

Signalni put Hedgehog

Pahlić, Anastazija

Undergraduate thesis / Završni rad

2022

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:217:701762>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-11**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Anastazija Pahlić

Signalni put Hedgehog

Završni rad

Zagreb, 2022.

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Anastazija Pahlić

Hedgehog signaling pathway

Bachelor thesis

Zagreb, 2022.

Ovaj završni rad je izrađen u sklopu studijskog programa Biologija na zavodu za molekularnu biologiju Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu, pod mentorstvom izv. Prof. dr. sc. Maje Matulić

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Završni rad

Signalni put Hedgehog

Anastazija Pahlić

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Signalni putevi imaju važnu ulogu u primaju i prenošenju informacija unutar stanice i u međustaničnoj komunikaciji te su bitni za normalno funkcioniranje organizama. Tako je visokokonzervirani signalni put Hedgehog (Hh), koji je prvi put otkriven u vinskoj mušici (lat. *Drosophila melanogaster*), važan za prijenos informacija vezanih uz pravilan razvoj organa i plana tijela tijekom embriogeneze kralježnjaka i beskralježnjaka. Također ima ulogu u održavanju homeostaze i regeneracije odraslih tkiva. Sastoji se od kaskade signalnih molekula: proteina Hedgehog koji su ekstracelularni ligandi, receptora Patched, proteina Smothened, Kif7, Sufu i transkripcijskih faktora Gli. Njihova aktivnost mora biti precizno regulirana kako bi došlo do pravilne diferencijacije i proliferacije stanica. Poremećaji povezani uz slabu ili onemogućenu signalizaciju tijekom embrionalnog razvoja povezuju se s urođenim manama, dok povećana aktivnost signalnog puta u tkivu odraslih jedinki dovodi do nastanka određenih vrsta tumora. Danas postoje mnoge terapije za liječenje tumora koje se baziraju na inhibiranju signalnog puta Hh.

Ključne riječi: signalni put, proteini Hedgehog, embriogeneza, tumori
(28 stranica, 7 slika, 0 tablica, 91 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)
Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Mentor: izv. prof. dr. sc. Maja Matulić

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Bachelor thesis

Hedgehog signaling pathway

Anastazija Pahlić

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Signaling pathways play an important role in receiving and transmitting information in the cell and in the intercellular communication, and are essential for the normal function of the organism. Thus, the highly conserved Hedgehog (Hh) signaling pathway, which was discovered in the fruit fly (lat. *Drosophila melanogaster*), is important for the transmission of information related to the proper development of organs and body plan during vertebrate and invertebrate embryogenesis. It also plays a role in maintaining homeostasis and regeneration of adult tissues. It consists of a cascade of signaling molecules: Hh proteins which are extracellular ligands, Patched receptor, Smoothed protein, Kif7, Sufu and Gli transcription factors. Their activity must be precisely regulated in order to allow proper cell differentiation and proliferation to occur. Abnormalities associated with weak or disabled signaling during embryonic development are associated with birth defects, while increased activity of the signaling pathway in adult tissues leads to the formation of certain types of tumors. Today, there are many drugs for the treatment of tumors which act as Hh signaling pathway inhibitors.

Keywords: signaling pathway, Hedgehog proteins, embryogenesis, tumors
(28 pages, 7 figures, 0 tables, 91 references, original in: croatian)
Thesis is deposited in Central Biological Library.

Mentor: Maja Matulić, PhD, Associate professor

Sadržaj

Popis kratica	0
1. Uvod	1
2. Općenito o putu Hedgehog	3
3. Molekule signalnog puta Hedgehog	5
3.1. Protein Hh	5
3.2 Protein Patched	5
3.3 Protein Smoothened	6
3.4 Proteini Gli	7
3.5 Protein Sufu i Kif7	8
3.6 Primarna cilija	8
4. Signalizacija puta Hedgehog	9
4.1 Modifikacija proteina Hh	9
4.2 Prijenos proteina Hh	9
4.3 Kanonski put	10
4.4 Nekanonski put	11
5. Uloga puta Hedgehog u razvoju	13
6. Uloga puta Hh u nastanku tumora	15
7. Inhibitori puta Hedgehog	16
8. Zaključak	17
9. Literatura	18
10. Životopis	28

Popis kratica

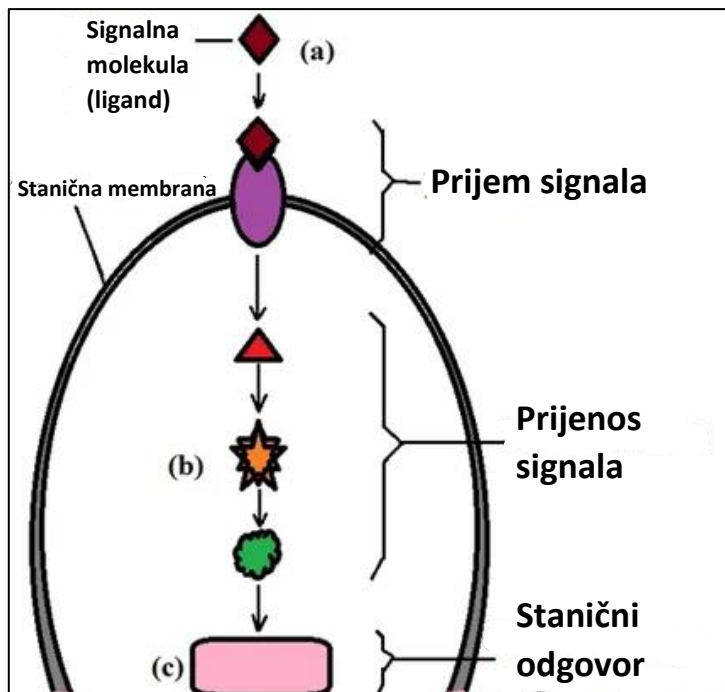
BCC	bazocelularni karcinom (engl. basal cell carcinoma)
BCL2	limfom B-stanica 2 (engl. B-cell lymphoma 2)
BCNS	sindromom bazalnih stanica nevus (engl. basal cell nevus syndrom)
BDA1	brahidaktilija tipa A1 (engl. brachydactyly type A1)
Ci	engl. Cubitus interruptus
CK1	kazein kinaza 1 (engl. casein kinase 1)
CRD	domena bogata cisteinom (engl. cysteine-rich domain)
Dhh	engl. Desert hedgehog
Disp	engl. Dispatched
ECD	ekstracelularna domena (engl. extracellular domain)
ER	endoplazmatski retikulum (engl. endoplasmatic reticulum)
FDA	Američka agencija za hranu i lijekove (engl. US food and drug administration)
Fu	engl. Fused
GCPS	Greigovim sindromom cefalopolisindaktilije (engl. Greig cephalopolysyndactyly syndrome)
Gli	engl. Glioma-associated oncogene
GliA	Gli aktivacijski oblik (engl. Gli activation form)
GliFL	engl. Full-length Gli
GliR	Gli represorski oblik (engl. Gli repression form)
GSK3 β	glikogen sintaza kinaza 3 (engl. glycogen synthase kinase 3)
Hh	engl. Hedgehog
HhC	C-terminalna Hh domena (engl. C-terminal Hh domain)
HhN	N-terminalna Hh domena (engl. N-terminal Hh domain)
Hip	engl. Hedgehog-interacting protein
ICD	intracelularna domena (engl. intracellular domain)
ICL	intracelularna petlja (engl. intracellular loop)
Ihh	engl. Indian hedgehog

Kif7	kinezin protein (engl. kinesin protein)
LD	engl. linker domains
MB	meduloblastom (engl. medulloblastoma)
MPF	engl. M-phase promoting factor
PHS	Pallister–Hall sindromom (engl. Pallister-Hall syndrome)
PI3K	fosfatidilinozitol 3-kinaza (engl. phosphatidylinositol 3-kinase)
PKA	protein kinaza A (engl. protein kinase A)
Ptch	engl. Patched
RND	engl. resistance-nodulatio-division
SFK	engl. Src family kinase
Shh	engl. Sonic hedgehog
Ski	engl. Skinny
Smo	engl. Smoothened
SRR	regija koja prepoznaje sterol (engl. sterol-recognition region)
ss	signalna sekvenca
SSD	domena osjetljiva na sterol (engl. sterol-sensing domain)
Sufu	engl. Suppressor of fused
TMD	transmembranska domena (engl. transmembrane domain)
ZPA	engl. zone of polarizing activity

1. Uvod

Signalni putevi su neophodni za funkcioniranje svakog živog organizma, od najjednostavnijih jednostaničnih pa do najsloženijih višestaničnih organizama. Oni služe primanju informacija iz okoliša, vanjskog i unutarnjeg, čime se potiče stanični odgovor (tj. reakcija na podražaj) koji ima ulogu u kontroli staničnog rasta, metabolizma, proliferacije i drugih staničnih procesa. Također omogućuju međustaničnu komunikaciju koja je potrebna za funkcioniranje tkiva, organa i organizma kao cjeline.

Iako su molekule koje su uključene razne signalne puteve veoma različite i putevi imaju vrlo raznolike uloge, princip funkcioniranja signalnih puteva je u suštini veoma sličan. Put započinje dolaskom signalne molekule (liganda) do stanice na čijoj se površini ili u njoj nalazi receptor. Ligand se veže za receptor što dovodi do konformacijske promjene receptora. To za posljedicu ima seriju kemijskih reakcija tj. prijenos signala, zadnja molekula u toj biokemijskoj kaskadi potiče stanični odgovor (Slika 1.).



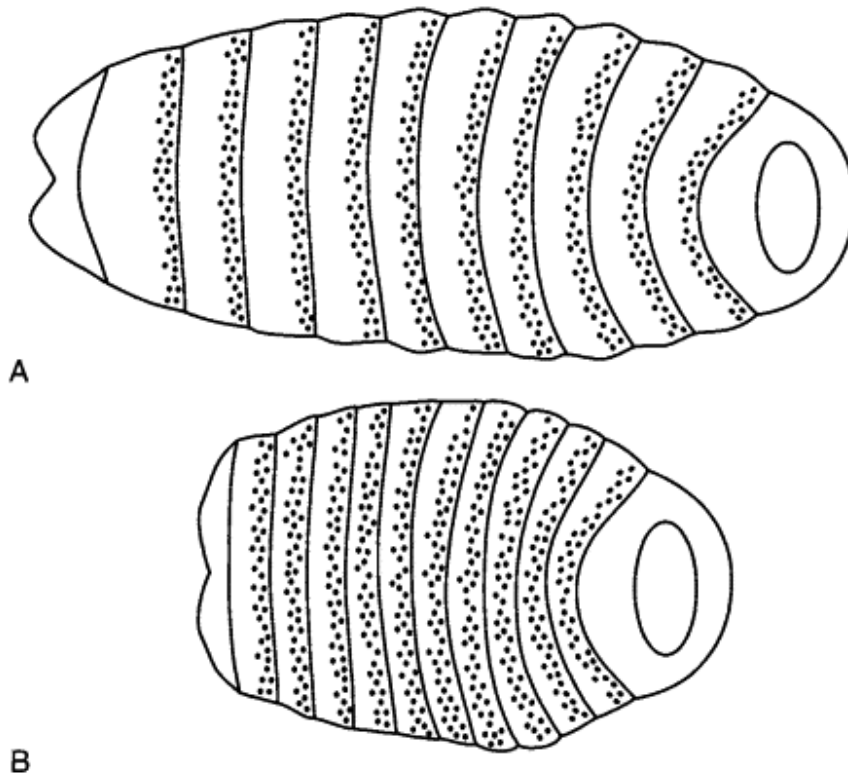
Slika 1: Shematski prikaz signalnog puta: (a) detekcija liganda i vezanje za receptor (b) kaskada biokemijskih reakcija (c) dolazak informacija na ciljano mjesto i poticanje staničnog odgovora. Slika preuzeta i prilagođena prema Microscope master <https://www.microscopemaster.com/four-steps-of-cell-signaling.html>

Komunikacija među stanicama odvija se od stanice koja oslobađa signalne molekule ili ih izlaže na svojoj staničnoj membrani do stanice koja ih veže i potiče unutarstaničnu signalnu kaskadu. Prijenos može biti autokrini, parakrini ili endokrini. Autokrini prijenos podrazumijeva prijenos signala u kojem se signalna molekula veže za receptore na stanici koja ju je i izlučila. Tijekom parakrinog prijenosa signalne molekule utječu na susjedne stanice. To je lokalni prijenos tj. molekule prelaze kratke udaljenosti za razliku od endokrinog prijenosa gdje signalne molekule krvlju prelaze velike udaljenosti.

Svi procesi u organizmu moraju biti jako dobro uređeni i kontrolirani kako bi sve pravilno funkcioniralo, pa tako i signalni putevi. Poznavanje komponenti i mehanizama putova omogućuje nam bolje razumijevanje kako funkcioniramo, mi i organizmi oko nas. Budući da poremećaji signalnih puteva mogu rezultirati bolestima i nenormalnom funkcioniranjem organskih sustava, poznavanje mehanizama također pomaže u otkrivanju uzroka bolesti te pronalaska načina liječenja. U ovom radu поближе ću objasniti dijelove, mehanizam i ulogu signalnog puta Hedgehog.

2. Općenito o putu Hedgehog

Proteini Hedgehog (Hh) glasnici su istoimenog signalnog puta, koji je bitan za međustaničnu komunikaciju tijekom razvoja organizama. Geni *Hedgehog* otkriveni su po prvi put u vinskoj mušici (lat. *Drosophila melanogaster*). Naime, ličinka koja je mutant za gen *Hh* ima karakterističan fenotip jer nije došlo do pravilne anteriorno-posteriorne segmentacije tijela. Budući da takva ličinka izgledom podsjeća na ježa (Slika 2), gen je dobio naziv hedgehog (hrv. jež) (Nusslein-Volhard i Wieschaus 1980). Naknadna istraživanja mutanti sličnog fenotipa dovela su otkrića ostalih komponenti i definiranja signalnog puta Hh u vinske mušice. Budući da su osnovne komponente i princip puta evolucijski vrlo konzervirani (Ingham i McMahon 2001), mogu se povući paralele između signalnog puta u vinske mušice i kralježnjaka (Murone i sur. 1999). Određene razlike ipak postoje, a jedna od većih je ta da se normalno odvijanje puta Hh u kralježnjacima odvija putem posebne strukture, primarne cilije. (Goetz i Anderson 2010).



Slika 2: Izgled ličinke vinske mušice divljeg tipa i mutanta u putu Hedgehog. (a) Ličinka divljeg tipa s pravilnom segmentacijom tijela. Svaki segment sastoji se od prednjeg dijela s dlakama (čekinjama) i stražnjeg dijela bez dlaka. (b) Mutant s nepravilnom segmentacijom. Segmentima nedostaje stražnji goli dio. Slika preuzeta iz Westendorp i sur. 2017.

Signalni put Hh je veoma važan tijekom embriogeneze metazoa (Inghan i sur. 2011). U embrionalnom tkivu ima ulogu u prijenosu informacija za pravilnu diferencijaciju i proliferaciju embrionalnih stanica. Stanični odgovor ovisi o koncentraciji i vremenu izloženosti proteinima hedgehog. Dokazano je da smanjena aktivnost signalnog puta Hh tijekom embrionalnog razvoja dovodi do poremećaja u razvoju organa i organskih sustava (Cooper i sur. 2003; Ming i sur. 1998).

U odraslom tkivu put Hh ponajviše je aktivan u matičnim stanicama. Ima ulogu u regeneraciji tkiva i zacjeljivanju rana (Le i sur. 2008) te reguliranju homeostaze tkiva kao što su npr. živčani sustav (Palma i sur. 2005), probavni sustav (van den Brink 2007), koža i krv (Crompton i sur. 2007). Također ima ulogu u kontroli oblikovanja i rasta folikula dlake (Oro i Higgins 2003; Silva-Vargas i sur. 2005). Poznato je da nenormalna aktivnost signalnog puta Hh u odraslim tkivima dovodi do nastanka određenih vrsta tumora (Taipale i Beachy 2001).

3. Molekule signalnog puta Hedgehog

3.1. Protein Hh

Proteini Hedgehog su signalne molekule, ekstracelularni ligandi u signalnom putu Hh i stoga su važan dio embrionalnog razvoja. U vinske mušice postoji samo jedan gen *Hh*, dok kod sisavaca postoje tri paralogna gena: *Sonic hedgehog (Shh)*, *Indian hedgehog (Ihh)* i *Desert hedgehog (Dhh)*, koji kodiraju za istoimene proteine. Shh je najbolje proučen i istražen od svih proteina Hh. Može djelovati autokrino ili parakrino te sudjeluje u tzv. kanonskom i nekanonskom putu signalizacije.

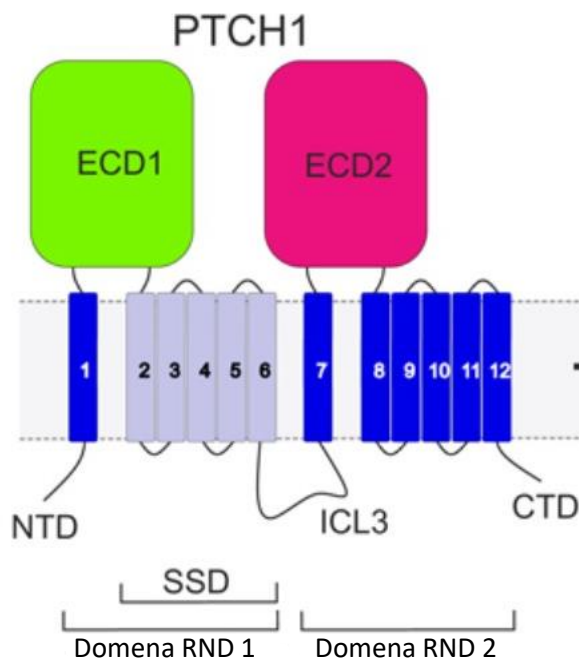
Svi proteini Hh sintetiziraju se kao prekursori koji moraju proći modifikacije kako bi postale aktivne signalne molekule (Chen i sur 2011). Prekursor se sastoji od dvije glavne domene, Hedge i Hog (Burglin 2008a). Domena Hedge je signalna domena i zajedno sa signalnom sekvencom (ss) čini fragment HhN. Domena Hog, koja se dijeli na regiju Hint i SRR (regija koja prepoznaje sterol; engl. sterol-recognition region), čini fragment HhC. Regija Hint dijeli sličnosti u sekvenci sa samo-spajajućim inteinima (Burglin 2008b; Koonin 1995), a SRR može vezati kolesterol. Stoga regije Hint i SRR imaju ulogu u modifikaciji proteina Hh.

3.2 Protein Patched

Patched (Ptch) je receptor proteina Hh (Marigo i sur. 1996) i negativni je regulator signalnog puta Hh. U kralježnjaka postoje dva homologa, Patched 1 i Patched 2 (Zaphiropoulos i sur. 1999;). Oba receptora vežu sve proteine Hh sličnim afinitetom (Gailani i sur. 1996), no postoje razlike u njihovoj ekspresiji što za sobom povlači i razliku u funkciji. Proteini Ptch kontroliraju signalni put na način da inhibiraju molekulu Smo u odsutnosti liganda Hh, no Ptch2 ima smanjenu mogućnost inhibicije Smo u odnosu na Ptch1 (Rahnama i sur. 2004). Ptch1 se eksprimira u stanicama koje luče protein Shh, a Ptch2 se najviše eksprimira u stanicama testisa i kože (Carpenter i sur. 1998).

Patched 1 sastoji se od transmembranske domene (TMD) i dvije ekstracelularne domene, vezane za transmembransku domenu, te intracelularne petlje (Kowatsch i sur. 2019). TMD je sastavljen od 12 zavojnica, podijeljenih u dvije domene RND (engl. resistance-nodulation-division), a unutar jedne od njih nalazi se regija SSD (domena osjetljiva na sterol; engl. sterol-

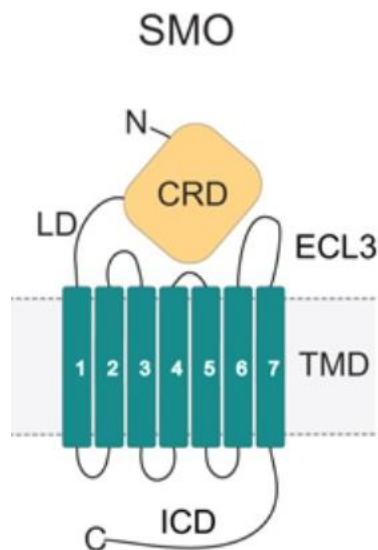
sensing domain) (slika 3). Pretpostavlja se da regija SSD stupa u interakciju s kolesterolom koji je vezan za protein Hh (Ingham 2000).



Slika 3: Shematski prikaz strukture proteina Ptch1. Ptch 1 sastoji se od transmembranske domene (TMD) i dvije ekstralne domene ECD1 i ECD2 (koje su vezane za transmembransku domenu) te intracelularne petlje ICL3. TMD je sastavljen od dvije domene RND, a SSD se dio domene RND1. Slika preuzeta i prilagođena prema Kowatsch i sur. 2019. NTD: N-terminalna domena, CTD: C-terminalna domena, SSD: domena osjetljiva na sterol

3.3 Protein Smoothened

Protein Smoothened (Smo) receptor je koji veže G proteine (Ruiz-Gomez i sur. 2007) i pozitivan regulator signalnog puta Hh. Građen je od 4 domene: CRD (domena bogata cisteinom; engl. cysteine-rich domain), LD (engl. linker domains), transmembranske domene sastavljene od 7 uzvojnica (tipičan izgled receptora koji veže G proteine) i intracelularne domene ICD (Kowatsch i sur. 2019) (slika 4). CRD i transmembranska domena imaju vezna mjesta za koja se mogu vezati kolesterol, oksisterol (Byrne i sur. 2016) i mnoge druge male molekule (Byrne i sur. 2018). ICD ima važnu ulogu u lokalizaciji Smo i aktiviranju daljnje kaskade reakcija u signalnom putu (Varjosalo i sur. 2006). Smo se naziva pozitivnim regulatorom puta jer, ukoliko on sam nije inhibiran, potiče daljnju signalizaciju (Murone i sur. 1999).



Slika 4: Shematski prikaz strukture Smo. Smo je građen od 4 domene: CRD (domena bogata cisteinom; engl. cysteine-rich domain), LD (engl. linker domains), transmembranske domene sastavljene od 7 uzvojnica (tipičan izgled receptora koji veže G proteine) i ICD (intracelularna domena) Slika preuzeta iz Kowatsch i sur. 2019

3.4 Proteini Gli

Proteini Gli (engl. Glioma-associated oncogene) transkripcijski su faktori prisutni u kralježnjaka i homologni proteinu Ci (Cubitus interruptus) vinske mušice. Dobili su ime prema glioblastomu iz kojeg su prvi put izolirani (Kinzler i sur. 1987). Sadrže domenu „cinkov prst“ koja služi za vezanje na sekvencu DNA ciljnih gena kako bi potakli ili inhibirali transkripciju (Sasaki i sur. 1997). Mutacija u toj domeni onemogućuje funkcioniranje proteina (Liu i sur. 1998).

Kod kralježnjaka postoje tri gena koji kodiraju za transkripcijske faktore Gli: *Gli1*, *Gli2* i *Gli3*. *Gli1* ima samo aktivacijsku funkciju, a *Gli2* i *Gli3* mogu biti i aktivatori i represori (Sasaki i sur. 1999). Ovisno o prisutnosti liganda dolazi do cijepanja proteina GliFL (engl. full-length Gli) na GliA (Gli aktivacijski oblik) ili GliR (Gli represorski oblik). *Gli2* je većinom u aktivacijskom obliku, a *Gli3* u represorskom obliku. Omjer pojedinih oblika proteina Gli može određivati aktivnost puta, te se naziva Gli kod. Mutacije u genu *Gli3* povezuju se Greigovim sindromom cefalopolisindaktilije (GCPS) te Pallister-Hall sindromom (PHS) (Teglund i Toftgård 2010).

3.5 Protein Sufu i Kif7

Protein Sufu (engl. suppressor of fused) i kinezin Kif7 bitni su regulatori signalnog puta Hh. Zajedno s faktorima Gli čine proteinski kompleks. Sufu je negativan regulator puta, vezanjem za Gli sprječava njegovu translokaciju u jezgru i aktivaciju gena (Humke i sur. 2010). Također održava faktor Gli u obliku GliFL na način da sprječava njegovu degradaciju što omogućuje modifikaciju u oblik GliR kada nema liganda, odnosno oblik GliA u prisutnosti liganda (Chen i sur. 2009a). Kinezin Kif7 ima ulogu u lokalizaciji proteina Gli, pa time i cijelog kompleksa.

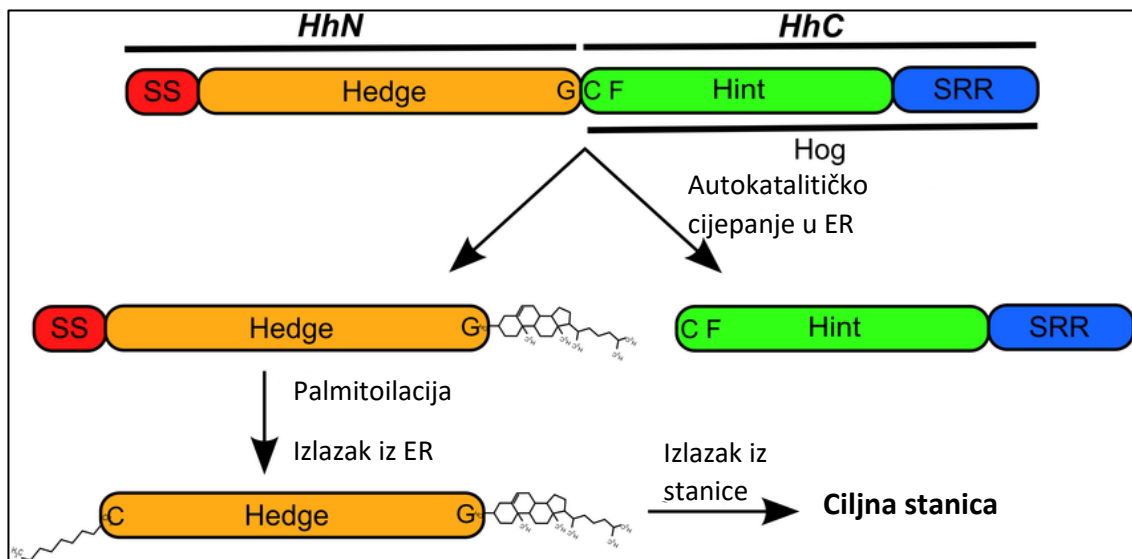
3.6 Primarna cilija

Primarna cilija igra važnu ulogu u putu Hh u kralježnjaka. To je nepokretna cilija, strukturom slična pokretnim cilijama. Izgrađena je od devet mikrotubularnih dubleta složenih u krug, no za razliku od pokretne cilije nema središnji par mikrotubula (Kiefer 2010). Kao i pokretne cilije, nastaje iz bazalnog tijela. Komponente signalnog puta lokaliziraju se na određenim mjestima u primarnoj ciliji ovisno o aktivnosti puta (Goetz i Anderson 2010; Nozawa i sur. 2013). Mutacije u genima odgovornim za formaciju primarne cilije uzrokuju da stanica ne može reagirati na signal (Huangfu i sur. 2003).

4. Signalizacija puta Hedgehog

4.1 Modifikacija proteina Hh

Za prijenos signala bitna je već početna modifikacija proteina Hh (slika 5). Ona se odvija u endoplazmatskom retikulumu (ER). Prvo se odvija autokatalitičko cijepanje prekursora na dva fragmenta, HhN i HhC (Lee i suradnici 1994), a zatim se na C-terminalni dio fragmenta HhN veže molekula kolesterola (Beachy i sur 1997). Oba procesa uzrokovana su aktivnošću fragmenta HhC. Potom se na N-terminalni dio fragmenta HhN, iza signalne sekvence, nadodaje palmitoilna skupina palmitinske kiseline (Chen i sur. 2004) uz pomoć enzima Skinny hedgehog (Ski) vinske mušice (Chamoun i sur 2001), odnosno hedgehog acetiltransferaze sisavaca (Buglino i Resh 2008). Tako aktivirani protein može se izlučiti iz stanice.



Slika 5: Modifikacija prekursora Hh u endoplazmatskom retikulumu. Prekursor proteina Hh sastoji se od domena Hedge i Hog te signalne sekvence (ss). On prolazi kroz autokatalitičko cijepanje te se na C-terminalni kraj domene Hedge veže molekula kolesterola. Oba procesa uzrokovana su aktivnošću domene Hog. Prije samog izlaska iz endoplazmatskog retikuluma na N-terminalni kraj domene Hedge nadodaje se palmitoilna skupina palmitinske kiseline. Tako modificiran protein može izaći iz stanice. Slika preuzeta i prilagođena prema Pereira i sur. 2014. HhN: N-terminalna domena, HhC: C-terminalna domena, SRR: regija koja prepoznaje sterol

4.2 Prijenos proteina Hh

U izlučivanju proteina Hh iz stanice sudjeluje membranski protein Dispatched (Disp) (Burke i sur. 1999) uz pomoć proteina Scube2 (Creanga i sur, 2012; Tukachinsky i sur. 2012).

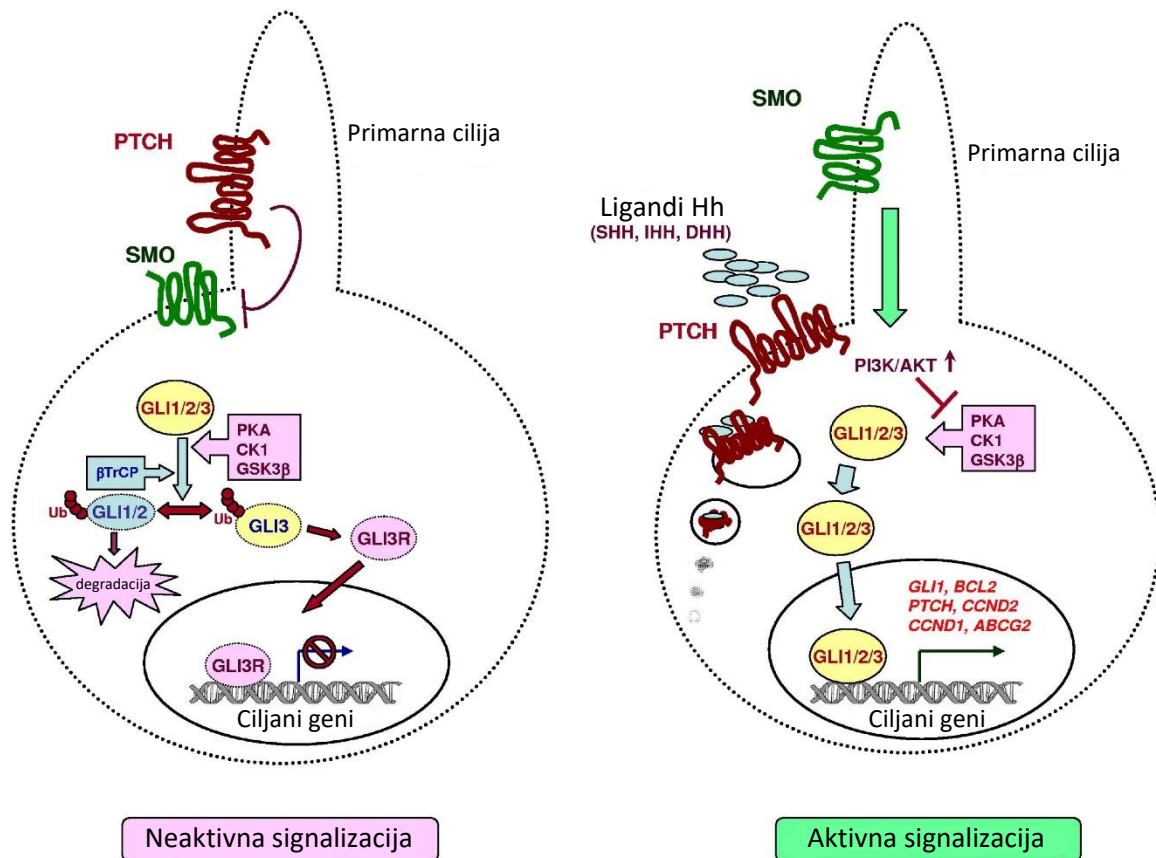
Poznato je da Hh može tvoriti multimerne komplekse (Chen i sur. 2004) i povezivati se s lipoproteinskim česticama (Panáková i sur. 2005). To, kao i interakcija s izvanstaničnim proteinima omogućuje kretanje proteina Hh od stanice koja ga luči do okolnih stanica, tj. autokrino i parakrino djelovanje (Gallet i sur. 2006).

4.3 Kanonski put

Signalni put Hh je neaktivan kada nema liganda Hh, odnosno aktivan kada ga ima. Kad nema Hh, Ptch1 inhibira akumulaciju Smo na membrani primarne cilije. Pretpostavlja se da to čini tako što uklanja oksisterole iz citoplazme (Corcoran i Scott 2006). Transkripcijski faktor Gli vezan je za kinezin Kif7 i Sufu (engl. suppressor of fused) u proteinski kompleks. Oni održavaju Gli u njegovoj punoj duljini (GliFL) i lokaliziraju ga u primarnoj ciliji. To omogućuje kinazama PKA (protein kinaza A), GSK3 β (kinaza glikogen sintaze 3) i CK1 (kazein kinaza 1) da u nedostatku Hh fosforiliraju Gli. Fosforilacija Gli potiče proteolitičko cijepanje pri čemu dolazi do konverzije GliFL u oblik GliR. GliR putuje u jezgru gdje inhibira transkripciju ciljnih gena.

Ukoliko postoje proteini Hh u staničnom okolišu, oni se vežu za receptor Patched te se zajedno s receptorom internaliziraju i degradiraju. Rezultat toga je to da Smo više nije inhibiran te se može akumulirati na membrani primarne cilije. Kif7 i Sufu, potaknuti aktivnošću Smo otpuštaju faktore Gli. To omogućuje nastanak GliA koji putuje u jezgru i aktivira transkripciju ciljnih gena kao što su: *Ptch*, *Gli1*, *Hip*, *BCL2*, *ciklin D* i drugi (Slika 6).

Opisani put je signalni put u kralježnjaka, no i u vinske mušice put funkcionira na veoma sličan način. Razlika je u molekulama koje sudjeluju u putu: transkripcijski faktor Ci te proteinski kompleks kojeg čine Ci, Cos2, Fu i Sufu. Također signalni put u vinske mušice je neovisan o postajanju primarne cilije.



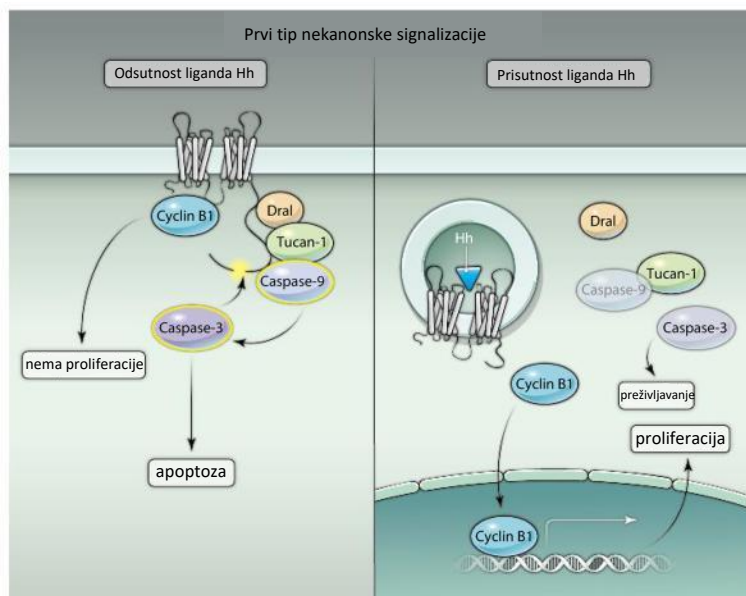
Slika 6: Shematski prikaz kanonskog signalnog puta Hh. Prikaz lijevo: Ukoliko nema liganda, Ptc sprječava akumulaciju Smo u primarnoj ciliji. Faktori Gli su fosforilirani putem kinaza PKA, CK1 i GSK3β te dolazi do nastanka oblika GliR koji odlazi u jezgru i inhibira transkripciju gena. Prikaz desno: Prisutni ligand veže se za receptor što dovodi do njihove internalizacije i razgradnje. Smo se akumulira na membrani cilije i sprječava fosforilaciju faktora Gli i omogućuje njihovu konverziju u aktivacijski oblik (GliA) koji odlazi u jezgru i potiče transkripciju ciljanih gena. Slika preuzeta i prilagođena prema Ok i sur. 2012.

4.4 Nekanonski put

U nekanonsku signalizaciju ulaze putovi koji su neovisni o faktorima Gli (Jenkins 2009). Zasad je poznato da postoje dva takva puta: put povezan s drugim funkcijama proteina Ptc, neovisno o njegovoj sposobnosti inaktivacije Smo i put povezan s drugim funkcijama proteina Smo nevezanim s kontrolom faktora Gli.

Prvi tip nekanonske signalizacije povezan je s aktivnosti proteina Ptc, odnosno njegovom funkcijom u kontroli proliferacije i apoptoze. Patched u odsustvu proteina Hh veže ciklin B (koji je sastavni dio kompleksa ciklina i kinaza ovisnih o ciklinu, MPF-a; engl. M-phase

promoting factor) i sprječava njegov odlazak u jezgru, a samim time i njegovu aktivnost (Barnes i sur. 2001). Osim ciklina B, Ptch također može vezati i proapoptotski kompleks koji se sastoji od kaspaze-9, proteina Dral i Tucan-1. Ptch svojom aktivnošću aktivira kaspazu-9 koja potiče kaskadu reakcija apoptoze. Ukoliko se za Ptch veže protein Hh, ne može doći do vezanja niti ciklina B, niti proapoptotskog kompleksa. Posljedica toga je ulazak u stanični ciklus, stanično preživljenje i proliferacija (slika 7).



Slika 7: Shematski prikaz nekanonske signalizacije tipa 1. Lijevi prikaz: U odsustvu proteina Hh, Ptch veže ciklin B i proapoptotski kompleks. To sprječava proliferaciju i potiče apoptozu. Desni prikaz: Ukoliko se za Ptch veže protein Hh, ne može doći do vezanja niti ciklina B, niti proapoptotskog kompleksa. Posljedica toga je ulazak u stanični ciklus i odsutnost apoptoze. Slika preuzeta i prilagođena prema Robbins i sur. 2012.

Drugi tip nekanonskog puta ima ulogu u regulaciji aktinskog citoskeleta te je ovisan o aktivnosti proteina Smo. Smo aktivira male GTP-aze iz obitelji Rho: RhoA i Rac1 (Polizio i sur. 2011). To se odvija pomoću kinaze PI3K i G proteina u fibroblastima te proteina Tiam1 (Sasaki i sur. 2010) ili kinaze SFK (Yam i sur. 2009) u neuronima.

5. Uloga puta Hedgehog u razvoju

Proteini Hh spadaju u skupinu tvari koje se nazivaju morfogeni. Njihove različite koncentracije dovode do različitih posljedica što uzrokuje diferencijaciju stanica, a to je jedna od glavnih uloga signalnog puta Hh tijekom embrionalnog razvoja. Razlika u koncentraciji, tj. koncentracijski gradijent nastaje lučenjem proteina Hh u međustanični prostor. Naime, stanice koje su bliže izvora izložene su većoj koncentraciji proteina, za razliku od udaljenijih stanica do kojih dopiru niže koncentracije proteina Hh. Uloga koncentracijskog gradijenta u razvoju dobro je predstavljena na primjeru uloge signalnog puta Hh u razvoju udova i prstiju u kralježnjaka.

Ud u kralježnjaka se razvija iz zametne kvržice uda (engl. limb bud). Na njegovoj posteriornoj strani nalazi se zona ZPA (engl. zone of polarizing activity), čije stanice luče proteine Shh (Riddle i sur. 1993). Koncentracija i vrijeme izloženosti proteinima Shh utječe na to koji će se prst razviti (Harfe i sur. 2004). Naime prsti 5 (mali prst) i 4 (prstenjak) te dio trećeg prsta (srednji prst) nastaju direktno iz potomaka stanica koje izlučuju proteine Shh. Pri tome prst 5 je najdulje izložen Shh, a prst 4 je izložen nešto kraće. Prst 3 je još kraće izložen nešto nižoj koncentraciji Shh, prst 2 (kažiprst) je izložen najnižoj koncentraciji, dok prst 1 (palac) uopće nije izložen (Harfe i sur. 2004).

Kao što je ranije rečeno, u kralježnjaka postoje tri homologa Hh (Shh, Ihh i Dhh). Oni su aktivni u različitim organskim sustavima (Echelard i sur. 1993), pa je tako Shh je uključen u razvoj mnogih organa i organskih sustava, a neki od njih su središnji živčani sustav (Litingtung i Chiang 2000), udovi (Laufer i sur. 1994), zubi (Hardcastle i sur. 1998) i pluća (Bellusci i sur. 1997). Mutacije u genu *Shh* mogu dovesti do holoprozencefalije (Dubourg i sur. 2007). Holoprozencefalija je urođena mana mozga koja nastaje kad se embrijski prozencefalon ne razdvoji u potpunosti na polutke.

Ihh ima ulogu u diferencijaciji hondrocita tijekom endohondralne osifikacije, oblikovanja kostiju iz hrskavica (Vortkamp i sur. 1996), a mutacija ovog gena uzrokuje brahidaktiliju tipa A1 (BDA1) (Ma i sur. 2011). BDA1 je dominantna autosomno nasljedna bolest, a njene karakteristike su kratke kosti zapešća i članaka prstiju, dodatne kosti u pešću te hipoplazija palčane kosti. Ihh također ima ulogu u formiranju gastrointestinalnog trakta zajedno sa Shh (van den Brink 2007). Dhh ima ulogu u diferencijaciji muških spolnih stanica (Bitgood i sur. 1996) te

je mutacija Dhh povezana s nastankom gonadne disgeneze XY (Werner i sur. 2015) poznate kao Swyerov sindrom.

6. Uloga puta Hh u nastanku tumora

Kontrola staničnog ciklusa veoma je važna jer u protivnom dolazi do nekontrolirane proliferacije što za posljedicu može imati nastanak tumora. Tumor je bolest koja je okarakterizirana nekontroliranom proliferacijom stanica. Kao što je ranije spomenuto, signalni put Hh ima ulogu u kontroli proliferacije stanica. To se može odvijati kanonskim putem te u tom slučaju put Hh aktivira transkripciju gena potrebnih za stanični ciklus. U vinske mušice to su geni za sintezu ciklina D i ciklina E (Duman-Scheel i sur. 2002), a kod sisavaca za ciklin D1 i D2 (Mill i sur. 2003). Također, proliferacija je i pod kontrolom nekanonske signalizacije, interakcijom proteina Ptch i ciklina B (Barnes i sur. 2001). Stoga nastanak tumora može biti potaknut ukoliko signalni put Hh ima pojačanu aktivnost u tkivima u kojima inače nije aktivan.

Do nenormalne aktivacije signalnog puta Hh može doći iz više razloga: mutacijom neke od komponenti puta (npr, mutacije proteina Ptch ili Smo) ili nekontroliranim lučenjem proteina Hh (od strane tumorskih stanica) (Hahn i sur. 1996; Merchant i Matsui 2010).

Mehanizam nastanka tumora kod kojeg su proteini puta Ptch ili Smo mutirani naziva se i mehanizmom neovisnim o ligandu jer nije potrebno vezanje proteina Hh da se aktivira signalni put. Mutacija koja inaktivira protein Ptch put je pronađena kod bolesnika sa sindromom bazalnih stanica nevusa (BCNS; engl. basal cell nevus syndrome) poznatim kao Gorlinov sindrom. Ljudi koji boluju od ovog sindroma imaju predispoziciju za oboljevanje od bazocelularnog karcinoma kože (BCC) i meduloblastoma (MB) (Hahn i sur. 1996). Osim mutacija proteina Ptch, BCC mogu izazvati i mutacije koje aktiviraju Smo te mutacije kod proteina Sufu. Na ovakav način nastaju i brojni drugi tumori.

Drugi način koji dovodi do nenormalne aktivacije puta naziva se put ovisan o ligandu Hh. Tumorske stanice izlučuju proteine Hh, koji djeluju parakrino i autokrino, potičući nekontrolirani rast tumora (Scales i de Sauvage 2009). Neki od tumora kod kojih je uočena ovakva aktivacija puta su tumori gornjeg gastrointestinalnog trakta (Berman i sur. 2003), gušterače, jajnika i endometrija (Bhattacharya i sur. 2008; Liao i sur. 2009) te prostate (Chen i sur. 2009b; Karhadkar, i sur. 2004).

7. Inhibitori puta Hedgehog

Liječenje tumora je individualiziran proces koji uvelike ovisi o vrsti i uzroku nastanka tumora. To vrijedi i za tumore nastale poremećajima u signalnom putu Hedgehog. Osim uobičajenih metoda liječenja (operacija, kemoterapija i radioterapija), sve se više radi na razvoju terapija koje inhibiraju put Hh, odnosno ciljano djeluju na uzrok nenormalne aktivnosti puta, pogotovo kod pacijenata s teškom dijagnozom. Do sada postoje tri molekulske terapije koje su odobrene od strane agencije FDA (U.S. Food and Drug Administration), a to su: vismodegib, sonidegib i arsenov trioksid, dok su mnoge druge u raznim fazama ispitivanja (Rimkus i sur. 2016). Općenito govoreći, inhibitori signalnog puta dijele se ovisno o tome na koji dio puta djeluju te tako postoje inhibitori proteina Hh, Smo i Gli.

Neki od inhibitora proteina Hh su 5E1, robotnikinin te RU-SKI 43. Robotnikinin je molekula koja se veže za protein Hh u međustaničnom prostoru (Stanton i sur. 2009), a RU-SKI 43 je inhibitor hedgehog acetiltransferaze koja je bitna u modifikaciji proteina Hh (Petrova i sur. 2013). U oba slučaja spriječeno je vezanje liganda za Ptch te je tako inhibiran signalni put.

Vismodegib (GDC-0449) i sonidegib (LDE-225) pripadaju inhibitorima proteina Smo te su oni jedni od najčešće korištenih spojeva u tumorskim terapijama za liječenje BCC-a. Inhibiraju Smo na način da se direktno vežu za njega, onemogućavajući daljnju signalnu kaskadu. Osim njih postoje mnogi drugi, a jedan od njih je i ciklopamin. Ciklopamin je steroidni alkaloid i prirodni inhibitor Smo, izoliran iz čemerike *Veratrum californicum* 1965 godine (McFerren 2006). Krave koje su pasle ovu biljku rađale su telad s poremećenim razvojem očiju, imala su samo jedno oko. Njegovo otkriće potaklo je znanstvenike na razvoj lijekova za borbu protiv raka koji se temelje na inhibiciji signalnog puta Hh (Cooper i su. 1998; Incardona i sur. 1998). Iako su inhibitori Smo učinkoviti u terapijama, istraživanja su pokazala da korištenje može potaknuti razvoj mutacija koje za posljedicu imaju otpornost prema terapiji (Dijkgraaf i sur. 2011; Laukkanen i Castellone 2016).

Osim inhibitora proteina Hh i Smo, postoje i inhibitori Gli. Oni se koriste kada je u tumorskim stanicama prevelika aktivacija faktora Gli. Neki od njih su arsenov trioksid, GANT56, GANT-6 i HPI-1. Oni mogu djelovati na način da ometaju vezanje faktora Gli na sekvencu DNA (kao npr GANT) ili da utječu na reakcije u citoplazmi kao što su posttranslacijske modifikacije (HPI-1) (Hyman i sur. 2009), lokalizacija te degradacija (arsenov trioksid).

8. Zaključak

Signalni put Hedgehog je veoma važan i složen put. Iako je prošlo četrdesetak godina od njegova otkrića i svake se godine otkrije nešto novo, on za sobom još uvijek povlači brojne nepoznanice. Daljnja istraživanja pojedinih komponenti puta mogu ukazati na do sad nepoznate funkcije i sposobnosti tih komponenti u međusobnoj interakciji, što može pridonijeti boljem razumijevanju pojedinosti regulacije samog puta. S obzirom na kompleksnost interakcija signalnog puta Hedgehog s drugim signalnim putevima, moguće je očekivati otkriće još nekog načina nekanonske signalizacije. U sklopu s time, omogućuje se razvoj novih lijekova i metoda kontrole tumorskih stanica. To je trenutno veoma potrebno zbog činjenice da korištenje inhibitora Smo, koji se od svih inhibitora najviše upotrebljavaju u liječenju, može potaknuti razvoj mutacija koje za posljedicu imaju otpornost prema terapiji.

Sve u svemu, nova istraživanja signalnog puta Hedgehog mogu otvoriti vrata mnogobrojnim mogućnostima u svijetu medicine.

9. Literatura

1. Barnes, E. A., Kong, M., Ollendorff, V., & Donoghue, D. J. (2001). Patched1 interacts with cyclin B1 to regulate cell cycle progression. *The EMBO journal*, *20*(9), 2214–2223.
2. Beachy, P. A., Cooper, M. K., Young, K. E., von Kessler, D. P., Park, W. J., Hall, T. M., Leahy, D. J., & Porter, J. A. (1997). Multiple roles of cholesterol in hedgehog protein biogenesis and signaling. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*, *62*, 191–204.
3. Bellusci, S., Furuta, Y., Rush, M. G., Henderson, R., Winnier, G., & Hogan, B. L. (1997). Involvement of Sonic hedgehog (Shh) in mouse embryonic lung growth and morphogenesis. *Development (Cambridge, England)*, *124*(1), 53–63.
4. Berman, D. M., Karhadkar, S. S., Maitra, A., Montes De Oca, R., Gerstenblith, M. R., Briggs, K., Parker, A. R., Shimada, Y., Eshleman, J. R., Watkins, D. N., & Beachy, P. A. (2003). Widespread requirement for Hedgehog ligand stimulation in growth of digestive tract tumours. *Nature*, *425*(6960), 846–851.
5. Bhattacharya, R., Kwon, J., Ali, B., Wang, E., Patra, S., Shridhar, V., & Mukherjee, P. (2008). Role of hedgehog signaling in ovarian cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, *14*(23), 7659–7666.
6. Bitgood, M. J., Shen, L., & McMahon, A. P. (1996). Sertoli cell signaling by Desert hedgehog regulates the male germline. *Current biology : CB*, *6*(3), 298–304.
7. Buglino, J. A., & Resh, M. D. (2008). Hhat is a palmitoyltransferase with specificity for N-palmitoylation of Sonic Hedgehog. *The Journal of biological chemistry*, *283*(32), 22076–22088.
8. Burglin, T.R. (2008a). The Hedgehog protein family. *Genome Biology* *9*: 241
9. Burglin, T.R. (2008b). Evolution of hedgehog and hedgehog-related genes, their origin from Hog proteins in ancestral eukaryotes and discovery of a novel Hint motif. *BMC Genomics* *9*: 127.
10. Burke, R., Nellen, D., Bellotto, M., Hafen, E., Senti, K. A., Dickson, B. J., & Basler, K. (1999). Dispatched, a novel sterol-sensing domain protein dedicated to the release of cholesterol-modified hedgehog from signaling cells. *Cell*, *99*(7), 803–815.

11. Byrne, E. F., Luchetti, G., Rohatgi, R., & Siebold, C. (2018). Multiple ligand binding sites regulate the Hedgehog signal transducer Smoothed in vertebrates. *Current opinion in cell biology*, *51*, 81–88.
12. Byrne, E., Sircar, R., Miller, P. S., Hedger, G., Luchetti, G., Nachtergaele, S., Tully, M. D., Mydock-McGrane, L., Covey, D. F., Rambo, R. P., Sansom, M., Newstead, S., Rohatgi, R., & Siebold, C. (2016). Structural basis of Smoothed regulation by its extracellular domains. *Nature*, *535*(7613), 517–522.
13. Carpenter, D., Stone, D. M., Brush, J., Ryan, A., Armanini, M., Frantz, G., Rosenthal, A., & de Sauvage, F. J. (1998). Characterization of two patched receptors for the vertebrate hedgehog protein family. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *95*(23), 13630–13634.
14. Chamoun, Z., Mann, R. K., Nellen, D., von Kessler, D. P., Bellotto, M., Beachy, P. A., & Basler, K. (2001). Skinny hedgehog, an acyltransferase required for palmitoylation and activity of the hedgehog signal. *Science (New York, N.Y.)*, *293*(5537), 2080–2084.
15. Chen, M., Tanner, M., Levine, A. C., Levina, E., Ohouo, P., & Buttyan, R. (2009b). Androgenic regulation of hedgehog signaling pathway components in prostate cancer cells. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, *8*(1), 149–157.
16. Chen, M. H., Li, Y. J., Kawakami, T., Xu, S. M., & Chuang, P. T. (2004). Palmitoylation is required for the production of a soluble multimeric Hedgehog protein complex and long-range signaling in vertebrates. *Genes & development*, *18*(6), 641–659.
17. Chen, M. H., Wilson, C. W., Li, Y. J., Law, K. K., Lu, C. S., Gacayan, R., Zhang, X., Hui, C. C., & Chuang, P. T. (2009a). Cilium-independent regulation of Gli protein function by Sufu in Hedgehog signaling is evolutionarily conserved. *Genes & development*, *23*(16), 1910–1928.
18. Chen, X., Tukachinsky, H., Huang, C. H., Jao, C., Chu, Y. R., Tang, H. Y., Mueller, B., Schulman, S., Rapoport, T. A., & Salic, A. (2011). Processing and turnover of the Hedgehog protein in the endoplasmic reticulum. *The Journal of cell biology*, *192*(5), 825–838.
19. Cooper, M. K., Porter, J. A., Young, K. E., & Beachy, P. A. (1998). Teratogen-mediated inhibition of target tissue response to Shh signaling. *Science (New York, N.Y.)*, *280*(5369), 1603–1607.

20. Cooper, M. K., Wassif, C. A., Krakowiak, P. A., Taipale, J., Gong, R., Kelley, R. I., Porter, F. D., & Beachy, P. A. (2003). A defective response to Hedgehog signaling in disorders of cholesterol biosynthesis. *Nature genetics*, *33*(4), 508–513.
21. Corcoran, R. B., & Scott, M. P. (2006). Oxysterols stimulate Sonic hedgehog signal transduction and proliferation of medulloblastoma cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *103*(22), 8408–8413.
22. Creanga, A., Glenn, T. D., Mann, R. K., Saunders, A. M., Talbot, W. S., & Beachy, P. A. (2012). Scube/You activity mediates release of dually lipid-modified Hedgehog signal in soluble form. *Genes & development*, *26*(12), 1312–1325.
23. Crompton, T., Outram, S. V., & Hager-Theodorides, A. L. (2007). Sonic hedgehog signalling in T-cell development and activation. *Nature reviews. Immunology*, *7*(9), 726–735.
24. Dijkgraaf, G. J., Aliche, B., Weinmann, L., Januario, T., West, K., Modrusan, Z., Burdick, D., Goldsmith, R., Robarge, K., Sutherlin, D., Scales, S. J., Gould, S. E., Yauch, R. L., & de Sauvage, F. J. (2011). Small molecule inhibition of GDC-0449 refractory smoothed mutants and downstream mechanisms of drug resistance. *Cancer research*, *71*(2), 435–444.
25. Dubourg, C., Bendavid, C., Pasquier, L., Henry, C., Odent, S., & David, V. (2007). Holoprosencephaly. *Orphanet journal of rare diseases*, *2*, 8.
26. Duman-Scheel, M., Weng, L., Xin, S., & Du, W. (2002). Hedgehog regulates cell growth and proliferation by inducing Cyclin D and Cyclin E. *Nature*, *417*(6886), 299–304.
27. Echelard, Y., Epstein, D. J., St-Jacques, B., Shen, L., Mohler, J., McMahon, J. A., & McMahon, A. P. (1993). Sonic hedgehog, a member of a family of putative signaling molecules, is implicated in the regulation of CNS polarity. *Cell*, *75*(7), 1417–1430.
28. Gailani, M. R., Stähle-Bäckdahl, M., Leffell, D. J., Glynn, M., Zaphiropoulos, P. G., Pressman, C., Undén, A. B., Dean, M., Brash, D. E., Bale, A. E., & Toftgård, R. (1996). The role of the human homologue of *Drosophila* patched in sporadic basal cell carcinomas. *Nature genetics*, *14*(1), 78–81.
29. Gallet, A., Ruel, L., Staccini-Lavenant, L., & Théron, P. P. (2006). Cholesterol modification is necessary for controlled planar long-range activity of Hedgehog in *Drosophila* epithelia. *Development (Cambridge, England)*, *133*(3), 407–418.

30. Goetz, S. C., & Anderson, K. V. (2010). The primary cilium: a signalling centre during vertebrate development. *Nature reviews. Genetics*, *11*(5), 331–344.
31. Hahn, H., Wicking, C., Zaphiropoulos, P. G., Gailani, M. R., Shanley, S., Chidambaram, A., Vorechovsky, I., Holmberg, E., Uden, A. B., Gillies, S., Negus, K., Smyth, I., Pressman, C., Leffell, D. J., Gerrard, B., Goldstein, A. M., Dean, M., Toftgard, R., Chenevix-Trench, G., Wainwright, B., Bale, A. E. (1996). Mutations of the human homolog of *Drosophila* patched in the nevoid basal cell carcinoma syndrome. *Cell*, *85*(6), 841–851.
32. Hardcastle, Z., Mo, R., Hui, C. C., & Sharpe, P. T. (1998). The Shh signalling pathway in tooth development: defects in *Gli2* and *Gli3* mutants. *Development (Cambridge, England)*, *125*(15), 2803–2811.
33. Harfe, B. D., Scherz, P. J., Nissim, S., Tian, H., McMahon, A. P., & Tabin, C. J. (2004). Evidence for an expansion-based temporal Shh gradient in specifying vertebrate digit identities. *Cell*, *118*(4), 517–528.
34. Huangfu, D., Liu, A., Rakeman, A. S., Murcia, N. S., Niswander, L., & Anderson, K. V. (2003). Hedgehog signalling in the mouse requires intraflagellar transport proteins. *Nature*, *426*(6962), 83–87.
35. Humke, E. W., Dorn, K. V., Milenkovic, L., Scott, M. P., & Rohatgi, R. (2010). The output of Hedgehog signaling is controlled by the dynamic association between Suppressor of Fused and the Gli proteins. *Genes & development*, *24*(7), 670–682.
36. Hyman, J. M., Firestone, A. J., Heine, V. M., Zhao, Y., Ocasio, C. A., Han, K., Sun, M., Rack, P. G., Sinha, S., Wu, J. J., Solow-Cordero, D. E., Jiang, J., Rowitch, D. H., & Chen, J. K. (2009). Small-molecule inhibitors reveal multiple strategies for Hedgehog pathway blockade. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *106*(33), 14132–14137.
37. Incardona, J. P., Gaffield, W., Kapur, R. P., & Roelink, H. (1998). The teratogenic Veratrum alkaloid cyclopamine inhibits sonic hedgehog signal transduction. *Development (Cambridge, England)*, *125*(18), 3553–3562.
38. Ingham, P. W. (2000). How cholesterol modulates the signal. *Current biology : CB*, *10*(5), R180–R183.

39. Ingham, P. W., & McMahon, A. P. (2001). Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles. *Genes & development*, *15*(23), 3059–3087.
40. Ingham, P. W., Nakano, Y., & Seger, C. (2011). Mechanisms and functions of Hedgehog signalling across the metazoa. *Nature reviews. Genetics*, *12*(6), 393–406.
41. Jenkins, D. (2009). Hedgehog signalling: emerging evidence for non-canonical pathways. *Cellular signalling*, *21*(7), 1023–1034.
42. Karhadkar, S. S., Bova, G. S., Abdallah, N., Dhara, S., Gardner, D., Maitra, A., Isaacs, J. T., Berman, D. M., & Beachy, P. A. (2004). Hedgehog signalling in prostate regeneration, neoplasia and metastasis. *Nature*, *431*(7009), 707–712.
43. Kiefer, J. C. (2010). Primer and interviews: Diverse connections between primary cilia and Hedgehog signaling. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists*, *239*(4), 1255–1262.
44. Kinzler, K. W., Bigner, S. H., Bigner, D. D., Trent, J. M., Law, M. L., O'Brien, S. J., Wong, A. J., & Vogelstein, B. (1987). Identification of an amplified, highly expressed gene in a human glioma. *Science (New York, N.Y.)*, *236*(4797), 70–73.
45. Koonin, E. V. (1995). A protein splice-junction motif in hedgehog family proteins. *Trends in biochemical sciences*, *20*(4), 141–142.
46. Kowatsch, C., Woolley, R. E., Kinnebrew, M., Rohatgi, R., & Siebold, C. (2019). Structures of vertebrate Patched and Smoothed reveal intimate links between cholesterol and Hedgehog signalling. *Current opinion in structural biology*, *57*, 204–214.
47. Laufer, E., Nelson, C. E., Johnson, R. L., Morgan, B. A., & Tabin, C. (1994). Sonic hedgehog and Fgf-4 act through a signaling cascade and feedback loop to integrate growth and patterning of the developing limb bud. *Cell*, *79*(6), 993–1003.
48. Laukkanen, M. O., & Castellone, M. D. (2016). Hijacking the Hedgehog Pathway in Cancer Therapy. *Anti-cancer agents in medicinal chemistry*, *16*(3), 309–317.
49. Le, H., Kleinerman, R., Lerman, O. Z., Brown, D., Galiano, R., Gurtner, G. C., Warren, S. M., Levine, J. P., & Saadeh, P. B. (2008). Hedgehog signaling is essential for normal wound healing. *Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society*, *16*(6), 768–773.

50. Lee, J. J., Ekker, S. C., von Kessler, D. P., Porter, J. A., Sun, B. I., & Beachy, P. A. (1994). Autoproteolysis in hedgehog protein biogenesis. *Science (New York, N.Y.)*, 266(5190), 1528–1537.
51. Liao, X., Siu, M. K., Au, C. W., Wong, E. S., Chan, H. Y., Ip, P. P., Ngan, H. Y., & Cheung, A. N. (2009). Aberrant activation of hedgehog signaling pathway in ovarian cancers: effect on prognosis, cell invasion and differentiation. *Carcinogenesis*, 30(1), 131–140.
52. Litington, Y., & Chiang, C. (2000). Control of Shh activity and signaling in the neural tube. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists*, 219(2), 143–154.
53. Liu, C. Z., Yang, J. T., Yoon, J. W., Villavicencio, E., Pfendler, K., Walterhouse, D., & Iannaccone, P. (1998). Characterization of the promoter region and genomic organization of GLI, a member of the Sonic hedgehog-Patched signaling pathway. *Gene*, 209(1-2), 1–11.
54. Ma, G., Yu, J., Xiao, Y., Chan, D., Gao, B., Hu, J., He, Y., Guo, S., Zhou, J., Zhang, L., Gao, L., Zhang, W., Kang, Y., Cheah, K. S., Feng, G., Guo, X., Wang, Y., Zhou, C. Z., & He, L. (2011). Indian hedgehog mutations causing brachydactyly type A1 impair Hedgehog signal transduction at multiple levels. *Cell research*, 21(9), 1343–1357.
55. Marigo, V., Davey, R. A., Zuo, Y., Cunningham, J. M., & Tabin, C. J. (1996). Biochemical evidence that patched is the Hedgehog receptor. *Nature*, 384(6605), 176–179.
56. McFerren, M. A. (2006). Useful plants of dermatology. VIII. The false hellebore (*Veratrum californicum*). *Journal of the American Academy of Dermatology*, 54(4), 718–720.
57. Merchant, A. A., & Matsui, W. (2010). Targeting Hedgehog--a cancer stem cell pathway. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 16(12), 3130–3140.
58. Microscope master: Four steps of cell signaling <https://www.microscopemaster.com/four-steps-of-cell-signaling.html> (pristupljeno 8.08. 2022.)

59. Mill, P., Mo, R., Fu, H., Grachtchouk, M., Kim, P. C., Dlugosz, A. A., & Hui, C. C. (2003). Sonic hedgehog-dependent activation of Gli2 is essential for embryonic hair follicle development. *Genes & development*, *17*(2), 282–294.
60. Ming, J. E., Roessler, E., & Muenke, M. (1998). Human developmental disorders and the Sonic hedgehog pathway. *Molecular medicine today*, *4*(8), 343–349.
61. Murone, M., Rosenthal, A., & de Sauvage, F. J. (1999). Hedgehog signal transduction: from flies to vertebrates. *Experimental cell research*, *253*(1), 25–33.
62. Nozawa, Y. I., Lin, C., & Chuang, P. T. (2013). Hedgehog signaling from the primary cilium to the nucleus: an emerging picture of ciliary localization, trafficking and transduction. *Current opinion in genetics & development*, *23*(4), 429–437.
63. Nüsslein-Volhard, C., & Wieschaus, E. (1980). Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature*, *287*(5785), 795–801.
64. Ok, C. Y., Singh, R. R., & Vega, F. (2012). Aberrant activation of the hedgehog signaling pathway in malignant hematological neoplasms. *The American journal of pathology*, *180*(1), 2–11.
65. Oro, A. E., & Higgins, K. (2003). Hair cycle regulation of Hedgehog signal reception. *Developmental biology*, *255*(2), 238–248.
66. Palma, V., Lim, D. A., Dahmane, N., Sánchez, P., Brionne, T. C., Herzberg, C. D., Gitton, Y., Carleton, A., Alvarez-Buylla, A., & Ruiz i Altaba, A. (2005). Sonic hedgehog controls stem cell behavior in the postnatal and adult brain. *Development (Cambridge, England)*, *132*(2), 335–344.
67. Panáková, D., Sprong, H., Marois, E., Thiele, C., & Eaton, S. (2005). Lipoprotein particles are required for Hedgehog and Wingless signalling. *Nature*, *435*(7038), 58–65.
68. Pereira, J., Johnson, W. E., O'Brien, S. J., Jarvis, E. D., Zhang, G., Gilbert, M. T., Vasconcelos, V., & Antunes, A. (2014). Evolutionary genomics and adaptive evolution of the Hedgehog gene family (Shh, Ihh and Dhh) in vertebrates. *PloS one*, *9*(12), e74132.
69. Petrova, E., Rios-Esteves, J., Ouerfelli, O., Glickman, J. F., & Resh, M. D. (2013). Inhibitors of Hedgehog acyltransferase block Sonic Hedgehog signaling. *Nature chemical biology*, *9*(4), 247–249.
70. Rahnama, F., Toftgård, R., & Zaphiropoulos, P. G. (2004). Distinct roles of PTCH2 splice variants in Hedgehog signalling. *The Biochemical journal*, *378*(Pt 2), 325–334.

71. Riddle, R. D., Johnson, R. L., Laufer, E., & Tabin, C. (1993). Sonic hedgehog mediates the polarizing activity of the ZPA. *Cell*, 75(7), 1401–1416.
72. Rimkus, T. K., Carpenter, R. L., Qasem, S., Chan, M., & Lo, H. W. (2016). Targeting the Sonic Hedgehog Signaling Pathway: Review of Smoothed and GLI Inhibitors. *Cancers*, 8(2), 22.
73. Robbins, D. J., Fei, D. L., & Riobo, N. A. (2012). The Hedgehog signal transduction network. *Science signaling*, 5(246), re6.
74. Ruiz-Gómez, A., Molnar, C., Holguín, H., Mayor, F., Jr, & de Celis, J. F. (2007). The cell biology of Smo signalling and its relationships with GPCRs. *Biochimica et biophysica acta*, 1768(4), 901–912.
75. Sasaki, H., Hui, C., Nakafuku, M., & Kondoh, H. (1997). A binding site for Gli proteins is essential for HNF-3beta floor plate enhancer activity in transgenics and can respond to Shh in vitro. *Development (Cambridge, England)*, 124(7), 1313–1322.
76. Sasaki, H., Nishizaki, Y., Hui, C., Nakafuku, M., & Kondoh, H. (1999). Regulation of Gli2 and Gli3 activities by an amino-terminal repression domain: implication of Gli2 and Gli3 as primary mediators of Shh signaling. *Development (Cambridge, England)*, 126(17), 3915–3924.
77. Sasaki, N., Kurisu, J., & Kengaku, M. (2010). Sonic hedgehog signaling regulates actin cytoskeleton via Tiam1-Rac1 cascade during spine formation. *Molecular and cellular neurosciences*, 45(4), 335–344.
78. Scales, S. J., & de Sauvage, F. J. (2009). Mechanisms of Hedgehog pathway activation in cancer and implications for therapy. *Trends in pharmacological sciences*, 30(6), 303–312.
79. Silva-Vargas, V., Lo Celso, C., Giangreco, A., Ofstad, T., Prowse, D. M., Braun, K. M., & Watt, F. M. (2005). Beta-catenin and Hedgehog signal strength can specify number and location of hair follicles in adult epidermis without recruitment of bulge stem cells. *Developmental cell*, 9(1), 121–131.
80. Stanton, B. Z., Peng, L. F., Maloof, N., Nakai, K., Wang, X., Duffner, J. L., Taveras, K. M., Hyman, J. M., Lee, S. W., Koehler, A. N., Chen, J. K., Fox, J. L., Mandinova, A., & Schreiber, S. L. (2009). A small molecule that binds Hedgehog and blocks its signaling in human cells. *Nature chemical biology*, 5(3), 154–156.

81. Taipale, J., & Beachy, P. A. (2001). The Hedgehog and Wnt signalling pathways in cancer. *Nature*, *411*(6835), 349–354.
82. Teglund, S., & Toftgård, R. (2010). Hedgehog beyond medulloblastoma and basal cell carcinoma. *Biochimica et biophysica acta*, *1805*(2), 181–208.
83. Varjosalo, M., Li, S. P., & Taipale, J. (2006). Divergence of hedgehog signal transduction mechanism between *Drosophila* and mammals. *Developmental cell*, *10*(2), 177–186.
84. Tukachinsky, H., Kuzmickas, R. P., Jao, C. Y., Liu, J., & Salic, A. (2012). Dispatched and scube mediate the efficient secretion of the cholesterol-modified hedgehog ligand. *Cell reports*, *2*(2), 308–320.
85. van den Brink, G. R. (2007). Hedgehog signaling in development and homeostasis of the gastrointestinal tract. *Physiological reviews*, *87*(4), 1343–1375.
86. Von Ohlen, T., Lessing, D., Nusse, R., & Hooper, J. E. (1997). Hedgehog signaling regulates transcription through cubitus interruptus, a sequence-specific DNA binding protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *94*(6), 2404–2409.
87. Vortkamp, A., Lee, K., Lanske, B., Segre, G. V., Kronenberg, H. M., & Tabin, C. J. (1996). Regulation of rate of cartilage differentiation by Indian hedgehog and PTH-related protein. *Science (New York, N.Y.)*, *273*(5275), 613–622.
88. Werner, R., Merz, H., Birnbaum, W., Marshall, L., Schröder, T., Reiz, B., Kavran, J. M., Bäumer, T., Capetian, P., & Hiort, O. (2015). 46,XY Gonadal Dysgenesis due to a Homozygous Mutation in Desert Hedgehog (DHH) Identified by Exome Sequencing. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, *100*(7), E1022–E1029.
89. Westendorp, B.F., van Dop, W.A., van den Brink, G.R. (2018). Chapter 4 - Hedgehog Signaling in Gastrointestinal Morphogenesis and Morphostasis, *Physiology of the Gastrointestinal Tract (Sixth Edition)*, Academic Press, str. 103-129, ISBN 9780128099544
90. Yam, P. T., Langlois, S. D., Morin, S., & Charron, F. (2009). Sonic hedgehog guides axons through a noncanonical, Src-family-kinase-dependent signaling pathway. *Neuron*, *62*(3), 349–362.

91. Zaphiropoulos, P. G., Undén, A. B., Rahnama, F., Hollingsworth, R. E., & Toftgård, R. (1999). PTCH2, a novel human patched gene, undergoing alternative splicing and up-regulated in basal cell carcinomas. *Cancer research*, 59(4), 787–792.

10. Životopis

Rođena sam 14.11.2000. godine u Rijeci. Završila sam Osnovnu školu Fran Krsto Frankopan 2015. godine u Krku. Maturirala sam 2019. godine u Prirodoslovno-grafičkoj školi Rijeka te iste godine upisala Prirodoslovno-matematički fakultet u Zagrebu. Govorim engleski jezik.