve tri stanične linije postoji sličan trend u ekspresiji komponenata signalnog puta HH-GLI, u staničnim linijama CHL-1 i MEL224 se ni razine ekspresija gena *KRT16*, *KRT17* i *S100A7* nisu mogle utvrditi. Jedini gen čija je ekspresija zabilježena u sve tri stanične linije je *MRAS*.

Nakon toga je napravljena prekomjerna ekspresija *GLI1* i *GLI2* u staničnoj liniji A375 te su stanice nakon transfekcije nasadene u viseće kapljice. Određena je ekspresija šest ciljnih gena proteina *GLI* u sferama A375 sa prekomjernom ekspresijom *GLI1* i *GLI2* (Slika 61.). Rezultati pokazuju da su promjene ekspresije gena *KRT16*, *KRT17*, *S100A7* i *IL1R2* statistički značajne, dok ekspresije gena *EBI3* i *MRAS* nisu bile značajno promijenjene. Najveću ekspresiju nakon transfekcije s *GLI1* ili *GLI2* imao je gen *KRT16* (povećanje od čak 232,88 puta u odnosu na kontrolu). Kao i kod validacije gena *S100A7* na adherentnim staničnim linijama, njegova ekspresija je puno veća s transfekcijom *GLI1* nego s *GLI2*.

Zanimljivo, od 6 ciljnih gena jedino je gen *KRT16* validiran u svim ispitanim staničnim modelima (obje stanične linije rezistentne na GANT61, stanična linija CHL-1 sa stabilno prekomjerno eksprimiranim SHH, sferoidne kulture linije A375 s endogenom ili s prekomjernom ekspresijom *GLI1* i *GLI2*). Drugi gen koji je najuspješnije validiran, gen *S100A7* nije utvrđen endogeno u sferama niti jedne stanične linije, ali je zato njegova ekspresija porasla s prekomjernom ekspresijom *GLI1* i *GLI2* u sferama i to čak oko 30 puta za *GLI1*. Također mu je snižena razina ekspresije u staničnim linijama rezistentnim na GANT61, uslijed snižene aktivnosti puta HH-GLI. To što ekspresija *S100A7* nije statistički značajno promijenjena u liniji CHL-1-SHH KI, može značiti da ona nije regulirana kanonskom



aktivacijom signalnog puta koja uključuje ligand SHH. Od svih rezultata vezanih za validaciju S100A7 najzanimljiviji su rezultati imunofluorescentnog bojanja stanica, koji pokazuju da ima jaku proteinsku ekspresiju u sve 4 ispitane stanične linije. To može upućivati da je ekspresija S100A7 u melanomima prediktivni biomarker te da je potrebno daljnje istražiti ovaj protein.

Istraživanja poput ovog imaju za cilj otkrivanje novih potencijalnih terapijskih pristupa u melanomima. U ovom doktorskom radu je identificiran velik broj do sada nepoznatih ciljnih gena proteina GLI1, GLI2 i GLI3 u staničnim linijama melanoma čovjeka. Validacijom na različitim staničnim modelima, izdvojeno je nekoliko dobrih gena kandidata (*KRT16*, *KRT17*, *S100A7*, *IL1R2* i *MRAS*) koje bi bilo dobro ispitati na kliničkim uzorcima. Ukoliko bi se i na kliničkim uzorcima pokazalo da su ovi geni dobri kandidati za daljnje promatranje, postoji veliki potencijal za njihovo ispitivanje u farmakološkom i kliničkom polju. Osim kao mete novih ciljanih terapija, neki od ovih gena bi mogli biti prediktivni ili prognostički biomarkeri u melanomu. Uz sve navedeno, ovo istraživanje otvara i mogućnost za analizu niza drugih identificiranih ciljnih gena za otkrivanje novih nekanonskih interakcija s drugim signalnim putevima.

## 6. Zaključci

- Metodom sekvenciranja RNA identificirani su novi jedinstveni i preklapajući ciljni geni proteina GLI1, GLI2 i GLI3 u staničnim linijama melanoma čovjeka.
- Najviše ciljnih gena ima transkripcijski faktor GLI2, a najmanji broj ciljnih gena GLI3 te je velik broj ciljnih gena preklapajući za GLI1 i GLI2.
- GLI3 regulira neovisan set gena čime utječe na procese u stanici različite od GLI1 i GLI2 te bi se u budućim istraživanjima trebalo posvetiti autonomnim funkcijama ovog proteina.
- U slučaju uzoraka s prekomjernom ekspresijom GLI1 i GLI2, oko 20-30% gena sa značajno promijenjenom ekspresijom su uključeni u signalne puteve Wnt, MAPK i RAS.
- Nakon analize ekspresije gena qPCR-om, lista gena kandidata smanjena je na 6 gena koji su pokazali ujednačeno povećanu ekspresiju u velikom broju staničnih linija.
- Nije bilo moguće uspostaviti modele staničnih linija s potpuno uklonjenim genima *GLI1*, *GLI2*, i *GLI3*, koristeći metodu CRISPR/Cas9. Postoji mogućnost da je došlo samo do djelomičnog uklanjanja gena *GLI2* u staničnoj liniji MEL224, no ovaj model nije uzet u razmatranje u daljnjem provođenju eksperimenata.
- Utišavanje gena GLI također nije bilo moguće primjenom siRNA.
- U staničnim linijama CHL-1 i MEL224 rezistentnim na GANT61, a koje su model sa sniženom aktivnošću puta HH-GLI, uspješno je potvrđeno statistički značajno smanjenje u ekspresiji gena *KRT16* u obje linije te gena *KRT17*, *S100A7* i *MRAS* u liniji MEL224 GANTR.
- Na modelu stanične linije CHL-1 sa stabilnom prekomjernom ekspresijom SHH potvrđeno je statistički značajno povećanje u ekspresiji gena *MRAS* te *IL1R2*. Iako su zabilježena i povećanja u ekspresiji gena *KRT16* i *S100A7*, ona nisu bila statistički značajna.

- Metodom viseće kapljice su uspješno uspostavljene sferoidne kulture staničnih linija melanoma CHL-1, A375 i MEL224 te je zaključeno da ove stanične linije tvore vijabilne sfere, zdravog izgleda i oblika.
- Sferoidne kulture linije keratinocita HaCaT nije bilo moguće uspostaviti metodom viseće kapljice.
- Uspješno je provedena prekomjerna ekspresija proteina GLI1 i GLI2 u sferama stanične linije A375 te je od 6 ispitanih ciljnih gena proteina GLI na ovom modelu potvrđeno statistički značajno povećanje u ekspresiji za 4 gena: *KRT16*, *KRT17*, *S100A7* i *IL1R2*.
- Od sva tri proteina GLI, u sferoidnim kulturama staničnih linija melanoma čovjeka, GLI3 ima najjaču proteinsku i relativnu mRNA ekspresiju.
- Novoidentificirani ciljni geni proteina GLI koji bi se trebali dodatno istražiti i funkcionalno validirati u melanomu su geni *KRT16*, *KRT17*, *S100A7*, *IL1R2* te *MRAS*.
- Zbog svoje jake endogene ekspresije u sve tri stanične linije melanoma čovjeka, CHL-1, A375 i MEL224, protein S100A7 bi mogao biti potencijalni prediktivni biomarker.

## 7. Literatura

- [1] Bandarchi B, Jabbari CA, Vedadi A, Navab R. Molecular biology of normal melanocytes and melanoma cells. *J Clin Pathol*. 2013;66(8):644-8.
- [2] Shain AH, Bastian BC. From melanocytes to melanomas. *Nat Rev Cancer*. 2016;16(6):345-58.
- [3] Gray-Schopfer V, Wellbrock C, Marais R. Melanoma biology and new targeted therapy. *Nature*. 2007;445:851-857.
- [4] Wang JX, Fukunaga-Kalabis M, Herlyn M. Crosstalk in skin: melanocytes, keratinocytes, stem cells, and melanoma. *J Cell Commun Signal*. 2016 Sep;10(3):191-196. doi: 10.1007/s12079-016-0349-3. Epub 2016 Aug 23. PMID: 27553358; PMCID: PMC5055506.
- [5] Davis LE, Shalin SC, Tackett AJ. Current state of melanoma diagnosis and treatment. *Cancer Biol Ther*. 2019;20(11):1366-1379. doi: 10.1080/15384047.2019.1640032. Epub 2019 Aug 1. PMID: 31366280; PMCID: PMC6804807.
- [6] Scolyer RA, Long GV, Thompson JF. Evolving concepts in melanoma classification and their relevance to multidisciplinary melanoma patient care. *Mol Oncol*. 2011 Apr;5(2):124-36. doi: 10.1016/j.molonc.2011.03.002. Epub 2011 Mar 21. PMID: 21482206; PMCID: PMC552828.
- [7] Matias M, Pinho JO, Penetra MJ, Campos G, Reis CP, Gaspar MM. The Challenging Melanoma Landscape: From Early Drug Discovery to Clinical Approval. *Cells*. 2021; 10(11):3088. <https://doi.org/10.3390/cells10113088>.
- [8] Guo, W., Wang, H. & Li, C. Signal pathways of melanoma and targeted therapy. *Sig Transduct Target Ther* 6, 424 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00827-6>.
- [9] Hrvatski zavod za javno zdravstvo, Registar za rak Republike Hrvatske. Incidencija raka u Hrvatskoj 2020., Bilten 45, Zagreb, 2022.
- [10] Wilson MA, Schuchter LM. Chemotherapy for Melanoma. *Cancer Treat Res*. 2016;167:209-29. doi: 10.1007/978-3-319-22539-5\_8. PMID: 26601864.
- [11] Garbe C, Peris K, Hauschild A, Saiag P, Middleton M, Spatz A, Grob JJ, Malvey J, Newton-Bishop J, Stratigos A, Pehamberger H, Eggermont A. Diagnosis and treatment of melanoma: European consensus-based interdisciplinary guideline. *Eur J Cancer*. 2010 Jan;46(2):270-83. doi: 10.1016/j.ejca.2009.10.032. Epub 2009 Dec 1. PMID: 19959353.
- [12] Luke JJ, Flaherty KT, Ribas A, Long GV. Targeted agents and immunotherapies: optimizing outcomes in melanoma. *Nat Rev Clin Oncol*. 2017;14(8):463-82.
- [13] Rotte Anand, Bhandaru. Immunotherapy of melanoma. Springer; 2016:1-434.
- [14] Domingues B, Lopes JM, Soares P, Pópulo H. Melanoma treatment in review. *Immunotargets Ther*. 2018;7:35-49 <https://doi.org/10.2147/ITT.S134842>.
- [15] Samlowski WE, Moon J, Witter M, et al. High frequency of brain metastases after adjuvant therapy for high-risk melanoma. *Cancer Med*. 2017;6(11):2576–258.

- [16] Holderfield M, Deuker MM, McCormick F, McMahon M. Targeting RAF kinases for cancer therapy: BRAF-mutated melanoma and beyond. *Nat Rev Cancer*. 2014 Jul;14(7):455-67. doi: 10.1038/nrc3760. PMID: 24957944; PMCID: PMC4250230.
- [17] Nüsslein-Volhard C, Wieschaus E (October 1980). "Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*". *Nature*. 287 (5785): 795–801. Bibcode:1980Natur.287..795N. doi:10.1038/287795a0.
- [18] Abe Y, Tanaka N. Roles of the Hedgehog Signaling Pathway in Epidermal and Hair Follicle Development, Homeostasis, and Cancer. *Journal of Developmental Biology*. 2017; 5(4):12. <https://doi.org/10.3390/jdb5040012>.
- [19] Skoda AM, Simovic D, Karin V, Kardum V, Vranic S, Serman L. The role of the Hedgehog signaling pathway in cancer: A comprehensive review. *Bosn J Basic Med Sci*. 2018 Feb 20;18(1):8-20. doi: 10.17305/bjbms.2018.2756. PMID: 29274272; PMCID: PMC5826678.
- [20] Hahn H., Wicking C., Zaphiropoulos P.G., Gailani M.R., Shanley S., Chidambaram A., Vorechovsky I., Holmberg E., Uden A.B., Gillies S., et al. Mutations of the Human Homolog of *Drosophila* patched in the Nevroid Basal Cell Carcinoma Syndrome. *Cell*. 1996;85:841–851. doi: 10.1016/S0092-8674(00)81268-4.
- [21] Johnson R.L., Rothman A.L., Xie J., Goodrich L.V., Bare J.W., Bonifas J.M., Quinn A.G., Myers R.M., Cox D.R., Epstein E.H., et al. Human Homolog of patched, a Candidate Gene for the Basal Cell Nevus Syndrome. *Science*. 1996;272:1668–1671. doi: 10.1126/science.272.5268.1668.
- [22] Ingham, P. W., and McMahon, A. P. (2001). Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles. *Genes Dev*. 15, 3059–3087. doi: 10.1101/gad.938601.
- [23] Kong JH, Siebold C, Rohatgi R. Biochemical mechanisms of vertebrate hedgehog signaling. *Development*. 2019 May 15;146(10):dev166892. doi: 10.1242/dev.166892. PMID: 31092502; PMCID: PMC6550017.
- [24] Qi X, Li X. Mechanistic Insights into the Generation and Transduction of Hedgehog Signaling. *Trends Biochem Sci*. 2020 May;45(5):397-410. doi: 10.1016/j.tibs.2020.01.006. Epub 2020 Feb 17. PMID: 32311334; PMCID: PMC7174405.
- [25] Qian H, Cao P, Hu M, Gao S, Yan N, Gong X. Inhibition of tetrameric Patched1 by Sonic Hedgehog through an asymmetric paradigm. *Nat Commun*. 2019 May 24;10(1):2320. doi: 10.1038/s41467-019-10234-9. PMID: 31127104; PMCID: PMC6534611.
- [26] 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 Feb 15;59(4):787-92. PMID: 10029063.
- [27] Ingham P., Nystedt S., Nakano Y., Brown W., Stark D., Heuvel M.V.D., Taylor A. Patched represses the Hedgehog signalling pathway by promoting modification of the Smoothed protein. *Curr. Biol*. 2000;10:1315–1318. doi: 10.1016/S0960-9822(00)00755-7.
- [28] Qi X, Schmiege P, Coutavas E, Li X. Two Patched molecules engage distinct sites on Hedgehog yielding a signaling-competent complex. *Science*. 2018 Oct 5;362(6410):eaas8843. doi: 10.1126/science.aas8843. Epub 2018 Aug 23. PMID: 30139912; PMCID: PMC6341491.
- [29] Lee D-H, Lee S, Oh SC. Hedgehog signaling pathway as a potential target in the treatment of advanced gastric cancer. *Tumor Biology*. 2017;39(6).

- [30] Goetz SC, Ocbina PJ, Anderson KV. The primary cilium as a Hedgehog signal transduction machine. *Methods Cell Biol.* 2009;94:199-222. doi: 10.1016/S0091-679X(08)94010-3. Epub 2009 Dec 23. PMID: 20362092; PMCID: PMC2867239.
- [31] Shi Q, Han Y, Jiang J. Suppressor of fused impedes Ci/Gli nuclear import by opposing Trn/Kap $\beta$ 2 in Hedgehog signaling. *J Cell Sci.* 2014 Jan 10;jcs.142828.
- [32] Huntzicker EG. Dual degradation signals control Gli protein stability and tumor formation. *Genes & Development.* 2006 Jan;20(3):276–81.
- [33] Kasper M., Regl G., Frischauf A.-M., Aberger F. GLI transcription factors: Mediators of oncogenic Hedgehog signalling. *Eur. J. Cancer.* 2006;42:437–445. doi: 10.1016/j.ejca.2005.08.039.
- [34] Urman N.M., Mirza A., Atwood S.X., Whitson R.J., Sarin K.Y., Tang J.Y., Oro A.E. Tumor-Derived Suppressor of Fused Mutations Reveal Hedgehog Pathway Interactions. *PLoS ONE.* 2016;11:e0168031. doi: 10.1371/journal.pone.0168031.
- [35] Schulman J.M., Oh D.H., Sanborn J.Z., Pincus L., McCalmont T.H., Cho R.J. Multiple Hereditary Infundibulocystic Basal Cell Carcinoma Syndrome Associated With a GermlineSUFUMutation. *JAMA Dermatol.* 2016;152:323–325. doi: 10.1001/jamadermatol.2015.4233.
- [36] Cohen P.R., Kurzrock R. Merkel Cell Carcinoma with a Suppressor of Fused (SUFU) Mutation: Case Report and Potential Therapeutic Implications. *Dermatol. Ther.* 2015;5:129–143. doi: 10.1007/s13555-015-0074-5.
- [37] Xu Q., Gao J., Li Z. Identification of a novel alternative splicing transcript variant of the suppressor of fused: Relationship with lymph node metastasis in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Int. J. Oncol.* 2016;49:2611–2619. doi: 10.3892/ijo.2016.3753.
- [38] Kinzler, K. W., Hamilton, S. R., and Vogelstein, B. (1987). Increased expression of the epidermal growth factor receptor gene in malignant gliomas is invariably associated with gene amplification. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84, 6899–6903. doi: 10.1073/pnas.84.19.6899.
- [39] Kinzler K.W., Ruppert J.M., Bigner S.H., Vogelstein B. (1988). The GLI gene is a member of the Kruppel family of zinc finger proteins. *Nature* 332: 371–374.
- [40] Jiang J., Hui C.-C. Hedgehog signaling in development and cancer. *Dev. Cell.* 2008;15:801–812. doi: 10.1016/j.devcel.2008.11.010.
- [41] Kinzler K.W., Vogelstein B. The GLI gene encodes a nuclear protein which binds specific sequences in the human genome. *Mol. Cell. Biol.* 1990;10:634–642. doi: 10.1128/MCB.10.2.634.
- [42] Pan Y, Bai CB, Joyner AL, Wang B. Sonic hedgehog signaling regulates Gli2 transcriptional activity by suppressing its processing and degradation. *Mol Cell Biol.* 2006;26:3365–77 *American Society for Microbiology Journals* [cited 2019 Oct 16] Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16611981>.
- [43] Han, Y., Xiong, Y., Shi, X., Wu, J., Zhao, Y., and Jiang, J. (2017). Regulation of Gli ciliary localization and Hedgehog signaling by the PY-NLS/karyopherin- $\beta$ 2 nuclear import system. *PLoS Biol.* 15:e2002063. doi: 10.1371/journal.pbio.2002063.

- [44] Sigafoos AN, Paradise BD, Fernandez-Zapico ME. Hedgehog/GLI Signaling Pathway: Transduction, Regulation, and Implications for Disease. *Cancers (Basel)*. 2021 Jul 7;13(14):3410. doi: 10.3390/cancers13143410. PMID: 34298625; PMCID: PMC8304605.
- [45] Pietrobono S, Gagliardi S, Stecca B. Non-canonical Hedgehog Signaling Pathway in Cancer: Activation of GLI Transcription Factors Beyond Smoothed. *Front Genet*. 2019 Jun 12;10:556. doi: 10.3389/fgene.2019.00556. PMID: 31244888; PMCID: PMC6581679. Antonucci et al., 2019.
- [46] Nguyen V., Chokas A.L., Stecca B., Altaba A.R.I. Cooperative requirement of the Gli proteins in neurogenesis. *Development*. 2005;132:3267–3279. doi: 10.1242/dev.01905.
- [47] I Altaba A.R., Mas C., Stecca B. The Gli code: An information nexus regulating cell fate, stemness and cancer. *Trends Cell Biol*. 2007;17:438–447. doi: 10.1016/j.tcb.2007.06.007.
- [48] Carpenter R., Lo H.-W. Hedgehog pathway and GLI1 isoforms in human cancer. *Discov. Med*. 2012;13:105–113.
- [49] Sadam H., Liivas U., Kazantseva A., Pruunsild P., Kazantseva J., Timmusk T., Neuman T., Palm K. GLI2 cell-specific activity is controlled at the level of transcription and RNA processing: Consequences to cancer metastasis. *Biochim. Biophys. Acta BBA—Mol. Basis Dis*. 2016;1862:46–55. doi: 10.1016/j.bbadis.2015.10.008.
- [50] Regl G, Kasper M, Schnidar H. et al. The zinc-finger transcription factor GLI2 antagonizes contact inhibition and differentiation of human epidermal cells. *Oncogene*. 2004;23(6):1263–1274.
- [51] Buttitta L, Mo R, Hui CC. et al. Interplays of Gli2 and Gli3 and their requirement in mediating Shh-dependent sclerotome induction. *Development*. 2003;130(25):6233–6243.
- [52] Yoon JW, Kita Y, Frank DJ. et al. Gene expression profiling leads to identification of GLI1-binding elements in target genes and a role for multiple downstream pathways in GLI1-induced cell transformation. *J Biol Chem*. 2002;277(7):5548–5555.
- [53] Skoda AM, Simovic D, Karin V, Kardum V, Vranic S, Serman L. The role of the Hedgehog signaling pathway in cancer: A comprehensive review. *Bosn J Basic Med Sci*. 2018 Feb 20;18(1):8–20. doi: 10.17305/bjbms.2018.2756. PMID: 29274272; PMCID: PMC5826678.
- [54] Jenkins D. Hedgehog signalling: emerging evidence for non-canonical pathways. *Cell Signal*. 2009 Jul;21(7):1023–34. doi: 10.1016/j.cellsig.2009.01.033. PMID: 19399989.
- [55] Polizio AH, Chinchilla P, Chen X, Kim S, Manning DR, Riobo NA. Heterotrimeric Gi proteins link Hedgehog signaling to activation of Rho small GTPases to promote fibroblast migration. *J Biol Chem*. 2011 Jun 3;286(22):19589–96. doi: 10.1074/jbc.M110.197111. Epub 2011 Apr 7. PMID: 21474452; PMCID: PMC3103338.
- [56] Riobó NA, Lu K, Ai X, Haines GM, Emerson CP. Phosphoinositide 3-kinase and Akt are essential for Sonic Hedgehog signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Mar 21;103(12):4505–10.
- [57] Buonamici S, Williams J, Morrissey M, Wang A, Guo R, Vattay A, Hsiao K, Yuan J, Green J, Ospina B, Yu Q, Ostrom L, Fordjour P, Anderson DL, Monahan JE, Kelleher JF, Peukert S, Pan S, Wu X, Maira SM, García-Echeverría C, Briggs KJ, Watkins DN, Yao YM, Lengauer C, Warmuth M, Sellers WR, Dorsch M. Interfering with resistance to smoothed antagonists by

inhibition of the PI3K pathway in medulloblastoma. *Sci Transl Med.* 2010 Sep 29;2(51):51ra70. doi: 10.1126/scitranslmed.3001599. PMID: 20881279; PMCID: PMC3422576.

- [58] Filbin MG, Dabral SK, Pazyra-Murphy MF, Ramkissoon S, Kung AL, Pak E, Chung J, Theisen MA, Sun Y, Franchetti Y, Sun Y, Shulman DS, Redjal N, Tabak B, Beroukhim R, Wang Q, Zhao J, Dorsch M, Buonamici S, Ligon KL, Kelleher JF, Segal RA. Coordinate activation of Shh and PI3K signaling in PTEN-deficient glioblastoma: new therapeutic opportunities. *Nat Med.* 2013 Nov;19(11):1518-23. doi: 10.1038/nm.3328. Epub 2013 Sep 29. PMID: 24076665; PMCID: PMC3923315.
- [59] Alexaki, V. I., Javelaud, D., Van Kempen, L. C., Mohammad, K. S., Dennler, S., Luciani, F., et al. (2010). GLI2-mediated melanoma invasion and metastasis. *J. Natl. Cancer Inst.* 102, 1148–1159. doi: 10.1093/jnci/djq257.
- [60] Di Magno, L., Basile, A., Coni, S., Manni, S., Sdruscia, G., D’Amico, D., et al. (2016). The energy sensor AMPK regulates Hedgehog signaling in human cells through a unique Gli1 metabolic checkpoint. *Oncotarget* 7, 9538–9549. doi: 10.18632/oncotarget.7070.
- [61] Zhang, R., Huang, S. Y., Li, K. W., Li, Y. H., Hsu, W. H., Zhang, G. J., et al. (2017). Dual degradation signals destruct GLI1: AMPK inhibits GLI1 through b-TrCP-mediated proteasome degradation. *Oncotarget* 8, 49869–49881. doi: 10.18632/oncotarget.17769.
- [62] Cargnello M, Roux PP. Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. *Microbiol Mol Biol Rev* 2011;75:50-83.
- [63] Zhang W., Liu H.T. MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells. *Cell Res.* 2002;12:9–18. doi: 10.1038/sj.cr.7290105.
- [64] Stecca B, Mas C, Clement V, Zbinden M, Correa R, Piguet V, et al. Melanomas require HEDGEHOG-GLI signaling regulated by interactions between GLI1 and the RAS-MEK/AKT pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007 Apr 3;104(14):5895-900. doi: 10.1073/pnas.0700776104. Epub 2007 Mar 28. PMID: 17392427; PMCID: PMC1838820.
- [65] Riobo NA, Haines GM, Emerson CP Jr. Protein kinase C-d and mitogen-activated protein/extracellular signal-regulated kinase-1 control GLI activation in hedgehog signaling. *Cancer Res* 2006;66:839-45.
- [66] Whisenant TC, Ho DT, Benz RW, Rogers JS, Kaake RM, Gordon EA, et al. Computational prediction and experimental verification of new MAP kinase docking sites and substrates including Gli transcription factors. *PLoS Comput Biol* 2010;6:e1000908.
- [67] Faião-Flores F, Alves-Fernandes DK, Pennacchi PC, Sandri S, Vicente ALSA, Scapulatempo-Neto C, et al. Targeting the hedgehog transcription factors GLI1 and GLI2 restores sensitivity to vemurafenib-resistant human melanoma cells. *Oncogene.* 2017 Mar 30;36(13):1849–61.
- [68] Osawa H, Ohnishi H, Takano K, Noguti T, Mashima H, Hoshino H, et al. Sonic hedgehog stimulates the proliferation of rat gastric mucosal cells through ERK activation by elevating intracellular calcium concentration. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;344:680-7. Osawa H, Ohnishi H, Takano K, Noguti T, Mashima H, Hoshino H, et al. Sonic hedgehog stimulates the proliferation of rat gastric mucosal cells through ERK activation by elevating intracellular calcium concentration. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;344:680-7.



- [69] Yan R, Peng X, Yuan X, Huang D, Chen J, Lu Q, et al. Suppression of growth and migration by blocking the Hedgehog signaling pathway in gastric cancer cells. *Cell Oncol (Dordr)*. 2013;36:421-35.
- [70] Che J, Zhang FZ, Zhao CQ, Hu XD, Fan SJ. Cyclopamine is a novel Hedgehog signaling inhibitor with significant anti-proliferative, anti-invasive and anti-estrogenic potency in human breast cancer cells. *Oncol Lett* 2013;5:1417-21.
- [71] Chang H, Li Q, Moraes RC, Lewis MT, Hamel PA. Activation of Erk by sonic hedgehog independent of canonical hedgehog signalling. *Int J Biochem Cell Biol* 2010;42:1462-71.
- [72] Ji Z, Mei FC, Xie J, Cheng X. Oncogenic KRAS activates hedgehog signaling pathway in pancreatic cancer cells. *J Biol Chem* 2007;282:14048-55.
- [73] Morton JP, Mongeau ME, Klimstra DS, Morris JP, Lee YC, Kawaguchi Y, et al. Sonic hedgehog acts at multiple stages during pancreatic tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104:5103-8.
- [74] Hsieh A, Ellsworth R, Hsieh D. Hedgehog/GLI1 regulates IGF dependent malignant behaviors in glioma stem cells. *J Cell Physiol* 2011;226:1118-27.
- [75] Lu JT, Zhao WD, He W, Wei W. Hedgehog signaling pathway mediates invasion and metastasis of hepatocellular carcinoma via ERK pathway. *Acta Pharmacol Sin* 2012;33:691-700.
- [76] Hou X, Chen X, Zhang P, Fan Y, Ma A, Pang T, et al. Inhibition of hedgehog signaling by GANT58 induces apoptosis and shows synergistic antitumor activity with AKT inhibitor in acute T cell leukemia cells. *Biochimie* 2014;101:50-9.
- [77] Mazumdar T, DeVecchio J, Agyeman A, Shi T, Houghton JA. The GLI genes as the molecular switch in disrupting Hedgehog signaling in colon cancer. *Oncotarget*. 2011 Aug;2(8):638-45. doi: 10.18632/oncotarget.310. PMID: 21860067; PMCID: PMC3248207.
- [78] Lee D-H, Lee S, Oh SC. Hedgehog signaling pathway as a potential target in the treatment of advanced gastric cancer. *Tumor Biology*. 2017;39(6). doi:10.1177/1010428317692266.
- [79] Amakye D, Jagani Z, Dorsch, M. Unraveling the therapeutic potential of the Hedgehog pathway in cancer. *Nature Medicine* 2013;19:1410-22.
- [80] [https://en.wikipedia.org/wiki/Cyclopamine#cite\\_note-Heretsch\\_2010-2](https://en.wikipedia.org/wiki/Cyclopamine#cite_note-Heretsch_2010-2). In.
- [81] Jalili A, Mertz KD, Romanov J, Wagner C, Kalthoff F, Stuetz A, et al. NVP-LDE225, a potent and selective SMOOTHENED antagonist reduces melanoma growth in vitro and in vivo. *PLoS One*. 2013 Jul 30;8(7):e69064. doi: 10.1371/journal.pone.0069064. Erratum in: *PLoS One*. 2013;8(9). doi:10.1371/annotation/ddd22094-5d8d-43ef-ad81-b95afe392ec7. PMID: 23935925; PMCID: PMC3728309.
- [82] Yauch RL, Dijkgraaf GJ, Alicke B, Januario T, Ahn CP, Holcomb T, et al. Smoothed mutation confers resistance to a Hedgehog pathway inhibitor in medulloblastoma. *Science* 2009;326:572-4.
- [83] Lee MJ, Hatton BA, Villavicencio EH, Khanna PC, Friedman SD, Ditzler S, et al. Hedgehog pathway inhibitor saridegib (IPI-926) increases lifespan in a mouse medulloblastoma model. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012;109:7859-64.

- [84] Lauth M, Bergström A, Shimokawa T, Toftgård R. Inhibition of GLI-mediated transcription and tumor cell growth by small-molecule antagonists. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104:8455-60.
- [85] Calcaterra A, Iovine V, Botta B, Quaglio D, D'Acquarica I, Ciogli A, Iazzetti A, Alfonsi R, Lospinoso Severini L, Infante P, Di Marcotullio L, Mori M, Ghirga F. Chemical, computational and functional insights into the chemical stability of the Hedgehog pathway inhibitor GANT61. *J Enzyme Inhib Med Chem*. 2018 Dec;33(1):349-358. doi: 10.1080/14756366.2017.1419221. PMID: 29338454; PMCID: PMC6009951.
- [86] Kim J, Lee JJ, Kim J, Gardner D, Beachy PA. Arsenic antagonizes the Hedgehog pathway by preventing ciliary accumulation and reducing stability of the Gli2 transcriptional effector. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010;107:13432-7.
- [87] Infante P, Mori M, Alfonsi R, Ghirga F, Aiello F, Toscano S, et al. Gli1/DNA interaction is a druggable target for Hedgehog-dependent tumors. *EMBO J* 2015;34:200-17.
- [88] Ericson J, Morton S, Kawakami A, Roelink H, Jessell TM. Two critical periods of Sonic Hedgehog signaling required for the specification of motor neuron identity. *Cell* 1996;87:661-73.
- [89] Stanton BZ, Peng LF, Maloof N, Nakai K, Wang X, Duffner JL, et al. A small molecule that binds Hedgehog and blocks its signaling in human cells. *Nat Chem Biol* 2009;5:154-6.
- [90] Maun HR, Wen X, Lingel A, de Sauvage FJ, Lazarus RA, Scales SJ, Hymowitz SG. Hedgehog pathway antagonist 5E1 binds hedgehog at the pseudo-active site. *J Biol Chem*. 2010 Aug 20;285(34):26570-80. doi: 10.1074/jbc.M110.112284. Epub 2010 May 26. PMID: 20504762; PMCID: PMC2924095.
- [91] Dahmane N, Lee J, Robins P, Heller P, Ruiz i Altaba A. Activation of the transcription factor Gli1 and the Sonic Hedgehog signalling pathway in skin tumours. *Nature*. 1997;389(6653):876-881.
- [92] Pandolfi S, Stecca B. Hedgehog-Gli signaling in basal cell carcinoma and other skin cancers: prospects for therapy. *Research and Reports in Biology*. 2015;6:55-71 <https://doi.org/10.2147/RRB.S60262>.
- [93] Pomeroy SL, Tamayo P, Gaasenbeek M, Sturla LM, Angelo M, McLaughlin ME, Kim JY, Goumnerova LC, Black PM, Lau C, Allen JC, Zagzag D, Olson JM, Curran T, Wetmore C, Biegel JA, Poggio T, Mukherjee S, Rifkin R, Califano A, Stolovitzky G, Louis DN, Mesirov JP, Lander ES, Golub TR. Prediction of central nervous system embryonal tumour outcome based on gene expression. *Nature*. 2002;415:436-442.
- [94] Bar EE, Chaudhry A, Farah MH, Eberhart CG. Hedgehog signaling promotes medulloblastoma survival via Bc/II. *Am J Pathol*. 2007 Jan;170(1):347-55. doi: 10.2353/ajpath.2007.060066. PMID: 17200206; PMCID: PMC1762704.
- [95] Berman DM, Karhadkar SS, Maitra A, Montes De Oca R, Gerstenblith MR, Briggs K, et al. Widespread requirement for Hedgehog ligand stimulation in growth of digestive tract tumours. *Nature*. 2003 Oct 23;425(6960):846-51. doi: 10.1038/nature01972. Epub 2003 Sep 14. PMID: 14520411.
- [96] Sheng T, Li C, Zhang X, Chi S, He N, Chen K, et al. Activation of the hedgehog pathway in advanced prostate cancer. *Mol Cancer*. 2004 Oct 13;3:29. doi: 10.1186/1476-4598-3-29. PMID: 15482598; PMCID: PMC524523.

- [97] Varnat F, Duquet A, Malerba M, Zbinden M, Mas C, Gervaz P, Ruiz i Altaba A. Human colon cancer epithelial cells harbour active HEDGEHOG-GLI signalling that is essential for tumour growth, recurrence, metastasis and stem cell survival and expansion. *EMBO Mol Med*. 2009 Sep;1(6-7):338-51. doi: 10.1002/emmm.200900039. PMID: 20049737; PMCID: PMC3378144.
- [98] Bermudez O, Hennen E, Koch I, Lindner M, Eickelberg O. Gli1 mediates lung cancer cell proliferation and Sonic Hedgehog-dependent mesenchymal cell activation. *PLoS One*. 2013 May 7;8(5):e63226. doi: 10.1371/journal.pone.0063226. PMID: 23667589; PMCID: PMC3646741.
- [99] Huang L, Walter V, Hayes DN, Onaitis M. Hedgehog-GLI signaling inhibition suppresses tumor growth in squamous lung cancer. *Clin Cancer Res*. 2014 Mar 15;20(6):1566-75. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-13-2195. Epub 2014 Jan 14. PMID: 24423612; PMCID: PMC4136748.
- [100] Giroux-Leprieur E, Costantini A, Ding VW, He B. Hedgehog Signaling in Lung Cancer: From Oncogenesis to Cancer Treatment Resistance. *Int J Mol Sci*. 2018 Sep 19;19(9):2835. doi: 10.3390/ijms19092835. PMID: 30235830; PMCID: PMC6165231.
- [101] Bhattacharya R, Kwon J, Ali B, Wang E, Patra S, Shridhar V, Mukherjee P. Role of hedgehog signaling in ovarian cancer. *Clin Cancer Res*. 2008 Dec 1;14(23):7659-66. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-08-1414. PMID: 19047091.
- [102] Ozretić P, Trnski D, Musani V, Maurac I, Kalafatić D, Orešković S, et al. Non-canonical Hedgehog signaling activation in ovarian borderline tumors and ovarian carcinomas. *Int J Oncol*. 2017 Dec;51(6):1869–77.
- [103] O'Reilly KE, de Miera EV, Segura MF, Friedman E, Poliseno L, Han SW, et al. Hedgehog pathway blockade inhibits melanoma cell growth in vitro and in vivo. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2013 Nov 11;6(11):1429-50. doi: 10.3390/ph6111429. PMID: 24287465; PMCID: PMC3854019.
- [104] Gunarta IK, Li R, Nakazato R, Suzuki R, Boldbaatar J, Suzuki T, Yoshioka K. Critical role of glioma-associated oncogene homolog 1 in maintaining invasive and mesenchymal-like properties of melanoma cells. *Cancer Sci*. 2017 Aug;108(8):1602-1611. doi: 10.1111/cas.13294. Epub 2017 Jul 11. PMID: 28635133; PMCID: PMC5543504.
- [105] <https://www.upmbiomedicals.com/resource-center/learning-center/what-is-3d-cell-culture/3d-cell-culture-models/>.
- [106] Rasband, W.S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <https://imagej.nih.gov/ij/>, 1997-2018.
- [107] Ben-Ari Fuchs S, Lieder I, Stelzer G, Mazor Y, Buzhor E, Kaplan S, et al. GeneAnalytics: An Integrative Gene Set Analysis Tool for Next Generation Sequencing, RNAseq and Microarray Data, OMICS(2016).
- [108] Tang Z, Li C, Kang B, Gao G, Li C, Zhang Z. GEPIA: a web server for cancer and normal gene expression profiling and interactive analyses. *Nucleic Acids Res*. 2017 Jul 3;45(W1):W98-W102. doi: 10.1093/nar/gkx247. PMID: 28407145; PMCID: PMC5570223.
- [109] Uhlén M, Fagerberg L, Hallström BM, Lindskog C, Oksvold P, Mardinoglu A, et al. Proteomics. Tissue-based map of the human proteome. *Science*. 2015 Jan 23;347(6220):1260419. doi: 10.1126/science.1260419. PMID: 25613900.

- [110] Principles of Gene Manipulation and Genomics, 7th Edition. S. B. Primrose & R. M. Twyman. Blackwell Publishing, 2006.
- [111] Piteša, N. (2023) Interakcija signalnih puteva RAS/RAF/MAPK i Hedgehog-GLI u rezistenciji na lijekove u staničnim linijama melanoma čovjeka. Doktorski rad. Osijek. Sveučilište u Osijeku.
- [112] Brtan, A. (2021) Karakterizacija i validacija sojeva stanične linije melanoma dobivenih ugradnjom sekvence gena SHH u genom. Diplomski rad. Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet.
- [113] Epstein EH. Basal cell carcinomas: attack of the hedgehog. *Nat Rev Cancer*. 2008 Oct;8(10):743-54. doi: 10.1038/nrc2503. PMID: 18813320; PMCID: PMC4457317.
- [114] Lospinoso Severini L, Ghirga F, Bufalieri F, Quaglio D, Infante P, Di Marcotullio L. The SHH/GLI signaling pathway: a therapeutic target for medulloblastoma. *Expert Opin Ther Targets*. 2020 Nov;24(11):1159-1181. doi: 10.1080/14728222.2020.1823967. Epub 2020 Sep 29. PMID: 32990091.
- [115] Santini R, Vinci MC, Pandolfi S, Penachioni JY, Montagnani V, Olivito B, Gattai R, Pimpinelli N, Gerlini G, Borgognoni L, Stecca B. Hedgehog-GLI signaling drives self-renewal and tumorigenicity of human melanoma-initiating cells. *Stem Cells*. 2012 Sep;30(9):1808-18. doi: 10.1002/stem.1160. PMID: 22730244.
- [116] Tolosa EJ, Fernandez-Barrena MG, Iguchi E, McCleary-Wheeler AL, Carr RM, Almada LL, et al. GLI1/GLI2 functional interplay is required to control Hedgehog/GLI targets gene expression. *Biochem J*. 2020 Sep 18;477(17):3131-3145. doi: 10.1042/BCJ20200335. PMID: 32766732.
- [117] Lo Ré AE, Fernández-Barrena MG, Almada LL, Mills LD, ElSawa SF, Lund G, et al. Novel AKT1-GLI3-VMP1 pathway mediates KRAS oncogene-induced autophagy in cancer cells. *J Biol Chem*. 2012 Jul 20;287(30):25325-34. doi: 10.1074/jbc.M112.370809. Epub 2012 Apr 25. PMID: 22535956; PMCID: PMC3408195.
- [118] Todd L, Fischer AJ. Hedgehog signaling stimulates the formation of proliferating Müller glia-derived progenitor cells in the chick retina. *Development*. 2015 Aug 1;142(15):2610-22.
- [119] Harter PN, Baumgarten P, Zinke J, Schilling K, Baader S, Hartmetz AK, et al. Paired box gene 8 (PAX8) expression is associated with sonic hedgehog (SHH)/wingless int (WNT) subtypes, desmoplastic histology and patient survival in human medulloblastomas. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2015;41(2):165-79.
- [120] Buttitta L, Mo R, Hui CC, Fan CM. Interplays of Gli2 and Gli3 and their requirement in mediating Shh-dependent sclerotome induction. *Development*. 2003 Dec 22;130(25):6233-43.
- [121] Zhang R, Wu J, Ferrandon S, Glowacki KJ, Houghton JA. Targeting GLI by GANT61 involves mechanisms dependent on inhibition of both transcription and DNA licensing. *Oncotarget*. 2016 Nov 15;7(49):80190-207.
- [122] Wang X, Venugopal C, Manoranjan B, McFarlane N, O'Farrell E, Nolte S, et al. Sonic hedgehog regulates Bmi1 in human medulloblastoma brain tumor-initiating cells. *Oncogene*. 2012 Jan;31(2):187-99.
- [123] Li X, Deng W, Nail CD, Bailey SK, Kraus MH, Ruppert JM, et al. Snail induction is an early response to Gli1 that determines the efficiency of epithelial transformation. *Oncogene*. 2006 Jan;25(4):609-21.

- [124] Wen L, Hasebe T, Miller TC, Ishizuya-Oka A, Shi YB. A requirement for hedgehog signaling in thyroid hormone-induced postembryonic intestinal remodeling. *Cell Biosci.* 2015 Mar 24;5(1):13.
- [125] Katoh Y, Katoh M. WNT antagonist, SFRP1, is Hedgehog signaling target. *Int J Mol Med.* 2006 Jan;17(1):171–5.
- [126] Usui T, Sakurai M, Umata K, Elbadawy M, Ohama T, Yamawaki H, et al. Hedgehog Signals Mediate Anti-Cancer Drug Resistance in Three-Dimensional Primary Colorectal Cancer Organoid Culture. *Int J Mol Sci.* 2018 Apr;19(4):1098.
- [127] Zeb1 controls neuron differentiation and germinal zone exit by a mesenchymal-epithelial-like transition | *eLife* [Internet]. [cited 2023 May 12]. Available from: <https://elifesciences.org/articles/12717>
- [128] Katoh Y, Katoh M. Hedgehog Target Genes: Mechanisms of Carcinogenesis Induced by Aberrant Hedgehog Signaling Activation. *Curr Mol Med.* 9(7):873–86.
- [129] Eichberger T, Sander V, Schnidar H, Regl G, Kasper M, Schmid C, et al. Overlapping and distinct transcriptional regulator properties of the GLI1 and GLI2 oncogenes. *Genomics.* 2006 May;87(5):616-32. doi: 10.1016/j.ygeno.2005.12.003. Epub 2006 Jan 24. PMID: 16434164.
- [130] Ali SA, Niu B, Cheah KSE, Alman B. Unique and overlapping GLI1 and GLI2 transcriptional targets in neoplastic chondrocytes. *PLoS One.* 2019 Jan 29;14(1):e0211333. doi: 10.1371/journal.pone.0211333. PMID: 30695055; PMCID: PMC6350985.
- [131] Wang C, Rütter U, Wang B. The Shh-independent activator function of the full-length Gli3 protein and its role in vertebrate limb digit patterning. *Dev Biol.* 2007 May 15;305(2):460-9. doi: 10.1016/j.ydbio.2007.02.029. Epub 2007 Feb 28. PMID: 17400206; PMCID: PMC1952533.
- [132] Zubčić V, Rinčić N, Kurtović M, Trnski D, Musani V, Ozretić P, et al. GANT61 and Lithium Chloride Inhibit the Growth of Head and Neck Cancer Cell Lines Through the Regulation of GLI3 Processing by GSK3β. *Int J Mol Sci.* 2020 Sep 3;21(17):6410. doi: 10.3390/ijms21176410. PMID: 32899202; PMCID: PMC7504345.
- [133] Lex, R.K., Zhou, W., Ji, Z. et al. GLI transcriptional repression is inert prior to Hedgehog pathway activation. *Nat Commun* 13, 808 (2022). <https://doi.org/10.1038/s41467-022-28485-4>.
- [134] Metri R, Mohan A, Nsengimana J, Pozniak J, Molina-Paris C, Newton-Bishop J, et al. Identification of a gene signature for discriminating metastatic from primary melanoma using a molecular interaction network approach. *Sci Rep.* 2017 Dec 11;7(1):17314.
- [135] Hibino T, Sakaguchi M, Miyamoto S, Yamamoto M, Motoyama A, Hosoi J, et al. S100A9 is a novel ligand of EMMPRIN that promotes melanoma metastasis. *Cancer Res.* 2013 Jan 1;73(1):172–83.
- [136] Hwang SH, Ahn JH, Lee M. Upregulation of S100A9 contributes to the acquired resistance to BRAF inhibitors. *Genes Genomics.* 2019 Nov;41(11):1273–80.
- [137] Yang X, Liang R, Liu C, Liu JA, Cheung MPL, Liu X, et al. SOX9 is a dose-dependent metastatic fate determinant in melanoma. *J Exp Clin Cancer Res CR.* 2019 Jan 14;38(1):17.

- [138] Cheng PF, Shakhova O, Widmer DS, Eichhoff OM, Zingg D, Frommel SC, et al. Methylation-dependent SOX9 expression mediates invasion in human melanoma cells and is a negative prognostic factor in advanced melanoma. *Genome Biol.* 2015 Feb 22;16:42.
- [139] Lazar I, Perlman R, Lotem M, Peretz T, Ben-Yehuda D, Kadouri L. The clinical effect of the inhibitor of apoptosis protein livin in melanoma. *Oncology.* 2012;82(4):197–204.
- [140] Yonekura S. Epstein-Barr Virus-induced Gene 3 as a Novel Biomarker in Metastatic Melanoma With Infiltrating CD8+ T Cells: A Study Based on The Cancer Genome Atlas (TCGA). *Anticancer Res.* 2022 Jan;42(1):511–7.
- [141] Chhabra Y, Waters MJ, Brooks AJ. Role of the growth hormone-IGF-1 axis in cancer. *Expert Rev Endocrinol Metab.* 2011 Jan;6(1):71-84. doi: 10.1586/eem.10.73. PMID: 30764037.
- [142] Zhou, C.; Shen, S.; Moran, R.; Deng, N.; Marbán, E.; Melmed, S. Pituitary Somatotroph Adenoma-Derived Exosomes: Characterization of Nonhormonal Actions. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2022, 107, 379–397.
- [143] Boguszewski CL, Boguszewski MCDS. Growth Hormone's Links to Cancer. *Endocr Rev.* 2019 Apr 1;40(2):558-574. doi: 10.1210/er.2018-00166. PMID: 30500870.
- [144] Faruk, M.; Ibrahim, S.; Aminu, S.M.; Adamu, A.; Abdullahi, A.; Suleiman, A.M.; Rafindadi, A.H.; Mohammed, A.; Iliyasu, Y.; Idoko, J.; et al. Prognostic Significance of BIRC7/Livin, Bcl-2, P53, Annexin V, PD-L1, DARC, MSH2 and PMS2 in Colorectal Cancer Treated with FOLFOX Chemotherapy with or without Aspirin. *PLoS ONE* 2021, 16, e0245581.
- [145] Yang, Y.; Sun, P.; Xu, W.; Xia, W. High BIRC7 Expression Might Be an Independent Prognostic Indicator of Poor Recurrence-Free Survival in Patients with Prostate Cancer. *Technol. Cancer Res. Treat.* 2018, 17, 1533033818809694.
- [146] Li, J.; Yang, Z.; Huang, S.; Li, D. BIRC7 and STC2 Expression Are Associated With Tumorigenesis and Poor Outcome in Extrahepatic Cholangiocarcinoma. *Technol. Cancer Res. Treat.* 2020, 19, 1533033820971676.
- [147] Liu, K.; Yu, Q.; Li, H.; Xie, C.; Wu, Y.; Ma, D.; Sheng, P.; Dai, W.; Jiang, H. BIRC7 Promotes Epithelial-Mesenchymal Transition and Metastasis in Papillary Thyroid Carcinoma through Restraining Autophagy. *Am. J. Cancer Res.* 2020, 10, 78–94.
- [148] Lazar I, Perlman R, Lotem M, Peretz T, Ben-Yehuda D, Kadouri L. The clinical effect of the inhibitor of apoptosis protein livin in melanoma. *Oncology.* 2012;82(4):197-204. doi: 10.1159/000334234. Epub 2012 Mar 22. PMID: 22441029.
- [149] Yuan, B.; Ran, B.; Wang, S.; Liu, Z.; Zheng, Z.; Chen, H. SiRNA Directed against Livin Inhibits Tumor Growth and Induces Apoptosis in Human Glioma Cells. *J. Neurooncol.* 2012, 107, 81–87.
- [150] Zhuang, L.; Shen, L.-D.; Li, K.; Yang, R.-X.; Zhang, Q.-Y.; Chen, Y.; Gao, C.-L.; Dong, C.; Bi, Q.; Tao, J.-N.; et al. Inhibition of Livin Expression Suppresses Cell Proliferation and Enhances Chemosensitivity to Cisplatin in Human Lung Adenocarcinoma Cells. *Mol. Med. Rep.* 2015, 12, 547–552.
- [151] Gao F, Zhang Y, Wang S, Liu Y, Zheng L, Yang J, et al. Hes1 is involved in the self-renewal and tumorigenicity of stem-like cancer cells in colon cancer. *Sci Rep.* 2014 Dec 4;4:7287. doi: 10.1038/srep07287. Erratum for: doi: 10.1038/srep03963. PMCID: PMC4255176.

- [152] Li, Y.; Zhang, Y.; Liu, X.; Wang, M.; Wang, P.; Yang, J.; Zhang, S. Lutein Inhibits Proliferation, Invasion and Migration of Hypoxic Breast Cancer Cells via Downregulation of HES1. *Int. J. Oncol.* 2018, 52, 2119–2129.
- [153] Cenciarelli C, Marei HE, Zonfrillo M, Casalbore P, Felsani A, Giannetti S, et al. The interference of Notch1 target Hes1 affects cell growth, differentiation and invasiveness of glioblastoma stem cells through modulation of multiple oncogenic targets. *Oncotarget.* 2017 Mar 14;8(11):17873-17886. doi: 10.18632/oncotarget.15013. PMID: 28157712; PMCID: PMC5392293.
- [154] Sharma D, Mirando AJ, Leinroth A, Long JT, Karner CM, Hilton MJ. HES1 is a novel downstream modifier of the SHH-GLI3 Axis in the development of preaxial polydactyly. *PLoS Genet.* 2021 Dec 20;17(12):e1009982. doi: 10.1371/journal.pgen.1009982. PMID: 34928956; PMCID: PMC8726490.
- [155] Ballerini, P.; Struski, S.; Cresson, C.; Prade, N.; Toujani, S.; Deswarte, C.; Dobbelsstein, S.; Petit, A.; Lapillonne, H.; Gautier, E.-F.; et al. RET Fusion Genes Are Associated with Chronic Myelomonocytic Leukemia and Enhance Monocytic Differentiation. *Leukemia* 2012, 26, 2384–2389.
- [156] Hojo H, Ohba S, Taniguchi K, Shirai M, Yano F, Saito T, Ikeda T, Nakajima K, Komiyama Y, Nakagata N, Suzuki K, Mishina Y, Yamada M, Konno T, Takato T, Kawaguchi H, Kambara H, Chung UI. Hedgehog-Gli activators direct osteo-chondrogenic function of bone morphogenetic protein toward osteogenesis in the perichondrium. *J Biol Chem.* 2013 Apr 5;288(14):9924-9932. doi: 10.1074/jbc.M112.409342. Epub 2013 Feb 19. PMID: 23423383; PMCID: PMC3617292.
- [157] Tan Z, Niu B, Tsang KY, Melhado IG, Ohba S, He X, Huang Y, Wang C, McMahon AP, Jauch R, Chan D, Zhang MQ, Cheah KSE. Synergistic co-regulation and competition by a SOX9-GLI-FOXA phasic transcriptional network coordinate chondrocyte differentiation transitions. *PLoS Genet.* 2018 Apr 16;14(4):e1007346. doi: 10.1371/journal.pgen.1007346. PMID: 29659575; PMCID: PMC5919691.
- [158] Yang X, Liang R, Liu C, Liu JA, Cheung MPL, Liu X, et al. SOX9 is a dose-dependent metastatic fate determinant in melanoma. *J Exp Clin Cancer Res.* 2019 Jan 14;38(1):17. doi: 10.1186/s13046-018-0998-6. PMID: 30642390; PMCID: PMC6330758.
- [159] Hwang SH, Ahn JH, Lee M. Upregulation of S100A9 contributes to the acquired resistance to BRAF inhibitors. *Genes Genomics.* 2019 Nov;41(11):1273-1280. doi: 10.1007/s13258-019-00856-0. Epub 2019 Aug 6. PMID: 31388978.
- [160] Hibino T, Sakaguchi M, Miyamoto S, Yamamoto M, Motoyama A, Hosoi J, et al. S100A9 is a novel ligand of EMMPRIN that promotes melanoma metastasis. *Cancer Res.* 2013 Jan 1;73(1):172-83. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-11-3843. Epub 2012 Nov 7. PMID: 23135911.
- [161] UCSC Genome Browser: Kent WJ, Sugnet CW, Furey TS, Roskin KM, Pringle TH, Zahler AM, Haussler D. The human genome browser at UCSC. *Genome Res.* 2002 Jun;12(6):996-1006.
- [162] Metri R, Mohan A, Nsengimana J, Pozniak J, Molina-Paris C, Newton-Bishop J, et al. Identification of a gene signature for discriminating metastatic from primary melanoma using a molecular interaction network approach. *Sci Rep.* 2017 Dec 11;7(1):17314. doi: 10.1038/s41598-017-17330-0. PMID: 29229936; PMCID: PMC5725601.
- [163] Wang LX, Li Y, Chen GZ. Network-based co-expression analysis for exploring the potential diagnostic biomarkers of metastatic melanoma. *PLoS One.* 2018 Jan 29;13(1):e0190447. doi: 10.1371/journal.pone.0190447. PMID: 29377892; PMCID: PMC5788335.

- [164] Wang Z, Yang MQ, Lei L, Fei LR, Zheng YW, Huang WJ, Li ZH, Liu CC, Xu HT. Overexpression of KRT17 promotes proliferation and invasion of non-small cell lung cancer and indicates poor prognosis. *Cancer Manag Res.* 2019 Aug 7;11:7485-7497. doi: 10.2147/CMAR.S218926. PMID: 31496806; PMCID: PMC6689799.
- [165] Li D, Ni XF, Tang H, Zhang J, Zheng C, Lin J, Wang C, Sun L, Chen B. KRT17 Functions as a Tumor Promoter and Regulates Proliferation, Migration and Invasion in Pancreatic Cancer via mTOR/S6k1 Pathway. *Cancer Manag Res.* 2020 Mar 19;12:2087-2095. doi: 10.2147/CMAR.S243129. PMID: 32256116; PMCID: PMC7090205.
- [166] Zhang H, Zhang Y, Xia T, Lu L, Luo M, Chen Y, Liu Y, Li Y. The Role of Keratin17 in Human Tumours. *Front Cell Dev Biol.* 2022 Feb 24;10:818416. doi: 10.3389/fcell.2022.818416. PMID: 35281081; PMCID: PMC8912659.
- [167] Sakurai M, Miki Y, Takagi K, Suzuki T, Ishida T, Ohuchi N, Sasano H. Interaction with adipocyte stromal cells induces breast cancer malignancy via S100A7 upregulation in breast cancer microenvironment. *Breast Cancer Res.* 2017 Jun 19;19(1):70. doi: 10.1186/s13058-017-0863-0. PMID: 28629450; PMCID: PMC5477117.
- [168] Muoio MG, Talia M, Lappano R, Sims AH, Vella V, Cirillo F, et al. Activation of the S100A7/RAGE Pathway by IGF-1 Contributes to Angiogenesis in Breast Cancer. *Cancers (Basel).* 2021 Feb 4;13(4):621. doi: 10.3390/cancers13040621. PMID: 33557316; PMCID: PMC7915817.
- [169] Tian T, Li X, Hua Z, Ma J, Wu X, Liu Z, et al. S100A7 promotes the migration, invasion and metastasis of human cervical cancer cells through epithelial-mesenchymal transition. *Oncotarget.* 2017 Apr 11;8(15):24964-24977. doi: 10.18632/oncotarget.15329. PMID: 28212564; PMCID: PMC5421902.
- [170] Lin M, Xia B, Qin L, Chen H, Lou G. S100A7 Regulates Ovarian Cancer Cell Metastasis and Chemoresistance Through MAPK Signaling and Is Targeted by miR-330-5p. *DNA Cell Biol.* 2018 May;37(5):491-500. doi: 10.1089/dna.2017.3953. Epub 2018 Feb 27. PMID: 29485916.
- [171] Yuan M, Wang L, Huang H, Li Y, Zheng X, Shao Q, Jiang J. IL-1R2 expression in human gastric cancer and its clinical significance. *Biosci Rep.* 2021 Mar 26;41(3):BSR20204425. doi: 10.1042/BSR20204425. PMID: 33704402; PMCID: PMC8011276.
- [172] Zhang, L.; Qiang, J.; Yang, X.; Wang, D.; Rehman, A.U.; He, X.; Chen, W.; Sheng, D.; Zhou, L.; Jiang, Y.-Z.; et al. IL1R2 Blockade Suppresses Breast Tumorigenesis and Progression by Impairing USP15-Dependent BMI1 Stability. *Adv. Sci.* 2020, 7, 1901728.
- [173] Liu, J.; Yang, Y.; Li, H.; Liu, Y.; Sun, Y.; Wu, J.; Xiong, Z.; Jin, T. IL1R2 Polymorphisms Are Associated with Increased Risk of Esophageal Cancer. *Curr. Mol. Med.* 2020, 20, 379–387. [.
- [174] Torricelli, C.; Carron, J.; Carvalho, B.F.; Macedo, L.T.; Rinck-Junior, J.A.; Lima, C.S.P.; Lourenço, G.J. Influence of IL1B (Rs16944) and IL1R2 (Rs4141134) Polymorphisms on Aggressiveness and Prognosis of Cutaneous Melanoma. *Melanoma Res.* 2021, 31, 476–481.
- [175] Yonekura S. Epstein-Barr Virus-induced Gene 3 as a Novel Biomarker in Metastatic Melanoma With Infiltrating CD8+ T Cells: A Study Based on The Cancer Genome Atlas (TCGA). *Anticancer Res.* 2022 Jan;42(1):511-517. doi: 10.21873/anticancer.15509. PMID: 34969761.
- [176] Young LC, Hartig N, Muñoz-Alegre M, Osés-Prieto JA, Durdu S, Bender S, et al. An MRAS, SHOC2, and SCRIB complex coordinates ERK pathway activation with polarity and tumorigenic



- growth. *Mol Cell*. 2013 Dec 12;52(5):679-92. doi: 10.1016/j.molcel.2013.10.004. Epub 2013 Nov 7. PMID: 24211266.
- [177] Young LC, Rodriguez-Viciano P. MRAS: A Close but Understudied Member of the RAS Family. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2018 Dec 3;8(12):a033621. doi: 10.1101/cshperspect.a033621. PMID: 29311130; PMCID: PMC6280710.
- [178] Oh JM, Rajendran RL, Gangadaran P, Hong CM, Jeong JH, Lee J, Ahn B-C. Targeting GLI1 Transcription Factor for Restoring Iodine Avidity with Redifferentiation in Radioactive-Iodine Refractory Thyroid Cancers. *Cancers*. 2022; 14(7):1782. <https://doi.org/10.3390/cancers14071782>.
- [179] Kijewska M, Kocyk M, Kloss M, Stepniak K, Korwek Z, Polakowska R, Dabrowski M, Gieryng A, Wojtas B, Ciecchomska IA, Kaminska B. The embryonic type of SPP1 transcriptional regulation is re-activated in glioblastoma. *Oncotarget*. 2017 Mar 7;8(10):16340-16355. doi: 10.18632/oncotarget.14092. PMID: 28030801; PMCID: PMC5369967.
- [180] Verjans ET, Doijen J, Luyten W, Landuyt B, Schoofs L. Three-dimensional cell culture models for anticancer drug screening: Worth the effort? *J Cell Physiol*. 2018 Apr;233(4):2993-3003. doi: 10.1002/jcp.26052. Epub 2017 Jul 11. PMID: 28618001.
- [181] Kapałczyńska M, Kolenda T, Przybyła W, Zajączkowska M, Teresiak A, Filas V, Ibbs M, Bliźniak R, Łuczewski Ł, Lamperska K. 2D and 3D cell cultures - a comparison of different types of cancer cell cultures. *Arch Med Sci*. 2018 Jun;14(4):910-919. doi: 10.5114/aoms.2016.63743. Epub 2016 Nov 18. PMID: 30002710; PMCID: PMC6040128.
- [182] Robinson M, Gilbert SF, Waters JA, Lujano-Olazaba O, Lara J, Alexander LJ, Green SE, Burkeen GA, Patrus O, Sarwar Z, Holmberg R, Wang C, House CD. Characterization of SOX2, OCT4 and NANOG in Ovarian Cancer Tumor-Initiating Cells. *Cancers (Basel)*. 2021 Jan 12;13(2):262. doi: 10.3390/cancers13020262. PMID: 33445692; PMCID: PMC7828139.
- [183] Gheyntchi E, Naseri M, Karimi-Busheri F, Atyabi F, Mirsharif ES, Bozorgmehr M, Ghods R, Madjd Z. Morphological and molecular characteristics of spheroid formation in HT-29 and Caco-2 colorectal cancer cell lines. *Cancer Cell Int*. 2021 Apr 13;21(1):204. doi: 10.1186/s12935-021-01898-9. PMID: 33849536; PMCID: PMC8042991.
- [184] Rodrigues MFSD, Miguita L, De Andrade NP, Heguedusch D, Rodini CO, Moyses RA, Toporcov TN, Gama RR, Tajara EE, Nunes FD. GLI3 knockdown decreases stemness, cell proliferation and invasion in oral squamous cell carcinoma. *Int J Oncol*. 2018 Dec;53(6):2458-2472. doi: 10.3892/ijo.2018.4572. Epub 2018 Sep 26. PMID: 30272273; PMCID: PMC6203148.

## 8. Popis kratica

AKT – protein kinaza B (drugi naziv PKB)

ANOVA – analiza varijanci

AMPK – protein kinaza aktivirana AMP-om, (eng. *AMP-activated protein kinase*)

APS – amonijev persulfat

ATO – arsenov trioksid; inhibitor proteina GLI

BCA – bicinkonična kiselina (eng. *Bicinchoninic Acid*)

BIRC7 – eng. *Baculoviral IAP Repeat Containing 7*

BRAF – eng. *Serine/threonine-protein kinase B-raf*

BSA – albumin iz govedeg seruma (eng. *Bovine Serum Albumine*)

cDNA – komplementarna DNA (eng. *Complementary DNA*)

CK1 – kazein kinaza 1 (eng. *Casein Kinase 1*)

CTLA-4 – eng. *Cytotoxic T-lymphocyte-Associated Antigen 4*

DEG – diferencijalno eksprimirani geni (eng. *Differentially Expressed Genes*)

DIG – eng. *Digoxigenin*

DHH – eng. *Desert Hedgehog*

DMEM – eng. *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

DMSO – dimetilsulfoksid

dTTP – deoksitimidin-trifosfat

dUTP – deoksiuridin-trifosfat

EBI3 – eng. *Epstein-Barr Virus Induced 3*

EDTA – etilendiamintetraoctena kiselina (eng. *Ethylenediaminetetraacetic acid*)

EGFR – receptor za epidermalni faktor rasta (eng. *Epidermal growth factor receptor*)

ERK – kinaze regulirane ekstracelularnim signalima (eng. *Extracellular signal-regulated kinases*)

FBS – fetalni goveđi serum (eng. *Fetal Bovine Serume*)

FDA – Agencija za hranu i lijekove (eng. *Food and Drug Administration*)

FDR – stopa lažnog otkrivanja (eng. *False Discovery Rate*)

FIGO – klasifikacija stadija raka jajnika (eng. *International Federation of Gynecology and Obstetrics*)

GANT61 – GLI antagonist 61; specifični inhibitor proteina GLI

GEPIA – eng. *Gene Expression Profiling Interactive Analysis*

GFP – zeleni fluorescentni protein (eng. *Green Fluorescent Protein*)

GH1 – eng. *Growth Hormone 1*

GlaB – glabrescione B; inhibitor proteina GLI1

GLI1 – homolog onkogeno povezanog s gliomom 1 (eng. *Glioma- Associated Oncogene Homolog 1*)

GLI2 – homolog onkogeno povezanog s gliomom 2 (eng. *Glioma- Associated Oncogene Homolog 2*)

GLI2ko – „Knock out“ gena GLI2

GLI3 – homolog onkogeno povezanog s gliomom 3 (eng. *Glioma- Associated Oncogene Homolog 3*)

GLI3R – represorski oblik proteina GLI

GO – genska ontologija (eng. *Gene Ontology*)

GSEA – analiza obogaćivanja setovima gena (eng. *Gene Set Enrichment Analysis*)

GSK3 $\beta$  – kinaza glikogen sintaze 3 $\beta$  (eng. *Glycogen synthase kinase 3 $\beta$* )

GTE<sub>x</sub> – eng. *Genotype–Tissue Expression*

HA – regija homologije (eng. *Homology Arm*)

HES1 – eng. *Hes Family BHLH Transcription Factor 1*

HH – eng. *Hedgehog*

HH-GLI – signalni put Hedgehog-GLI

HHIP – eng. *Hedgehog interacting protein*

IHH – eng. *Indian Hedgehog*

IL1 – citokini iz obitelji interleukina 1 (eng. *Interleukin-1 family*)

IL1R2 – eng. *Interleukin-1 Receptor Type 2*

JNK – eng. *c-Jun N-terminal kinase*

KRAS – protoonkogen KRAS (eng. *KRAS Proto-Oncogene*)

KRT16 – Keratin 16

KRT17 – Keratin 17

LEF – eng. *Lymphoid Enhancer Binding Factor 1*

log<sub>2</sub>Fc – logaritamska promjena ekspresije gena

MAPK – kinaza aktivirana mitogenom (eng. *Mitogen activated protein kinase*)

MCS – eng. *Multiple Cloning Site*

MEK – eng. *Mitogen-activated protein kinase kinase*

MITF – eng. *Melanocyte Inducing Transcription Factor*

MRAS – eng. *Muscle RAS Oncogene Homolog*

mTOR – meta rapamicin kinaze kod sisavaca (eng. *Mammalian Target of Rapamycin Kinase*)

MTT – spoj 3-(4,5-dimetiltiazol-2)-2,5-difeniltetrazoliumbromid

NANOG – eng. *Homeobox Transcription Factor Nanog*

NLK – kinaza nalik Nemo proteinu (eng. *Nemo like kinase*)

NRAS – protoonkogen NRAS (eng. *NRAS Proto-Oncogene*)

NF- $\kappa$ B – nuklearni faktor kappa B

OCT4 – eng. *Octamer-Binding Protein 4*

PBS – otopina puferirana fosfatima (eng. *Phosphate-buffered Saline*)

PCA – analiza glavnih komponenti (eng. *Principal Component Analysis*)

PCR – lančana reakcija polimerazom (eng. *Polymerase Chain Reaction*)

PDB – eng. *Protein Data Bank*

PD-1 – eng. *Programmed Cell-Death Protein 1*

PD-L1 – eng. *Programmed Death ligand 1*

PI3K – eng. *Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase*

PKA – protein kinaza A

PKC – protein kinaza C

PNK – polinukleotid kinaza

PTCH1 – eng. *Patched 1*

PTEN – eng. *Phosphatase and tensin homolog*

qPCR – kvantitativna lančana reakcija polimerazom

RAS – eng. *Rat Sarcoma Virus Family*

RAF – eng. *proto-oncogene serine/threonine-protein kinase*

RET – eng. *Proto-Oncogene Tyrosine-Protein Kinase Receptor*

RIN – eng. *RNA Integrity Number*

RNA-Seq – sekvenciranje RNA

RPLP0 – eng. *Ribosomal Protein Lateral Stalk Subunit P0*

RPMI – eng. *Roswell Park Memorial Institute medium*

sgRNA – eng. *single guide RNA*

siRNA – eng. *Small interfering RNA*

STAR – eng. *Spliced Transcripts Alignment to a Reference*

SDS – natrijev dodecilsulfat (eng. *Sodium dodecyl sulfate*)

SDS-PAGE – elektroforeza u poliakrilamidnom gelu s dodatkom SDS-a (eng. *Sodium dodecyl-sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*)

SHH – eng. *Sonic Hedgehog*

SMAD – članovi obitelji proteina SMAD (eng. SMA "*small*" worm phenotype i eng. MAD "*Mothers Against Decapentaplegic*")

SMO – eng. *Smoothened*

SOX9 – eng. *SRY-Box Transcription Factor 9*

SUFU – eng. *Supressor of Fused*

S100A7 – psorijazin (eng. *S100 calcium binding protein A7*)

S100A9 – eng. *S100 calcium binding protein A9*

TBST – otopina puferirana Trisom s dodatkom Tweena (eng. *Tris-buffered Saline with Tween*)

TCF4 – transkripcijski faktor 4

TCGA – eng. *The Cancer Genome Atlas*

TGF- $\beta$  – transformirajući faktor rasta  $\beta$  (eng. *Transforming growth factor  $\beta$* )

TNF – eng. *Tumor Necrosis Factor*

UV – ultraljubičasto zračenje

Wnt – eng. *Wnt Family Member*

$\beta$ TrCP – eng. *Beta-transducin repeat containing E3 ubiquitin protein ligase*

## 9. Popis slika i tablica

### Slike

*Slika 1. Shematski prikaz razvoja melanom iz melanocita*

*Slika 2. Dva oblika aktivacije signalnog puta HH-GLI: kanonski i nekanonski*

*Slika 3. Lokalizacija i aktivacija SMO na primarnoj ciliji*

*Slika 4. Građa domena proteina GLI1, GLI2 i GLI3 te njihovih izoformi*

*Slika 5. Kanonska aktivacija signalnog puta HH-GLI*

*Slika 6. Neki od primjera nekanonske aktivacije signalnog puta HH-GLI*

*Slika 7. Interakcija signalnih puteva HH-GLI i MAPK te njihovi inhibitori*

*Slika 8. Različiti pristupi inhibiciji signalnog puta HH-GLI*

*Slika 9. Sličnosti i razlike između inhibitora ciklopamina i vismodegiba*

*Slika 10. Strukture inhibitora proteina GLI: GANT58, GANT61 i GlaB.*

*Slika 11. Shematski prikaz formiranja sfera pomoću metode viseće kapljice*

*Slika 12. Shematski prikaz postupka odabira 12 ciljnih gena proteina GLI za daljnju validaciju metodom kvantitativne lančane reakcije polimerazom*

*Slika 13. Mapa vektora px330-Cas9*

*Slika 14. Mapa vektora HR210PA-1/GFP/Puro*

*Slika 15. Shematski prikaz transfekcije različitih vektora u svrhu uklanjanja gena iz genoma stanica metodom CRISPR/Cas9*

*Slika 16. Shematski prikaz metode graničnog razjeđenja za razvijanje monoklonalne linije stanica.*

*Slika 17. Shematski prikaz eksperimenta Southern blot*

*Slika 18. Prikaz relativne ekspresije proteina signalnog puta HH-GLI: GLI1, GLI2, GLI3 te PTCH1*

*Slika 19. Rezultati elektroforeze RNA na agaroznom gelu u svrhu provjere uspješnosti izolacije i čistoće uzoraka*

*Slika 20. Relativna ekspresija mRNA gena PTCH1 u stanicama transfeciranim s proteinima GLI u svrhu sekvenciranja RNA*

*Slika 21. Primjer elektroferograma za uzorak A375 GLI3TF*

*Slika 22. Prikaz kvalitete sirovih sekvenci dobivenih sekvenciranjem RNA*

*Slika 23. MDS analiza grupiranja uzoraka sekvenciranja RNA*

*Slika 24. Dijagram prikaza jedinstvenih i preklapajućih ciljnih gena proteina GLI1, GLI2 i GLI3*

*Slika 25. Analiza obogaćivanja seta gena u staničnim linijama transfeciranim s GLI1, GLI2 i GLI3, s prikazom svih kategorija.*

*Slika 26. Analiza obogaćivanja seta gena u staničnim linijama transfeciranim s GLI1, GLI2 i GLI3, s prikazom dvije odabrane kategorije.*

*Slika 27. Primjer analiza podataka iz javnih baza za gen MRAS.*

*Slika 28. Prikaz rezultata diferencijalne ekspresije gena za GLI1 u obliku dijagrama „vulkana“*

*Slika 29. Prikaz rezultata diferencijalne ekspresije gena za GLI2 u obliku dijagrama „vulkana“*

*Slika 30. Prikaz rezultata diferencijalne ekspresije gena za GLI3 u obliku dijagrama „vulkana“*

*Slika 31. Rezultati optimizacije početnica za qPCR za ciljni gen MRAS*

*Slika 32. Validacija 12 ciljnih gena proteina GLI na 11 staničnih linija transfeciranih sa ekspresijskim vektorima za GLI1, GLI2 i GLI3*

*Slika 33. Relativne ekspresije gena KRT16, KRT17, S100A7, IL1R2, EBI3 i MRAS u staničnoj liniji A375 dobivene metodom qPCR*

*Slika 34. Imunofluorescentno bojanje stanica na staničnoj liniji A375*

*Slika 35. Imunofluorescentno bojanje stanica na staničnoj liniji CHL-1*

*Slika 36. Imunofluorescentno bojanje stanica na staničnoj liniji MEL224*

*Slika 37. Imunofluorescentno bojanje stanica na liniji HaCaT*

*Slika 38. Relativne ekspresije gena GLI nakon utišavanja pomoću siRNA u staničnoj liniji A375*

*Slika 39. Prikaz agaroznog gela nakon PCR-a na kolonijama u svrhu potvrde ispravne ugradnje sgRNA u vektor pX330-Cas9*

*Slika 40. Primjer kromatograma jedne od sgRNA za gen GLI3 (sgRNA GLI3 613 K1) poravnate u programu Snap Gene nakon sekvenciranja po Sangeru*

*Slika 41. Agarozni gel nakon PCR-a na bakterijskim kolonijama u slučaju ugradnje regije homologije na 5'-kraju gena*

*Slika 42. Krivulje utjecaja antibiotika puromicina na preživljenje stanica*

*Slika 43. Probir stanica koje imaju zeleni fluorescentni biljeg GFP kod stanične linije MEL224 na fluorescentnom mikroskopu EVOS Flouid*

*Slika 44. Provjera ekspresije proteina GLI2 nakon uklanjanja gena metodom CRISPR/CAS9 u staničnim linijama CHL-1 i MEL224*

*Slika 45. Rezultati umnažanja odsječka gena GLI2 metodom PCR u svrhu provjere uspješnosti uklanjanja gena iz genoma stanica*

*Slika 46. Southern blot na DNA iz uzoraka MEL224 divljeg tipa (WT) i MEL224 s uklonjenim genom GLI2 (MEL224 GLI2ko), nakon cijepanja restrikcijским enzimom BsrGI*

*Slika 47. Provjera ekspresije proteina GLI3 nakon uklanjanja gena metodom CRISPR/CAS9 u staničnim linijama CHL-1 i A375*

*Slika 48. Ekspresija ciljnih gena proteina GLI: PTCH1, KRT16, KRT17, S100A7 i MRAS u staničnim linijama CHL-1 i MEL224 rezistentnim na inhibitor GANT61*

*Slika 49. Ekspresija ciljnih gena proteina GLI: KRT16, S100A7, MRAS i IL1R2 u staničnoj liniji CHL-1 sa stabilnom prekomjernom ekspresijom SHH*

*Slika 50. Fotografije sfera staničnih linija CHL-1, A375 i MEL224*

*Slika 51. Fotografije sfera stanične linije HaCaT.*

*Slika 52. Vijabilnost stanica u sferama staničnih linija CHL-1, A375 i MEL224.*

*Slika 53. Proliferacija stanica u sferama staničnih linija CHL-1 (A), A375 (B) i MEL224 (C)*



*Slika 54. Relativna genska ekspresija komponenti signalnog puta HH-GLI i ciljnih gena proteina GLI: KRT16, KRT17, IL1R2 i MRAS u sferama stanične linije A375 tijekom 5 dana*

*Slika 55. Relativna genska ekspresija komponenti signalnog puta HH-GLI i ciljnog gena MRAS u sferama stanične linije CHL-1 tijekom 5 dana*

*Slika 56. Relativna genska ekspresija komponenti signalnog puta HH-GLI i ciljnog gena MRAS u sferama stanične linije MEL224 tijekom 5 dana*

*Slika 57. Ekspresija proteina GLI3 u sferama staničnih linija CHL-1, A375 i MEL224*

*Slika 58. Relativna ekspresija gena OCT4 i NANOG u sferama staničnih linija CHL-1, A375, MEL224 tijekom 5 dana*

*Slika 59. Relativna genska ekspresija GLI1 (A) i GLI2 (B) nakon prekomjerne ekspresije GLI1 i GLI2 potaknute transfekcijom ekspresijskih vektora u sferama kroz tri dana, odnosno 48, 72 i 96 sati od ekspresije*

*Slika 60. Fotografije sfera stanične linije A375 transfecirane ekspresijskim vektorima za GLI1 i GLI2 te „mock“ kontrolom (prazni ekspresijski vektor).*

*Slika 61. Ekspresija ciljnih gena proteina GLI u sferama stanične linije A375 sa prekomjernom ekspresijom GLI1 i GLI2 kroz tri dana, odnosno nakon 48, 72 i 96 sati od ekspresije*

## Tablice

Tablica 1. Sekvence molekula malih interferirajućih RNA (siRNA) za utišavanje gena GLI

Tablica 2. Popis primarnih protutijela korištenih za imunofluorescentno bojanje stanica i western blot

Tablica 3. Tablični prikaz programa reakcije reverzne transkripcije

Tablica 4. Popis uzvodnih i nizvodnih početnica koje su korištene u qPCR reakcijama

Tablica 5. Tablični prikaz programa po kojem je provedena metoda qPCR

Tablica 6. Popis sekvenci sgRNA za navođenje vektora px330-Cas9

Tablica 7. Tablični prikaz PCR programa korištenog za provjeru uspješnosti kloniranja

Tablica 8. Sekvence početnica korištenih za provjeru uspješnosti ugradnje sgRNA u vektor

Tablica 9. Duljine regija homologije, njihovi položaji u odnosu na gen te restrikcijski enzimi potrebni za njihovo kloniranje u vektor

Tablica 10. Popis početnica korištenih za provjeru ugradnje regija homologije metodom PCR

Tablica 11. Sekvence početnica korištenih za umnažanje odsječka DNA u svrhu provjere uspješnosti uklanjanja gena *GLI2* te ugradnje donorske kazete

Tablica 12. Popis početnica korištenih za umnažanje odsječaka gena *GLI2* i *GFP*

Tablica 13. Koncentracije RNA za pripremu cDNA knjižnica dobivene Bioanalyzerom

Tablica 14. Broj diferencijalno eksprimiranih ciljnih gena proteina GLI, u svakoj od analiziranih staničnih linija, nakon filtriranja prema statističkoj značajnosti

Tablica 15. Tablični prikaz 20 ciljnih gena proteina GLI1 s najviše povećanom ekspresijom, nakon filtriranja prema vrijednostima  $\log F_c$

Tablica 16. Tablični prikaz 20 ciljnih gena proteina GLI2 s najviše povećanom ekspresijom, nakon filtriranja prema vrijednostima  $\log F_c$

Tablica 17. Tablični prikaz 20 ciljnih gena proteina GLI3 s najviše povećanom ekspresijom, nakon filtriranja prema vrijednostima  $\log F_c$

Tablica 18. Prikaz funkcija i dosad poznatih uloga u karcinomu za 6 ciljnih gena proteina GLI pronađenih u literaturi

## 10. Životopis

Rođena sam 29.9.1991. godine u Bjelovaru gdje sam završila osnovnu i srednju školu. 2014. godine sam završila preddiplomski, a zatim 2016. godine diplomski studij Kemije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu, Sveučilišta u Zagrebu (smjer istraživački) te stekla titulu magistra kemije. Od 2017. godine sudjelujem u radu Laboratorija za naprednu genomiku Instituta Ruđer Bošković, a od 2019. godine radim u Laboratoriju za nasljedni rak. 2018. godine sam upisala doktorski studij Medicinske kemije Sveučilišta u Rijeci.

Suradnik sam i doktorand na projektu Hrvatske zaklade za znanost „*Regulacija GLI koda u tumorima ovisnim o BRAF/NRAS mutacijama*“. U sklopu projekta i svoje disertacije bavim se proučavanjem staničnih signalnih puteva koji su aktivni u melanomu. Tijekom 2021. godine provela sam mjesec dana na kratkoročnom studijskom usavršavanju u Firenci na institutu ISPRO.

Uključena sam u održavanje nastave na doktorskim studijima pri Sveučilištu u Zagrebu (PMF i Medicinski fakultet), predmet „Metode istraživanja u molekularnoj onkologiji“ i Sveučilištu u Osijeku (Združeni interdisciplinarni studij Molekularne bioznanosti), predmet „Biologija tumorskih i normalnih stanica“.

Članica sam međunarodne udruge *European Association for Cancer Research* (EACR) te Hrvatskog društva za istraživanje raka (HDIR). Također sam članica Hrvatskog društva za biokemiju i molekularnu biologiju (HDBMB).

2021. bila sam dobitnica FEBS stipendije za sudjelovanje na kongresima „*20th FEBS Young Scientist Forum*“, te „*45th FEBS Congress*“. 2022. bila sam dobitnica EACR stipendije za kongres „*Innovative Cancer Science: Translating Biology to Medicine*“ koji se održao u Sevilli. 2023. godine sam bila dobitnica EMBO stipendije za „*Workshop Hedgehog signalling: From molecular structure to developmental biology and diseases*“ koji se održao u Španjolskoj.

Do sada sam objavila 6 radova u međunarodnim znanstvenim časopisima od kojih su četiri u kategoriji izvrsnosti Q1, a preostala dva u Q2 kategoriji.

## Popis publikacija

Piteša, N.; Kurtović, M.; Bartoniček, N.; Gkotsi, D. S.; Čonkaš, J.; Petrić, T.; Musani, V.; Ozretić, P.; Riobo-Del Galdo, N.; Sabol, M.; Signaling switching from Hedgehog-GLI to MAPK signaling potentially serves as a compensatory mechanism in melanoma cell lines resistant to GANT-61 // *Biomedicines*, 11 (2023), 1353, 19 doi:10.3390/biomedicines11051353 (međunarodna recenzija, članak, znanstveni)

Kurtović, M.; Piteša, N.; Bartoniček, N.; Ozretić, P.; Musani, V.; Čonkaš, J.; Petrić, T.; King, C.; Sabol, M.; RNA-seq and ChIP-seq Identification of Unique and Overlapping Targets of GLI Transcription Factors in Melanoma Cell Lines. // *Cancers*, 14 (2022), 18; 4540, 20 doi:10.3390/cancers14184540 (međunarodna recenzija, članak, znanstveni)

Baranašić, J.; Šutić, M.; Catalano, C.; Drpa, G.; Huhn, S.; Majhen, D.; Nestić, D.; Kurtović, M.; Rumora, L. et al. TLR5 Variants Are Associated with the Risk for COPD and NSCLC Development, Better Overall Survival of the NSCLC Patients and Increased Chemosensitivity in the H1299 Cell Line. // *Biomedicines*, 10 (2022), 9; 2240, 23 doi:10.3390/biomedicines10092240 (međunarodna recenzija, članak, znanstveni)

Trnski, D.; Sabol, M.; Tomić, S.; Štefanac, I.; Mrčela, M.; Musani, V.; Rinčić, N.; Kurtović, M.; Petrić, T.; Levanat, S.; Ozretić, P.; SHH-N non-canonically sustains androgen receptor activity in androgen-independent prostate cancer cells. // *Scientific reports*, 11 (2021), 1; 14880, 11 doi:10.1038/s41598-021-93971-6 (međunarodna recenzija, članak, znanstveni)

Zubčić, V.; Rinčić, N.; Kurtović, M.; Trnski, D.; Musani, V.; Ozretić, P.; Levanat, S.; Leović, D.; Sabol, M.; GANT61 and Lithium Chloride Inhibit the Growth of Head and Neck Cancer Cell Lines Through the Regulation of GLI3 Processing by GSK3beta. // *International journal of molecular sciences*, 21 (2020), 6410, 13 doi:10.3390/ijms21176410 (međunarodna recenzija, članak, znanstveni)

Ozretić, P.; da Silva Filho, M. I.; Catalano, C.; Sokolović, I.; Vukić-Dugac, A.; Šutić, M.; Kurtović, M.; Bubanović, G.; Popović-Grle, S. et al. Association of NLRP1 Coding Polymorphism with Lung Function and Serum IL-1 $\beta$  Concentration in Patients Diagnosed with Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD). // *Genes*, 10 (2019), 783, 16 doi:10.3390/genes10100783 (međunarodna recenzija, članak, znanstveni)