

# Karakterizacija i validacija sojeva stanične linije melanoma dobivenih ugradnjom sekvence SHH u genom

---

Brtan, Ana

Master's thesis / Diplomski rad

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:353167>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-22**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Ana Brtan

**Karakterizacija i validacija sojeva stanične  
linije melanoma dobivenih ugradnjom  
sekvence *SHH* u genom**

Diplomski rad

Zagreb, 2021.

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Department of Biology

Ana Brtan

**Characterization and validation of *SHH*  
knock-in melanoma cell lines**

Master thesis

Zagreb, 2021.

Ovaj rad je izrađen u Laboratoriju za nasljedni rak na Zavodu za molekularnu medicinu Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu, pod voditeljstvom dr. sc. Maje Sabol. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra eksperimentalne biologije (mag. biol. exp.).

## **Zahvala**

*Velika zahvala najboljoj mentorici, dr. sc. Maji Sabol na prilici za izradu diplomskog rada, na pokazanom strpljenju, povjerenju i svemu što me naučila tijekom izrade i pisanja ovog diplomskog rada.*

*Zahvaljujem se i ostalim članovima Laboratorija za nasljedni rak, osobito Nikolini i Matei, koje su mi pomogle kada god mi je pomoć bila potrebna i dale mi odgovore na sva moja pitanja.*

*Hvala svim mojim prijateljima, novima i starima, što su uvijek bili uz mene, pružali mi pozitivnu perspektivu te ohrabrivali me da nastavim s učenjem i radom kada bi moja volja posustala.*

*Zahvaljujem se braći, Ivanu i Goranu, koji su me poticali i podržavali tijekom studija.*

*Najveću zahvalu i posvetu ovog rada želim uputiti pokojnoj majci čija je posljednja želja bila moje obrazovanje i ocu koji je omogućio njeno ostvarenje. Bez vas ne bih bila gdje jesam!*

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

---

Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Diplomski rad

## **Karakterizacija i validacija sojeva stanične linije melanoma dobivenih ugradnjom sekvence *SHH* u genom**

Ana Brtan

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

U okviru ovog diplomskog rada identificirana je stanična linija dobivena ugradnjom sintetske sekvence koja kodira za protein *sonic hedgehog*. Aktivni oblik proteina *sonic hedgehog*, SHH-N, odgovoran je za autokrinu i parakrinu aktivaciju signalnog puta vezanjem za transmembranski receptor *Patched 1*. Provođenjem signala u stanicu, aktivacijski oblici transkripcijskih faktora *glioma associated oncogenes* ulaze u jezgru i aktiviraju transkripciju gena koji sudjeluju u ovom signalnom putu. Glavna uloga ovog signalnog puta je u organizaciji polarnosti organizma tijekom embriogeneze, dok je u odraslom organizmu većinom inaktivan, osim tijekom proliferacije i diferencijacije stanica. Zbog činjenice da regulira rast i razvoj, promjene u ovom signalnom putu mogu dovesti do nastanka tumora, poticanja njihovog rasta i invazije. Iz pojedinačnih transfeciranih stanica uspostavljene su klonske stanične linije kojima je pomoću PCR-a testirana prisutnost inserta *SHH* u genomu, ekspresija proteina SHH i SHH-N. Na temelju tih rezultata izabrane su četiri linije kojima su westernskom metodom otiska i imunofluorescencijom analizirane količine proteina HH/GLI signalnog puta (*PTCH1*, *GLI1*, *GLI2*, *GLI3*) i markera EMT (vimentin, E-kadherin). Identifikacijom prikladne stanične linije koja stabilno eksprimira SHH-N bit će moguće daljnje istraživanje ovog signalnog puta, osobito u stanicama tumora.

(58 stranica, 27 slika, 5 tablica, 77 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: Hedgehog-GLI, CHL1, melanom, transfekcija

Voditelj: Doc. dr. sc. Maja Sabol

Suvoditelj: Doc. dr. sc. Sofia Ana Blažević

Ocjenitelji:

Doc. dr. sc. Sofia Ana Blažević

Izv. prof. dr. sc. Petra Peharec Štefanić

Izv. prof. dr. sc. Jasna Lajtner

Rad prihvaćen: 17.2.2021.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

---

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Department of Biology

Master Thesis

### **Characterization and validation of *SHH* knock-in melanoma cell lines**

Ana Brtan

Rooseveltovej trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

This master thesis contains the identification of one knock-in cell line for the protein SHH. Its active form, SHH-N is responsible for autocrine and paracrine activation of the HH/GLI signaling pathway by binding to its transmembrane receptor PTCH1. Transduction of the HH/GLI signal into the cell leads to the localization of activator forms of transcription factors GLI in the nucleus where they induce transcription of GLI target genes. This signaling pathway is mostly active during embryonic development, during which it regulates the polarity of the organism. In adults, under normal conditions, the pathway is inactivated or very weakly activated, except during cell proliferation and differentiation. Because of its role in regulating growth and development, changes in this signaling pathway can lead to tumor development, stimulating their growth and invasion. Cell lines developed from individual transfected cells were tested by PCR to detect the *SHH* insert, and by Western blot to identify the lines with increased SHH and SHH-N protein expression. Four candidate cell lines were selected based on PCR and Western blot results and additionally tested by Western blot and immunofluorescence to analyze the levels of HH/GLI components (PTCH1, GLI1, GLI2, GLI3) and EMT markers (vimentin, E-cadherin). By finding the appropriate cell line with a stable expression of SHH-N, it becomes possible to further study this signalling pathway, especially in tumor cells.

(58 pages, 27 figures, 5 tables, 77 references, original in: Croatian)

Thesis is deposited in Central Biological Library.

Keywords: Hedgehog-GLI, CHL1, melanoma, transfection

Supervisor: Maja Sabol, PhD

Co-supervisor: Sofia Ana Blažević, Asst. Prof.

Reviewers:

Sofia Ana Blažević, Asst. Prof.

Petra Peharec Štefanić, Assoc. Prof.

Jasna Lajtner, Assoc. Prof.

Thesis accepted: February 17th, 2021

# SADRŽAJ:

1. UVOD .....	1
1.1. Signalni put Hedgehog-GLI.....	1
1.2. Kanonski i nekanonski put HH/GLI signalizacije .....	2
1.3. Uloga signalnog puta HH/GLI u embriogenezi .....	7
1.4. Uloga signalnog puta HH/GLI u odraslim organizmima.....	8
1.5. Uloga signalnog puta HH/GLI u tumorigenezi.....	9
1.6. CRISPR/Cas9 sustav.....	14
2. CILJ ISTRAŽIVANJA .....	18
3. MATERIJALI I METODE .....	19
3.1. Materijali.....	19
3.2. Metode .....	19
3.2.1. Rad sa staničnim kulturama .....	19
3.2.2. Unos gena za protein SHH u stanične linije CHL-1 .....	19
3.2.3. Uzgoj i održavanje stanica u kulturi .....	21
3.2.4. Izolacija DNA .....	22
3.2.5. Lančana reakcija polimerazom (PCR).....	23
3.2.6. Izolacija proteina iz stanica.....	26
3.2.7. Westernska metoda otiska.....	27
3.2.8. Imunofluorescencija.....	30
4. REZULTATI.....	34
4.1. Analiza prisutnosti inserta SHH u klonskim linijama.....	34
4.2. Analiza ekspresije proteina SHH u klonskim linijama .....	35
4.3. Analiza aktivnosti signalnog puta HH/GLI i usporedba morfologije kod odabranih staničnih linija.....	39
4.4. Imunofluorescencija.....	41
5. RASPRAVA .....	45
6. ZAKLJUČAK .....	49
7. LITERATURA .....	50
8. ŽIVOTOPIS .....	58



## KRATICE

AAVS1 – lokus Adeno-povezano virusno mjesto integracije 1

AKT – Akt kinaza

ANG – Angiopoietin

APS – Amonijev persulfat

BCL2 – *engl. B-cell lymphoma 2*, protein limfoma B stanica

BIM – *engl. BCL2 like protein*, protein sličan BCL2

BSA – *engl. Bovine serum albumin*, albumin iz goveđeg seruma

CAS – *engl. CRISPR Associated Proteins*, CRISPR-povezani proteini

CI – gen *Cubitus interruptus*

CKI  $\alpha$  – *engl. Casein kinase I*, kazein kinaza 1

CRISPR – *engl. Clustered Regularly Interspaced Palindromic Repeats*

crRNA – CRISPR RNA

DHH – protein *engl. Desert Hedgehog*

DISP – protein *engl. Dispatched*

DMEM – *engl. Dulbecco's Modified Eagle's Medium*, Dulbeccov minimalni esencijalni medij

DMSO – dimetil sulfoksid

dNTP – deoksinukleotid trifosfat

DYRK1B – *engl. Dual Specificity Tyrosine Phosphorilation Regulated Kinase 1B*, tirozin regulirana kinaza sa dualnom specifičnošću

E-CAD – E-kadherin

EDTA – Etilendiamintetraoctena kiselina

EGFR – *engl. Epidermal growth factor receptor*, receptor epidermalnog faktora rasta

EMT – Epitelno-mezenhimalna tranzicija

ERK – *engl. Extracellular-signal-regulated kinase*, kinaza regulirana vanstaničnim signalima

FBS – *engl. Fetal Bovine Serum*, fetalni goveđi serum

GLI – Protein GLI, *engl. Glioma-associated onkogene*

*GLI* – gen koji kodira proteine GLI

GLI1AS – GLI1-antisense RNA

GLIA – aktivacijski oblik proteina GLI

GRK2 – *engl. G protein-coupled receptor kinase 2*, receptorska kinaza povezana s G-proteinima

GSK  $\beta$  – *engl. Glycogen synthase kinase  $\beta$* , Glikogen sintaza kinaza  $\beta$

HA-L, HA-R – regije homologije

HDR – *engl. Homology Directed Repair*, homologijom vođen popravak

HH – proteini Hedhehog

*HH* – gen koji kodira proteine Hedgehog

HH/GLI, HH/PTCH/SMO, HH/PTC – signalni put Hedgehog-GLI, *engl. Hedgehog-Patched-Smoothened, Hedgehog-Smoothened*

IHH – protein *engl. Indian Hedgehog*

LB – *engl. Loading buffer*, pufer za nanošenje

MAPK – *engl. Mitogen activated protein kinase*, mitogenima aktivirana protein kinaza

miRNA – mikro RNA

mRNA – glasnička RNA

mTOR – *engl. mechanistic target of rapamycin*, mehanistička meta rapamicina

NF-KB – transkripcijski faktor NF-KB

NHEJ – *engl. non-homologous end joining*, spajanje nehomolognih krajeva

p19, p53 – tumor supresorski proteini

PAM – *engl. protospaces adjacent motif*

PCR – lančana reakcije polimeraze

PI3K – *engl. Phosphoinositide 3-kinase*, fosfatidilinozitol 3 kinaza

PKA – *engl. Protein kinase A*, protein kinaza A

PKC – *engl. Protein kinase C*, protein kinaza C

PTCH1,2 – receptori *engl. Patched*

RAF – RAF kinaze

RAS – RAS GTPaze

RIPA – *engl. Radioimmunoprecipitation assay buffer*

SDS – natrijev dodecil sulfat

sgRNA – *engl. single guide RNA*, RNA vodilja

SHH – protein *engl. Sonic hedgehog*

SHH-N – aktivni oblik proteina SHH

SMO – koreceptor *engl. smoothened*

SNAI– proteini SNAI

SOXC2 – protein SOXC2

SUFU – *engl. Supressor of Fused*, Fused supresor

TAE – Tris-acetat-EDTA pufer

TBST – *engl. Tris-buffered saline with 0.1% Tween buffer*

TE – Tris-EDTA pufer

TEMED – tetrametiletilendiamin

TNF $\alpha$  – *engl. Tumor necrosis factor  $\alpha$* , faktor nekroze tumora  $\alpha$

tracrRNA – *engl. trans-activating crRNA*, trans-aktivirajuća crRNA

TRIS – tris(hidroksimetil)aminometan

TWIST – transkripcijski faktori TWIST

UTR – netranslacijska regija mRNA

VEGF – *engl. Vascular endothelial growth factor*, vaskularni endotelni faktor rasta

VIM – protein vimentin

ZEB1, ZEB2 – transkripcijski faktori ZEB

# 1. UVOD

## 1.1. Signalni put Hedgehog-GLI

### 1.1.1. Povijest signalnog puta

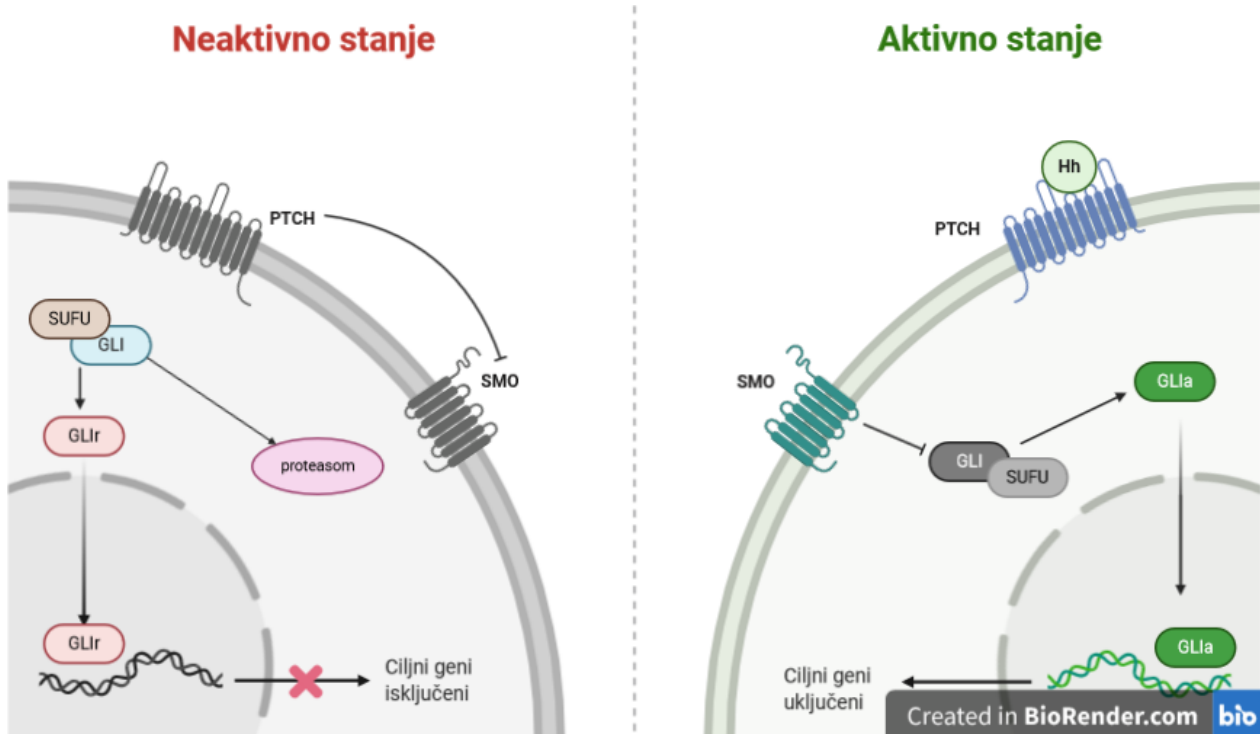
Proteini *Hedgehog* su prvi put spomenuti 1980. godine. Istraživanje tijekom kojeg su dobili ime je provedeno na ličinkama vinske mušice *Drosophila melanogaster*. Proučavani su geni koji uzrokuju deformacije tijela ličinki te je identificirano petnaest genskih lokusa koji kada su izmijenjeni dovode do nepravilnosti u segmentaciji tijela. Na leđima ličinke koja je imala promijenjen genski lokus koji kodira jedan od ovih proteina su uočene neobične strukture koje podsjećaju na bodlje ježa te je stoga ovaj protein i nazvan *hedgehog* (engl. jež) (Nüsslein-Volhard i Wieschaus, 1980). Osim kod vinske mušice, postojanost gena *HH* je dokazana i kod nekih drugih beskrležnjaka kao što su pijavice i ježinci (Ingham i McMahon, 2001). Kod vinske mušice je dokazana prisutnost samo jednog gena *HH*, dok je kod većine kralježnjaka, uključujući i sisavce, pokazana prisutnost tri homologna tkivno specifična proteina: SHH (engl. *sonic hedgehog*), DHH (engl. *desert hedgehog*) i IHH (engl. *indian hedgehog*) (Bürglin i sur. 2008.; Levanat i sur. 2008.; Pereira i sur. 2014.). Signalni put Hedgehog-GLI (HH/GLI), poznat i pod nazivima HH/PTC/SMO i HH-PTC, osim liganda SHH, DHH i IHH, kod ljudi se sastoji od još nekoliko komponenti: transmembranski receptori *Patched* (PTCH1 i PTCH2), transmembranski protein *Smoothened* (SMO) koji nalikuje receptorima udruženima s G-proteinima, *Supressor of Fused* (SUFU), te tri transkripcijska faktora, GLI1, GLI2 i GLI3 (Niyaz i sur. 2019; Wu i sur. 2017). S obzirom da su se najranija istraživanja ovog signalnog puta provodila na vinskih mušicama, većina signalnih komponenti je dobila ime po fenotipskim karakteristikama tijela i krila mutiranih ličinki uz izuzetak transkripcijskih faktora GLI koji su svoj naziv dobili zbog činjenice da je kod pacijenata s glioblastomom prisutna amplifikacija gena (Levanat i sur. 2008). Genska obitelj *HH* kodira sekretorne proteine koji su tkivno specifični i djeluju kao modulatori tijekom embriogeneze pri staničnoj proliferaciji, diferencijaciji i održavanju tkivne polarnosti, ali i u tkivima odraslih jedinki, kako kod kralježnjaka, tako i kod beskrležnjaka (Niyaz i sur. 2019; Pereira i sur. 2014). S obzirom na prirodu funkcije ovog signalnog puta te činjenice da komponente ovog puta djeluju kao tumor supresori ili proto-onkogeni, nije iznenađujuće da organizmi kod kojih su mutirani geni odgovorni za kodiranje komponenti signalnog puta imaju različite razvojne poteškoće koje mogu

dovesti do smrti pri rođenju. Kod ljudi, mutacija u genu *SHH* uzrokuje ciklopiju, a mutacija u genu *PTCH1* dovodi do razvoja Gorlinovog sindroma koji je karakteriziran malformacijama te visokom incidencijom meduloblastoma i tumora bazalnih stanica (Murone i sur. 1999; Niyaz i sur. 2019). Mutacije unutar signalnog puta HH/GLI mogu uzrokovati nastanak više vrsta humanih sporadičnih tumora (Stecca i sur. 2007).

## 1.2. Kanonski i nekanonski put HH/GLI signalizacije

Kod sisavaca, tri glavna proteina koja su uključena u aktivaciju i prijenos signalna u stanicu su tkivno specifični ligandi HH: SHH, DHH i IHH, receptori PTCH1, PTCH2 te SMO. Najbolje proučen ligand signalnog puta HH/GLI je SHH. Nakon translacije proteina HH, N-terminalna sekvenca se autokatalitički odcijepi sa prekursorskog polipeptida dugog oko 45kDa kako bi nastao N-terminalni fragment od 20kDa i C-terminalni fragment od 25kDa. N-terminalni fragment je odgovoran za prijenos signala, dok je zadatak C-terminalnog fragmenta procesiranje prekursora (Porter i Young, 1996; Skoda i sur. 2018). Tijekom procesiranja, C-terminalna domena djeluje kao kolesterol-transferaza te kovalentno veže kolesterol na C-terminusu N-terminalne domene, a na N-terminus se veže palmitinska kiselina rezultirajući formacijom modificirane signalne domene i aktivnog proteina HH. Lipidne modifikacije proteina imaju ulogu u sposobnosti kretanja i lokalizaciji HH-proteina u tkivima. S obzirom na dualne lipidne modifikacije, procesirani protein je hidrofoban te ima tendenciju zadržavanja na membranama. Za putovanja na duže udaljenosti je potrebno dodatno procesiranje u kojem bi se lipidne modifikacije otklonile i omogućilo kretanje u hidrofilnom okruženju. U otpuštanju procesiranog proteina sudjeluje i membranski protein pod nazivom *Dispatched* (DISP) koji omogućava otpuštanje proteina iz stanice u okolinu (Farzan i sur. 2008; Kong i sur. 2019). Nakon otpuštanja liganda iz stanice, formira se koncentracijski i vremenski gradijent u okolini koji djeluje na druge stanice u razvoju, određujući njihovu staničnu sudbinu ovisno o vremenu izlaganja ligandu, jačini signala i osjetljivosti stanice (Kong i sur. 2019). Aktivni proteini HH djeluju kao mitogeni, morfogeni te diferencijacijski faktori na kratkim i dugim udaljenostima unutar organizma (Bambakidis i Onwuzulike, 2012; Jiang i Hui, 2008; Levanat i sur. 2008).

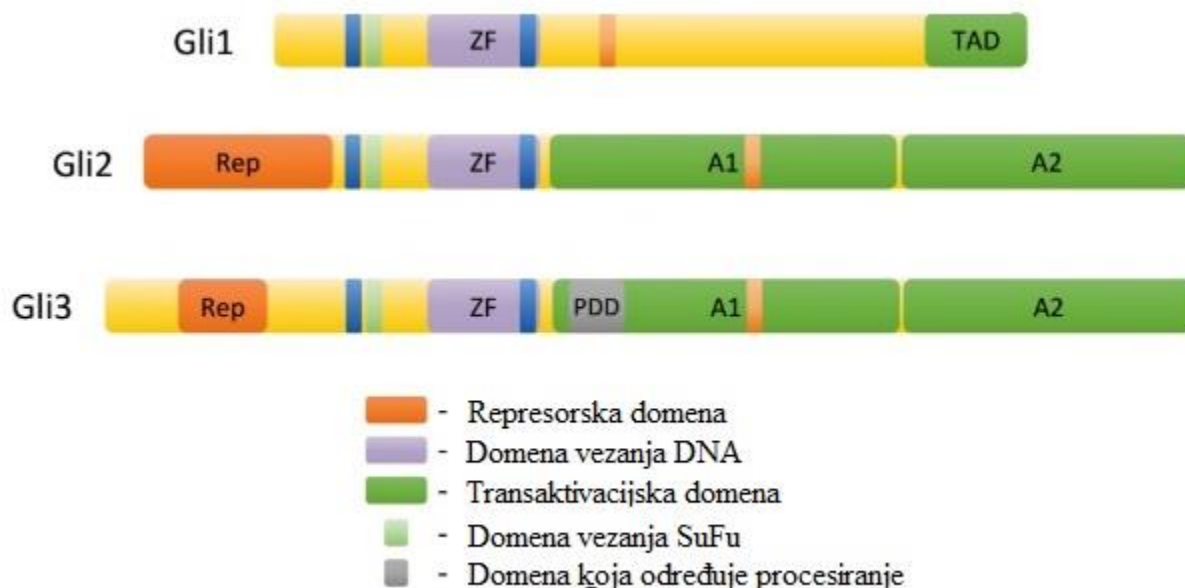
U slučaju kanonske signalizacije, prijenos signala započinje vezanjem aktivnog proteina HH na receptor PTCH, uglavnom PTCH1 (Slika 1). PTCH u stanju nedostatka liganda djeluje kao supresor signalnog puta (Teperino i sur. 2014).



**Slika 1. Prikaz signalnog puta HH/GLI kod sisavaca.** Lijevi dio slike prikazuje neaktivno stanje puta u kojemu receptor PTCH inhibira koreceptor SMO. Zbog njegove inaktivnosti proteini GLI su vezani za supresor SUFU koji sprječava translokaciju aktivnog oblika GLI u jezgru i njegovu funkciju kao transkripcijski faktor. Umjesto toga proteini GLI se upućuju na cijepanje u proteasom, čime nastaju represorski oblici GLI2r i GLI3R koji djeluju kao represori transkripcije. S desne strane slike se nalazi prikaz puta u kojemu je ligand HH vezan na receptor PTCH, nema inhibicije SMO te se u jezgru upućuju aktivni oblici proteina GLI koji potiču transkripciju ciljanih gena (Ilustracija izrađena na BioRender.com).

Vežanje proteina na receptor dovodi do njihove internalizacije i razgradnje u lizosomima što omogućava fosforilaciju SMO pomoću GPCR kinaze GRK2 i  $CKI\alpha$  (Chen i Jiang 2013). Fosforilacija ovog proteina dovodi do njegove lokalizacije u primarnoj ciliji (Jiang i Hui, 2008). SMO je transmembranski koreceptor vezan uz G proteine koji djeluje kao pozitivni regulator jer u aktivnom stanju, kada nema supresije od strane receptora PTCH, konstitutivno provodi nizvodno signal kojem su cilj GLI proteini. Kada ligandi HH nisu prisutni, proteini GLI su vezani na SUFU koji djeluje kao negativni regulator signalnog puta, sprječavajući ulazak GLI proteina u jezgru. Nakon aktivacije signalnog puta i fosforilacije SMO, kompleks SUFU-GLI translocira u primarnu ciliju gdje se degradira te protein GLI putuje u jezgru gdje djeluje kao transkripcijski faktor (Niyaz

i sur. 2019; Skoda i sur. 2018). Proteini GLI su ljudski homologzi transkripcijskog faktora *Cubitus interruptus* (CI) koji postoji kod vinskih mušica, s razlikom da je CI ujedno aktivator i represor signalnog puta HH/GLI, dok su funkcije transkripcijskih faktora GLI specijalizirane. Kod sisavaca su poznata tri homologa transkripcijskog faktora CI: GLI1, GLI2 i GLI3. Obitelj GLI se sastoji od proteina koji u domenama odgovornim za vezanje DNA sadrže pet cinkovih prstiju (Hui i Angers, 2011; Niewiadomski i sur. 2019) (Slika 2). Vežu se na određene sekvence unutar promotora gena i djeluju na transkripciju istih. GLI1 i GLI3 se vežu na sekvencu 5'-GACCACCCA-3' dok se GLI2 veže na veoma sličnu 5'-GAACCACCCA-3' sekvencu (Skoda i sur. 2018). Kako će se ponašati i kako će djelovati na prienos signala u signalni put HH/GLI, određuju njihove N-terminalne i C-terminalne domene.

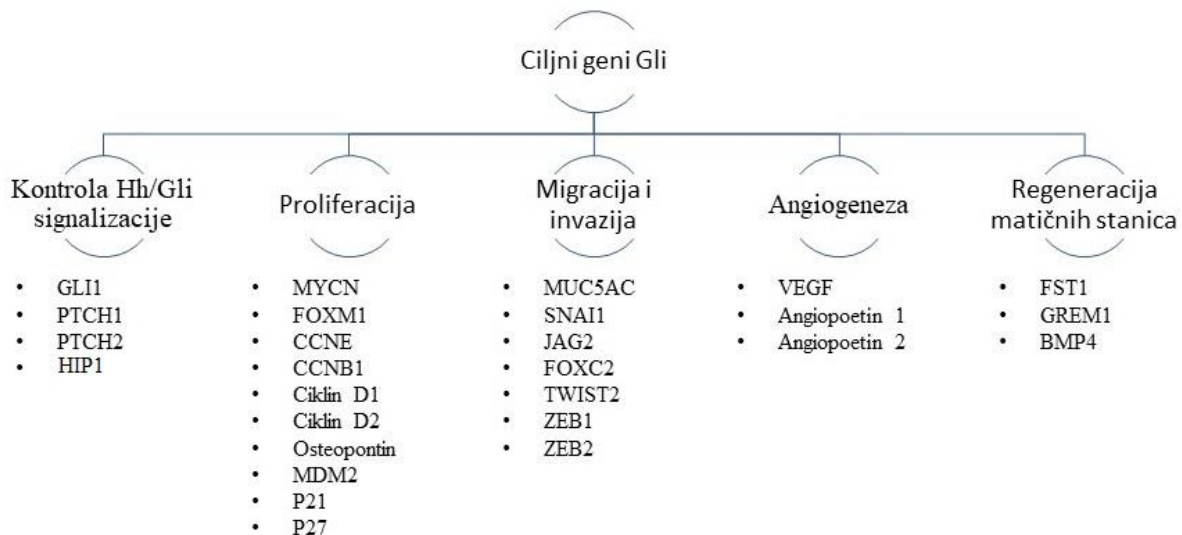


**Slika 2. Domene proteina GLI.** Na ilustraciji su prikazane represorske domene, domene vezanja DNA, transaktivacijske domene, domene vezanja supresora SUFU te domene koje određuju procesiranje proteina GLI1, GLI2 i GLI3. Ove domene određuju aktivacijsku ili represorsku funkciju proteina (preuzeto i prilagođeno iz Niewiadomski i sur. 2019).

N-terminalna domena proteina GLI2 i GLI3 im omogućava represorsko djelovanje, dok GLI1 koji nema tu domenu, djeluje isključivo kao aktivator. S druge strane, GLI2 i GLI3 također posjeduju i C-terminalnu domenu što im omogućava dvojno djelovanje, kao aktivatori i represori, ovisno o staničnom kontekstu. Nizvodno od domene koja sadrži cinkove prste se nalazi domena



koja određuje procesiranje. Kod GLI3 ova domena omogućuje proteolitičko procesiranje proteina kako bi postao represor te u većini slučajeva tako i djeluje. Kod GLI2 procesiranje u represorski oblik je moguće, ali nije efikasno te stoga GLI2 uglavnom djeluje kao aktivator (Niewiadomski i sur. 2019). U nedostatku HH/GLI signala, proteini iz obitelji GLI su fosforilirani od strane PKA i GSK3 $\beta$  (Glikogen sintaza kinaza 3). Zbog fosforilacije, GLI2 se degradira, a GLI3 se procesira u represorski oblik koji putuje u jezgru i sprječava transkripciju (Teperino i sur. 2014). Kada postoji HH/GLI signal, fosforilacija nije moguća, proteini GLI se stabiliziraju te mogu ući u jezgru. GLI2 je glavni efektor signalnog puta HH/GLI. Djeluje pozitivno i na ekspresiju proteina GLI1. Također djeluje i na ekspresiju receptora PTCH, čime se stvara kontrola signalnog puta pozitivnom (GLI1) i negativnom povratnom spregom (PTCH1, PTCH2). Osim kontrole signalnog puta, GLI2 djeluje i na ekspresiju proteina koji su odgovorni za napredovanje staničnog ciklusa i proliferaciju stanica. Povećavanjem ekspresije N-Myc, ciklin D1, ciklin D2, ciklin E i FOXM1, signalni put potiče progresiju stanice kroz kontrolne točke u staničnom ciklusu, te samim time djeluje na proliferaciju stanica (Katoh i Katoh 2009). Osim proliferacije, djeluju na ekspresiju proteina odgovornih za angiogenezu, migraciju i invaziju tumorskih stanica kao što su SNAI1, SOXC2, TWIST, VEGF te EMP4 (Katoh i Katoh, 2009; Zheng i sur. 2013)(Slika 3).



**Slika 3. Uloge i ciljni geni transkripcijskih faktora GLI.** Nakon ulaska proteina GLI u jezgru započinje njihova aktivnost u aktivaciji transkripcije gena koji su uključeni u kontrolu HH/GLI signalizacije, proliferacije, migracije, invazije, regeneracije i angiogeneze (preuzeto i prilagođeno od Zheng i sur. 2013).

Nekanonnska HH signalizacija je naziv za dva tipa prijenosa signala HH/GLI signalnim putem koji na određenim mjestima mogu premostiti kanonski prijenos signala. Tip 1 funkcionira neovisno o koreceptoru SMO, a tip 2 funkcionira pomoću SMO ali neovisno o transkripcijskim faktorima GLI (Niyaz i sur. 2019). Signalni put HH/GLI je pod utjecajem drugih signalnih puteva u organizmu. Dokazano je da je u interakciji sa RAS-RAF-MEK-ERK signalnim putem. Ovaj signalni put je pozitivni regulator HH/GLI jer aktivni MEK1 povećava aktivnost transkripcijskog faktora GLI1, a njegova farmakološka inhibicija smanjuje stabilnost proteina GLI1. Smatra se da je transkripcijska aktivnost proteina GLI određena i njihovom fosforilacijom pomoću RAS-MEK-ERK kaskade ili sprječavanjem njihove degradacije. Na GLI1 utječe i ekspresija onkogenog K-RAS u humanim jetrenim stanicama (Gu i Xie, 2015; Pietrobono i sur. 2019). K-RAS djeluje na signalizaciju i na način da potiče autokrino signaliziranje preko parakrinog te inducira ekspresiju proteina SHH. Osim toga, negativno utječe na kanonski način signalizacije preko efektoru DYRK1B (Pandolfi i Stecca, 2015). Signalizacija preko receptora za epidermalni faktor rasta (EGFR) također djeluje na HH/GLI. Aktivacija JUN/AP1 u međudjelovanju s aktivacijskim oblicima GLI1 i GLI2 potiče onkogene transformacije (Schnidar i sur. 2009). Aktivnost GLI1 se može modulirati neovisno o SMO i preko signalnog puta TNF $\alpha$ /mTOR. TNF $\alpha$  aktivira mTOR koji fosforilira GLI1. Fosforilacija GLI1 omogućava njegovo otpuštanje sa inhibitora SUFU (Wang i sur. 2012). AKT također potiče transkripcijsku aktivnost GLI1, kao i PI3K (Pietrobono i sur. 2019). S obzirom na sinergističko djelovanje ovih signalnih puteva, nije iznenađujuće da gubljenjem njihovog negativnog regulatora PTEN, dolazi do jačanja signala (Riobó i sur. 2006). Indukcija GLI2 neovisna o proteinima HH te PTCH i SMO receptorima pomoću TGF- $\beta$  je također moguća te se njom potiče i ekspresija GLI1 (Dennler i sur. 2007). Obitelj protein kinaza C (PKC) također ima sposobnost modifikacije HH/GLI signalizacije, iako su nalazi provedenih istraživanja kontradiktorni. Neill i suradnici (2003) su pokazali da PKC $\alpha$  smanjuje aktivnost GLI1, dok PKC $\delta$  povećava njegovu aktivnost. S druge strane, Cai i suradnici (2009) su dokazali da PKC $\delta$  smanjuje djelovanje GLI1 i endogenog PTCH1. Osim signalnih puteva, aktivnost HH/GLI se može modulirati i preko tumor supresora, kao i miRNA molekula. Supresija aktivnosti ovog signalnog puta može se postići pomoću proteina p53 koji smanjuje aktivnost GLI1, njegovu fosforilaciju, koncentraciju i lokalizaciju unutar stanice (Pietrobono i sur. 2019). Neovisno o PTCH/SMO, molekule miRNA imaju sposobnost funkcionalne supresije GLI1. Molekula miR-361 direktno inhibira GLI1 vezanjem za 3' – UTR mRNA (Chen i sur. 2017).

### 1.3. Uloga signalnog puta HH/GLI u embriogenezi

Razvoj organizma je vrlo složen proces stanične proliferacije i diferencijacije kojeg kontrolira nekoliko signalnih putova. Jedan od ključnih putova tijekom razvoja je HH/GLI koji djeluje na način da određuje specifične stanične sudbine kod progenitorskih stanica kod beskralježnjaka i kralježnjaka (Niewiadomski i sur. 2019). Proteini HH su tkivno specifični, uz izuzetak SHH koji je od tri liganda HH najrašireniji unutar organizma. DHH je ograničen na prostor Sertolijevih stanica te je zadužen za njihov razvoj i spermatogenezu. Gubitak proteina DHH nije smrtonosan, ali mužjaci bez njega u potpunosti gube sposobnost za proizvodnju zrelih spermija i postaju sterilni (Bitgood i sur. 1996). IHH je lokaliziran u probavnom sustavu, hrskavici, kontrolira rast kostiju tijekom razvoja te popravak kostiju (Levanat i sur. 2008; Yamaguchi i sur. 2000). SHH je tijekom razvoja izražen u nekoliko organizacijskih centara poput notohorda za kojeg se smatra da je glavni izvor SHH u razvoju, te zonama polarizacijske aktivnosti u pupovima udova (Jia i Jiang 2006). Izražen je i u probavnom sustavu, folikulima dlaka, očima i plućima (Levanat i sur. 2008). Zaduzen je za stvaranje obrasca tkiva u distalnim dijelovima udova pomoću koncentracijskog gradijenta te za proliferaciju i diferencijaciju stanica. Djeluje i na većinu epitelnih tkiva. Delecija SHH dovodi do ozbiljnih deformacija od kojih je najpoznatija ciklopija, ali uzrokuje i malformacije udova, nedostatak kralježnice i rebara, nerazgranata pluća i nepravilan razvitak ventralne neuralne cijevi (Varjosalo i Taipale 2008). Vrlo je bitan u određivanju staničnih identiteta u živčanom sustavu što postiže stvaranjem koncentracijskog gradijenta te djelovanjem kao morfogen. U ventralnom dijelu leđne moždine potiče preživljavanje i proliferaciju neuralnih progenitora zaustavljajući inhibitorno djelovanje proteina GLI3 (Jiang i Hui 2008). Također, potiče stvaranje neuralnih progenitora sa mezenhimalnim i neuralnim potencijalima, umjesto isključivo neuralnog potencijala (Calloni i sur. 2007).

Tijekom embrionalnog razvoja stanice neuralne cijevi se među ostalog, diferenciraju i u melanocyte. Ove stanice su sklone mobilnosti, multipotentne su, imaju sposobnost samoobnavljanja te su pod utjecajem signalnog puta HH/GLI koji sudjeluje u obnavljanju populacije stanica (Shakhova 2014). U koži je dokazana prisutnost stanica sličnih progenitorskim stanicama neuralne cijevi koje u kulturama mogu proliferirati i diferencirati se u neurone, glija stanice, glatke mišiće i adipocyte, slično pravim stanicama neuralne cijevi (Toma i sur. 2001).

Prisutnost ovih stanica u koži te njihova podložnost HH/GLI signalnom putu, osobito ako je signal aberantan, može pridonijeti malignom potencijalu ovih matičnih stanica i razvoju melanoma.

Glavni efektori signalizacije preko mitogena SHH su aktivacijski oblici proteina GLI (GLIA), uglavnom aktivacijskog oblika proteina GLI2, te o njima ovisi proliferacija stanica i razvoj tkiva. Zbog njihove funkcije poticanja diobe stanica, njihovom pretjeranom ekspresijom može doći do nastanka tumorogeneze (Jiang i Hui 2008). Dokazano je da protein GLI1 nije nužan za razvoj tkiva, a da važnost GLI2/GLI3 varira ovisno o vrsti tkiva, ali njihov nedostatak se pokazao fatalnim te se karakteriziraju s ozbiljnim defektima lubanje, centralnog živčanog sustava, polidaktilijom i nepravilnostima u plućima (Niewiadomski i sur. 2019). Pri stvaranju obrasca stanica u neuralnoj cijevi, vrlo su bitni GLI2 i GLI3. U ventralnom dijelu cijevi se luče velike količine SHH iz notohorda te se potiče stvaranje aktivacijskih oblika proteina GLI, a stvaranje represorskih se blokira što usmjerava progenitorske stanice ventralno (Stamatakis i sur. 2005). Stvaranje uzorka tkiva je vidljivo i kod pupova udova te funkcionira na veoma sličan način kao u neuralnoj cijevi – utjecaji aktivatorskih oblika proteina GLI su jači na dijelu gradijenta gdje se nalazi više proteina SHH, a na mjestima gdje je njegova koncentracija niža, jači su učinci represorskih oblika (Niewiadomski i sur. 2019).

#### **1.4. Uloga signalnog puta HH/GLI u odraslim organizmima**

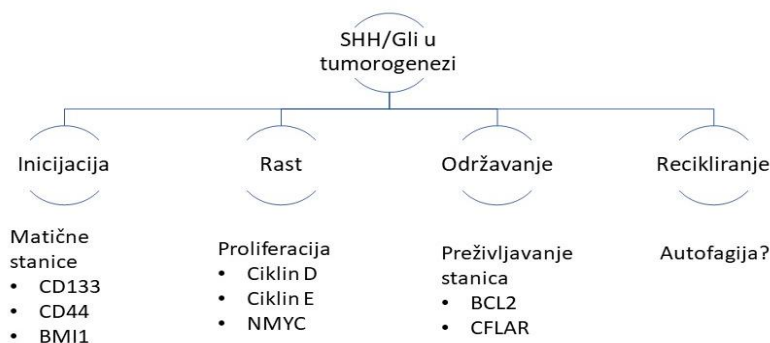
U odraslom organizmu je aktivnost signalnog puta HH/GLI slaba ili je u potpunosti inaktivan. Nakon embriogeneze uloga mu se svodi na regeneraciju tkiva i održavanje populacija progenitorskih stanica u organima poput mozga, kože, prostate, mjehura i drugih (Petrova i Joyner 2014).

Signalni put HH/GLI je zadužen za održavanje populacije HH osjetljivih i GLI1 pozitivnih neuralnih matičnih stanica u odraslom mozgu (Jiang i Hui 2008). SHH je osim u živčanom sustavu prisutan i u koži odraslih organizama. Pokazano je da tretman anti-SHH protutijelima sprječava progresiju anagena i blokira rast dlake, dok tretman dodatnim SHH stimulira početak anagena i rast dlake (Petrova i Joyner 2014). Delecija IHH u hondrocitima rezultira trajnim poremećajima u rastu kosti pomoću djelovanja na proliferaciju i diferencijaciju hondrocita, kao i diferencijaciju osteoblasta (Razzaque i sur. 2005). Uz regeneraciju kostiju, SHH sudjeluje i u regeneraciji mišića

i zarastanju nakon ozljede pomoću pojačane angiogeneze i vaskulogeneze zbog stvaranja proangiogenih faktora (VEGF, ANG1, ANG2) i stvaranja faktora rasta (Piccioni i sur. 2014). Kao i kod kostiju i mišića, HH/GLI ima ulogu u regeneraciji jetre. SMO regulira popravak jetre pomoću promoviranja epitelno-mezenhimalne tranzicije u jetrenim stanicama (Michelotti i sur. 2013). Djelomično odstranjenje jetre kod odraslih miševa dovodi do povećane produkcije liganda HH i pojačano se aktivira signalni put HH/GLI u jetrenim stanicama. Inhibicijom prijenosa signala narušena je normalna regeneracija jetre, remodeliranje matriksa i proliferacija stanica (Ochoa i sur. 2010).

### 1.5. Uloga signalnog puta HH/GLI u tumorogenezi

Signalni put HH/GLI ima bitnu ulogu u embriogenezi i stanicama odraslog organizma zbog činjenice da utječe na progresiju staničnog ciklusa, proliferaciju i diferencijaciju stanica, epitelno-mezenhimalnu tranziciju, angiogenezu, regeneraciju stanica, migraciju i invaziju. Sve komponente ovog puta djeluju kao proto-onkogeni ili kao tumor supresori koji se međusobno čvrsto reguliraju (Niyaz i sur. 2019) (Slika 4).



**Slika 4. Neke od uloga HH/GLI signalizacije kod tumorogeneze i progresije tumora.** Tijekom inicijacije tumorogeneze dolazi do povećanja koncentracije markera matičnih tumorskih stanica BMI1 koji je ovisan o HH/GLI. Uključen je u održavanje matičnih stanica tumora koje su odgovorne za inicijaciju. Kontrolira transkripciju gena koji potiču napredovanje staničnog ciklusa i proliferaciju. Aktivira gene odgovorne za stanično preživljavanje i angiogenezu te je uključen i u autofagiju (preuzeto i prilagođeno iz Milla i sur. 2012).

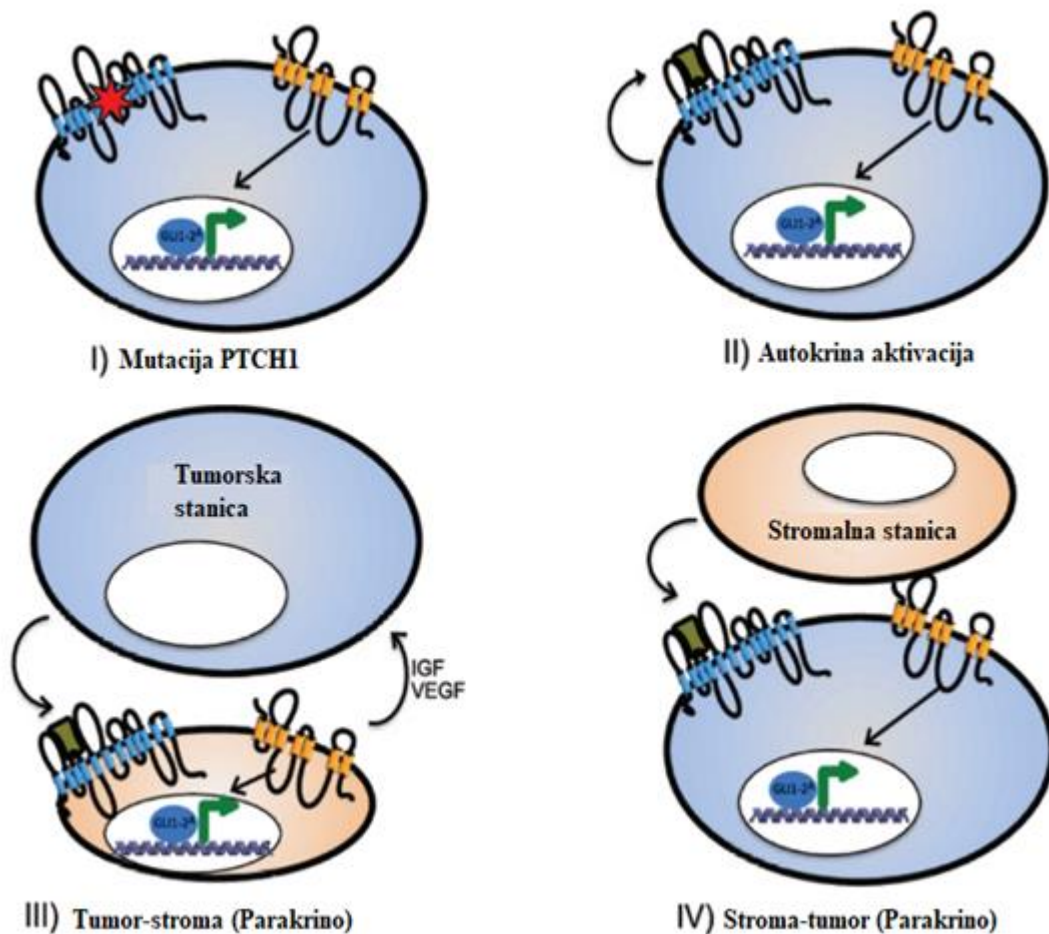
Dokazom prisutnosti populacija matičnih stanica raka od kojih tumori nastaju, lako je doći do zaključka da signalni put koji ima ulogu u održavanju velikog broja populacija matičnih stanica

može imati ulogu i u održavanju tumorskih populacija. Ovakve stanice imaju sposobnost diferencijacije u bilo koji fenotip prisutan u tumoru te imaju sposobnost obnavljanja kako bi se rast tumora održao, a mogu biti i otporne na lijekove. Signalni put HH/GLI stoga može imati različite uloge u inicijaciji tumorogeneze, aktivirajući njihov tumorigenični potencijali i poticanje ekspresije gena koji će zauzvrat poticati proliferaciju i preživljenje ovih stanica (Milla i sur. 2012).

Nepravilnom aktivacijom ovog puta, funkcije koje on obnaša postaju aberantne te mogu pridonijeti tumorogenezi ili rastu već postojećeg tumora. Postoji nekoliko mehanizama preko kojih može doći do nepravilne aktivacije signalnog puta: mutacije u genima koji kodiraju komponente puta (pogrešna/besmislena/promjena okvira čitanja/broj ponavljanja), pretjerana ekspresija ili inhibicija komponenti puta i posttranskripcijske modifikacije *GLI1/2* mRNA (Niewiadomski i sur. 2019) (Slika 5).

Povišena razina produkcije liganada HH također može biti zaslužna za pretjeranu autokrinu aktivaciju signalnog puta HH/GLI. Ovaj mehanizam je opisan kod više vrsta tumora, uključujući tumore pluća, debelog crijeva, prostate i glioblastome (Armas-López i sur. 2017; Watkins i sur. 2003). Parakrina aktivacija ovisna o ligandu može biti potaknuta pomoću tumorskog mikrookoliša koji djeluje recipročno između strome i tumorskih stanica. Stromalne stanice imaju sposobnost lučenja liganada SHH koji će djelovati na neoplastične stanice i poticati njihov rast i razvoj, kao što i tumorske stanice imaju sposobnost lučenja istog koji može djelovati na stromalne stanice i poticati stvaranje tumoru pogodnog mikrookoliša (Armas-López i sur. 2017). Poznata je i potreba za parakrinom signalizacijom kod tumorogeneze onih tumora koji su osjetljivi na HH/GLI (Yauch i sur. 2008).

Tip aktivacije signalizacije neovisan o ligandu u stanicama raka se temelji na mutacijama komponenti koje mijenjaju stanicu kako bi bila pogodnija tumoru. Najčešće mutacije mijenjaju represore signalnog puta poput *SUFU* i *PTCH1*. Ovakva mutacija u genu *PTCH1* dovodi do razvoja Gorlinovog sindroma koji je asociran sa višom pojavnosti karcinoma bazalnih stanica te je prvi opisani put kojem aberantna aktivacija signalnog puta HH/GLI može dovesti do tumorogeneze (Pandolfi i Stecca 2015). U tom slučaju, mutacije u *PTCH1* dovode do pretjerane aktivnosti signalnog puta preko koreceptora SMO i transkripcijskog faktora *GLI1* te pridonose održavanju maligno transformiranih stanica (Armas-López i sur. 2017).



**Slika 5. Prikaz načina na koje nepravilna aktivnost HH/GLI signalnog puta može biti odgovorna za inicijaciju i održavanje tumora.** I) Neovisna o ligandu: konstitutivna aktivacija uzrokovana mutacijom u genu PTCH, II) Ligand ovisna autokrina aktivacija u kojoj stanica producira ligand koji se veže na receptore te iste stanice i potiče aktivnost signalnog puta, III) Parakrino: tumorske stanice luče ligand koji aktivira stromalne stanice koje zauzvrat luče faktore rasta koji djeluju na tumorsku stanicu, IV) Parakrino: stromalne stanice luče ligande HH kako bi potaknule signalni prijenos u tumorskim stanicama (preuzeto i prilagođeno od Armas-López i sur. 2017)

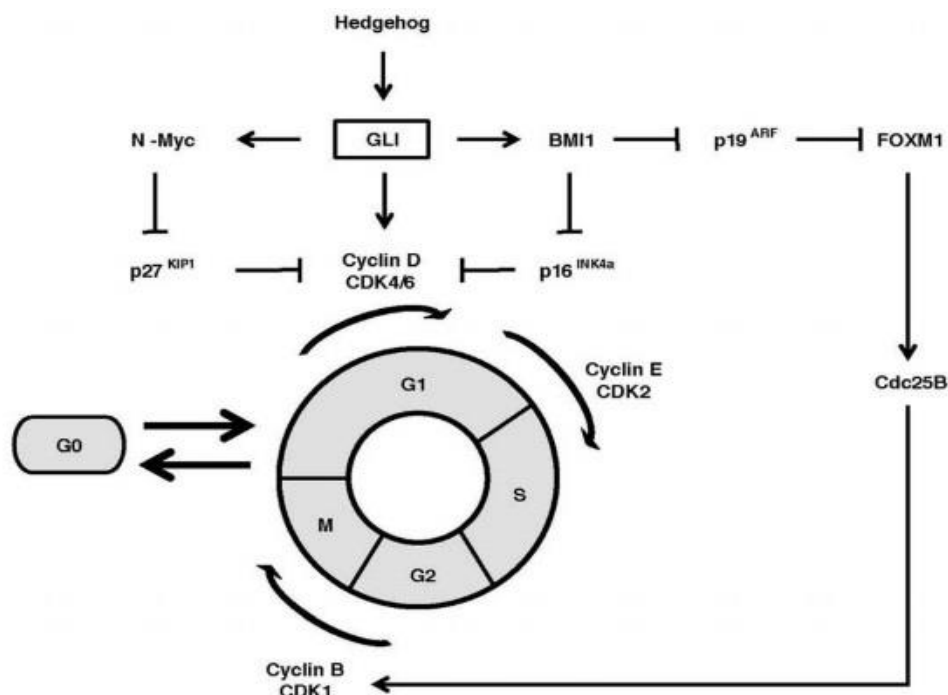
Sposobnost i jačinu signala je moguće modulirati i pomoću posttranslacijskih mehanizama, osobito pomoću miRNA molekula u stanicama. Gubitak liganada HH kod pacijenata s mijeloidnom leukemijom ima pozitivan učinak na pacijente jer sprječava obnavljanje populacije matičnih stanica raka čime usporava progresiju tumora. Kod iste bolesti je dokazana povećana ekspresija koreceptora SMO kao i njegova povezanost sa smanjenom razinom miR-326 u CD34+ stanicama. Povišena ekspresija miR-326 dovodi do smanjene razine SMO što rezultira smanjenim proliferacijskim kapacitetom stanica te povišenim apoptotskim potencijalom. Pretpostavljen mehanizam pretjerane aktivnosti SMO u stanicama mijeloidne leukemije je niska razina miR-326

molekula koja više nema sposobnost regulacije prijenosa signala preko koreceptora SMO (Babashah i sur. 2013). Villegas i sur. (2014) su dokazali prisutnost *GLI1 antisense RNA* (*GLI1AS*) u stanicama raka koja utječe na razinu *GLI1*. Nedostatak ove RNA molekule dovodi do povišenja koncentracije proteina *GLI1* i pojačane proliferacije tumorskih stanica što dovodi do rasta tumora. Njena pretjerana ekspresija smanjuje razinu proteina *GLI1*, ekspresiju gena *PTCH1* i *PTCH2* i smanjuje sposobnost proliferacije. *Knock-out* gena *GLI1* dovodi do smanjenja razine *GLI1AS*, a pojačana ekspresija proteina *GLI1* povećava njenu koncentraciju što je dovelo do zaključka da je *GLI1AS* jedan od ciljnih gena na koje djeluje transkripcijski faktor *GLI1*.

Stanična proliferacija je posljedica prolaska stanice kroz stanični ciklus koji je pažljivo kontroliran. Progresija ciklusa vodi stanicu kroz G1, S, G2 i M faze, a napredovanje ovog ciklusa je kontrolirano pomoću prisutnosti molekula koje se nazivaju ciklin ovisne kinaze, te naravno, ciklini. Za G1 fazu su zadužene ciklin ovisne kinaze 4 i 6 (CDK4 i CK6) i ciklin D. CDK2 i ciklin E su odgovorni za prijelaz iz G1 u S fazu, CDK2 i ciklin a za S fazu, CDK1 i ciklin A za G2 fazu i CDK1 zajedno sa ciklinom B za prijelaz iz G2 faze u mitozu. Geni koji kodiraju N-Myc, ciklin D1 i ciklin D2 su direktne mete proteina *GLI* koji potiču njihovu transkripciju i prolazak stanice kroz kontrolnu točku G1/S u staničnom ciklusu, potičući proliferaciju stanice. Osim direktnih meta, *GLI* može djelovati i indirektno na transkripciju gena (Kato i Kato 2009) (Slika 6).

Prisutnost veznih mjesta za transkripcijske faktore *GLI* je pronađena i kod gena koji su odgovorni za kontrolu stanične smrti ili apoptoze. *BCL2* je glavni stanični anti-apoptotski faktor te je pod kontrolom HH/*GLI* sustava. Signalni put HH/*GLI* dovodi do supresije pro-apoptotskih proteina kao što su *BIM*, *p53* i *p19* koji djeluju antagonistički na *BCL2*. Nedostatkom njihove aktivnosti, *GLI* djeluje sinergistički na *BCL2* te stanica ne ulazi u apoptozu (Kato i Kato 2009; Skoda i sur. 2018).





**Slika 6. Prikaz djelovanja signala HH/GLI na napredak staničnog ciklusa i staničnu proliferaciju.** Poticanjem ekspresije MYCN, CCND1, CCND2M CCNE, FOX1, CCNB1 i CCNB2 potiče se prelazak stanice iz G1 u S fazu te iz G2 u M fazu staničnog ciklusa (preuzeto iz Katoh i Katoh 2009).

Epitelno-mezenhimalna tranzicija (EMT) i njegov suprotan proces, mezenhimalno-epitelna tranzicija su nazivi za proces u kojemu stanice gube svoje originalne karakteristike, primjerice epitelne stanice gube svoj karakterističan oblik, usmjerenje i čvrste veze sa susjednim stanicama te poprimaju karakteristike drugih, u ovom slučaju mezenhimalnih stanica koje nemaju čvrste veze sa susjednim stanicama što im omogućava veću pokretljivost. EMT je vrlo značajan proces tijekom embriogeneze koji omogućava premještanje stanica, ali aktivan je i prilikom zarastanja rana, kao i u tumorogenezi. U slučaju tumorogeneze, smatra se da tijelo gleda na tumor kao ranu koja pretjerano koristi procese zarastanja. Proces u kojemu se omogućava poprimanje mezenhimalnih karakteristika stanica i povećanje njihove mobilnosti u tumorima, omogućava tim stanicama ulazak u krvne žile i putovanje istima dok se ne pričvrste na drugo mjesto u organizmu, ponovno poprime karakteristike epitelnih stanica, proliferiraju i stvore metastazu (Zhang i sur. 2016). U EMT, zajedno sa HH/GLI sustavom, uključeni su i drugi signalni putovi poput Notch i BMP, kao i drugi faktori poput citokinske obitelji TGF- $\beta$ . Signalni put HH/GLI također regulira ekspresiju i drugih proteina koji su uključeni u proces epitelno-mezenhimalne tranzicije i metastaziranja poput proteina SNAI1 (Milla i sur. 2012). Prisutnost signala HH/GLI potiče

aktivaciju TGF- $\beta$  koji aktivira MAPK-NF  $\kappa$ B kaskadu i pojačava stvaranje SNAI2, ZEB1 i ZEB2 (Slug). HH/GLI ima utjecaj i na stvaranje TWIST2. Ovi proteini zajedno su regulatori EMT kroz transkripcijsku represiju E-kadherina. Ekspresija FOXC2 pod utjecajem signala HH/GLI je također povišena, a on djeluje inducirajući N-kadherin, vimentin i fibronektin pospešujući poprimanje mezenhimalnih karakteristika (Kato i Kato 2009). Jiang i sur. (2020) su u istraživanju tumorske progresije kroz EMT dokazali da je smanjena transkripcijska aktivnost GLI povezana sa smanjenom ekspresijom N-kadherina i vimentina te da „*knock-out*“ GLI1 i GLI2 dovodi do smanjene invazivne sposobnosti tumora. Kod renalnih tumora i tumora dojke je situacija vrlo slična, SHH suprimira ekspresiju E-kadherina te je ekspresija vimentina i proteina SNAI povezana sa invazivnim potencijalom tumora (Behnsawy i sur. 2013; Riaz i sur. 2019).

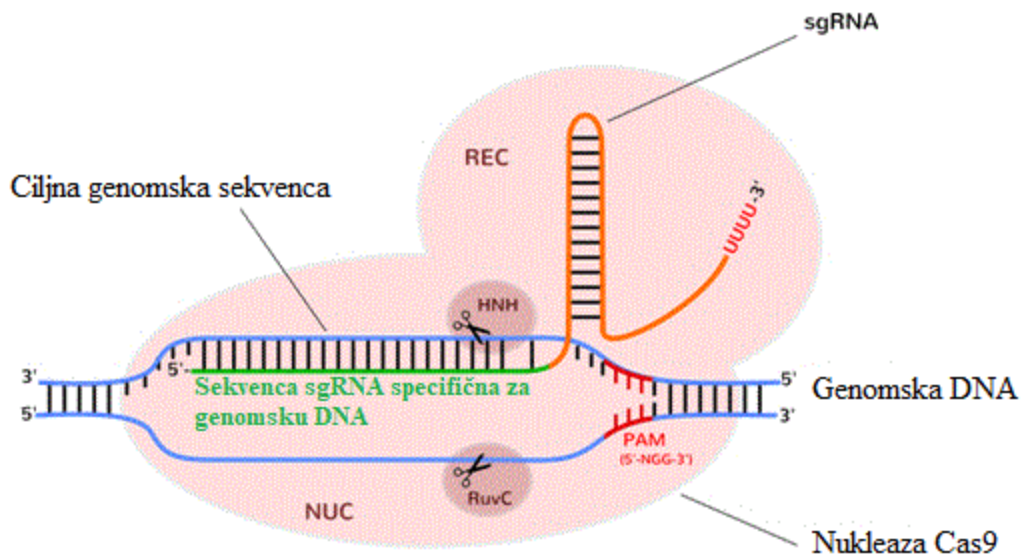
Melanom je najagresivniji oblik raka koji i u ranim stadijima ima lošiju prognozu ako ga usporedimo s drugim tipovima tumora (Shi i Chen 2019). S obzirom da signalni put HH/GLI ima ulogu u nastajanju melanocita i da može biti aktivan i kod odraslih populacija matičnih stanica u koži, nije iznenađujuće da je kod melanoma dokazana povišena razina ekspresije komponenti PTCH, SMO i GLI. Dodatno povišenje ekspresije je pokazano kod metastatskih melanoma, što je u skladu s već objašnjenim utjecajem na metastaziranje. Inhibitori koreceptora SMO smanjuju rast i sposobnost samoobnavljanja stanica melanoma preko inhibicije GLI1 (Petrobono i sur. 2018).

## 1.6. CRISPR/Cas9 sustav

Prvo spominjanje CRISPR/Cas sustava je zabilježeno 1987. godine kada su u genomu bakterije *Escherichia coli* primjećene izmjenjujuće ponavljajuće i neponavljajuće sekvence. Njihova funkcija je otkrivena tek dvadesetak godina kasnije kada je otkriveno da je ovaj dio genoma odgovoran za adaptivnu imunost bakterija protiv bakteriofaga i drugih plazmida. Naziv duguje svojoj strukturi unutar genoma koja se sastoji od ponavljajućih palindromskih sekvenci razdvojenih neponavljajućim razmaknicama (*engl. spacer*) dobivenih od stranog genetskog materijala, stoga je nazvan CRISPR (*engl. Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*). Oko 85% arheja i 45% bakterija posjeduje CRISPR lokus unutar genoma (Loureiro i Da Silva 2019). Osim ponavljajućih sekvenci i razmaknica, unutar CRISPR lokusa se nalaze i CRISPR povezani geni *Cas* (*engl. CRISPR associated genes*) koji kodiraju proteine potrebne za integraciju stranog materijala. Različiti geni *Cas* određuju do sada poznata tri glavna tipa i više

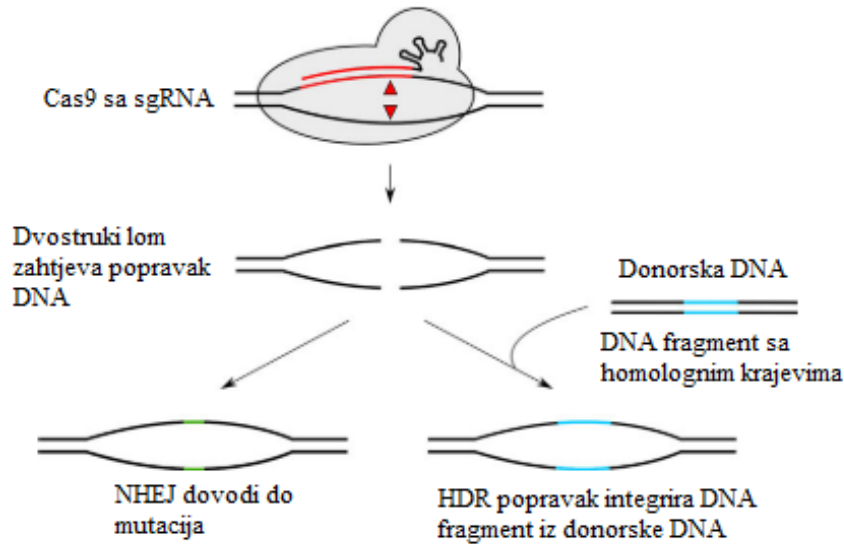
podtipova CRISPR sustava (Van Der Oost i sur. 2014). Mehanizam na koji CRISPR-Cas sustav bakterijama pruža adaptivnu imunost se sastoji od tri faze: adaptacija, biogeneza i interferencija. Strani genetički materijal se inkorporira u genom stanice tijekom stadija adaptacije. Proteini Cas1 i Cas2, koji su prisutni u svim CRISPR sustavima, su glavni efektori ovog stadija te igraju ulogu u odabiranju razmaknice i njenoj integraciji u genom. Kod CRISPR tipa II-A Cas9 prepoznaje PAM (*engl. protospaces adjacent motif*) koji se nalazi pokraj željene razmaknice. Smatra se da Cas9 regrutira Cas1 i Cas2 koji zahvaljujući svojoj endonukleaznoj i integraznoj aktivnosti cijepaju nukleinsku kiselinu i ugrađuju ju u genom stanice (Hille i Charpentier 2016). Prije ugradnje razmaknice, prva ponavljajuća sekvenca u genomu se duplicira te se razmaknica ugrađuje na vodeći kraj nukleinske kiseline. Tijekom biogeneze, CRISPR lokus se transkribira u dugu prekursorsku cr-RNA (pre-crRNA) koja se procesira u CRISPR RNA (cr-RNA) i sadrži sekvenca ugrađene razmaknice. Dolazi do hibridizacije cr-RNA sa komplementarnom sekvencom *trans-activating* CRISPR RNA (tracr-RNA) te procesiranja do zrele cr-RNA vodilje (*engl. guide*) koja ostaje čvrsto vezana za Cas9 (Van Der Oost i sur. 2014). Protein Cas9 zatim prepoznaje sekvenca na stranom materijalu na koju ju vodilja cr-RNA usmjeri te ju cijepa i time dovršava korak interferencije u kojem se strani genetički materijal cijepa te se njegov štetni potencijal za bakterijsku stanicu otklanja.

Uređivanje genoma organizama je moguće reprogramiranjem endonukleaze Cas9 pomoću jedne kimerne molekule RNA (sgRNA, gRNA) koja će djelovati kao vodilja i usmjeravati protein na željena mjesta cijepanja DNA u genomu kako bi se postigao ciljani rezultat. Ova kimerana molekula se sastoji od jedne hibridne RNA molekule koja ima dvije karakteristike nužne za pravilnu funkciju. Prva je sekvenca dužine oko 20 nukleotida na 5' kraju koja određuje vezno mjesto na DNA, a druga je dvolančani dio molekule na 3' kraju koji omogućava vezanje na Cas9. Stvaranjem ovakve RNA molekule omogućeno je korištenje sustava koji se sastoji od samo dvije komponente, a promjene u 5' kraju RNA molekule omogućavaju specifično ciljanje bilo kojeg mjesta u DNA uz uvjet da se pokraj nalazi PAM sekvenca (Slika 7) (Jinek i sur. 2012).



**Slika 7. Prikaz vezanja kompleksa sgRNA/Cas9 na ciljnu genomsku DNA nakon prepoznavanja PAM.** Kimerna molekula sgRNA 5' dijelom određuje vezno mjesto na DNA, a 3' dijelom veže Cas9, dok nukleazne domene HNH i RuvC cijepaju DNA domaćina (preuzeto i prilagođeno sa <https://www.bio-connect.nl/crispr-cas9-genome-editing-transfection-reagents/cnt/page/5171>)

Nakon uvođenja dvolančanog loma u DNA molekuli, postoje dva načina popravka DNA. Popravak spajanjem nehomolognih krajeva (*engl. non-homologous end joining*, NHEJ) je sklon točkastim mutacijama, delecijama i može uzrokovati pomak okvira čitanja koje izmjenjuju produkt mutiranog gena koji najčešće gubi svoju funkciju. Popravak NHEJ je koristan u slučajevima željenog *knock-outa*. Popravak usmjeren na homologiju (*engl. homology-directed repair*, HDR) je popravak tijekom kojeg dolazi do ugrađivanja dijela donorske DNA koji ima krajeve homologne domaćinskoj DNA (Slika 8). Popravak se odvija homolognom rekombinacijom. U donorskoj DNA se nalazi željeni gen koji se želi ugraditi u genom domaćinske stanice (Hille i Charpentier 2016).



**Slika 8. Popravak DNA nakon dvolančanog loma.** Cas9 uvodi dvolančani lom u molekulu DNA koja se može popraviti na dva načina: spajanjem nehomolognih krajeva, koje je sklono pogreškama, ili popravkom usmjerenim na homologiju kojim je moguće u domaćinsku DNA ugraditi željeni gen uz prisutnost donorske DNA koja sadrži taj gen te ima krajeve DNA homologne s domaćinskom DNA (preuzeto i prilagođeno iz Hille i Charpentier 2016).

Metoda CRISPR-Cas se pokazala učinkovitom u kreiranju staničnih i animalnih modela određenih tipova tumora, kao i za proučavanje utjecaja mutacija određenih gena na progresiju bolesti. Očigledan je potencijal koji ova metoda ima u ispravljanju mutacija koje uzrokuju različite monogenske bolesti kao što je cistična fibroza ili srpasta anemija. Osim kod genetskih bolesti, sustav je vrlo koristan i kod virusnih bolesti i bakterijskih infekcija. Do sada su istraživači već uspjeli eradicirati virus HIV-a iz humanih CD4<sup>+</sup> stanica pomoću izrezivanja dijela genoma s Cas9. Ipak, ovakav tretman je ograničen samo na specifične tretirane stanice, a ne na kompletno tkivo ili organske sustave što ograničava njegovu primjenu u liječenju bolesti. Zabrinutost oko pojave bakterija koje su rezistentne na velik broj modernih antibiotika je potakla znanstvenike da ovaj sustav testiraju i na otklanjanju antibiotske rezistencije u bakterija. Metoda se pokazala učinkovitom, bez štetnih utjecaja na bakterijske stanice *Escherichia coli* na kojima je istraživanje provedeno. Potencijal CRISPR-Cas sustava nije ograničen isključivo na biomedicinske svrhe. Moguće je izmijeniti genom biljaka kako bi postale rezistentne na štetočine, viruse, kako bi bolje podnosile sušna razdoblja ili davale više plodova (Loureiro i Da Silva 2019).

## 2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj ovog istraživanja je validacija ciljane ugradnje gena *SHH* u stanični genom i ispitivanje aktivnosti signalnog puta HH/GLI u tim staničnim linijama.

Kako bi se glavni cilj postigao, određeni su sljedeći ciljevi:

1. Razviti individualne klonske linije stanične linije CHL1-SHH iz pojedinačnih transfeciranih stanica
2. Definirati koje stanične linije imaju povišenu razinu proteina SHH u odnosu na ishodišnu
3. Provjeriti prisutnost i ispravnost ugradnje gena *SHH* u *AAVSI* lokus
4. Ispitati aktivnost signalnog puta HH/GLI u stanicama s ugrađenim *SHH* i usporediti ih s ishodišnim stanicama divljeg tipa
5. Usporediti markere epitelno-mezenhimalne tranzicije i staničnu morfologiju ishodišnih i modificiranih stanica

## 3. MATERIJALI I METODE

### 3.1. Materijali

Materijal na kojem je istraživanje provedeno je komercijalno dostupna stanična linija melanoma čovjeka CHL-1. Uzgaja se u staničnoj kulturi u DMEM (*engl. Dulbecco's Minimal Essential Medium*, Gibco) mediju s dodatkom 10% fetalnog goveđeg seruma (*engl. fetal bovine serum*, FBS, Sigma). Stanična linija je uzgajana u inkubatoru (Kambič) na temperaturi 37°C i pri 5% CO<sub>2</sub> u petrijevim zdjelicama promjera 10 cm.

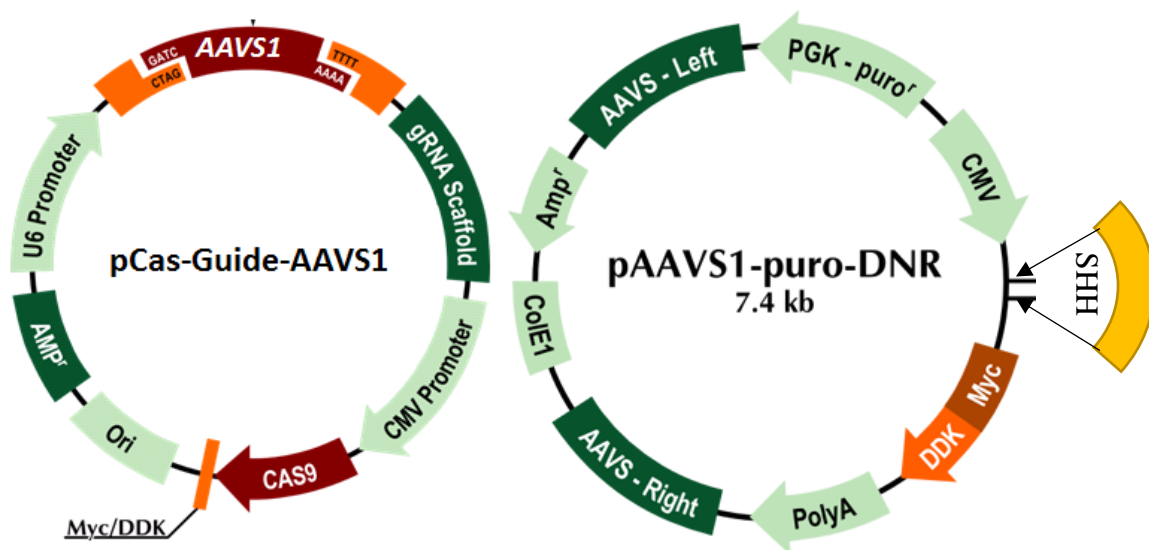
### 3.2. Metode

#### 3.2.1. Rad sa staničnim kulturama

Rad koji uključuje stanične kulture sam obavljala u sterilnim uvjetima unutar laminarnog zaštitnog uređaja s protokom zraka. Provodila sam i sterilizaciju laminara UV svjetlom prije i poslije rada, uz dezinfekciju radne površine etanolom.

#### 3.2.2. Unos gena za protein SHH u stanične linije CHL-1

Ugradnja gena *SHH* je napravljena pomoću CRISPR-Cas9 sustava koji je omogućio ciljanu ugradnju gena u *AAVSI* lokus u genomu stanice. Za to se koristio komercijalni komplet za ugradnju u *AAVSI* lokus (GE100027, Origene, SAD) koji sadrži dva vektora. Prvi je pCas-Guide-AAVSI koji eksprimira sgRNA koja cilja *AAVSI* lokus, te nukleazu Cas9. Drugi je pAAVSI-Puro -DNR koji sadrži homologne regije koje odgovaraju *AAVSI* lokusu. Između tih regija nalazi se mjesto za kloniranje željenog inserta i gen za rezistenciju na puomicin (Slika 9). Postupak dizajna, kloniranja i provjere inserta gena *SHH* u ovaj vektor opisane su u diplomskom radu Josipe Čonkaš (2021).



**Slika 9. Shematski prikaz korištenih vektora iz kompleta** (preuzeto i prilagođeno s [www.origene.com](http://www.origene.com))

Postupak transfekcije i selekcije stanica napravljen je u Laboratoriju za nasljedni rak.

200 000 stanica stanične linije CHL-1 nasađeno je u jedan bunarić pločice sa šest bunarića u 2 mL kompletnog DMEM medija (90% DMEM, 10% FBS) i ostavljeno preko noći u inkubatoru na 37°C i 5% CO<sub>2</sub> kako bi se stanice pričvrstile za podlogu. Sljedeći dan je pripremljena transfekcijska mješavina tako da je 2,5 µg vektora pCas-Guide-AAVS1 (3,58 µL) i 2,5 µg vektora pAAVS1-Puro-DNR-SHH (9,29 µL) pomiješano sa 87,13 µL Xfect pufera (Takara Bio). Mješavini je dodan 1,5 µL Xfect polimera (Takara Bio). Smjesu se dobro protreslo 10 sekundi i inkubiralo 10 minuta na sobnoj temperaturi. Za to vrijeme je sa stanica uklonjen medij i stanice su isprane s 2 mL PBS pufera (*engl. Phosphate-Buffered Saline*; 1,7mM mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 136 mM NaCl, 1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.2) koji je nakon ispiranja uklonjen. Na stanice je nakapana mješavina vektora s Xfect reagensima, a zatim je dodano 2 mL DMEM medija bez FBS-a. Stanice su pohranjene u inkubator na 37°C i 5% CO<sub>2</sub> na 5 sati. Nakon inkubacije, sa stanica je uklonjen medij, stanice su isprane sa 2 mL PBS pufera i ostavljene preko noći u kompletnom DMEM mediju. Sljedeći dan je na stanice dodan antibiotik puromicin u koncentraciji 1 µg/mL. Stanice su ostavljene u antibiotiku 15 dana. Svaki drugi ili treći dan im je mijenjan medij s antibiotikom. Nakon selekcije antibiotikom, preživjele stanice su pomoću tripsina odvojene od podloge, izbrojane i nasađene u pločicu s 96 bunarića u gustoći od 5 stanica/mL u 100 µL medija u bunariću. Ovakvim nasađivanjem se osigurava da će u pojedinom bunariću najčešće biti jedna stanica, što omogućava razvoj klonske linije. Na ovaj način možemo biti sigurni da je linija genetički



homogena. Ako je u stanici došlo do ugradnje željenog gena, cijela stanična linija koja je od nje nastala će nositi tu promjenu. Stanice su održavane u pločici s 96 bunarića dok nisu formirale po jednu jasnu koloniju u bunariću. Ako je u bunarićima bilo više kolonija, ili ako u bunariću nije bilo stanica, ti bunarići su odbačeni. Oni s jednom kolonijom su tripsinizirani i presađeni u pločice sa 6 bunarića.

### 3.2.3. Uzgoj i održavanje stanica u kulturi

Sve potrebne tubice, epruvete, pločice s bunarićima i petrijevke sam prije početka samog postupka označila s odgovarajućim oznakama te sam postupke obavljala u sterilnim uvjetima. Stanične linije su čuvane u inkubatoru pri 37°C i 5% CO<sub>2</sub>.

Inicijalno prikupljanje stanica za izolaciju DNA, proteina i zamrzavanje se obavljalo sa stanicama koje su se nalazile u pločicama sa šest bunarića, a svi kasniji eksperimenti sa stanicama nasadenima u petrijevim zdjelicama.

Promjenu medija sam radila na način da stari medij pipetom prikupim iz petrijeve zdjelice i bacim te sterilnom pipetom dodam 10 mL svježeg medija za petrijevke, i 2 mL za bunariće u pločicama sa 6 bunarića. Prikupljanje stanica sam obavljala za tri različite svrhe: izolaciju DNA, izolaciju proteina i zamrzavanje. Stanice koje sam prikupljala za izolaciju DNA i zamrzavanje sam nakon prikupljenog starog medija ispirala sa 1 mL PBS pufera po bunariću, ili 5 mL po petrijevoj zdjelici pomoću sterilnih pipeta. Korak ispiranja PBS puferom je nužan iz razloga što se ove stanice sa podloge skidaju pomoću tripsina, a zaostali medij u bunariću ili petrijevcu ima sposobnost njegove deaktivacije u kojem slučaju se stanice neće odvojiti od podloge. Nakon ispiranja, ovisno o tome gdje se stanice nalaze, u bunarić sam dodala po 200 µL, a u petrijevku po 1 mL smjese tripsina s dodatkom 1mM EDTA. Nakon nekoliko minuta, u posudi se vidi zamućenje i kretanje stanica zajedno s tekućinom što je indikator da su se stanice uspješno odvojile od podloge. Kada je korak odvajanja od podloge gotov, u bunarić ili petrijevku sam dodala kompletni medij te stanice resuspendirala pipetom. Od ukupnog volumena medija u bunariću ili petrijevoj zdjelici sam odvojila 1 mL koji mi je služio za daljnje propagiranje tih staničnih linija. Za stanice koje sam pripremala za izolaciju DNA, suspenziju stanica sam centrifugirala 5 minuta na 1200 x g nakon čega sam supernatant izlila iz tubica te talog čuvala u zamrzivaču na -20°C. Postupak

zamrzavanja stanica je identičan skupljanju stanica za izolaciju DNA, uz razliku što sam umjesto kompletnog medija dodala 1 mL medija za zamrzavanje (50% FBS, 40% DMEM, 10% DMSO) te sam ih čuvala u zamrzivaču na  $-80^{\circ}\text{C}$ . Stanice koje sam planirala provesti kroz izolaciju proteina nisam mogla tripsinizirati jer bi se željeni potrebni proteini razgradili takvim postupkom. Stanicama bih prvo otklonila stari medij pomoću čiste pipete. Kad u petrijevcu više nije bilo medija, dodala sam po 1 mL PBS pufera te ih s podloge uklanjala fizički pomoću sterilne strugalice. Kada se izgubio osjećaj klizavosti na površini koju stružem sam sadržaj prikupila sterilnom pipetom te prebacila u označene tubice. Nakon svake stanične linije bih strugalicu isprala sa etanolom i destiliranom vodom. Tubice sa stanicama sam zatim centrifugirala 5 min na  $1200 \times g$ , izlila supernatant, a taloge u tubicama čuvala u frižideru na  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Presadivanje stanica iz petrijevih zdjelica u pločice sa šest bunarića sam obavljala tako da sam prvo otklonila medij iz petrijevke pomoću pipete. Isprala sam zdjelicu sa 5 ml PBS pufera, otklonila pufer te dodala 1 mL smjese tripsina i EDTA. Nakon što se stanice odlijepe od površine sam dodala 6 mL medija te ih dobro resuspendirala pipetom. Tih 6 mL medija sa stanicama sam ravnomjerno rasporedila u tri bunarića na pločici, po 2 mL u svaki bunarić nakon čega sam bunariće dodatno nadopunila medijem te pohranila stanice u inkubator.

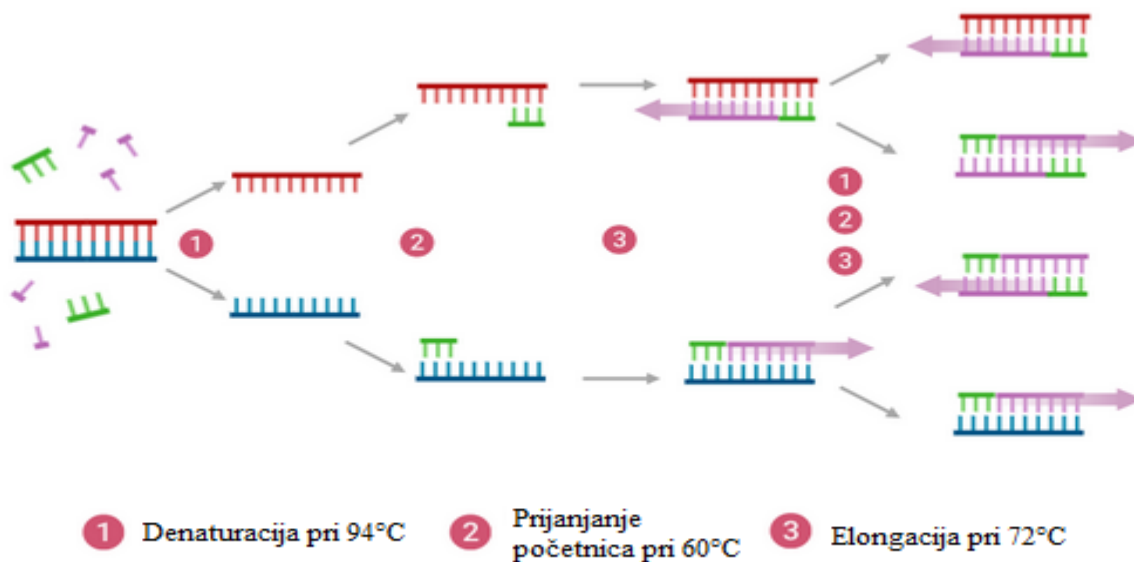
#### 3.2.4. Izolacija DNA

Proces izolacije DNA sam obavljala u digestoru s protokom zraka. U svaku tubicu sa stanicama predodređenima za izolaciju DNA koje su se čuvale na  $-20^{\circ}\text{C}$  dodala sam  $500 \mu\text{L}$  pufera za izolaciju (10 mM TRIS, 0.4 M NaCl, 2 mM EDTA, 1% SDS, pH 8.0) i  $10 \mu\text{L}$  proteinaze K te inkubirala 10 minuta na  $56^{\circ}\text{C}$ . Ovim korakom se stanica raspada, proteini degradiraju, a DNA oslobađa. Zatim sam dodala po  $500 \mu\text{L}$  fenola u svaku tubicu, dobro ih protresla te stavila u centrifugu na 10 minuta,  $16\ 000 \times g$  pri temperaturi od  $4^{\circ}\text{C}$ . Supernatant sam prebacila u čiste tubice te dodala  $500 \mu\text{L}$  otopine kloroform-izoamilni alkohol koju sam pripremila u omjeru 24:1. Kloroform omogućava razdvajanje vodene faze u kojoj se nalazi DNA od ostatka organskih tvari koje zaostaju u donjoj fazi. Tubice sam dobro protresla te ponovno centrifugirala 10 minuta na  $4^{\circ}\text{C}$ . Od gornje, vodene faze sam  $400 \mu\text{L}$  prebacila u čiste tubice pomoću pipete i dodala  $800 \mu\text{L}$  apsolutnog etanola koji je čuvan na  $-20^{\circ}\text{C}$  kako bi se DNA precipitirala. Tubice sam centrifugirala 20 minuta na  $16\ 000 \times g$  pri  $4^{\circ}\text{C}$ . Supernatant sam pipetom pažljivo uklonila bez da oštetim talog.

Talag u tubicama sam ostavila na sušenju na zraku nakon čega sam u svaku tubicu dodala 100  $\mu$ L TE pufera (10 mM TRIS, 1 mM EDTA, pH 8.0) te na nanofotometru (Implen, Njemačka) pri apsorbanciji  $A = 260/280$  izmjerila koncentracije DNA u uzorcima. Prije mjerenja uzoraka sam kalibrirala uređaj nanošenjem 1  $\mu$ L TE pufera, a tek nakon toga sam počela sa nanošenjem uzoraka. Između svakog uzorka sam očistila senzor uređaja. Omjer apsorbancije 260/280 ukazuje na čistoću uzorka, što je omjer bliži 2, to je uzorak čišći, ako je prenizak, najvjerojatnija je kontaminacija uzorka proteinima.

### 3.2.5. Lančana reakcija polimerazom (PCR)

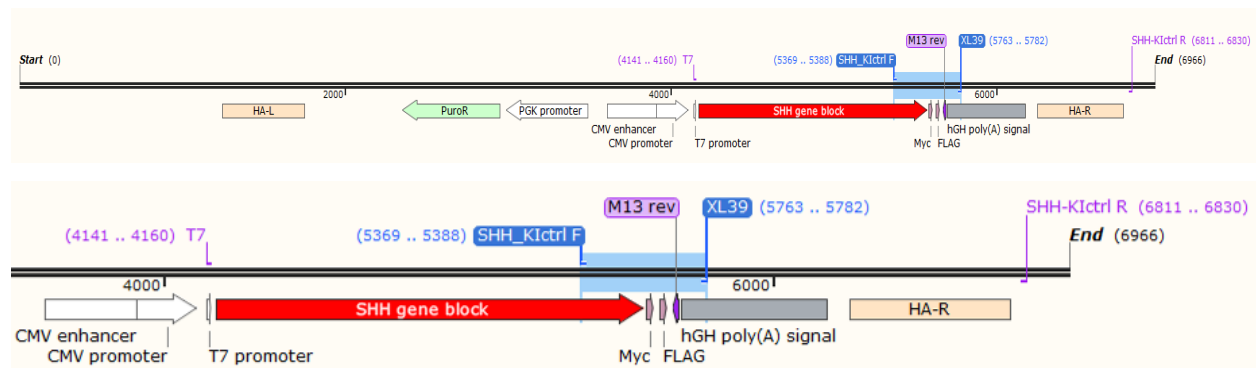
Pomoću lančane reakcije polimerazom umnažamo specifični odsječak male količine DNA do količine koja nam je dovoljna za proučavanje. Kopije manjih dijelova DNA se kroz cikluse eksponencijalno umnažaju kroz seriju temperaturnih promjena koje omogućavaju različite nužne reakcije poput razdvajanja lanaca dvolančane DNA, prijanjanja početnica i optimalne aktivnosti polimeraze (Slika 10).



**Slika 10. Prikaz koraka u lančanoj reakciji polimeraze** (slika izrađena na <https://app.biorender.com/>).

S obzirom da je ukupni volumen u kojemu sam provodila PCR vrlo malen, točno 10  $\mu$ L, sve komponente je jednostavnije dodati u jednu tubicu, u pravilu za veći broj uzoraka nego što je

potrebno da bi se korigirala moguća greška u pipetiranju i da reakcijska smjesa u svim uzorcima bude homogena. Broj uzoraka sam računala kao stvarni broj uzoraka uključujući divlji tip + vektor + negativna kontrola + 1 uzorak. Radna otopina se sastoji od vode, pufera, početnica SHH KI GEN F (sekvenca početnice: 5' GTGATAGTGGAGGCGGTGAT 3') i XL39 (sekvenca početnice: 5' ATTAGGACAAGGCTGGTGGG 3'), dNTPova te DNA polimeraze koje sam prije pipetiranja u tubicu za ukupnu radnu otopinu nekoliko sekundi centrifugirala (Tablica 1). Vezna mjesta početnica kao i lokus *AAVS1* su prikazani na Slici 11.



**Slika 11. Shematski prikaz lokusa AAVS1.** Prvi dio predstavlja kompletan lokus AAVS1 sa ugrađenom ekspresijskom kazetom za protein SHH. Drugi dio slike je dio lokusa sa *gene blockom* SHH i prikazanim mjestima vezanja početnica SHH\_KI F i XL39.

**Tablica 1. Volumeni komponenti radne otopine za jedan uzorak**

	1x
voda	6,72 $\mu$ L
pufer	1 $\mu$ L
F primer	0,5 $\mu$ L
R primer	0,5 $\mu$ L
dNTP	0,2 $\mu$ L
DNA polimeraza	0,08 $\mu$ L

Ekspresijska kazeta uz gen *SHH* sadrži i gen za rezistenciju na puromicin. HA-L i HA-R su regije homologije na kojima dolazi do popravka vođenim homologijom. Kako bi osigurali da se početnice neće vezati i za genomsku DNA, sekvence početnica su dizajnirane po sekvenci sintetskog gena *SHH* koji daje isti produkt, ali se razlikuje u sekvenci. Također, početnice se vežu

na regije unutar inserta za SHH i u dijelu kazete van inserta što osigurava da se neće umnažati DNA domaćinske stanice.

Napravljenu radnu otopinu sam zatim vorteksirala i kratko centrifugirala kako bi osigurala homogenost otopine te raspipetirala po 9 $\mu$ L u tubice od 0,2 mL, u njih dodala uzorke i kontrole volumena 1  $\mu$ L. Tubice sam ponovno vorteksirala i kratko centrifugirala te postavila u uređaj za PCR (Applied Biosystems GeneAmp PCR System 2700). Namjestila sam program koji se sastojao od:

Temperatura	Vrijeme(min)	
94°C	4:00	
94°C	0:30	} 45x
60°C	0:45	
72°C	0:45	
74°C	7:00	
8°C	$\infty$	

Program ukupno traje otprilike 2h, uz zagrijavanje i hlađenje uređaja. Kada se uređaj ohladi na 8°C, tubice sa uzorcima sam izvadila van. Pripremila sam otopinu 1% agaroze (0,8g agaroz, 80 mL TAE pufer (40 mM Tris, 20 mM octena kiselina, 1 mM EDTA)) koju sam u mikrovalnoj zagrijala do vrenja kako bi se sva agaroz otapila. Kada je smjesa počela ključati, izvadila sam ju van i dodala 3  $\mu$ L boje Midori Green, dobro promješala smjesu u tikvici te izlila u okvir za agarozni gel. Postavila sam češljice u gelove te ostavila gel da se polimerizira. Nakon što je gel očvrstio, izvadila sam češljice iz gela te nosač gela postavila u uređaj za razdvajanje u kojemu se nalazio TAE pufer. Po 3  $\mu$ L svakog uzorka sam na komadiću parafilma pomješala sa otprilike 1  $\mu$ L pufera za nanošenje (pufer LB) te zajedno nanosila u jažice. Sa obje strane gela sam nanosila DNA marker *Quick-Load Purple DNA Ladder* (New England BioLabs, SAD). Uređaj sam uključila na 100V u trajanju od 20-30 minuta. Nakon što je proces dovršen, gel sam slikala na transiluminatoru.

### 3.2.6. Izolacija proteina iz stanica

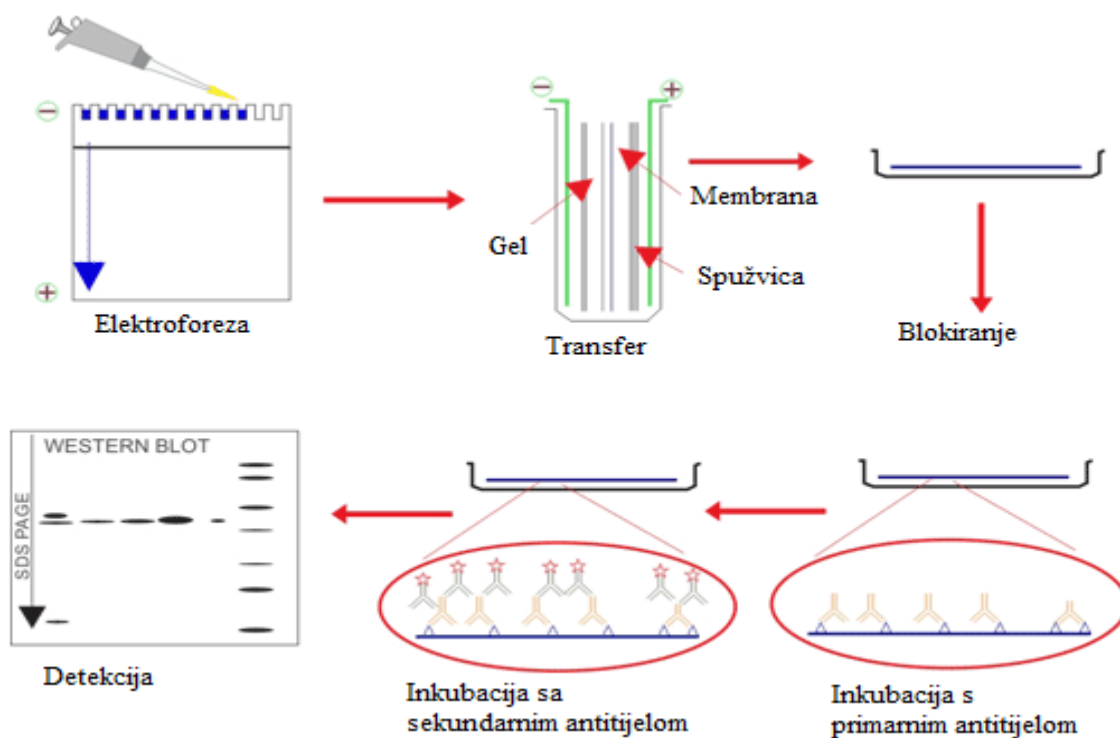
Tubice s talozima koje su predodređene za izolaciju proteina sam izvadila iz pohrane te u svaku tubicu dodala 100  $\mu$ L pufera za lizu stanica koji se sastoji od inhibitora proteaza i pufera RIPA (25 mM Tris-HCl, 1% Na-deoksiholat, 1% Nonidet P-40, 150 mM NaCl, 0.1% SDS). Inhibitori proteaza dodaju se u pufer RIPA u obliku tableta (Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail Tablets, Roche), pri čemu na 10 mL pufera ide jedna tableta inhibitora. Tubice sam držala na ledu tijekom cijelog postupka izolacije proteina kako ne bi došlo do degradacije proteina. U posudicu s ledom sam stavila tubicu u kojoj se nalazi talog i pufer te provela postupak sonikacije kako bih razbila stanice unutar uzorka. Nastavak za sonikator (debljina sonde 1 mm) sam uronila u tubicu koju sam držala na ledu te sonicirala 15 sekundi, pauzirala nekoliko sekundi te ponovno sonicirala 15 sekundi. Tako obrađene uzorke sam 30 minuta centrifugirala na 4°C i 6000 x g. Nakon centrifuge sam supernatant prebacila u sterilne označene tubice.

Kako bi mogla odrediti količinu uzorka koju ću koristiti u elektroforezi i westernskoj metodi otiska, morala sam odrediti koncentracije proteina u uzorcima. Za određivanje koncentracije proteina sam koristila komplet pod nazivom BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific, USA) u kojemu se nalaze otopine s već poznatim koncentracijama proteina s kojima možemo usporediti uzorke nepoznate koncentracije te tako odrediti njihovu koncentraciju. Ova metoda je kolorimetrijska kvantifikacijska metoda koja se temelji na promjeni boje reagensa pri različitim koncentracijama proteina. Peptidne veze unutar proteina reduciraju ione  $\text{Cu}^{2+}$  u  $\text{Cu}^{+}$ . Količina nastalog  $\text{Cu}^{+}$  iona ovisi o koncentraciji proteina u uzorku kojeg testiramo. Kolorimetrijski dio metode se zasniva na reakciji nastalih  $\text{Cu}^{+}$  iona s reagensima iz kompleta. Nastali kompleksi imaju snažnu apsorbanciju na 562 nm koja se povećava s koncentracijom proteina. Prateći upute koje dolaze uz komplet, pripremila sam niz serijskih razrjeđenja poznate koncentracije standardnog proteina 1 mg/mL BSA (engl. *bovine serum albumin*): 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 i 0  $\mu$ g/mL. Pripremila sam radnu otopinu koja se sastoji od reagensa A i reagensa B u omjeru 50:1. Po 25  $\mu$ L otopina standarda i uzoraka sam u duplikatima pipetirala u pločicu s 96 bunarića. U svaki od bunarića sam dodala po 200  $\mu$ L radne otopine, 30 sekundi protresla pločicu te inkubirala 30 minuta na 37°C. Nakon inkubacije sam izmjerila apsorbanciju pri 562 nm na spektrofotometru (Labsystems Multiskan MS, Finska). Rezultate sam unijela u Microsoft Office Excel program gdje

sam izradila standardnu krivulju koncentracija standardnih proteina pomoću koje sam odredila koncentracije proteina u uzorcima.

### 3.2.7. Westernska metoda otiska

Westernska metoda otiska omogućava identifikaciju specifičnih proteina unutar kompleksne smjese dobivene iz stanica. Metoda koristi nekoliko koraka kako bi ovo postignula: razdvajanje proteina po veličini, njihov transfer na čvrstu podlogu te vizualizaciju proteina pomoću primarnih i sekundarnih protutijela (Slika 12). Ovim postupkom dobivamo informacije je li protein prisutan u smjesi i okvirno u kojoj količini.



**Slika 12. Sažeti prikaz koraka westernske metode otiska** (preuzeto i prilagođeno od <https://www.cusabio.com/m-244.html>)

Metoda se temelji na specifičnom vezanju primarnog protutijela za željeni protein. Na Fab ulomak primarnog protutijela se veže sekundarno protutijelo koje je konjugirano s peroksidazom, koja nakon reakcije sa supstratom (kemiluminiscentni reagens) daje svjetlosni signal koji se može detektirati.

Westernska metoda otiska započinje razdvajanjem proteina iz uzorka po veličini pomoću SDS-elektroforeze. SDS djeluje denaturirajuće na proteine te ih čini negativno nabijenima kako bi mogli kroz gel putovati prema pozitivnoj elektrodi. Brzina putovanja ovisi o veličini proteina. Za elektroforezu sam pripremila gel za sabijanje i gel za razdvajanje koji se razlikuju po svom sastavu. Gel za razdvajanje je bio 12% SDS gel, a gel za sabijanje 5% (Tablica 2). Debljina gela za elektroforezu je bila 1.5 mm i koristila sam češljice za gel za 10 jažica.

Prvi gel koji sam pripremila je gel za razdvajanje. APS i TEMED sam dodala neposredno prije izlijevanja gela između stakala na nosaču. Gel sam nanijela do otprilike  $\frac{3}{4}$  visine stakla, a na njega sam nanijela otprilike 1 mL izopropanola koji omogućava stvaranje ravnog ruba gela bez mjehurića. Gel sam ostavila pola sata da se polimerizira, a u tom vremenu sam pripremila gornji gel u kojeg sam dodala sve osim TEMED-a. Kada je donji gel polimerizirao, uklonila sam izopropanol, u smjesu za gornji gel dodala TEMED te odmah nanijela gel za sabijanje do vrha stakla i stavila češljic za 10 jažica. Gel za sabijanje sam ostavila da se polimerizira pola sata.

**Tablica 2. Sastav korištenih gelova za elektroforezu**

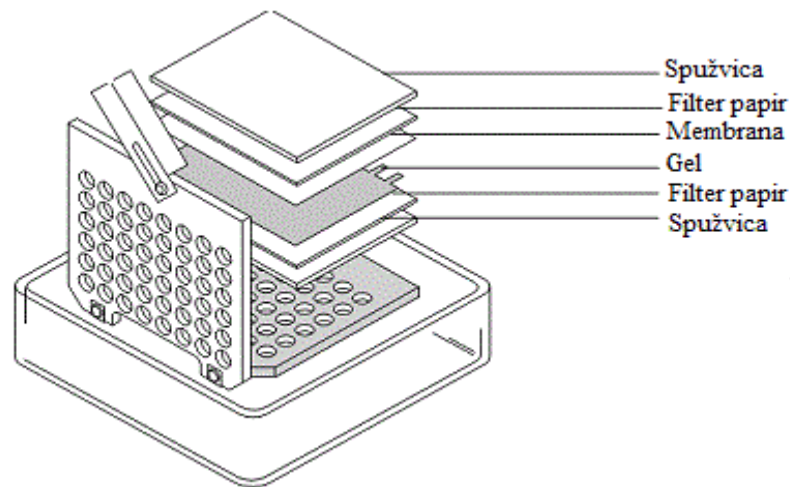
Gel za razdvajanje 20 mL		Gel za sabijanje 6 mL	
Voda	6.6mL	Voda	4.1mL
30% akrilamid	8mL	30% akrilamid	1mL
1.5M TRIS pH=8,8	5mL	1.5M TRIS pH=6,8	750 $\mu$ L
10% SDS	200 $\mu$ L	10% SDS	60 $\mu$ L
10% APS	200 $\mu$ L	10% APS	60 $\mu$ L
TEMED	8 $\mu$ L	TEMED	6 $\mu$ L

Nakon pripreme gelova, denaturirala sam uzorke. Pomoću prethodno dobivenih koncentracija proteina u uzorcima sam odredila količinu uzorka i pufera za nanošenje (pufer LB, *engl. loading buffer*; 0.2 M Tris-HCl pH 6.8, 0.4 M DTT, 8% SDS, 40% glicerol, 0.001% bromfenol blue), tako da u svim jažicama bude po 30  $\mu$ g proteina. Nakon miješanja uzorka s puferom LB, tubice u kojima se smjesa nalazila sam stavila na termoblok (Eppendorf, Njemačka) 10 minuta na 95°C. Kad su se proteini denaturirali, a gel za sabijanje se polimerizirao, staklo s gelom sam postavila u sustav za elektroforezu koji sam napunila puferom za elektroforezu (1 M glicin, 50 mM Tris, 1% SDS). U prvu jažicu u gelovima sam dodala po 3,5  $\mu$ L proteinskog



markera CozyHI Prestained Protein Ladder (HighQu, Njemačka), a zatim uzorke u ostale jažice. Sustav sam zatvorila, priključila na struju i ostavila 20 minuta na 90V, a zatim povisila na 120V još jedan sat ili dok fronta boje ne dođe na donji rub gela.

Kada je razdvajanje proteina po veličini gotovo, sljedeći korak je prenošenje proteina na čvrstu podlogu, u ovom slučaju nitroceluloznu membranu (Amersham Protran BA83, GE Healthcare, veličina pora 0,2  $\mu\text{m}$ ). Prije unošenja u nosač sam složila sustav za prijenos na membranu. Proces slaganja se sastojao od plastičnog nosača koji ima prozirnu i obojenu stranu. Nosač sam postavila u kadnicu u kojoj se nalazio pufer, otvorila ga te na prozirnu stranu slagala spužvicu, dva komada filter papira, nitroceluloznu membranu, gel koji sam pažljivo izvadila iz stakla, dva komada filter papira te konačno još jednu spužvicu (Slika 13).



**Slika 13. Shema slaganja kazete za prijenos na nitroceluloznu membranu** (preuzeto i prilagođeno od <http://www.radio.cuci.udg.mx/bch/EN/Western.html>)

Ako sam u isto vrijeme radila više od jednog prijenosa, membrane sam označavala rezanjem jednog kuta kako bih znala orijentaciju uzoraka na membrani. Valjkom sam pažljivo prošla po spužvici kako bih istisnula mjehuriće zraka koji su tijekom slaganja ostali zarobljeni između gela i membrane. Sustav sam čvrsto zatvorila te postavila u sustav za prijenos proteina koji sam prethodno napunila puferom (200 mM Tris, 1.5 M glicin, 10% metanol). Prijenos proteina je trajao 1h na konstantnih 100V. Kada je proces prijenosa završio, pripremila sam otopinu za blokiranje koja se sastoji od 5% mlijeka u prahu u TBST-u (*engl. Tris Buffered Saline Buffer with Tween20*; 50 mM Tris, 150 mM NaCl, 0.05% Tween 20, pH 7,5). Membranu sam pažljivo pincetom izvadila i postavila u kadnicu u kojoj se nalazila 5% otopina mlijeka u prahu u TBST puferu. Kadnicu

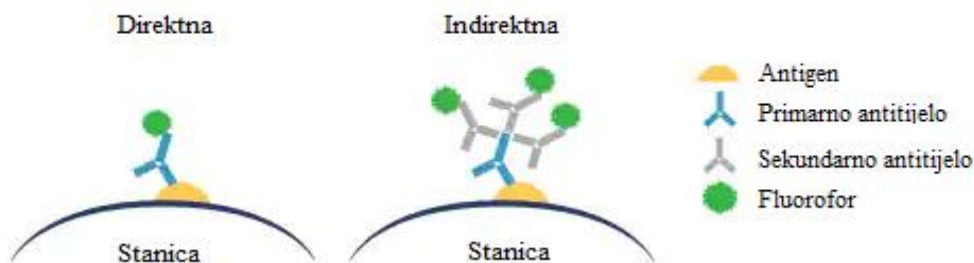
sam postavila na tresilicu i ostavila 30 minuta. Ovaj postupak služi tome da se popune mjesta na membrani na koja bi se primarno protutijelo moglo nespecifično vezati i dati netočne informacije o prisutnosti nekog proteina. Tijekom blokiranja membrane sam pripremila 1:50 razrjeđenje primarnog mišjeg protutijela anti-SHH (sc-365112, Santa Cruz Biotechnology) u 5% otopini mlijeka u TBST-u u ukupnom volumenu 1 mL. Membranu sam postavila između dvije zapečaćene folije, u nju dodala otopinu protutijela, zatvorila foliju te inkubirala na roteksu preko noći na 4°C. Sljedeći dan, membranu sam pažljivo izvadila iz folije, postavila u kadicu te tri puta uzastopno ispirala u TBST-u po pet minuta na tresilici. Kada sam membranu temeljito isprala kako bi otklonila višak primarnog protutijela, u kadicu gdje se nalazila membrana sam dodala otopinu sekundarnog anti-mišjeg protutijela (554002, BD Pharmigen) u razrjeđenju 1:8000. Inkubacija sa sekundarnim protutijelom je trajala sat vremena na tresilici na sobnoj temperaturi nakon čega je uslijedio postupak vizualizacije za što sam koristila Super Signal West (Thermo Scientific, USA) koji se sastojao od Pico i Femto reagensa koje sam miješala u omjeru 1:3. Pico i Femto reagensi su kemiluminiscentni supstrati za peroksidazu iz hrena s različitim jačinom signala. Membranu sam postavila na foliju te na nju nanijela 1 mL otopine Pico-Femto. Membranu sam poklopila kadicom te ostavila u mraku na inkubaciji 5 minuta. Kada je vrijeme inkubacije isteklo, membranu sam preklopila s još jednom folijom, pažljivo istisnula mjehuriće zraka te prenijela u aparat za slikanje UVITEC Alliance (UVITEC Cambridge, UK). Kao kontrolu sam isti postupak na istoj membrani provodila sa protutijelima za  $\beta$ -aktin (razrjeđenje 1:5000, 8H10D10, Cell Signaling).

Isti postupak je proveden pri testiranjima na ekspresiju PTCH1 (razrjeđenje primarnog protutijela 1:1000, A0826, zečje, ABClonal, USA), GLI1 (1:500, NB600-600, zečje, Novus, SAD), GLI3 (1:1000, 19949-1-AP, zečje, GeneTex, SAD), VIM (1:1000, D21H3, zečje, Cell Signaling) i E-kadherin (1:1000, 24E10, zečje, Cell Signaling), i sekundarno anti-zečje protutijelo /554021, BD Pharmigen) u razrjeđenju 1:6000.

### 3.2.8. Imunofluorescencija

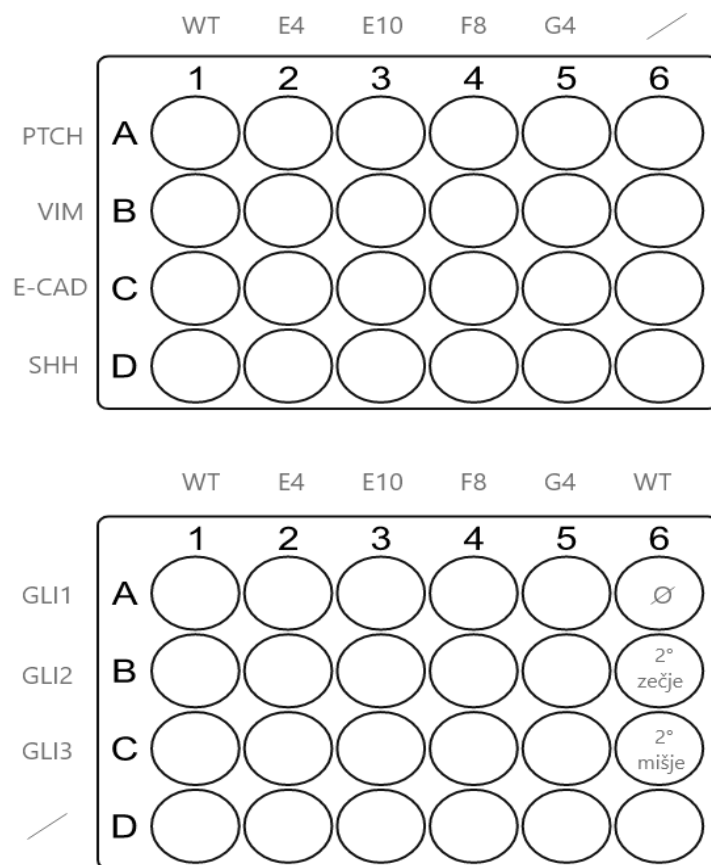
Imunofluorescencija je imunohistokemijska metoda koja koristi specifično vezanje protutijela kako bi pomoću fluorescentnog mikroskopa mogli vizualizirati proteine u tkivu ili njihovu lokaciju u stanici. Temelji se na sposobnosti fluorofora da otpušta svjetlo kada je izložen određenoj valnoj dužini svjetla. Primarno protutijelo se veže na željeni protein, a sekundarno

protutijelo konjugirano sa fluoroforom se veže na primarno. Pod svjetlom određene duljine, fluorofor emitira svjetlost druge valne duljine koju možemo vidjeti pod fluorescentnim mikroskopom (Slika 14).



**Slika 14. Shema funkcioniranja imunofluorescencije.** Ako je antigen prisutan, primarno protutijelo se veže za njega. Ukoliko je do vezanja došlo, nakon dodavanja sekundarnog protutijela koje je konjugirano s fluoroforom i izlaganja određenoj valnoj duljini svjetla, fluorofor otpušta svjetlosni signal koji možemo detektirati (preuzeto i prilagođeno od <https://www.abcam.com/secondary-antibodies/direct-vs-indirect-immunofluorescence>).

Staničnim linijama sam otklonila stari medij, tripsinizirala ih, pričekala da se odvoje od površine bunarića, u bunarić dodala medij, dobro ih resuspendirala pomoću pipete te prebacila u sterilne označene epruvete. Pripremila sam Neubauerove komorice za brojanje stanica. Prije unosa u komoricu, unutar jedne pločice sa 96 bunarića sam pomiješala 80  $\mu\text{L}$  metilenskog modrila s 20  $\mu\text{L}$  suspenzije stanica kako bih ih lakše vizualizirala pod mikroskopom. Zatim sam unutar mreže za brojanje prebrojala broj stanica, te izračunala potrebni volumen za nasađivanje uzevši u obzir razrjeđenje, broj prebrojanih stanica u volumenu komorice te željenu gustoću nasađenih stanica. Stanice sam nasadila u gustoći od 50 000 stanica po jednom bunariću u pločici sa 24 bunarića. Ukupno sam nasadila dvije pločice sa 24 bunarića. Svaka od linija je nasađena u 6 bunarića te tri dodatna bunarića s linijom divljeg tipa koje sam nasadila kako bi imala netretiranu negativnu kontrolu, te dva bunarića samo sa sekundarnim protutijelima kako bih testirala hoće li se sekundarno protutijelo nespecifično vezati za neku od komponenti unutar stanica. Nakon nasađivanja staničnih linija po shemi (Slika 15), u svaki bunarić sa stanicama sam dodala 500  $\mu\text{L}$  medija te ostavila pločice preko noći u inkubatoru pri 37°C da se stanice prihvate za podlogu.



**Slika 15. Shema nasadivanja staničnih linija u pločice sa 24 bunarića i dodavanja primarnih protutijela i negativnih kontrola.**

Slijedeći dan sam pločice izvadila s inkubacije te pipetom maknula stari medij te svaki bunarić isprala sa 500  $\mu$ L PBS pufera tri puta pazeći da ne isperem i stanice. Nakon svakog koraka sam mijenjala nastavak za pipetu. Nakon temeljitog ispiranja, u digestoru s protokom zraka sam u bunariće dodala po 500  $\mu$ L 3,6% formaldehida te pločicu poklopila i ostavila na inkubaciji 10 minuta pri sobnoj temperaturi. Ovaj korak će stanice fiksirati za površinu bunarića. Nakon 10 minuta, formaldehid sam pipetom maknula iz bunarića, ponovno sve bunariće isprala s PBS puferom tri puta, te dodala 500  $\mu$ L metanola po bunariću kako bi došlo do permeabilizacije. Nakon 10 minuta inkubacije sa metanolom, bunariće sam isprala tri puta sa PBS puferom. Zatim sam zakuhala citratni pufer (Dako, SAD) u mikrovalnoj pećnici te dodala 500  $\mu$ L pufera po bunariću te ostavila 20 minuta na sobnoj temperaturi. Citratni pufer omogućuje da se fiksirani proteini renaturiraju u prirodnu konformaciju nakon fiksacije i permeabilizacije. Ponovno sam bunariće

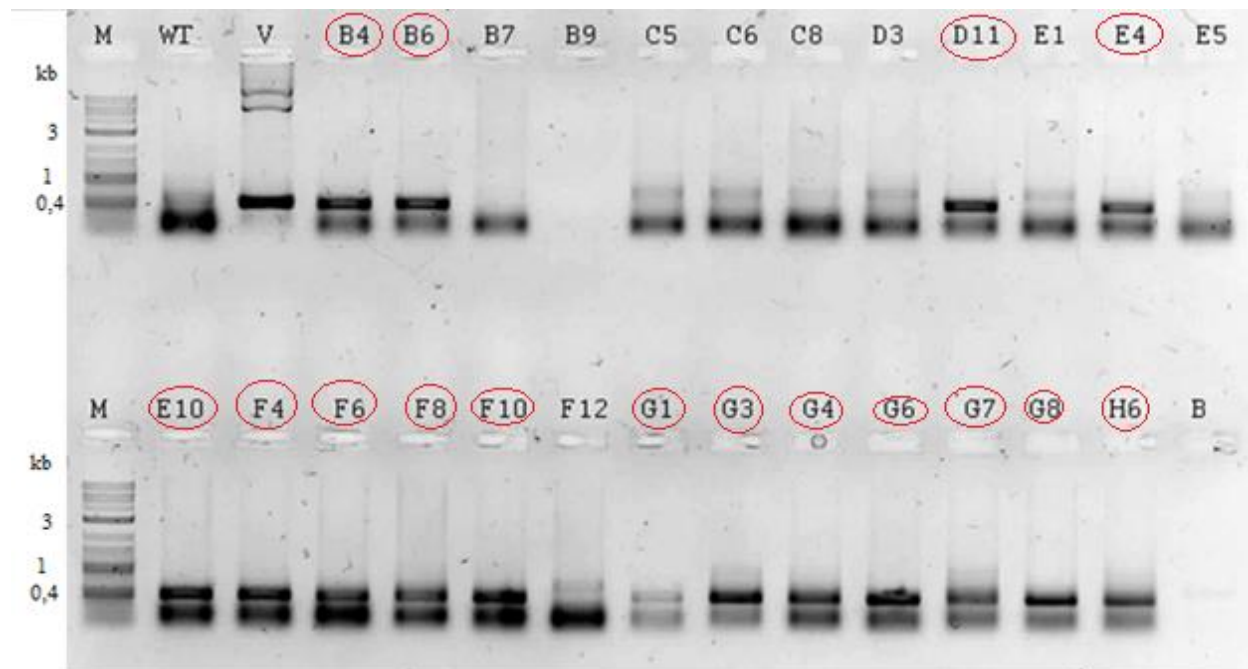
isprala sa PBS puferom tri puta te u svaki bunarić nakapala po tri kapi protein blokirajuće otopine (*engl. Protein block*, Dako, SAD) i ostavila na inkubaciji pola sata na sobnoj temperaturi. Ova otopina će spriječiti nespecifično vezanje primarnog protutijela. Pripremila sam razrjeđenja potrebnih protutijela u 2% BSA/TBST. Primarna protutijela za PTCH (A0826, zečje, ABClonal, USA), VIM (D21H3, zečje, Cell Signaling), E-CAD (24E10, zečje, Cell Signaling), i GLI3 (19949-1-AP, zečje, GeneTex, SAD), sam razrijedila u omjeru 1:500, a za GLI1 (NB600-600, zečje, Novus, SAD), GLI2 (sc-271786, mišje, Santa Cruz, SAD) i SHH (sc-365112, mišje, Santa Cruz) u omjeru 1:100. Po 100  $\mu$ L odgovarajućih protutijela sam dodala u bunariće odgovarajući shemi. Složila sam vlažnu komoru u koju sam postavila pločice te ju dobro zatvorila i ostavila da se inkubira preko noći na 4°C. Slijedeći dan sam pipetom uklonila primarna protutijela te bunariće temeljito isprala PBS-om tri puta kako bi otklonila sav višak protutijela. Pripremila sam razrjeđenja sekundarnih protutijela u omjeru 1:100. Za primarno anti-SHH i anti-GLI1 protutijela sam koristila sekundarno protutijelo specifično za mišja protutijela (*anti-mouse* IgG FITC, sc-2099, Santa Cruz), a za PTCH, VIM, E-CAD, GLI2 i GLI3 sekundarno protutijelo specifično za zečja protutijela (*anti-rabbit* IgG TR, sc-2784, Santa Cruz). Pločicu sam nakon dodavanja 100  $\mu$ L odgovarajućeg razrjeđenja protutijela umotala u aluminijsku foliju te ostavila na sobnoj temperaturi jedan sat. Kada je vrijeme inkubacije isteklo, sve bunariće sam ponovno isprala tri puta sa 500  $\mu$ L PBS-a, u svaki bunarić nakon ispiranja dodala po 1 mL PBS-a i slikala na fluorescentnom mikroskopu (EVOS Flouid Cell Imaging Station, Invitrogen) pod odgovarajućim svjetlom za sekundarna protutijela. Sve bunariće u kojima sam koristila protu-mišja sekundarna protutijela sam slikala pod bijelim i crvenim svjetlom (eksitacija 586/15 nm, emisija 646/68 nm), a protu-zečja pod bijelim i zelenim svjetlom (ekscitacija 482/18, emisija 532/59 nm). Svi bunarići su slikani pod istim uvjetima kako bi bili međusobno usporedivi, a slike su uređene i složene u programu FIJI (ImageJ 1.52.i, National Institute of Health, SAD).

## 4. REZULTATI

### 4.1. Analiza prisutnosti inserta *SHH* u klonским linijama

Nakon postupka transfekcije i selekcije uspješno su uspostavljene 24 klonске linije CHL1-SHH. Linije su imenovane na temelju pozicije u pločici s 96 bunarića iz kojih su razvijene. Sve stanične linije sam podvrgnula lančanoj reakciji polimerazom kako bih provjerila koje stanične linije u genomu posjeduju insert gena *SHH*. DNA gena *SHH* se na gelu može uočiti na veličini oko 415 parova baza te nam govori isključivo o njegovoj prisutnosti u genomu, ali ne i o njegovoj lokaciji.

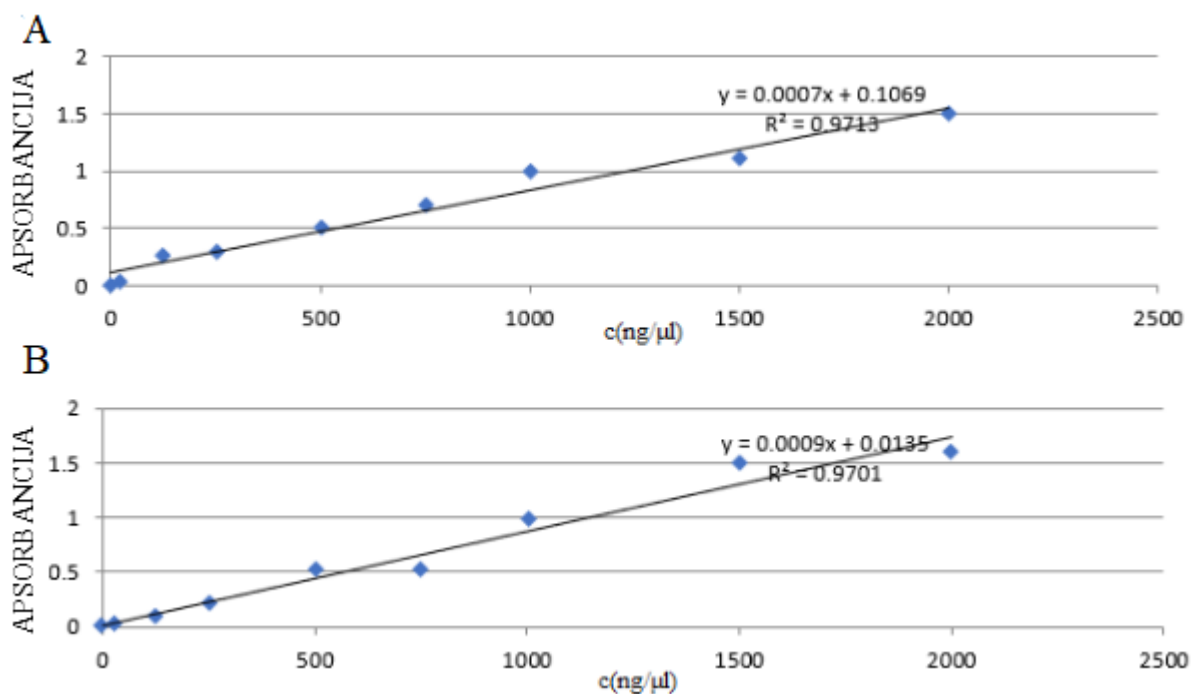
U usporedbi sa pozitivnom kontrolom (V, vektor), divljim tipom (WT) i negativnom kontrolom (B) (Slika 16), prisutnost inserta *SHH* pokazuju kolonije pod nazivima B4, B6, D11, E4, E10, F4, F6, F8, F10, G1, G3, G4, G6, G7, G8 i H6.



**Slika 16. Rezultati lančane reakcije polimeraze.** Slika gela nakon provođenja lančane reakcije polimeraze na fragment inserta *SHH* koji se može očitati u ravnini 0,4kb. M – marker, V – vektor, B – negativna kontrola, WT – divlji tip

## 4.2. Analiza ekspresije proteina SHH u klonским linijama

Kod svih linija ispitala sam ekspresiju proteina SHH pomoću westernske metode otiska. Prije nego što sam provela postupak ispitivanja ekspresije proteina SHH, izmjerila sam koncentraciju proteina iz uzoraka staničnih linija pomoću standardnih krivulja (Slika 17). S obzirom da se stanice nisu prikupljale u isto vrijeme, westernsku metodu otiska sam radila dva puta, kao i izradu standardnih krivulja. Koncentracija proteina je potrebna iz razloga što u bunariće za elektroforezu nanosimo istu količinu proteina kako bi kvantitativni prikaz ekspresije proteina bio što točniji.



Slika 17. Standardne krivulje BCA na temelju kojih se računa koncentracija proteina u uzorcima nepoznate koncentracije. Os Y prikazuje očitavanja apsorbancije. Krivulja A je izrađena 29.9.2020., a krivulja B 15.10.2020.

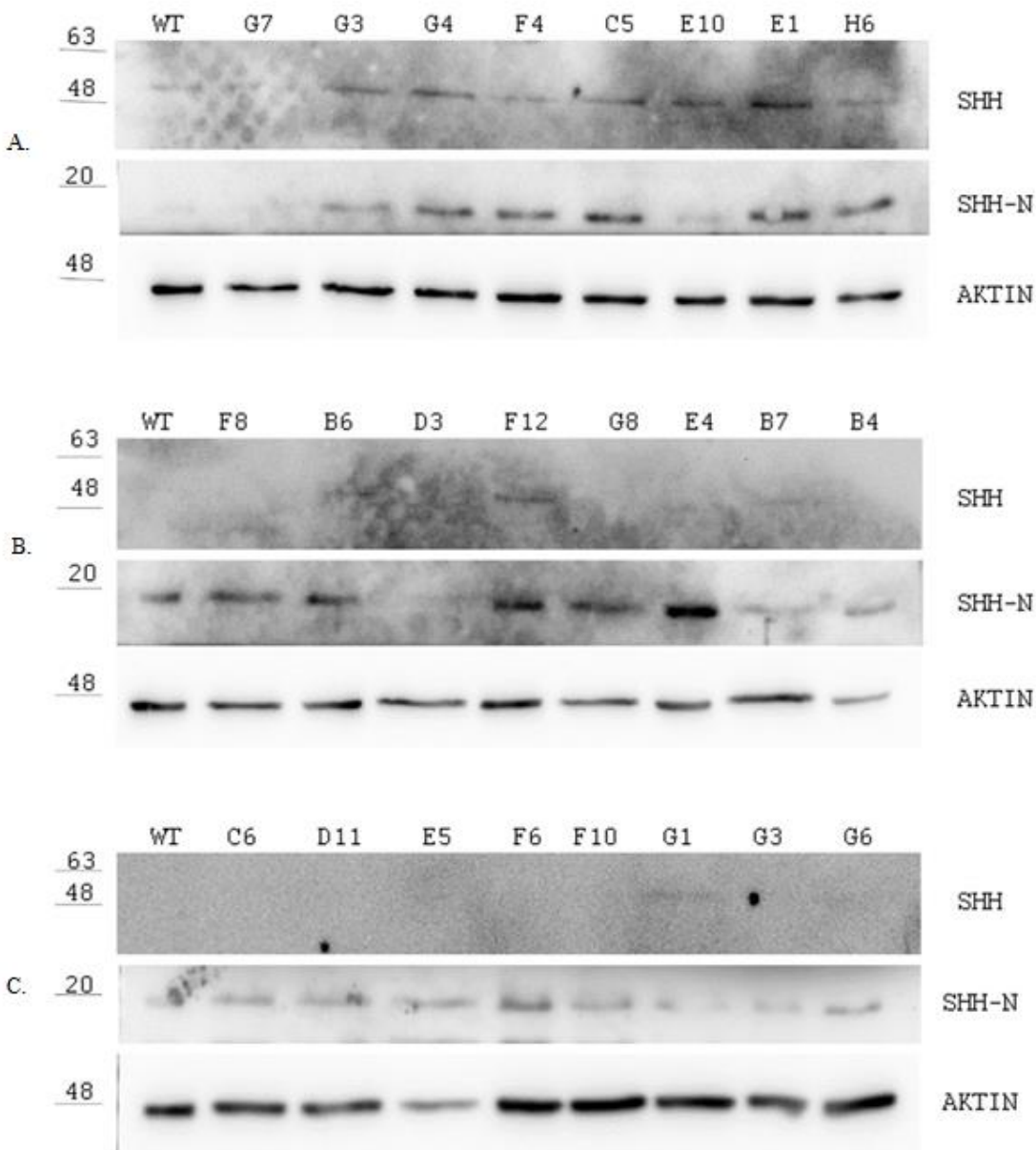
Nagib pravca na standardnim krivuljama se koristi za izračun koncentracije na temelju formule  $a=(y/x)*10$  da bi dobili koncentraciju u ng/ $\mu$ L (Tablica 3).

**Tablica 3. Izračun koncentracija proteina prema standardnim krivuljama.** Prvi dio tablice se odnosi na uzorke koji su računati po standardnoj krivulji A prikazanoj na Slici 17., a drugi dio tablice na uzorke čije su koncentracije računane po standardnoj krivulji B Slike 17. Zadnji stupac je volumen uzorka u  $\mu\text{L}$  koje treba nanesti u jažice na gelu da bi u jažici bilo 30  $\mu\text{g}$  proteina.

uzorak	Apsorbanca	ng/ $\mu\text{l}$	$\mu\text{g}/\mu\text{l}$	30 $\mu\text{g}$ ( $\mu\text{l}$ )
<b>F8</b>	0.187	1870	1.87	16.04
<b>B6</b>	0.235	2350	2.35	12.77
<b>D3</b>	0.073	730	0.73	41.10
<b>F12</b>	0.25	2500	2.5	12.00
<b>G8</b>	0.1245	1245	1.245	24.10
<b>E4</b>	0.351	3510	3.51	8.55
<b>B7</b>	0.112	1120	1.12	26.79
<b>B4</b>	0.2005	2005	2.005	14.96
<b>G7</b>	0.0925	925	0.925	32.43
<b>G3</b>	0.1005	1005	1.005	29.85
<b>G4</b>	0.22	2200	2.2	13.64
<b>F4</b>	0.255	2550	2.55	11.76
<b>C5</b>	0.2775	2775	2.775	10.81
<b>E10</b>	0.496	4960	4.96	6.05
<b>E1</b>	0.2925	2925	2.925	10.26
<b>H6</b>	0.235	2350	2.35	12.77
uzorak	Apsorbanca	ng/ $\mu\text{l}$	$\mu\text{g}/\mu\text{l}$	30 $\mu\text{g}$ ( $\mu\text{l}$ )
<b>C6</b>	0.2805	2283.33	2.28	13.14
<b>D11</b>	0.2195	1605.56	1.61	18.69
<b>E5</b>	0.188	1255.56	1.26	23.89
<b>F6</b>	0.578	5588.89	5.59	5.37
<b>F10</b>	0.3745	3327.78	3.33	9.02
<b>G1</b>	0.2955	2450.00	2.45	12.24
<b>G3</b>	0.6535	6427.78	6.43	4.67
<b>G6</b>	0.411	3733.33	3.73	8.04

Rezultati westernske metode otiska su pokazali nekoliko linija koje u usporedbi s divljim tipom stanica imaju povišenu ekspresiju proteina SHH-N (Slika 18). Aktin je korišten za kontrolu ukupne količine proteina po uzorku. Povišena razina ekspresije prekursorske molekule SHH ukazuje na povišenu razinu ekspresije gena *SHH*, a povećana ekspresija aktivnog oblika proteina SHH ukazuje na to da se protein SHH autoproteolitički cijepa na aktivnu molekulu (SHH-N) koja funkcionalno aktivira signalni put HH/GLI.





**Slika 18. Rezultati westernske metode otiska na ekspresiju proteina SHH.** SHH označava prekursoru, signalno neaktivnu molekulu proteina SHH, a SHH-N označava N-terminalni fragment koji je odgovoran za signalnu aktivnost proteina.

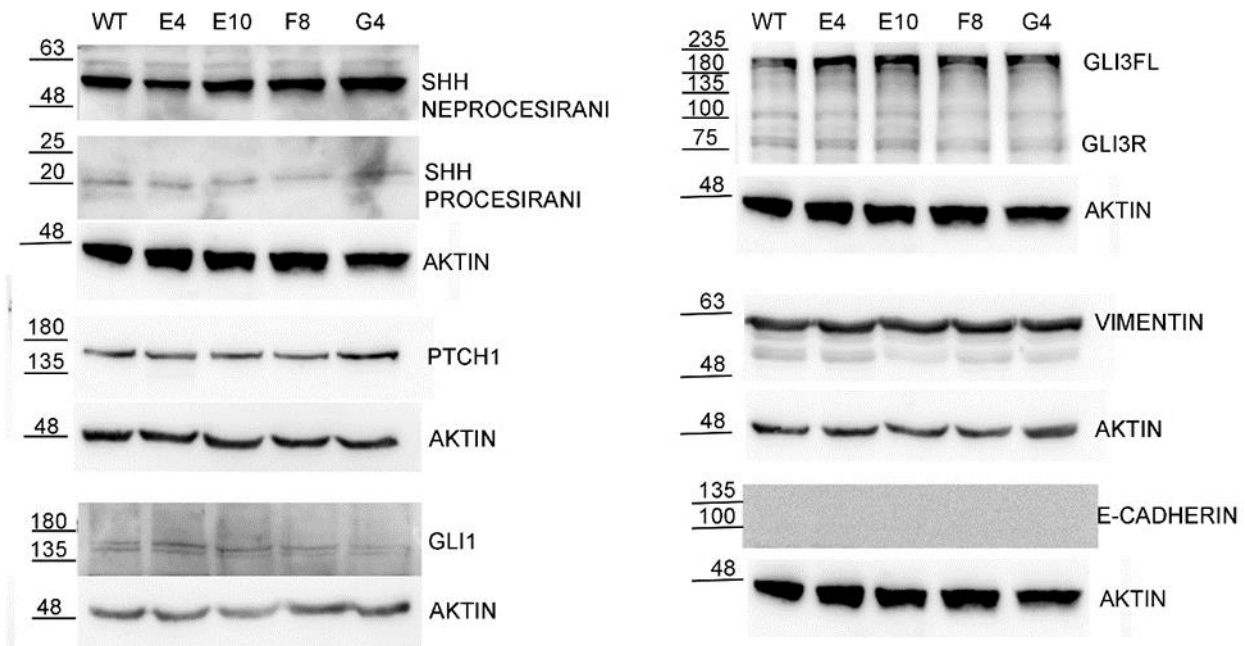
Na temelju usporedbe rezultata ekspresije neprocesirang proteina SHH, fragmenta SHH-N te PCR analize (Tablica 4), odabrane su četiri obećavajuće linije za daljnju obradu: E4, E10, F8 i G4.

**Tablica 4. Usporedba rezultata ekspresije proteina SHH, SHH-N te PCR analize.**

LINIJA	Pojačan SHH	Pojačan SHH-N	Pozitivan PCR
<b>B4</b>	-	-	+
<b>B6</b>	-	+	+
<b>B7</b>	+	-	-
<b>C5</b>	+	+	-
<b>C6</b>	-	+	-
<b>D3</b>	-	-	-
<b>D11</b>	-	+	+
<b>E1</b>	+	+	-
<b>E4</b>	+	+	+
<b>E10</b>	+	+	+
<b>F4</b>	-	+	+
<b>F6</b>	-	+	+
<b>F8</b>	-	+	+
<b>F10</b>	-	+	+
<b>F12</b>	+	+	-
<b>G1</b>	+	-	-
<b>G3</b>	-	-	+
<b>G4</b>	+	+	+
<b>G6</b>	-	+	+
<b>G7</b>	-	-	+
<b>G8</b>	-	+	+
<b>H6</b>	-	+	+

### 4.3. Analiza aktivnosti signalnog puta HH/GLI i usporedba morfologije kod odabranih staničnih linija

Pomoću usporedbe staničnih linija koje su na westernskoj metodi otiska i lančanoj reakciji polimeraze na dugi i kratki fragment bile pozitivne, određen su četiri obećavajuće stanične linije za testiranje aktivnosti signalnog puta HH/GLI: E4, E10, F8 i G4 (Tablica 4). Kako bih odredila aktivnost signalnog puta u odabranim staničnim linijama u usporedbi sa ishodišnom staničnom linijom, nakon sedam pasaža sam ponovno provela westernsku metodu otiska, ali ovaj put i na drugim proteinima koji su uključeni u signalizaciju ovog signalnog puta. Ekspresiju proteina sam testirala ponovno na neprocesirani SHH, fragment SHH-N, PTCH1, GLI1, GLI3, vimentin i E-kadherin (Slika 19).

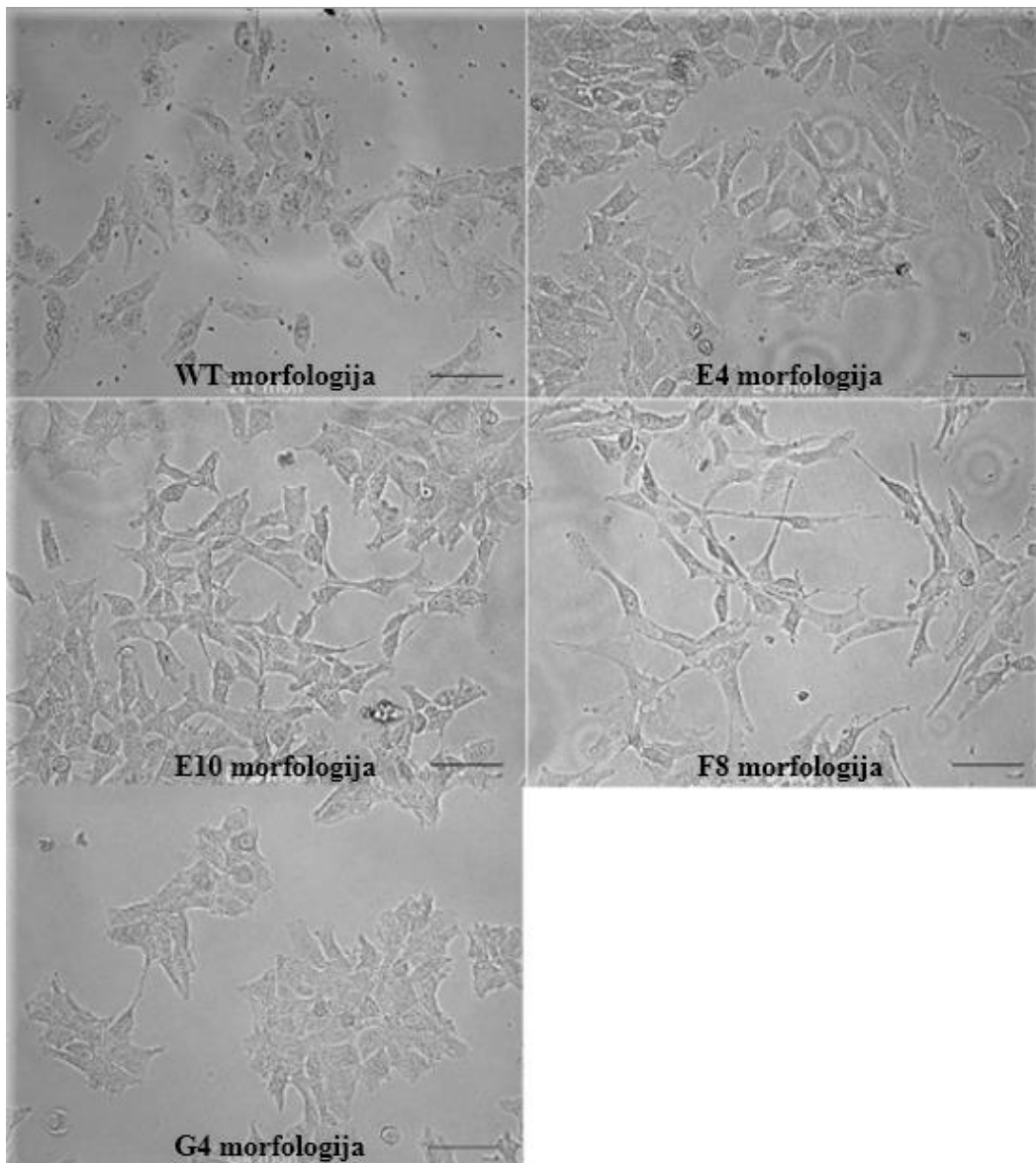


**Slika 19. Rezultati westernske metode otiska na neprocesirani SHH, fragment SHH-N, PTCH1, GLI1, GLI3, vimentin i E-kadherin.**

Rezultati westernske metode otiska na proteine signalnog puta HH/GLI nakon sedam pasaža su pokazali sljedeće rezultate: stanična linija E4 pokazuje snižen SHH-N, dok su drugi proteini usporedivi s divljim tipom stanica. E10 pokazuje nepromijenjenu ekspresiju SHH i SHH-N, kao i PTCH1, GLI1 i GLI3 nepromijenjeni. F8 pokazuje blago povišenu ekspresiju SHH-N, dok su drugi proteini signalnog puta nepromijenjeni. G4 ima povišenu razinu SHH, SHH-N i

PTCH1 te smanjenu razinu GLI1 i GLI3R. E-kadherin nije detektiran u ovim staničnim linijama, dok je ekspresija vimentina ujednačena u svim linijama i nepromijenjena u odnosu na divlji tip stanica.

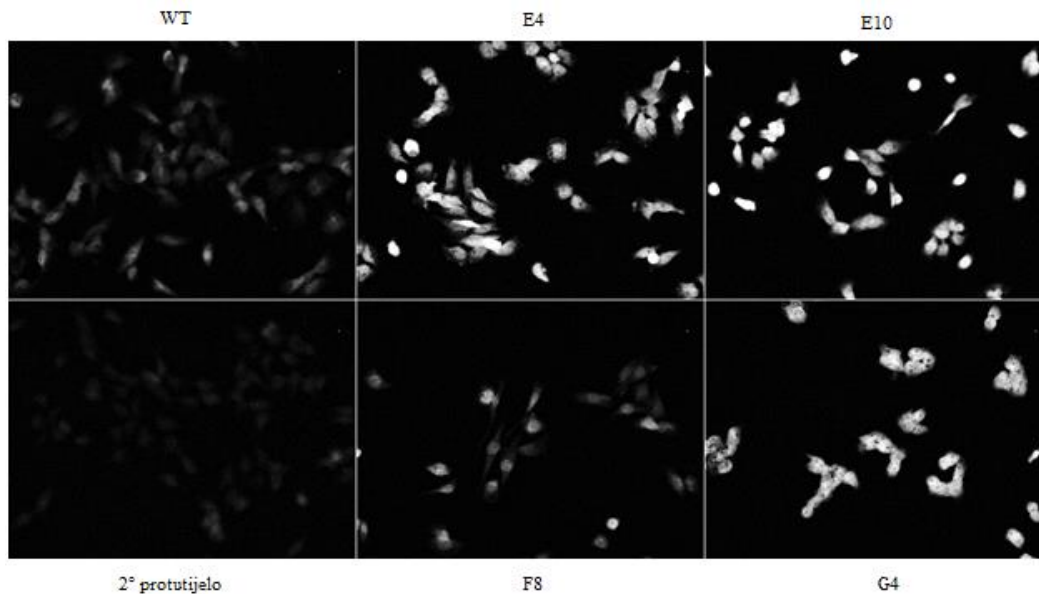
U morfološkom smislu, najveće promjene su vidljive kod staničnih linija F8 i G4 (Slika 20). E4 i E10 su usporedive s divljim tipom stanica. Kod F8 je došlo do izduživanja i stanjivanja dendritima sličnih staničnih nastavaka. U staničnoj liniji G4 sam primijetila smanjenje razgranjenja i sklonost nakupljanju stanica u otočiće.



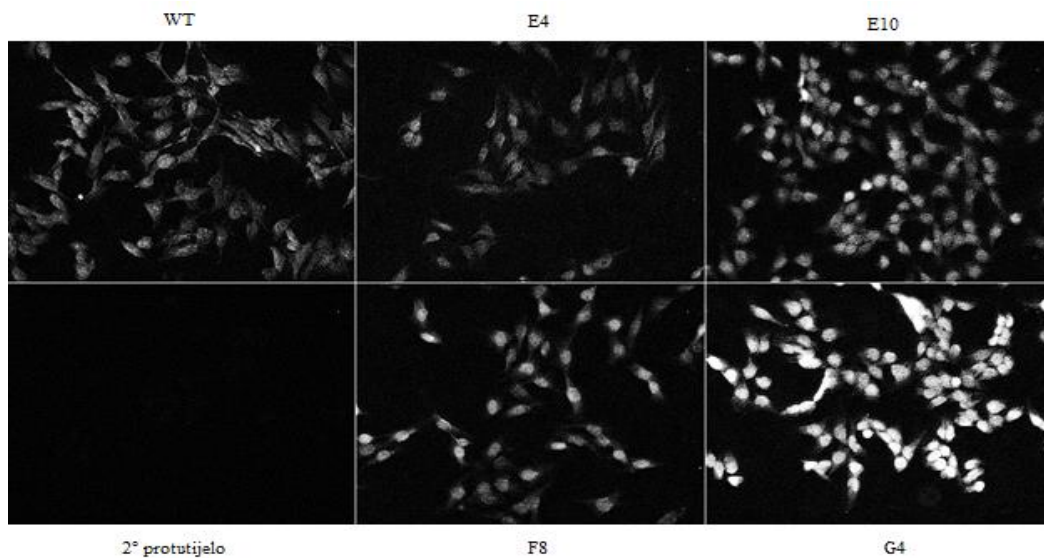
**Slika 20. Prikaz morfolologije staničnih linija redom: WT, E4, E10, F8 i G4.** Najveću razliku u morfolologiji se uočava kod stanične linije G4. Skala = 100  $\mu$ m.

#### 4.4. Imunofluorescencija

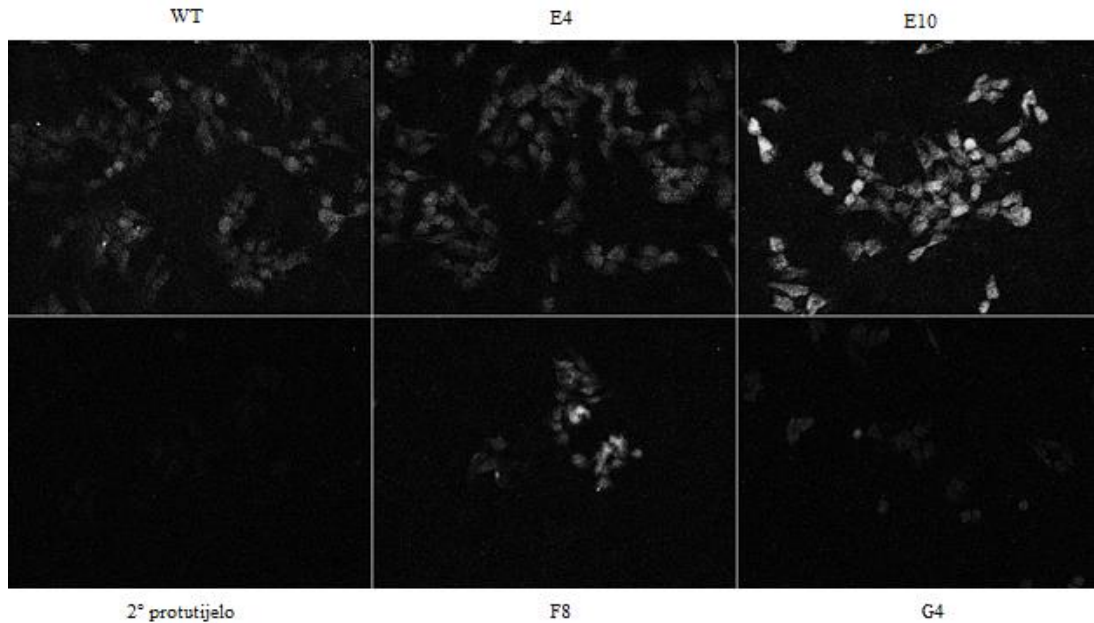
Iste linije analizirane su i imunofluorescencijom. Rezultati imunofluorescencije i usporedba ekspresije komponenti signalnog puta HH/GLI te proteina koji sudjeluju u EMT-u prikazani su na Slikama 21.-27. i Tablici 5.



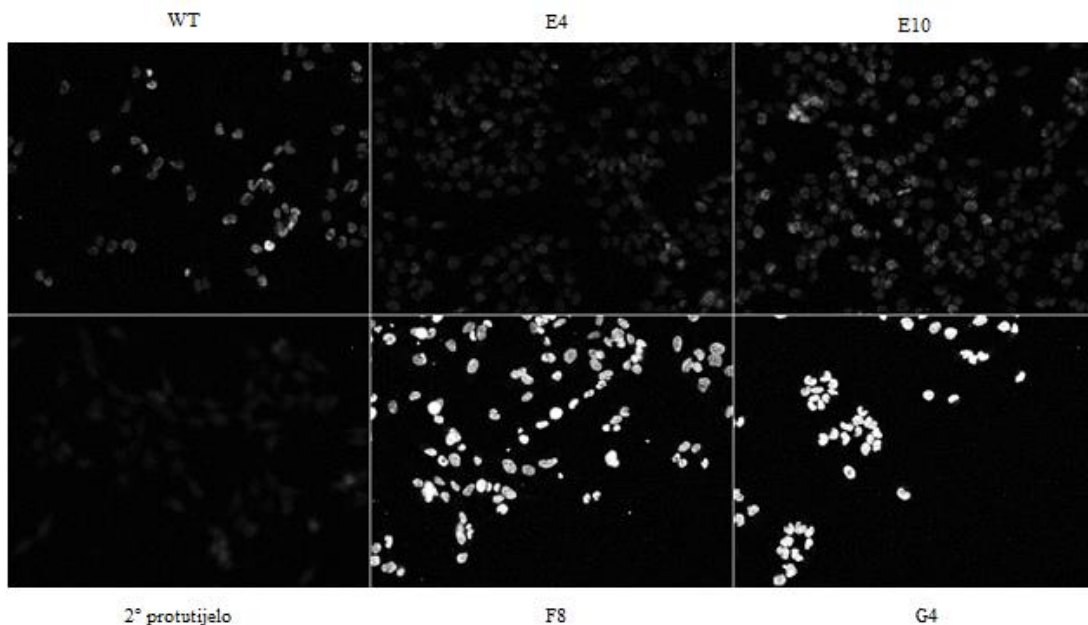
**Slika 21. Prikaz imunofluorescencije na protein SHH unutar stanica.** U usporedbi sa ishodišnom staničnom linijom divljeg tipa, povećanje u ekspresiji proteina pokazuju E4, E10 i G4.



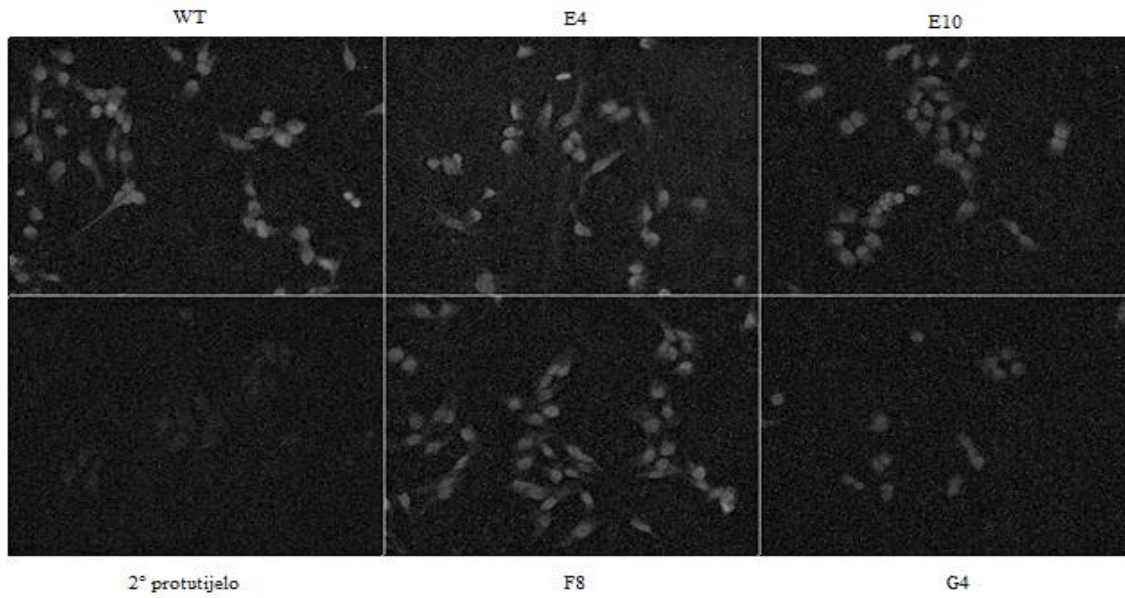
**Slika 22. Prikaz imunofluorescencije na receptor PTCH1 unutar stanica.** U usporedbi sa ishodišnom staničnom linijom divljeg tipa, povećanje u ekspresiji receptora PTCH1 pokazuju E10 i G4.



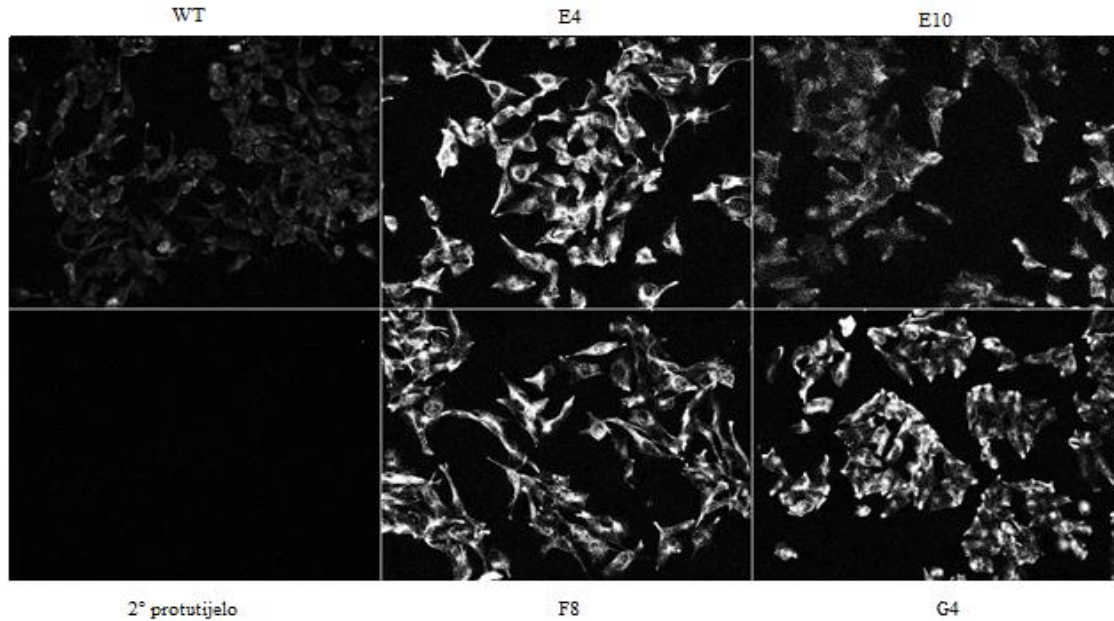
**Slika 23. Prikaz imunofluorescencije na transkripcijski faktor GLI1 unutar stanica.** U usporedbi sa ishodišnom staničnom linijom divljeg tipa, najočitija promjena u ekspresiji je kod stanične linije E10, zatim F8, dok su ostale linije usporedive sa divljim tipom. Jači intenzitet bojanje je u jezgri u odnosu na citoplazmu što pokazuje da GLI1 vrši funkciju transkripcijskog faktora u jezgri



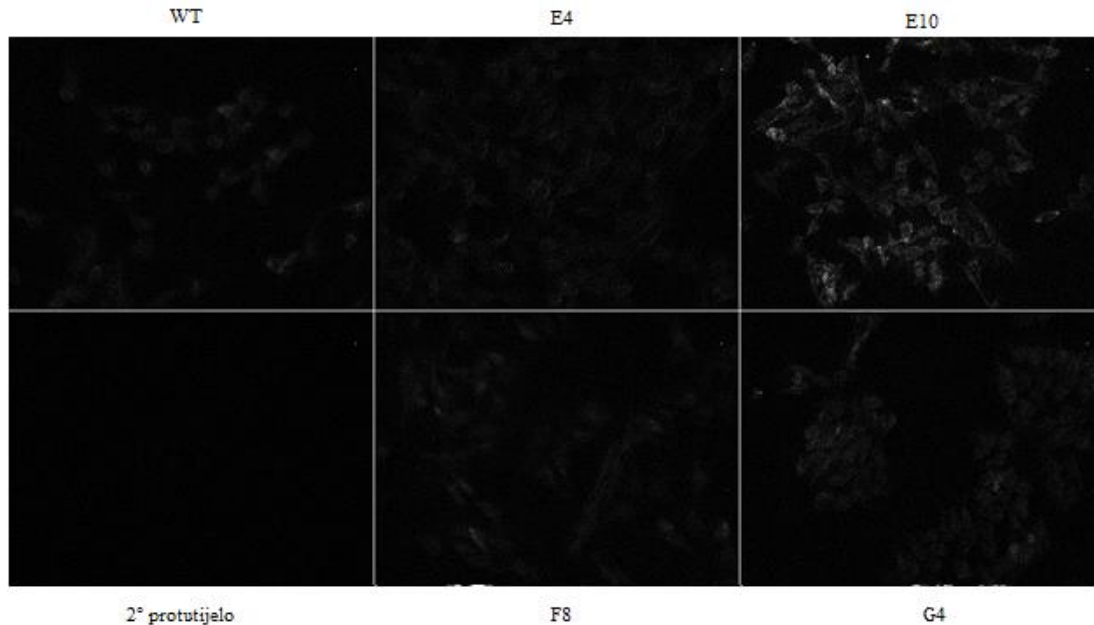
**Slika 24. Prikaz imunofluorescencije na transkripcijski faktor GLI2 unutar stanica.** Povišena ekspresija GLI2 je najupečatljivija kod staničnih linija F8 i G4. GLI2 pokazuje isključivo bojanje unutar jezgre što znači da se GLI2 procesira u aktivnu formu i čini signalni put aktivnim.



**Slika 25. Prikaz imunofluorescencije na transkripcijski faktor GLI3 unutar stanica.** Sve stanične linije osim G4 su usporedive sa divljim tipom, dok je kod G4 došlo do smanjenja ekspresije GLI3. GLI3 također pokazuje jači intenzitet u jezgri u odnosu na citoplazmu, što govori da GLI3 također aktivno sudjeluje u regulaciji prijenosa signala.



**Slika 26. Prikaz imunofluorescencije na vimentin unutar stanica.** Povišena razina vimentina je prisutna kod E4, F8 i G4. Vidljiva je i morfološka promjena stanica u staničnoj liniji G4 u kojoj se stanice skupljaju u strukture slične lopticama. Vimentin pokazuje jasnu membransku lokalizaciju.



**Slika 27. Prikaz imunofluorescencije na E-kadherin unutar stanica.** Signal za E-kadherin je općenito slab u svim analiziranim staničnim linijama. Kod staničnih linija E4, F8 i G4 nema zamjetne razlike u intenzitetu bojanja, dok je kod E10 povišen.

**Tablica 5. Usporedba staničnih linija s obzirom na ekspresiju proteina SHH, PTCH, GLI1, GLI2, GLI3, vimentin i E-kadherin.** (objašnjenje oznaka: ++ jako pojačanje, + pojačanje, 0 bez promjene, - smanjenje u usporedbi sa WT)

	E4	E10	F8	G4	WT
<b>SHH</b>	++	++	0	++	0
<b>PTCH1</b>	0	+	0	++	0
<b>GLI1</b>	0	+	+	0	0
<b>GLI2</b>	0	0	++	++	0
<b>GLI3</b>	0	0	0	--	0
<b>Vimentin</b>	++	0	++	++	0
<b>E-kadherin</b>	0	+	0	0	0

Usporedivši rezultate westernske metode otiska, lančane reakcije polimeraze te imunofluorescencije, kod stanične linije pod nazivom G4 se vidi povećanje neprocesiranog SHH, SHH-N i PTCH1. Dodatno, na imunofluorescenciji se vidi i pojačanje u bojanju GLI2, koji je lokaliziran u jezgri stanice. S obzirom da se rezultati vide u svim provedenim metodama, stanična linija G4 je najvjerojatnija stanična linija u kojoj je ugradnja gena *SHH* uspješna.



## 5. RASPRAVA

Signalni put HH/GLI je evolucijski očuvan put s ulogom u embrionalnom razvoju i homeostazi raznih tkiva uključujući kožu. Nepravilnosti u ovom signalnom putu povezane su s mnogim bolestima uključujući razna maligna oboljenja kao što je melanom (Niyaz i sur. 2019). Nužan je za normalnu proliferaciju melanocita u staničnim kulturama te u melanomima regulira rast, preživljavanje i metastaziranje (Stecca i sur. 2007). S obzirom da je melanom jedan od najagresivnijih tumora s povećavajućom incidencijom i lošijom prognozom u ranim stadijima bolesti, od sve veće važnosti je proučavanje signalnih puteva koji imaju ulogu u njegovu nastajanju. Stvaranjem staničnih linija s povećanom ekspresijom aktivnog SHH, PTCH1 te povećanom razinom HH/GLI signalizacije u stanicama, može se lakše proučavati njegova uloga u nastanku, rastu tumora i epitelno-mezenhimalnoj tranziciji koja dovodi do metastaziranja.

Primjenom sustava CRISPR-Cas9 provedena je transfekcija stanične linije melanoma CHL1 za gen *SHH*. Cilj ovog diplomskog rada bila je identifikacija stanične linije melanoma CHL1 na kojoj je postupak insercije sintetskog gena *SHH* bio uspješan kako bi se uspostavila ista za daljnje proučavanje signalnog puta i njegove uloge u stanicama melanoma.

Analizom rezultata PCR ispitana je prisutnost sintetskog inserta *SHH* unutar staničnog genoma. Od 24 testirane linije, u 16 je dokazana uspješna insercija gena *SHH*. Kod istih staničnih linija je proveden test ekspresije proteina na neprocesirani SHH i aktivni oblik, SHH-N. Četiri linije (E4, E10, F8 i G4) su na oba testa pokazale pojačanje ekspresije ovih proteina te su odabrane kao najbolji kandidati za dodatna ispitivanja. Provjerena je i održanost ekspresije proteina nakon sedam pasaža te je na istima testirana aktivnost signalnog puta. Pojačanu ekspresiju proteina SHH i SHH-N prati i pojačana ekspresija receptora PTCH1 iz razloga što je gen *PTCH1* pod direktnom transkripcijskom kontrolom transkripcijskih faktora GLI koji potiču transkripciju kada je signalni put HH/GLI aktivan (Ågren i sur. 2004).

U prisutstvu veće količine aktivnog proteina SHH, očekuje se pojačanje aktivnosti signalnog puta HH/GLI što se iskazuje pojačanjem aktivnosti aktivatora GLI2 koji djeluje kao primarni aktivator transkripcije, a manja ekspresija GLI3 koji djeluje kao represor (Hui i Angers 2011). GLI1 je također pozitivni regulator transkripcije za koji se kod povećane prisutnosti HH/GLI signala očekuje pojačanje aktivnosti, ali s obzirom da je njegova primarna uloga u

pozitivnoj povratnoj sprezi, te činjenice da je GLI1 jedan od ciljnih gena transkripcijskog faktora GLI2, aktivnost GLI2 je bitniji indikator jačine signala (Bai i sur. 2002; Mill i sur. 2003). Sukladno do sada objavljenim istraživanjima, u ispitivanju aktivnosti signalnog puta, stanične linije koje su pokazale veću ekspresiju proteina SHH, SHH-N i PTCH1, u nekoliko različitih kombinacija pokazale su i vidljivo pojačanje u aktivnosti primarnog aktivatora transkripcije GLI2, pozitivnog regulatora GLI1 i smanjenu aktivnost represora GLI3, što ukazuje na uspješnost pojačavanja signala HH/GLI.

Epitelno-mezenhimalna tranzicija je proces u kojemu epitelne stanice poprimaju karakteristike mezenhimalnih stanica gubljenjem čvrstih veza koje povezuju susjedne stanice. Prisutnost signalizacije preko HH/GLI dovodi do transkripcije raznih gena, uključujući gene koji su bitni za EMT poput SNAI1, ZEB1, ZEB2, SNAI2, E-kadherina i vimentina (Kato i Kato 2009). Prema do sada poznatim djelovanjima proteina GLI, pri jačoj aktivaciji signalnog puta očekuje se smanjenje E-kadherina na površini stanica, a povećanje ekspresije vimentina što olakšava EMT. Isti rezultati su ovim istraživanjem postignuti u nekoliko staničnih linija.

Neke od transfeciranih staničnih linija pokazuju morfološke promjene u usporedbi s divljim tipom CHL1 stanica. Poznato je da transkripcijski faktori induciraju promjene u sposobnosti širenja te morfologiji tumorskih stanica kroz smanjenje ekspresije E-kadherina, što dovodi do gubitka pravilne strukture među stanicama (Chun i Hong 2016). Stanice melanoma divljeg tipa su poligonalnog oblika, bez međustanične strukture, s malo kratkih dendritima sličnih staničnih nastavaka, što je u skladu s morfologijom stanica tumora s visokim metastatskim potencijalom. Iz nepoznatog razloga kod stanične linije F8 pojavila se pojačana razgranatost i izduženost stanica što ih čini sličnijima normalnim melanocitima. Ipak, kod stanične linije F8 je dokazana smanjena prisutnost E-kadherina i povećana ekspresija vimentina što je u skladu s obilježjima EMT, ali kako bi se točan razlog promjene morfologije saznao, potrebno je istražiti ekspresiju i drugih markera EMT. Kod stanične linije G4 je također iz nepoznatog razloga došlo do sklonosti stanica nakupljanju u nepravilne otočiće, što je suprotno očekivanoj morfologiji s obzirom da je i kod ove stanične linije pokazano smanjenje ekspresije E-kadherina koji je odgovoran za međusobno povezivanje susjednih stanica. Postoji mogućnost da je kod ovih staničnih linija u procesu transfekcije došlo do ugradnje inserta na nespecifična mjesta u genomu koja su odgovorna za promjenu morfologije.

Postoji mogućnost da je tijekom inicijalnog odabira najboljih kandidata za daljnja testiranja zapostavljena stanična linija s uspješnijom ugradnjom od konačno odabrane stanične linije G4, ali kako bi se to utvrdilo moraju se provesti dodatna ispitivanja još nekoliko linija kandidata, detaljnija testiranja ekspresije proteina te smještaja ugradnje sintetskog inserta *SHH* u genom na svim klonskim linijama stanične linije CHL1 na kojima je transfekcija provedena.

Daljnjim potvrdama te propagacijom stanične linije G4 uspostavlja se stanična linija sa ugrađenim sintetskim genom za protein SHH koja može služiti kao model pojačane signalizacije HH/GLI na kojoj se mogu provoditi daljnja istraživanja funkcija ovog signalnog puta u razvoju, rastu i metastatskom potencijalu melanoma, kao i inhibitorima koji bi se mogli razviti kao terapije za isti.

Prema znanstvenoj literaturi, do sada ne postoje radovi koji opisuju izradu i korištenje stanične linije sa stabilnom ekspresijom proteina SHH. Jedan od značaja koje razvitak ovakvog staničnog modela nosi je smanjenje ukupnog troška. Kako bi se ispitalo djelovanje proteina SHH u stanicama, potrebne su sve njegove posttranslacijske modifikacije, uključujući kolesterol i palmitat. Iako se sintetski protein SHH komercijalno proizvodi te se može kupiti i kao takav koristiti za tretiranje stanica, prilično je skup te nekada ne sadrži sve potrebne modifikacije proteina. Iz ovih razloga istraživači posežu za drugim načinima aktivacije signalnog puta HH/GLI kao što su kemijski aktivatori SMO. Jedan od primjera takvih aktivatora je SAG (Bragina i sur. 2010; Chen i sur. 2002). Ovakvom kemijskom aktivacijom signalnog puta se potpuno zaobilazi uloga SHH te njegove interakcije s drugim proteinima unutar stanice kao što je estrogenski receptor (Sabol i sur. 2014) i druge do sada dokazane interakcije.

Promatranje utjecaja proteina SHH na stanice se može postići i korištenjem rekombinantnog proteina SHH ili ekspresijskog vektora. Pomoću rekombinantnog proteina je ispitan utjecaj koji protein SHH ima na stanice tumora dojke (Ge i sur. 2015). Korištenjem ekspresijskog vektora provedena su istraživanja utjecaja proteina SHH na regeneraciju tkiva kod obnavljanja kosti kao i uloge pri specifikaciji dendrocita (Edwards i sur. 2005; Nery i sur. 2001). Prolazna ekspresija s ekspresijskog vektora je vrlo koristan stanični model koji se koristi u nedostatku stanične linije sa stabilnom ekspresijom proteina SHH. Prolazna ekspresija ovisi o velikom broju faktora kao što su tip i gustoća stanica, primjena pravog reagensa za transfekciju te njena uspješnost koja može varirati od eksperimenta do eksperimenta što dovodi do

nereproducibilnosti eksperimenta. Razvitak stanične linije sa stabilnom ekspresijom točno modificiranog proteina SHH koja za razliku od prolazno transfeciranih stanica, ostaje stabilna i nakon nekoliko staničnih dioba, uveliko ujednačava eksperimentalne uvjete i omogućava reproducibilnost eksperimenta. Također, sami eksperimentalni uvjeti više ne ovisi o uspješnosti transfekcije te je moguće raditi i dugotrajne eksperimente jer ne dolazi do smanjenja ekspresije proteina SHH nakon dioba transfeciranih stanica.

Poznato je da se protein SHH iz stanice izlučuje u eksosomima (Vyas i sur. 2014; Zhao i sur. 2020). Stanice koje stabilno ekspimiraju protein ga stoga mogu lučiti u eksosomima koji se mogu izolirati iz staničnog medija. Njegovom izolacijom pomoću ovakvog postupka, osim utjecaja ekspresije proteina SHH na stanice koje ga luče ili se nalaze u njihovoj blizini, omogućava se i jeftinija, stabilna produkcija proteina SHH sa svim potrebnim proteinskim modifikacijama koje su nužne za njegovu signalnu aktivnost. Ovakav protein se može koristiti i za promatranje utjecaja na različite tipove stanica. Također, korištenje proteina SHH dobivenog iz stanica pridonosi poboljšanju uvjeta eksperimenta, za razliku od korištenja rekombinantnog proteina ili ekspresijskog vektora.

Ovo istraživanje je prvi uspješan slučaj razvoja stanične linije melanoma s ugrađenom sekvencom *SHH* u genom. Značaj ovog istraživanja je uspostavljanje stanične linije sa stabilnom ekspresijom aktivnog oblika proteina SHH koja omogućava detaljna istraživanja uloge proteina SHH i signalnog puta HH/GLI u stanicama melanoma, ali i drugim tipovima stanica.

## 6. ZAKLJUČAK

Na temelju provedenog istraživanja doneseni su zaključci:

1. Uspješno su razvijene individualne klonske linije CHL1-SHH iz pojedinačnih transfeciranih stanica
2. Pomoću PCR-a su određene stanične linije koje imaju ugrađen sintetski gen *SHH* unutar staničnog genoma
3. Iz klonskih linija identificirane su one koje pokazuju povišenu razinu proteina SHH u odnosu na ishodišnu
4. Identificirane su stanične linije koje imaju povišenu aktivnost signalnog puta HH/GLI
5. Uspoređeni su markeri EMT i stanična morfologija ishodišnih i modificiranih stanica
6. Uspješno je identificirana stanična linija G4 koja pokazuje prisutnost inserta, povišenu razinu aktivnog proteina SHH, povišenu ekspresiju aktivatora signalnog puta, smanjenu razinu represora, pojačanu ekspresiju vimentina i nisku ekspresiju E-kadherina, što upućuje na uspješnu ugradnju gena i funkcionalnost inserta

## 7. LITERATURA

- Ågren M., Kogerman P., Kleman M.I., Wessling M., Toftgård R. (2004): Expression of the PTCH1 tumor suppressor gene is regulated by alternative promoters and a single functional Gli-binding site. *Gene* **330**: 101–114.
- Armas-López L., Zúñiga J., Arrieta O., Ávila-Moreno F. (2017): The Hedgehog-GLI pathway in embryonic development and cancer: Implications for pulmonary oncology therapy. *Oncotarget* **8**: 60684–60703.
- Babashah S., Sadeghizadeh M., Hajifathali A., Tavirani M.R., Zomorod M.S., Ghadiani M., Soleimani M. (2013): Targeting of the signal transducer Smo links microRNA-326 to the oncogenic Hedgehog pathway in CD34+ CML stem/progenitor cells. *Int. J. Cancer* **133**: 579–589.
- Bai C.B., Auerbach W., Lee J.S., Stephen D., Joyner A.L. (2002): Gli2, but not Gli1, is required for initial Shh signaling and ectopic activation of the Shh pathway. *Development* **129**: 4753–4761.
- Bambakidis N.C., Onwuzulike K. (Elsevier Inc.: 2012). Sonic hedgehog signaling and potential therapeutic indications. *Vitam. Horm.* **88**: .
- Behnsawy H.M., Shigemura K., Meligy F.Y., Yamamichi F., Yamashita M., Haung W.C., Li X., Miyake H., Tanaka K., Kawabata M., Shirakawa T., Fujisawa M. (2013): Possible role of sonic hedgehog and epithelial-mesenchymal transition in renal cell cancer progression. *Korean J. Urol.* **54**: 547–554.
- Bitgood M.J., Shen L., McMahon A.P. (1996): Sertoli cell signaling by Desert hedgehog regulates the male germline. *Curr. Biol.* **6**: 298–304.
- Bragina O., Sergejeva S., Serg M., Žarkovsky T., Maloverjan A., Kogerman P., Žarkovsky A. (2010): Smoothed agonist augments proliferation and survival of neural cells. *Neurosci. Lett.* **482**: 81–85.
- Bürglin T.R. (2008): The Hedgehog protein family. *Genome Biol.* **9**: 241.

- Cai Q., Li J., Gao T., Xie J., Evers B.M. (2009): Protein kinase C $\delta$  negatively regulates hedgehog signaling by inhibition of Gli1 activity. *J. Biol. Chem.* **284**: 2150–2158.
- Calloni G.W., Glavieux-Pardanaud C., Douarin N.M. Le, Dupin E. (2007): Sonic Hedgehog promotes the development of multipotent neural crest progenitors endowed with both mesenchymal and neural potentials. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**: 19879–19884.
- Chen J.K., Taipale J., Young K.E., Maiti T., Beachy P.A. (2002): Small molecule modulation of smoothed activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**: 14071–14076.
- Chen S., Zhang G., Yu Q., Zhang X., Han G. (2017): microRNA-361 inhibited prostate carcinoma cell invasion by targeting Gli1. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* **10**: 6108–6116.
- Chen Y., Jiang J. (2013): Decoding the phosphorylation code in Hedgehog signal transduction. *Cell Res.* **23**: 186–200.
- Christiane Nüsslein-Volhard, Eric Wieschaus N.P. (1980): Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature* **287**: 795–801.
- Chun H.W., Hong R. (2016): Significance of the hedgehog pathway-associated proteins Gli-1 and Gli-2 and the epithelial-mesenchymal transition-associated proteins twist and E-cadherin in hepatocellular carcinoma. *Oncol. Lett.* **12**: 1753–1762.
- Dennler S., André J., Alexaki I., Li A., Magnaldo T., Dijke P. Ten, Wang X.J., Verrecchia F., Mauviel A. (2007): Induction of sonic hedgehog mediators by transforming growth factor- $\beta$ : Smad3-dependent activation of Gli2 and Gli1 expression in vitro and in vivo. *Cancer Res.* **67**: 6981–6986.
- Edwards P.C., Ruggiero S., Fantasia J., Burakoff R., Moorji S.M., Paric E., Razzano P., Grande D.A., Mason J.M. (2005): Sonic hedgehog gene-enhanced tissue engineering for bone regeneration. *Gene Ther.* **12**: 75–86.
- Farzan S.F., Singh S., Schilling N.S., Robbins D.J. (2008): The Adventures of Sonic Hedgehog in Development and Repair. III. Hedgehog processing and biological activity. *Am. J. Physiol. - Gastrointest. Liver Physiol.* **294**: 844–849.
- Ge X., Lyu P., Gu Y., Li L., Li J., Wang Y., Zhang L., Fu C., Cao Z. (2015): Sonic hedgehog

- stimulates glycolysis and proliferation of breast cancer cells: Modulation of PFKFB3 activation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **464**: 862–868.
- Gu D., Xie J. (2015): Non-canonical Hh signaling in cancer—Current understanding and future directions. *Cancers (Basel)*. **7**: 1684–1698.
- Hille F., Charpentier E. (2016): CRISPR-cas: Biology, mechanisms and relevance. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **371**: .
- Hui C.C., Angers S. (2011): Gli proteins in development and disease. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **27**: 513–537.
- Ingham P.W., McMahon A.P. (2001): Hedgehog signaling in animal development: Paradigms and principles. *Genes Dev.* **15**: 3059–3087.
- Jeffery A. Porter, Keith E. Young P.A.B. (1996): Proteins in Animal Development. *Science (80-. )*. **274**: 255–259.
- Jia J., Jiang J. (2006): Decoding the Hedgehog signal in animal development. *Cell. Mol. Life Sci.* **63**: 1249–1265.
- Jiang J., Hui C. (2008): Review hedgehog signaling in development and cancer. *Dev. Cell* **15**: 801–812.
- Jiang L., Huang J., Hu Y., Lu P., Luo Q., Wang L. (2020): Gli promotes tumor progression through regulating epithelial-mesenchymal transition in non-small-cell lung cancer. *J. Cardiothorac. Surg.* **15**: 1–8.
- Jinek M., Chylinski K., Fonfara I., Hauer M., Doudna J.A., Charpentier E. (2012): A Programmable Dual-RNA – Guided. *Science (80-. )*. **337**: 816–822.
- Katoh Y., Katoh M. (2009): Hedgehog target genes: mechanisms of carcinogenesis induced by aberrant hedgehog signaling activation. *Curr. Mol. Med.* **9**: 873–886.
- Kong J.H., Siebold C., Rohatgi R. (2019): Biochemical mechanisms of vertebrate hedgehog signaling. *Dev.* **146**: dev166892.
- Levanat S., Čretnik M., Musani V. (2008): Hh-Gli signaling pathway functions and its therapeutic potential in cancer. *Croat. Chem. Acta* **81**: 1–5.



- Loureiro A., Silva G.J. Da (2019): Crispr-cas: Converting a bacterial defence mechanism into a state-of-the-art genetic manipulation tool. *Antibiotics* **8**: .
- Michelotti G.A., Xie G., Swiderska M., Choi S.S., Karaca G., Krüger L., Premont R., Yang L., Syn W.K., Metzger D., Diehl A.M. (2013): Smoothed is a master regulator of adult liver repair. *J. Clin. Invest.* **123**: 2380–2394.
- Mill P., Mo R., Fu H., Grachtchouk M., Kim P.C.W., Dlugosz A.A., Hui C.C. (2003): Sonic hedgehog-dependent activation of Gli2 is essential for embryonic hair follicle development. *Genes Dev.* **17**: 282–294.
- Milla L.A., González-Ramírez C.N., Palma V. (2012): Sonic hedgehog in cancer stem cells: A novel link with autophagy. *Biol. Res.* **45**: 223–230.
- Murone M., Rosenthal A., Sauvage F.J. De (1999): Hedgehog signal transduction: From flies to vertebrates. *Exp. Cell Res.* **253**: 25–33.
- Neill G.W., Ghali L.R., Green J.L., Ikram M.S., Philpott M.P., Quinn A.G. (2003): Loss of protein kinase C $\alpha$  expression may enhance the tumorigenic potential of Gli1 in basal cell carcinoma. *Cancer Res.* **63**: 4692–4697.
- Nery S., Wichterle H., Fishell G. (2001): Sonic hedgehog contributes to oligodendrocyte specification in the mammalian forebrain. *Development* **128**: 527–540.
- Niewiadomski P., Niedziółka S.M., Markiewicz Ł., Uśpieński T., Baran B., Chojnowska K. (2019): Gli proteins: regulation in development and cancer. *Cells* **8**: 147.
- Niyaz M., Khan M.S., Mudassar S. (2019): Hedgehog Signaling : An Achilles ' Heel in Cancer. *Transl. Oncol.* **12**: 1334–1344.
- Ochoa B., Syn W.K., Delgado I., Karaca G.F., Jung Y., Wang J., Zubiaga A.M., Fresnedo O., Omenetti A., Zdanowicz M., Choi S.S., Diehl A.M. (2010): Hedgehog signaling is critical for normal liver regeneration after partial hepatectomy in mice. *Hepatology* **51**: 1712–1723.
- Oost J. Van Der, Westra E.R., Jackson R.N., Wiedenheft B. (2014): Unravelling the structural and mechanistic basis of CRISPR-Cas systems. *Nat. Rev. Microbiol.* **12**: 479–492.
- Pandolfi S., Stecca B. (2015): Cooperative integration between HEDGEHOG-GLI signalling and

- other oncogenic pathways: Implications for cancer therapy. *Expert Rev. Mol. Med.* **17**: 1–36.
- Pereira J., Johnson W.E., O'Brien S.J., Jarvis E.D., Zhang G., Gilbert M.T.P., Vasconcelos V., Antunes A. (2014): Evolutionary genomics and adaptive evolution of the hedgehog gene family (Shh, Ihh and Dhh) in vertebrates. *PLoS One* **9**: 1–35.
- Petrova R., Joyner A.L. (2014): Roles for Hedgehog signaling in adult organ homeostasis and repair. *Dev.* **141**: 3445–3457.
- Piccioni A., Gaetani E., Palladino M., Gatto I., Smith R.C., Neri V., Marcantoni M., Giarretta I., Silver M., Straino S., Capogrossi M., Landolfi R., Pola R. (2014): Sonic hedgehog gene therapy increases the ability of the dystrophic skeletal muscle to regenerate after injury. *Gene Ther.* **21**: 413–421.
- Petrobono S., Gagliardi S., Stecca B. (2019): Non-canonical hedgehog signaling pathway in cancer: Activation of GLI transcription factors beyond smoothed. *Front. Genet.* **10**: 1–20.
- Petrobono S., Santini R., Gagliardi S., Dapporto F., Colecchia D., Chiariello M., Leone C., Valoti M., Manetti F., Petricci E., Taddei M., Stecca B. (2018): Targeted inhibition of Hedgehog-GLI signaling by novel acylguanidine derivatives inhibits melanoma cell growth by inducing replication stress and mitotic catastrophe. *Cell Death Dis.* **9**: .
- Razzaque M.S., Soegiarto D.W., Chang D., Long F., Lanske B. (2005): Conditional deletion of Indian hedgehog from collagen type 2 $\alpha$ 1-expressing cells results in abnormal endochondral bone formation. *J. Pathol.* **207**: 453–461.
- Riaz S.K., Ke Y., Wang F., Kayani M.A., Malik M.F.A. (2019): Influence of SHH/GLI1 axis on EMT mediated migration and invasion of breast cancer cells. *Sci. Rep.* **9**: 1–13.
- Riobó N.A., Lu K., Ai X., Haines G.M., Emerson C.P. (2006): Phosphoinositide 3-kinase and Akt are essential for Sonic Hedgehog signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**: 4505–4510.
- Sabol M., Trnski D., Uzarevic Z., Ozretic P., Musani V., Rafaj M., Cindric M., Levanat S. (2014): Combination of cyclopamine and tamoxifen promotes survival and migration of MCF-7 breast cancer cells - Interaction of Hedgehog-Gli and estrogen receptor signaling pathways. *PLoS One* **9**: 1–23.

- Schnidar H., Eberl M., Klingler S., Mangelberger D., Kasper M., Hauser-Kronberger C., Regl G., Kroismayr R., Moriggl R., Sibilina M., Aberger F. (2009): Epidermal growth factor receptor signaling synergizes with hedgehog/GLI in oncogenic transformation via activation of the MEK/ERK/JUN pathway. *Cancer Res.* **69**: 1284–1292.
- Shakhova O. (2014): Neural crest stem cells in melanoma development. *Curr. Opin. Oncol.* **26**: 215–221.
- Shi H., Chen H. Roles of the Hedgehog Signaling Pathway in Cutaneous Physiology and Oncology. doi:10.1097/01.JD9.0000559837.14785.f8.
- Skoda A.M., Simovic D., Karin V., Kardum V., Vranic S., Serman L. (2018): The role of the hedgehog signaling pathway in cancer: A comprehensive review. *Bosn. J. Basic Med. Sci.* **18**: 8–20.
- Stamatakis D., Ulloa F., Tsoni S. V, Mynett A., Briscoe J. (2005): A gradient of Gli activity mediates graded Sonic Hedgehog signaling in the neural tube. *Genes Dev.* **19**: 626–641.
- Stecca B., Mas C., Clement V., Zbinden M., Correa R., Piguat V., Beermann F., Ruiz I Altaba A. (2007): Melanomas require HEDGEHOG-GLI signaling regulated by interactions between GLI1 and the RAS-MEK/AKT pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**: 5895–5900.
- Teperino R., Aberger F., Esterbauer H., Riobo N., Pospisilik J.A. (2014): Canonical and non-canonical hedgehog signalling and the control of metabolism. *Semin. Cell Dev. Biol.* **33**: 81–92.
- Toma J.G., Akhavan M., Fernandes K.J.L., Barnabé-heider F., Sadikot A., Kaplan D.R., Miller F.D. (2001): Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin. **3**: 778-784.
- Varjosalo M., Taipale J. (2008): Hedgehog : functions and mechanisms. *GENES Dev.* **22**: 2454–2472.
- Villegas V.E., Rahman M.F.U., Fernandez-Barrena M.G., Diao Y., Liapi E., Sonkoly E., Stähle M., Pivarcsi A., Annaratone L., Sapino A., Ramírez Clavijo S., Bürglin T.R., Shimokawa T., Ramachandran S., Kapranov P., Fernandez-Zapico M.E., Zaphiropoulos P.G. (2014): Identification of novel non-coding RNA-based negative feedback regulating the expression

of the oncogenic transcription factor GLI1. *Mol. Oncol.* **8**: 912–926.

Vyas N., Walvekar A., Tate D., Lakshmanan V., Bansal D., Cicero A. Lo, Raposo G., Palakodeti D., Dhawan J. (2014): Vertebrate Hedgehog is secreted on two types of extracellular vesicles with different signaling properties. *Sci. Rep.* **4**: 1–12.

Wang Y., Ding Q., Yen C.J., Xia W., Izzo J.G., Lang J.Y., Li C.W., Hsu J.L., Miller S.A., Wang X., Lee D.F., Hsu J.M., Huo L., LaBaff A.M., Liu D., Huang T.H., Lai C.C., Tsai F.J., Chang W.C., Chen C.H., Wu T.T., Buttar N.S., Wang K.K., Wu Y., Wang H., Ajani J., Hung M.C. (2012): The crosstalk of mTOR/S6K1 and hedgehog pathways. *Cancer Cell* **21**: 374–387.

Watkins D.N., Berman D.M., Burkholder S.G., Wang B., Beachy P.A., Baylin S.B. (2003): Hedgehog signalling within airway epithelial progenitors and in small-cell lung cancer. *Nature* **422**: 313–317.

Wu F., Zhang Y., Sun B., McMahon A.P., Wang Y. (2017): Hedgehog Signaling: From Basic Biology to Cancer Therapy. *Cell Chem. Biol.* **24**: 252–280.

[www.abcam.com/secondary-antibodies/direct-vs-indirect-immunofluorescence](http://www.abcam.com/secondary-antibodies/direct-vs-indirect-immunofluorescence) (pristupljeno 30.1.2021.)

[www.bio-connect.nl/crispr-cas9-genome-editing-transfection-reagents/cnt/page/5171](http://www.bio-connect.nl/crispr-cas9-genome-editing-transfection-reagents/cnt/page/5171) (pristupljeno 30.1.2021.)

[www.cusabio.com/m-244.html](http://www.cusabio.com/m-244.html) (pristupljeno 30.1.2021.)

[www.origene.com](http://www.origene.com) (pristupljeno 1.2.2021.)

[www.radio.cuci.udg.mx/bch/EN/Western.html](http://www.radio.cuci.udg.mx/bch/EN/Western.html) 8 (pristupljeno 30.1.2021.)

Yamaguchi A., Komori T., Suda T. (2000): Regulation of osteoblast differentiation mediated by bone morphogenetic proteins, hedgehog, and Cbfa1. *Endocr. Rev.* **21**: 393–411.

Yauch R.L., Gould S.E., Scales S.J., Tang T., Tian H., Ahn C.P., Marshall D., Fu L., Januario T., Kallop D., Nannini-Pepe M., Kotkow K., Marsters J.C., Rubin L.L., Sauvage F.J. De (2008): A paracrine requirement for hedgehog signalling in cancer. *Nature* **455**: 406–410.

Zhang J., Tian X.-J., Xing J. (2016): Signal transduction pathways of EMT induced by TGF- $\beta$ , SHH, and WNT and their crosstalks. *J. Clin. Med.* **5**: 41.

Zhao G., Li H., Guo Q., Zhou A., Wang X., Li P., Zhang S. (2020): Exosomal sonic hedgehog

derived from cancer-associated fibroblasts promotes proliferation and migration of esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Med.* **9**: 2500–2513.

Zheng X., Zeng W., Gai X., Xu Q., Li C., Liang Z., Tuo H., Liu Q. (2013): Role of the Hedgehog pathway in hepatocellular carcinoma (Review). *Oncol. Rep.* **30**: 2020–2026.

## 8. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 10.08.1996. godine u Virovitici. Osnovnu školu Eugena Kumičića, osnovnu glazbenu školu Milka Kelemena za klavir i opću gimnaziju Marka Marulića završila sam u Slatini. Preddiplomski studij biologije upisala sam 2015. godine na Odjelu za biologiju na Sveučilištu Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku te sam isti završila 2018. godine sa završnim radom pod mentorstvom dr.sc. Gorana Palijana. Iste godine upisala sam diplomski studij Eksperimentalne biologije: modul Fiziologija i imunobiologija na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. U toku studija sudjelovala sam u aktivnostima popularizacije znanosti kao što su znanstveni sajmovi i predstavljanja fakulteta kao i Bioetički simpozij te sam kao organizatorica *Meet the Biologists - HRZZ Edition* zajedno sa ostatkom organizacijskog tima dobitnica Rektorove nagrade Sveučilišta u Zagrebu za društveno koristan rad u akademskoj i široj zajednici u akademskoj godini 2019./2020. Diplomski rad sam izradila na Institutu Ruđer Bošković u Laboratoriju za nasljedni rak pod mentorstvom dr. sc. Maje Sabol.