

Konstrukcija i validacija vektora za ekspresiju represorskog oblika proteina GLI3 u stanicama čovjeka

Brtan, Lucija

Master's thesis / Diplomski rad

2023

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:217:079669>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-01**



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Kemijски odsjek

Lucija Brtan

**Konstrukcija i validacija vektora za ekspresiju
represorskog oblika proteina GLI3 u stanicama
čovjeka**

Diplomski rad

predložen Kemijском odsjeku
Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu
radi stjecanja akademskog zvanja
magistre kemije

Zagreb, 2023. godina.

Ovaj diplomski rad izrađen je u Laboratoriju za nasljedni rak, Institut Ruđer Bošković pod mentorstvom dr.sc. Maje Sabol. Nastavnik imenovan od strane Kemijskog odsjeka je doc.dr.sc., Morana Dulić.

Diplomski rad izrađen je u okviru projekta Hrvatske zaklade za znanost pod nazivom „GLIcode - Regulacija GLI koda u tumorima ovisnim o BRAF/NRAS mutacijama“ (IP-2018-01-4889).

Zahvale

Hvala mojoj mentorici dr.sc. Maji Sabol na pruženoj prilici za izradu rada, na svom strpljenju ovoga svijeta kao i na svim riječima podrške tijekom rada. Neopisivo mi je drago što sam Vas susrela na svome obrazovnom putu jer uz Vas sam imala priliku upoznati znanost u pravom svjetlu i istinski ju zavoljeti. Kroz naše druženje naučila sam mnogo stvari koje se ne mogu pronaći u niti jednom udžbeniku – kako biti uspješna znanstvenica, ali i još divnija osoba.

Hvala voditelju Laboratorija za nasljedni rak, dr. sc. Petru Ozretiću, na ukazanom povjerenju i pruženoj prilici za izradu diplomskog rada. Također, ogromno hvala i svim ostalim djelatnicima - Nikolini, Matei, Josipi, Tini i Vesni na velikodušnoj pomoći, svom nesebično prenesenom znanju, podršci i strpljenju tijekom mog boravka na IRB! Zakon ste!

Puno hvala mojoj doc. dr. sc. Morani Dulić na trudu i vremenu uloženom u moj akademski napredak, posebno na toplim riječima i podršci onda kada bi trema bila jača od mene.

Hvala mojim dragim prijateljima, mojim životnim suputnicima, za sve lijepo trenutke. Bez vaše podrške, cijelo ovo putovanje bi bilo puno teže. Hvala dragoj Lani na svim skriptama, razgovorima, podršci i motivaciji, posebno onda kada je bilo teško! Najbolja si! Hvala i mojoj ekipi koja je uz mene od suza zbog „Fizike 1“ pa sve do jutarnjih fajrunta.

Hvala mojoj „seki“, mojoj Nikolini, na divnom prijateljstvu od kolijevke pa sve do groba. Što si tu za mene u bilo koje doba dana ili noći. Čast je imati takvu prijateljicu uz sebe!

Posebno i najveće hvala mojoj obitelji. Bez vaše ljubavi ja ne bih bila tu.

Mom dragom Mateju, u dobru i u zlu. Jednoj predivnoj ženi koja ima najtopliji zagrljaj – mojoj najdražoj majci Mirjani i čovjeku čije ruke nisu nikada dozvolile da padnem – mom jedinom i najdražem bratu Ivanu.

Ovaj rad posvećujem Vama i našoj obitelji. Kao spomen na sve teške trenutke koje smo skupa prebrodili.

Također, ovaj rad posvećujem svim oboljelima od malignih bolesti i njihovim obiteljima, u znak podrške kroz teška razdoblja. Vjerujem u znanost i nadam se da će jednog dana biti pronađena i dostupna adekvatna terapija svima potrebitima.

Iako više nismo zajedno na ovome svijetu, nadam se da si ponosan na mene kao što si bio do zadnjeg dana ovozemaljskog života. Hvala ti na najljepšoj uspomeni moga djetinjstva – na bezuvjetnoj ljubavi i vjeri. Sve ove godine si bio moj čuvar, moja motivacija i snaga.

Hvala dragi tata na svemu!

Sadržaj

SAŽETAK.....	XII
ABSTRACT	XIV
§ 1. UVOD.....	1
§ 2. LITERATURNI PREGLED	2
2.1. Signalni put Hedgehog-GLI (HH-GLI).....	2
2.1.1. Kanonska aktivacija signalnog puta Hedgehog-GLI.....	2
2.1.2. Nekanonska aktivacija signalnog puta Hedgehog-GLI.....	4
2.2. Transkripcijski faktori GLI	6
2.3. Genski lokus i domene u ljudskom GLI3	9
2.4. Mehanizmi procesiranja proteina GLI2 i GLI3 u represorske oblike	10
2.5. Utjecaji kemijskih tretmana na procesiranje proteina GLI3	12
2.5.1. Forskolin.....	12
2.5.2. Litijev klorid.....	13
2.5.3. MGI32	14
2.5.4. SAG (Smoothened agonist)	15
2.6. Biološka uloga GLI3 u embrionalnom razvoju.....	15
2.7. Biološka uloga GLI3 u razvoju genetskih poremećaja.....	17
2.8. Biološka uloga GLI3 u imunološkom sustavu.....	17
2.9. Biološka uloga GLI3 u tumorima	18
§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO	22
3.1. Materijali.....	22
3.1.1. Standardne kemikalije.....	22
3.1.2. Puferi i otopine	22
3.1.3. Hranjivi mediji i dodaci za uzgoj bakterija	23
3.1.4. Enzimi i nukleotidi	23
3.1.5. Početnice.....	23

3.1.6. Antitijela	24
3.1.7. Markeri veličine i boje	24
3.1.8. Komercijalni kompleti	24
3.1.9. Stanične linije	24
3.1.10. Hranjivi mediji i dodaci za uzgoj ljudskih stanica	25
3.1.11. Plazmidni vektori i inserti	25
3.1.12. Bakterijski sojevi	25
3.1.13. Ostalo	25
3.1.14. Pribor	25
3.1.15. Instrumenti	26
3.2. Metode	26
3.2.1. Konstrukcija vektora za ekspresiju represorskog oblika proteina GLI3 u stanicama čovjeka	26
3.2.1.1. Dizajn inserta „Gene Block Gli3R“	26
3.2.1.2. Digestija plazmidnog vektora i inserta	27
3.2.1.3. Ligacija plazmidnog vektora i inserta	30
3.2.1.4. Transformacija kompetentnih bakterija	30
3.2.1.5. Ispitivanje bakterijskih kolonija lančanom reakcijom polimeraze	31
3.2.1.6. Izolacija plazmidne DNA iz bakterija	34
3.2.1.7. Sekvenciranje izolirane plazmidne DNA	37
3.2.2. Validacija vektora za ekspresiju represorskog oblika proteina GLI3 u stanicama čovjeka	37
3.2.2.1. Rad sa staničnim kulturama	37
3.2.2.2. Nasađivanje stanica za pokuse	38
3.2.2.3. Tretmani stanica	39
3.2.2.4. Transfekcija stanica	40
3.2.2.5. Izolacija proteina iz stanica	42
3.2.2.6. Mjerenje koncentracije proteina BCA metodom	42
3.2.2.7. Western analiza	44
3.2.2.8. Imunofluorescencijska metoda (IF)	48
3.2.2.9. Izolacija RNA iz stanica	49
3.2.2.10. Metoda RT-qPCR	50
§ 4. REZULTATI I RASPRAVA	54
4.1. Analiza konstruiranog vektora za ekspresiju represorskog oblika proteina GLI3 u stanicama čovjeka	54
4.1.1. Dizajn Gene Block fragmenta GLI3R	54
4.1.2. Identifikacija transformiranih bakterijskih kolonija	56
4.1.3. Sekvenciranje plazmidne DNA	57

4.2. Validacija vektora za ekspresiju represorskog oblika proteina GLI3 u stanicama čovjeka	61
.....	
4.2.1. Optimizacija uvjeta vremena transfekcije ekspresijskog vektora <i>pcDNA4TOGLI3</i> i <i>pcDNA3-GLI3R</i>	61
.....	
4.2.2. Utjecaj tretmana i transfekcije na ekspresiju proteina <i>GLI3FL</i> i <i>GLI3R</i> u staničnim linijama <i>A375</i> i <i>WPMY-1</i>	64
.....	
4.2.3. Lokalizacija proteina <i>GLI3FL</i> i <i>GLI3R</i> u staničnim linijama <i>A375</i> i <i>WPMY-1</i>	67
.....	
4.2.4. Utjecaj tretmana i transfekcije na ekspresiju gena <i>GLI3</i> i <i>PTCH1</i> u staničnoj liniji <i>A375</i>	73
.....	
§ 5. ZAKLJUČAK	78
§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA	79
§ 7. LITERATURNI IZVORI	81
ŽIVOTOPIS	LXXXVII



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Kemijski odsjek

Diplomski rad

SAŽETAK

KONSTRUKCIJA I VALIDACIJA VEKTORA ZA EKSPRESIJU REPRESORSKOG OBLIKA PROTEINA GLI3 U STANICAMA ČOVJEKA Lucija Brtan

Proteini GLI važni su sudionici signalnog puta Hedgehog-GLI čiji se razni poremećaji u signalizaciji povezuju se s razvojnim deformacijama te onkološkim oboljenjima. U fokusu ovog rada nalazi se protein GLI3, jedan od tri izoforme proteina GLI. Protein GLI3 u svom punom obliku (GLI3FL) ima ulogu transkripcijskog aktivatora, dok njegov C-terminalni skraćeni oblik ima ulogu represora (GLI3R). Cilj ovog istraživanja je razviti *in vitro* alata za ispitivanje različitih funkcija GLI3FL i GLI3R u tumorskim stanicama. Konstruiran je vektor za ekspresiju GLI3R, a njegova validacija izvršena je na staničnim linijama s različitim proteinskom ekspresijom proteina GLI3. Uvjeti transfekcije su optimizirani na staničnoj liniji fibroblasta prostate WPMY-1 s niskom razinom ekspresije, a efekt transfekcije ispitan je na staničnoj liniji metastatskog melanoma A375 s visokom razinom ekspresije, te uspoređen s djelovanjem spojeva koji mijenjaju omjere GLI3FL/GLI3R. Nakon transfekcije staničnih linija, analizom po Westernu dokazana je povećana ekspresija proteina GLI3R, a RT-qPCR metodom je potvrđena povećana ekspresija gena *GLI3*. Imunofluorescencijskom metodom proteini GLI3 su lokalizirani u citoplazmi te u jezgri stanica.

(86 stranica, 39 slika, 13 tablica, 100 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj kemijskoj knjižnici Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Horvatovac 102a, Zagreb i Repozitoriju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

Ključne riječi: A375, protein GLI3, kloniranje, PTCH1, signalni put HH-GLI, transfekcija, WPMY-1

Mentor: dr. sc. Maja Sabol, v. zn. sur.

Nastavnik (imenovan od strane Kemijskog odsjeka): doc. dr. sc. Morana Dulić

Ocjenitelji:

1. Doc. dr. sc. Morana Dulić
 2. Prof. dr. sc. Željka Soldin
 3. Prof. dr. sc. Iva Juranović Cindrić
- Zamjena: doc. dr. sc. Marko Močibob

Datum diplomskog ispita: 16. veljače 2023.



University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry

Diploma Thesis

ABSTRACT

CONSTRUCTION AND VALIDATION OF THE EXPRESSION VECTOR FOR THE REPRESSOR FORM OF THE GLI3 PROTEIN IN HUMAN CELLS

Lucija Brtan

GLI proteins are essential members of the Hedgehog-GLI signaling pathway, and aberrations in which are associated with developmental deformities and oncological diseases. This thesis focuses on the GLI3 protein, one of the three isoforms of GLI proteins. The GLI3 protein in its full form (GLI3FL) has the role of a transcriptional activator, while its C-terminal shortened form has the repressor effect (GLI3R). This research aims to develop an *in vitro* tool for testing the different functions of GLI3FL and GLI3R in tumor cells. A GLI3R expression vector was constructed and validated on cell lines with different basal expression of the GLI3 protein. The transfection conditions were optimized on the low-expressing WPMY-1 cell line, and the transfection effect was tested on the high-expressing A375 cell line, and compared with the effect of compounds which affect the GLI3FL/GLI3R ratio. After the transfection of the cell lines, increased protein expression of GLI3R was demonstrated by the Western blot, and increased gene expression of *GLI3* was confirmed by the RT-qPCR method. GLI3 proteins were localized in the cytoplasm and the cell nucleus using immunofluorescent staining.

(86 pages, 39 figures, 13 tables, 100 references, original in croatian)

Thesis deposited in Central Chemical Library, Faculty of Science, University of Zagreb, Horvatovac 102a, Zagreb, Croatia and in Repository of the Faculty of Science, University of Zagreb

Keywords: A375, GLI3 protein, cloning, PTCH1, HH-GLI signaling pathway, transfection, WPMY-1

Mentor: Dr. Maja Sabol, Senior Research Associate

Supervisor (appointed by the Department of Chemistry): Dr. Morana Dulić, Assistant Professor

Reviewers:

1. Dr. Morana Dulić, Assistant Professor
2. Dr. Željka Soldin, Professor
3. Dr. Iva Juranović Cindrić, Professor

Substitute: Dr. Marko Močibob, Assistant Professor

Date of exam: February 16th, 2023.

§ 1. UVOD

Proteini GLI važni su sudionici signalnog puta Hedgehog-GLI (HH-GLI) čija je uloga ključna tijekom embrionalnog razvoja. Signalni put HH-GLI je uglavnom neaktivan ili slabo aktivan u odraslom organizmu, dok je u embrionalnom razvoju aktivan. Navedeni signalni put aktivira se vezanjem liganda Hedgehog (HH) za transmembranski receptor PTCH1 čime se aktivira kaskada koja povećava aktivnost transkripcijskih faktora GLI koji nadalje potiču transkripciju ciljnih gena. Razni poremećaji u signalnom putu povezuju se s razvojnim deformacijama i razvojem raka.^{1,2}

U čovjeka, poznate su tri izoforme proteina GLI - GLI1, GLI2, GLI3. Sva tri proteina visoko su evolucijski konzervirana, ali zbog razlika u građi nemaju podjednaku funkciju u signalnom putu. Proteini GLI u svojem središnjem dijelu imaju evolucijski konzerviranu domenu s motivom cinkovih prstiju, N-terminalni kraj se nalazi uzvodno od domene cinkovih prstiju, a C-terminalni kraj nizvodno. GLI2 i GLI3 sadrže N-terminalnu represorsku domenu dok GLI1 ne sadrži, stoga GLI1 može postojati samo u aktivatorskom obliku. Represorski oblici proteina GLI2 i GLI3 nastaju procesiranjem punog oblika proteina, ali represorski oblik proteina GLI2 (GLI2R) je vrlo nestabilan zbog čega GLI2 usprkos N-terminalnoj represorskoj domeni ima uglavnom aktivatorsku ulogu (GLI2A). U ovom diplomskom radu fokus je na proteinu GLI3 koji u svom punom obliku (GLI3FL) ima ulogu aktivatora (GLI3A), dok njegov C-terminalni skraćeni oblik ima ulogu represora (GLI3R). GLI3 je uglavnom istraživan kao represorski oblik, ali novijim istraživanjima njegova aktivatorska uloga dobiva na važnosti.^{3,4}

Cilj ovog rada je razvitak *in vitro* alata za ispitivanje različitih funkcija GLI3FL i GLI3R u tumorskim stanicama. Analizom i identifikacijom potencijalnih mjesta cijepanja konstruirati će se GeneBlock fragment koji će se klonirati u vektor čime će se dobiti vektor za ekspresiju represorskog oblika proteina GLI3. Uspješnost kloniranja, transformacije te izolacije bit će potvrđena sekvenciranjem. Validacija vektora će se izvršiti pomoću western analize proteina izoliranih iz transfeciranih staničnih linija metastatskog melanoma (A375) konstruiranim vektorom te iz istih staničnih linija tretiranih tretmanima koji aktiviraju ili inhibiraju cijepanje GLI3FL.^{5,6} Transkripcijska aktivnost GLI3FL i GLI3R analizirat će se RT-qPCR metodom mjerenjem ekspresije gena *PTCH1* koji je glavna transkripcijska meta proteina GLI3, a lokalizacija transfeciranih proteina u stanici ispitat će se metodom imunofluorescencije.

§ 2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Signalni put Hedgehog-GLI (HH-GLI)

2.1.1. Kanonska aktivacija signalnog puta Hedgehog-GLI

U sisavaca, signalni put HH-GLI se odvija u primarnim cilijama stanica. Primarna cilija je stanični organel za koji se može reći da djeluje poput stanične antene koja prima i prenosi signalne podražaje. Sastoji se od membranski usidrenog tripleta centriola koje se još naziva bazalnim tijelom, a od kojeg se kružno proteže devet mikrotubularnih dubleta formirajući aksonemu koja je skelet cilije. Aksonema je okružena cilijarnom membranom. Transport u ciliju te iz cilije odvija se dvosmjerno diljem mikrotubula intraflagelarnim transportom (IFT, eng. *intraflagellar transport*).^{7,8}

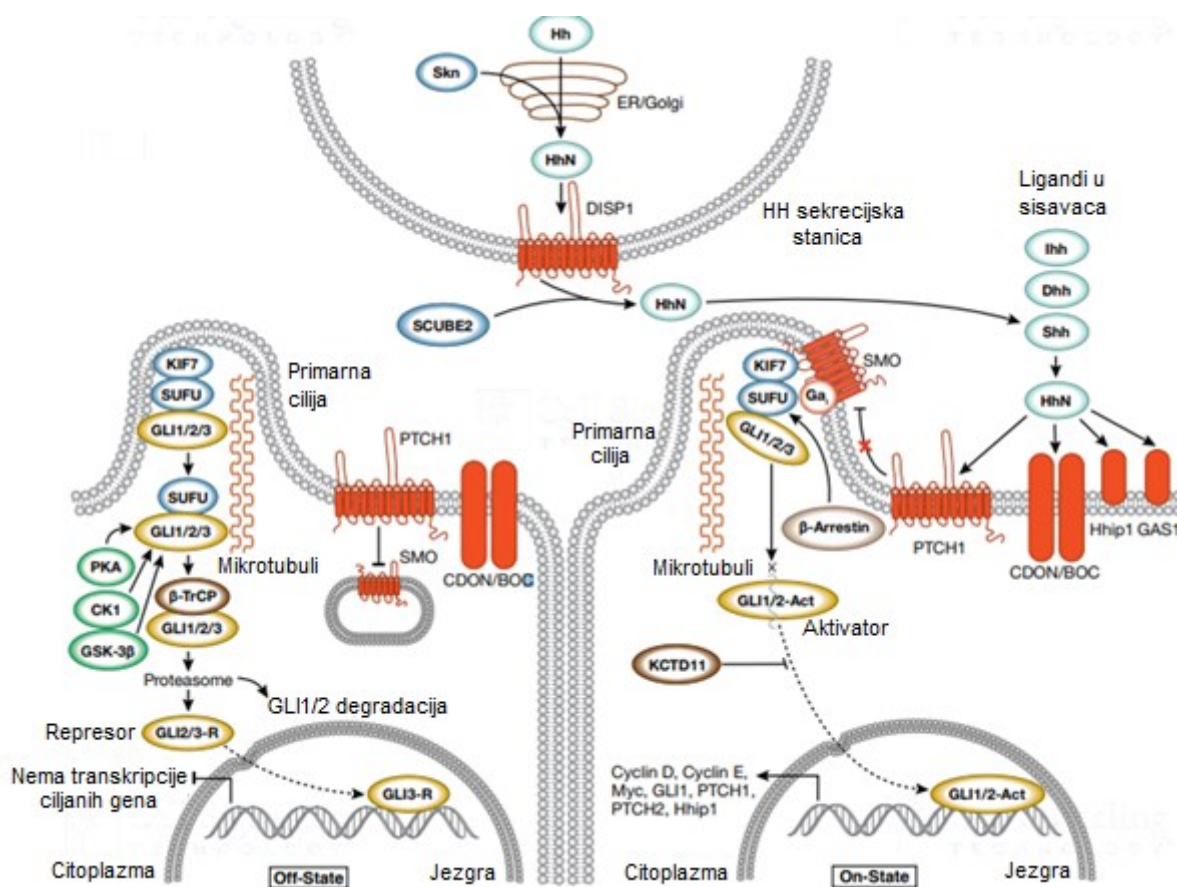
Komponente nužne za kanonsku aktivaciju signalnog puta HH-GLI su ligandi Hedgehog (HH). Razlikujemo tri specifične vrste liganda HH - Sonic hedgehog (SHH), Indian hedgehog (IHH) i Desert hedgehog (DHH). Svi ligandi HH sintetizirani su kao prekursorski proteini koji prolaze kroz autokatalitičko cijepanje između glicina i cisteina pri čemu se formira N-terminalni (HH-N) i C-terminalni fragment proteina (HH-C). Nakon što je peptidna veza pocijepana, formira se tioesterski intermedijer (peptidna veza se zamijeni tioesterskom) koji je nadalje podvrgnut nukleofilnom napadu kolesterola. Dolazi do kovalentnog vezanja kolesterola na C-terminalni kraj HH-N fragmenta, a otpušta se HH-C fragment. Nadalje, na N-terminalni cistein HH-N fragmenta dolazi do vezanja se palmitata pomoću enzima acil-transferate SKI (eng. *skinny hedgehog*). Posljedično, dvostrukom lipidnom modifikacijom formira se zrela signalna molekula koja se u obliku monomera veže na vanjsku površinu stanične membrane. HH oslobađaju se iz stanica kombiniranim djelovanjem proteina Dispatched (DISP) i SCUBE2 (eng. *signal peptide, CUB and EGF-like domain-containing protein 2*) koji se vežu za kolesterolski dio. Ligandi se do receptora transportiraju pomoću proteina LRP2 i pomoću obitelji glipikana, odnosno proteoglikana heparan sulfata (GPC1-6) usidrenih za vanjsku površinu stanične membrane pomoću glikozil fosfatidilinozitola.^{8,9}

Uz ligande, u signalnom putu, nužni su i transmembranski receptori za koje će se vezati ligandi. Tako se u sisavaca razlikuju dva transmembranska receptora s 12 transmembranskih regija,

Patched1 (PTCH1) i Patched2 (PTCH2) koji je rjeđe istraživani.¹ Također, važan je i 7-kanalni transmembranski protein spregnut s proteinom G, Smoothed (SMO), koji djeluje kao koreceptor. Uz navedene receptore, u signalnom putu sudjeluju i ko-receptori GAS1, CDON i BOC.¹⁰

U odsustvu liganda HH, PTCH1 djeluje kao negativni regulator zbog svojeg inhibirajućeg djelovanja na koreceptor SMO čime je onemogućen prijenos signala. U usporedbi s PTCH1, SMO je pozitivan regulator signalnog puta budući da u odsustvu PTCH1 postaje konstantno aktivan te time transducira signal u stanicu. U inaktivnom stanju, PTCH1 se nalazi na membrani cilije, a svojom represijom SMO-a onemogućava SMO-u lokalizaciju na plazma membrani cilije što je nužan korak za aktivaciju signalnog puta. U odsustvu signala, SMO se nalazi u citoplazmi stanica, a mehanizam inhibicije, odnosno interakcija PTCH1 i SMO nije poznata.¹¹ Stvaranjem kompleksa ligand-receptor (HH-PTCH1), odnosno aktivacijom signalnog puta, prekida se inhibitorsko djelovanje PTCH1 te posljedično dolazi do aktivacije transkripcijskih faktora GLI. Nastanak HH-PTCH1 kompleksa potiče ubikvitinaciju, endocitozu, a potom i degradaciju PTCH1 uz pomoć proteina SMURF. Aktivacijom SMO dolazi do akumulacije proteina SMO u ciliji te dolazi do fosforilacije njegova C-terminalnog kraja koji se nalazi u citoplazmi.^{12,13} Može se reći da je SMO zapravo medijator nizvodnog signala koji aktivira disocijaciju proteina GLI iz citoplazmatskog kompleksa s proteinom Suppressor of Fused (SUFU).¹² Proteini GLI su efektori signalnog puta HH-GLI, a poznate su tri izoforme proteina - GLI1, GLI2 i GLI3 koji su ujedno i transkripcijski faktori.

Kompleks SUFU je glavni negativni regulator HH-GLI aktivnosti jer u odsustvu liganda HH on direktno na sebe veže proteine GLI čime je onemogućena njihova translokacija u jezgru gdje oni djeluju kao transkripcijski faktori. Također, vezanjem na SUFU potencira se stvaranje represorskih formi GLI2/3 fosforilacijom navedenih proteina pomoću protein-kinaze A (PKA), glikogen-sintaze-3-beta kinaze (GSK3 β) i kazein-kinaze 1 (CK1). Nakon fosforilacije, puni oblici proteina GLI2/3 se cijepaju u proteasomu pomoću ubikvintin E3 ligaze SCF β TrCP čime se formira represorska forma navedenih proteina. Protein GLI1 može djelovati samo kao transkripcijski aktivator, dok GLI2 i GLI3 mogu imati i aktivatorska i represorska svojstva.^{1,14} Shema signalnog puta HH-GLI prikazana je na **slici 1**.

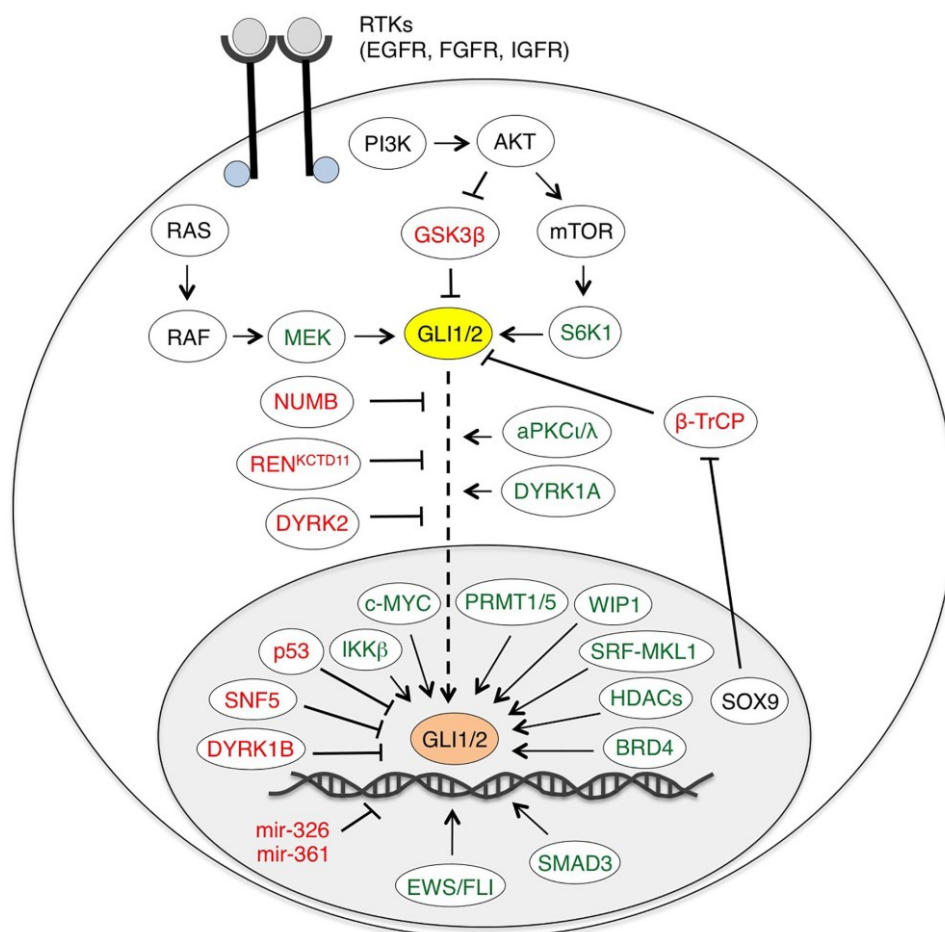


Slika 1. Kanonska aktivacija signalnoga puta Hedgehog-GLI. (Preuzeto i prilagođeno prema referenci)¹⁵

2.1.2. Nekanonska aktivacija signalnog puta Hedgehog-GLI

Osim kanonske aktivacije, poznato je nekoliko mehanizama nekanonskog djelovanja signalnog puta HH-GLI, pri čemu se misli na signalnu transdukciju preko GLI-neovisnih mehanizama. Najviše su istraživana dva tipa takve nekanonske signalne aktivacije: tip I u kojem PTCH1 aktivira proteine koji nisu članovi signalnog puta HH-GLI te tip II u kojem takva aktivacija ide preko proteina SMO.¹⁶ Nizvodna nekanonska aktivacija signalnog puta HH-GLI odvija se interakcijom s drugim signalnim putevima, koji mogu aktivirati proteine GLI neovisno o membranskim dijelovima kanonske kaskade HH-GLI.

Nekoliko istraživanja pokazuje kako se proteini GLI, naročito GLI1 i GLI2, mogu modificirati interakcijom s drugim signalnim putevima u raznim malignim oboljenjima. Tako su poznate interakcije između HH-GLI i signalnih puteva poput RAS-RAF-MEK-ER, PI3K/AKT i TGFB/SMAD.¹⁷ Neki od poznatih mehanizama nekanonske aktivacije prikazani su na **slici 2**.



Slika 2. Nekanonska aktivacija signalnog puta Hedgehog-GLI I njegovih pozitivnih (zeleno) i negativnih (crveno) regulatora. (Preuzeto prema referenci)¹⁷

Većina istraživanja se prvenstveno fokusira na GLI1 i GLI2 obzirom da su oni pozitivni regulatori ekspresije gena potaknutih kanonskom aktivacijom HH-GLI, stoga je GLI3 često izuzet iz istraživanja. Obzirom da se regulacija proteinima GLI može aktivirati putem drugih signalnih puteva, moguća su odstupanja od regulacije poznate u kanonskom HH-GLI signalnom putu. Moguća odstupanja dovode u pitanje primjenu znanja o kanonskome putu na nekanonske puteve čime je naglašena važnost istraživanja nekanonskih puteva i njihovih induktora i represora. Također, važnost treba pridodati i istraživanju mogućih uloga proteina GLI3 obzirom da je poznato kako u imunološkom sustavu i u tumorima GLI3 često djeluje kao pozitivni regulator puteva, iako nije pokazao značajnu indukciju ciljnih gena u kanonskom HH putu.^{18,19}

2.2. Transkripcijski faktori GLI

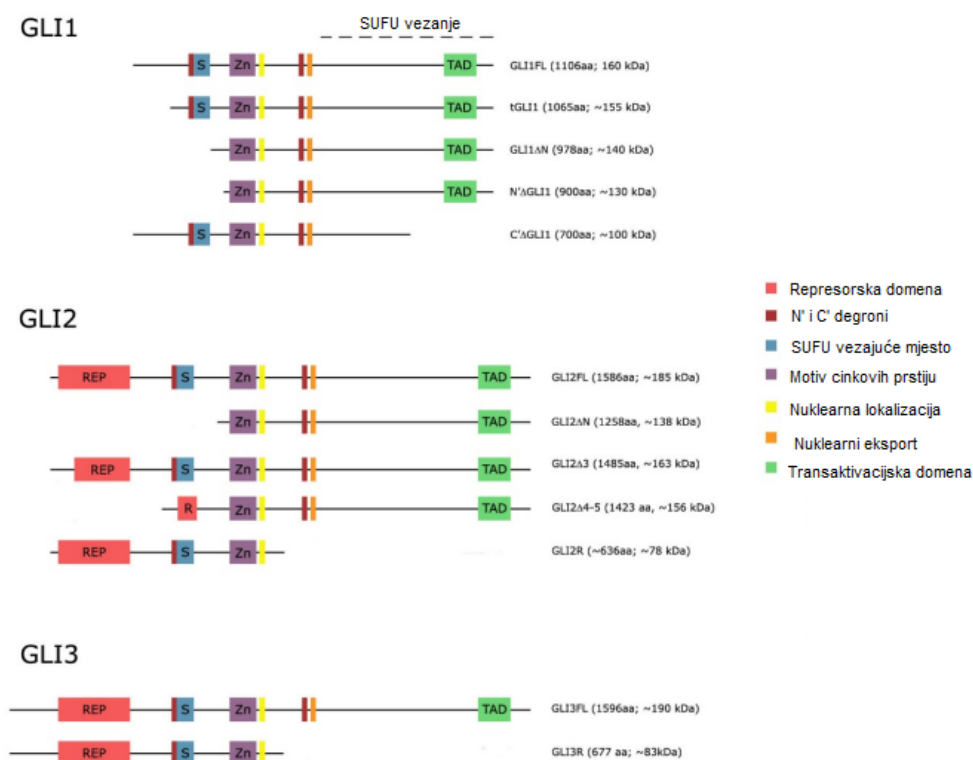
Proteini GLI pripadaju obitelji transkripcijskih faktora GLI-Kruppel. Obitelj je dobila ime prema prvom izoliranom genu iz glioblastoma, genu *GLI1*.²⁰ Proteini se sastoje od pet konzerviranih DNA-vezajućih -C₂H₂- domena Kruppelova tipa koje nose motiv cinkovih prstiju (ZF, eng. *Zinc finger*), a pomoću kojih se vežu za konsenzusnu sekvencu 5'-GACCACCCA-3' na promotorima ciljnih gena. Domena je smještena u središnjem dijelu proteina GLI.^{10,20,21}

U čovjeka, poznate su tri visoko evolucijski konzervirane izoforme proteina, GLI1, GLI2 i GLI3. GLI2 i GLI3 sadrže N-terminalnu represorsku domenu dok GLI1 ne sadrži, stoga GLI1 može postojati samo u aktivatorskom obliku. Represorski oblici proteina GLI2 i GLI3 nastaju procesiranjem punog oblika proteina, ali represorski oblik proteina GLI2 (GLI2R) je vrlo nestabilan zbog čega GLI2 ima uglavnom aktivatorsku ulogu (GLI2A). Protein GLI3 u svom punom obliku (GLI3FL) ima ulogu aktivatora (GLI3A), dok njegov C-terminalni skraćeni oblik ima ulogu represora (GLI3R). Proteini GLI1 i GLI3 prepoznaju 5'-GACCACCCA-3' sekvencu na promotorima ciljnih gena, dok GLI2 prepoznaje 5'-GAACCACCCA-3' sekvencu.^{1,3,4,10}

Poravnate sekvence proteina GLI1, GLI2 i GLI3 i shematska usporedba njihovih domena je prikazana na **slici 3** i **slici 4**.

GLI2_mRNA	1	ME T S A S A T A S E K Q E A K S G I L E A A G F P D P G K K A S P L V V A A A A A A - - - - -	43
GLI3_mRNA	1	M E A Q S H S S T T E K K K V E N S I V K C S T R T D V S E K A V A S S T T S N E D E S P G Q T Y H R R E R R N A I T M Q P Q N V Q G L S K V S E E P S T S S D E R A S L I K K E I H G S L P H V A E P S V P Y R G T V F A	110
GLI1_mRNA	1	M F N S M T R - - - - -	7
GLI2_mRNA	44	- - - - - A V A A Q G V P Q H L L P P F H A P L P I D M R H Q E G R Y H Y E P H S V H G V H P P A L S G S P V I S D I S L I R L S P H - - - P A G P G E S P F N A P H P Y V N P H M E H Y L R S V H S S P T L S M I S A A	145
GLI3_mRNA	111	M D P R N G Y M E P H Y H P P H L F P A F H P P V P I D A R H H E G R Y H Y D P S P I P P L H M T S A L S S P T Y P D L P F I R I S P H R N P T A A S E S P F S P P H P Y I N P Y M D - Y I R S L H S S P S L S M I S A T	219
GLI1_mRNA	8	- - - - - P P I S S Y G E P C C L R R L P S O G A P S V G I E - - - - -	33
GLI2_mRNA	146	R G L S P A D V A Q E H L K E R G L F G L P A P G T T P S D Y Y H O M T L V A G H P A P Y G D L L M Q S G G A A S A P H L D Y L N P V D V S R F S S P R V T P R L S R K R A L S I S P L S D A S L D L Q R M I R T S P N S	255
GLI3_mRNA	220	R G L S P T D A - - - - - P H A G V S P A E Y Y H Q M A L L T G Q R S P Y A D I P S A A T A G T G A I H M E Y L H A M D S T R F S S P R L S A R P S R K R T L S I S P L S D H S F D L Q T M I R T S P N S	316
GLI1_mRNA	34	- - - - - G L S G P P F C H Q A N L M S G P H S - Y G P A - - - - - R E T N S C T E G R L F S S P R S A V K L T K K R A L S I S P L S D A S L D L Q T V I R T S P S S	105
GLI2_mRNA	256	L V A Y I I N N S R S S S A A S G S Y G H L S A G A L S P A F T F P H P I N P V - - - A Y Q O I L S Q D R G L S A F G H T P P L I Q P S P T F L A Q P M A L T S I N A T P T Q L S S S N C L S D T N D N K O S S E S A V	362
GLI3_mRNA	317	L V T I L N N S R S S S A S G S Y G H L S A S A I S P A L S F T Y S S A P V S L H M H Q O I L S R Q C S L G S A F G H S P P L I H P A P T F P T R P I P G I P T V L N P V Q V S S G - - - P S E S S N K P T S E S A V	423
GLI1_mRNA	106	L V A F I N S R C H - S P G S Y G H L S I G T M S P S L G F P A Q M N - - - - - H K G P S P S F G V O P C G P H D - - - - - A R G G M I P H Q S R G - - - P F P T C L K S E L D M L V	187
GLI2_mRNA	363	S S T V N P V A I H K R S K V K T E P E G L R P A S P L A L T G G V S G H G S C G C A L P L S O E Q L A D L K E D L D R D D C K O E A E V V I Y E T N C H W E D C T K E Y D T O E Q L V H H I N N E H I H G E K K E F V C	472
GLI3_mRNA	424	S S T G D P M H - N K R S K I K P - - - - - D E D L P S P G A R G Q D E Q P E - - G T T L V K E E G D K D E S K O E P E V - I Y E T N C H W E C A R E F D T O E Q L V H H I N N D H I H G E K K E F V C	515
GLI1_mRNA	188	G - - - - - K C R E E P L - - - - - E G D M S S P N S T G I D D P L L - G M L D G R E D L E R E E - K R E P E S - V Y E I T D C R W D G C S Q E F D S O E Q L V H H I N S E H I H G E R K E F V C	270
GLI2_mRNA	473	R W Q A C T R E Q K P F K A Q Y M L V V H M R R H T G E K P H K C T F E G C S K A Y S R L E N L K T H L R S H T G E K P Y V C E H E G C N K A F S N A S D R A K H O N R T H S N E K P Y I C K I P G C T K R Y T D P S S L R	582
GLI3_mRNA	516	R W L D C S R E Q K P F K A Q Y M L V V H M R R H T G E K P H K C T F E G C T K A Y S R L E N L K T H L R S H T G E K P Y V C E H E G C N K A F S N A S D R A K H O N R T H S N E K P Y V C K I P G C T K R Y T D P S S L R	625
GLI1_mRNA	271	H W G C S R E L R P F K A Q Y M L V V H M R R H T G E K P H K C T F E G C R K S Y S R L E N L K T H L R S H T G E K P Y M C E H E G C S K A F S N A S D R A K H O N R T H S N E K P Y V C K L P G C T K R Y T D P S S L R	380
GLI2_mRNA	583	K H V K T V H G P D A H V T K K Q R N D V H L - R T P L L K E N G D S E A G T E P G G P E S - - - - - T E A S S T S Q A V E D C L H V R A I K T E S S G L C O S S P G A O S S C S S E P S P L G S A P I N D S G V E M P G	685
GLI3_mRNA	626	K H V K T V H G P E A H V T K K Q R G D I H P - R P P P P R D S G S H S Q S R S P G R P T Q A L G E O O D L S N T T S K R E E C L O V K T V K A E K P M T S O P S P G G O S S C S S Q S P I S N Y - - - S N S G L E L P L	732
GLI1_mRNA	381	K H V K T V H G P D A H V T K R H R G D G L P R A P S I I - - S T V E P K R E R E G G P I R - - - - - E E - - - - - S R L T V P E G A M K P O P S P G A O S S C S S D H S P A G S A A N T D S G V E M T G	469
GLI2_mRNA	686	T G P G S L G D L T A L D D T P P G A D T S A L A A P S A G G L O L R K H M T M H R F E O L K E K L K S L K D S C W A G P T P H T R N T K L P L P G S G S I L E N F S G S G G G P A G L L P N P R L S E L S A S E	795
GLI3_mRNA	733	D G G S I G D L S A I D E T P I M - D S T I S T A T A L A L Q A R R N P A G T K M E H V R L E R L K O V N G M F R R L N P I L P P K A P A V S P L I G N G T O S N T C - - - S L G G P M T L L P G - - - R S D L S G V D	837
GLI1_mRNA	470	N A G G S T E D L S S L D E G P C I A G T G - - - - - L S T L R R L E N L R D L Q L H L R P I G - - - - - T R G L K L P S L S H T G I T V S R R - - - Y G P P V - - - - -	537
GLI2_mRNA	796	V T M L S Q L O E R R D S S T S T V S S A Y T V S R R S S G I S P Y F S S R R S S E A S P L G A G R P H N A S S A D S Y D P I S T D A S R R S S E A S C C S G G S G L L N L T P A Q Q Y S L R A K Y A A A T G - G P P P T P	904
GLI3_mRNA	838	V T M L N M L - N R R D S S A S T I S S A Y L S R R S S G I S P C F S S R R S S E A S - Q A E G R P O N V S V A D S Y D P I S T D A S R R S S E A S C S D G L P S L L S L T P A Q Q Y R L K A K Y A A A T G - G P P P T P	944
GLI1_mRNA	538	- - - - - S L - E R R S S S S S I S S A Y T V S R R S S L A S P F P P - - - - - G S P - - - - - P E N G A S S L P G L M P A Q H Y L L R A R Y A S A R G G G T S P T A	605
GLI2_mRNA	905	L P G L E R M S L R T R L A L L - D A P E R T L P A G C P R P - - - L G P R R G S D G P T Y G H G H A G A A P F P H E A P G G G - A R R A S D P V R R - P D A L S L P R V O R F H S T H N V N P G P L - P P C A D R R G L R	1008
GLI3_mRNA	945	L P N M E R M S L K T R L A L L G D A L E - - - P G V A L P P V H A P R R C S D G G A H G Y G - - - R R H L Q P H D A P H G - V R R A S D P V R T G S E G L A L P R V P R F S S L S S C N P P A M - A T S A E K R S L V	1045
GLI1_mRNA	606	A S L D R I G - - - - - G L P M P - - - - - P W R - - - - - S R A E Y P G Y N F N A G V T R R A S D P A Q A - A D R P A P A R V O R F K S L G C V H T P P T V A G G G Q N F - - -	676
GLI2_mRNA	1009	L G S H P S T D G G L A R G A - Y S P R P P S I S E N V A M E A V A A G V D G A G P E - - A D L G L P E - D D L V L P D D V V Q Y I K A H A S G A L D E G T G Q V Y P T E S T G F S D N P R L P S P G L H Q R R M V A A D	1114
GLI3_mRNA	1046	L G N Y T R P E G G Q S R N F H S S P C P P S I T E N V T L E S L T M D A D A - - - - - N L N D - E D - F L P D D V V Q Y L N S Q N A G Y E Q H F P S A L P D D S K V P - - - - -	1123
GLI1_mRNA	677	- - - - - D P Y L P T S V - Y S P O P P S I T E N A A M D A R G L Q E E P E V G T S M V G S G L N P Y M D - F P P T D T L Y G G P E G A A A - P E Y G A R G P - - - - -	748
GLI2_mRNA	1115	S N V G R S A P M L G G C O L G F G A P S - - - - - S L N K N N M P V Q - - - - - V N E V S S G T V D A L A S Q V K P P P P Q G N L A V V Q K P A F G Q Y P G Y S P Q G L Q A S P G G L D	1199
GLI3_mRNA	1124	- - - - - H G R - - - - - G D F D - A P G L P D S H A Q Q F H A L E Q P C P E G S K T D L P I Q - - - - - V N E V S S G S A D L S S K L K C G P R P A - - - - - V P T R A F G F N G M - - - - -	1197
GLI1_mRNA	749	- - - - - G S L P L G P G P P T - - - - - N Y G P N P C P O L A S Y P D P T O E T W G F P S H S G L Y P G P K A L G G T Y S G - - - - - C P R L E H Y G V Q - - - - -	813
GLI2_mRNA	1200	S T Q F H L Q P R S G A P S D G I P R V N Y M Q L R Q P V A G S Q C P G M T T M S P H A C Y G O V H P Q L S P S T I S G A - - - - - L N Q F P Q S C S N M P A K P G H L G H P Q Q T	1286
GLI3_mRNA	1198	- - - - - V V H P N P L R - - - - - S G P A G G Y Q T L G E N S N P Y G G P E H L M L - - - - - H N S P G S G T S G N A F H E G P C K A P Q Y G N C L N R - - - - - O P V A P G A I D G A C G A	1274
GLI1_mRNA	814	- - - - - V K P E G G C P - - - - - V G S D S T G L A P C L N A H P S E G P P H Q P - - - - - L - - - - - F S H Y P - - - - - Q P S P P O Y L Q S G R Y T	866
GLI2_mRNA	1287	E V A P D P T T M G N R H R E L G V P D S A L A G V P P P H V Q S Y P Q D S - - - - - H H L - - - - - A A S M S Q E G Y H Q V P S L L P A R Q P G F M E P - - - - - Q T G P M G	1360
GLI3_mRNA	1275	G I Q A S K L K - - - - - S T P M O G S G G O L N F G L P V A P N E S A G S M V - N G M O N D P P V - - - - - G O G Y L A H Q L G D S M O H P A G A R P G Q O M L Q O I S A T S H I N	1355
GLI1_mRNA	867	P P P P D Y L R - - - - - S E P R P C L D F D S P T H T G Q L K A Q L V C N Y V S Q Q E L W E G G R E D A P A C E P S Y Q S P K F L G G S O V S P S R - - - - - A K A P V N	946
GLI2_mRNA	1361	V A T A G F G L V O P - R - - P P L E P S P T G R H R G V R A V Q Q L A Y A R A T G H A M A A P S S - - - - - Q E T A E A V P K G A M G - - - - - N M G S V P P P P P O D A G G A P D H S M L Y Y G Q I H	1452
GLI3_mRNA	1356	I Y Q - G P E S C L P G A H G M G S O P S S L A V V R G Y Q P - - - - - C A S F G G S R O A M P R D S L A L Q S - - - - - G Q L S D T S Q T C R V N G I K M E M K G Q P H L C - S N L Q N Y S G Q F Y D Q T V G	1449
GLI1_mRNA	947	T Y G P G F G P N L P - N H K S G A Y P T P S P C H E N F V V - - - - - G A N R A S H R A A A P P R L - - - - - L - - - - - P P L - - - - - P T - - - - - C Y G P L K	1003
GLI2_mRNA	1453	- - M Y E C D G G L E N L G S C O V M R S O P P O P A C Q D S I O P O L P S P G V N Q V S S T V D - - - - - S Q L L E A P O I D F D A I M D D G H S S L F S G A L S P S L L H S L S O N S S R L T T P R N S L T L P S I P	1557
GLI3_mRNA	1450	- - F S Q O D T K - - - - - A G S F S I S D A S C L - - - - - L Q G T S A - K N S E L L S P G A N Q V T S T V S L D S H D L E G V O I D F D A I I D D G H S S L M S G A L S P S I I Q N L S H S S R L T T P R A S L P P P A L S	1551
GLI1_mRNA	1004	V G G I N - - - - - P S C G - - - - - H P E V G R L G - G G P A L Y P P P E G Q V C N P L D - - - - - S L D L N T G L D F V A I L D E R Q - - - - - G L S P P P S H D O R G - S S G H T P P - - - - - P	1077
GLI2_mRNA	1558	A G I S N M A V G D M S S M L T S L A E E S K F L N M M T	1586
GLI3_mRNA	1552	M S T T N M A I G D M S S L L T S L A E E S K F L A V M Q	1580
GLI1_mRNA	1078	S G P P N M A V G N M S V L L R S L P E T E F L N S S A	1106

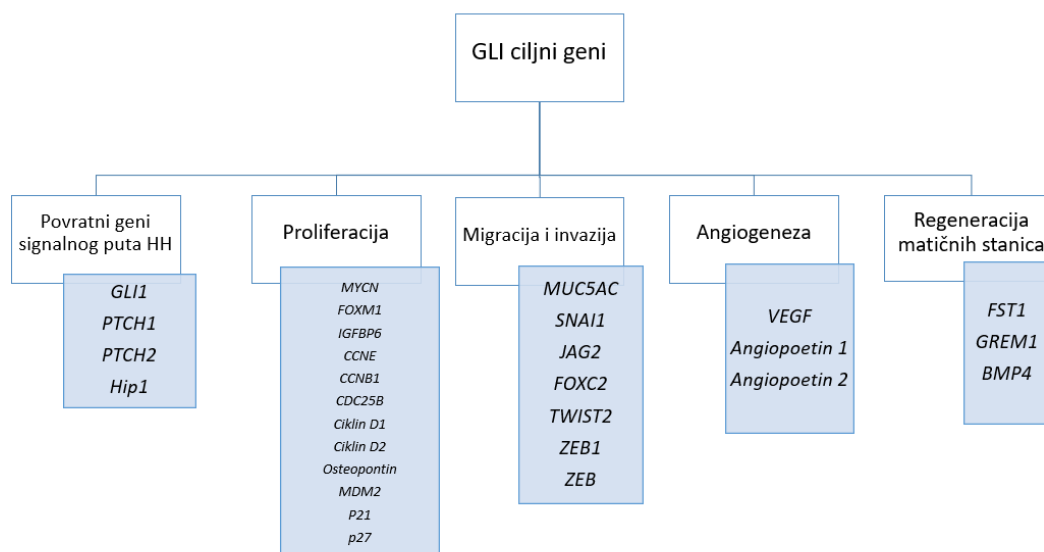
Slika 3. Proteinski sljedovi proteina GLI (na slici redom GLI2, GLI3, GLI1) poravnati računalnim programom Jalview



Slika 4. shematski prikaz svakog od proteina s proteinskim domenama (preuzeto i prilagođeno prema referenci)¹.

Transkripcijski faktori GLI reguliraju ekspresiju ciljnih gena u raznim biološkim procesima, uključujući staničnu proliferaciju, diferencijaciju i morfogenezu. Glavni ciljni geni signalnog puta HH-GLI su *PTCH1*, *PTCH2* i *GLI1*, stoga su pogodni za praćenje aktivnosti signalnog puta.

Osim navedenih gena, GLI proteini reguliraju i transkripciju ostalih gena od kojih su neki prikazani na **slici 5.**, a prekomjerna ekspresija ili aktivacija nekih od njih je povezana je s onkogenim učincima. Tako primjerice prekomjerna ekspresija ciklina D1 povezana je s raznim vrstama raka i smatra se potencijalnim onkogenom, kao i MYC koji pokazuje onkogeno svojstva u neuroblastomima ili FGF18 koji je povezan s razvojem raka pluća i gušterače.²²⁻²⁴



Slika 5. Neki od ciljnih gena signalnog puta HH-GLI (preuzeto i prilagođeno prema referenci)²⁴

2.3. Genski lokus i domene u ljudskom GLI3

Ljudski gen *GLI3* nalazi se na kromosomu 7p14.1 (ID gena: 2737).²⁵ Dugačak je 276261 parova baza (NC_000007.14),²⁶ a njegova mRNA sekvenca sadrži 15 eksona dugačkih 8405 parova baza (NM_000168.6)²⁷. Konsenzus kodirajuća sekvenca (CCDS) se sastoji od 4734 nukleotida (nt) (282-5024 nt) s transkripcijskim početkom na eksonu 2 (CCDS5465.1)²⁸. Puna forma proteina GLI3 se sastoji od 1580 aminokiselina (aa) (GLI3FL, NP_000159.3)²⁹. Kao što je u prethodnom poglavlju spomenuto, GLI3 sadrži N-terminalnu represorsku domenu, a ona se nalazi u rasponu 106-235 aa (eksoni 3-6, mRNA 649-986 nt). Domena s motivom cinkovih prstiju se nalazi u rasponu 480-632 aa (eksoni 10-13, 1719-2177 nt), a C-terminalna aktivacijska domena se nalazi u rasponu 827-1132 aa (ekson 15, 2760-3677 nt). Proteasomalno cijepanje proteina obuhvaća eksone 13 i 14 (aa 650-750 ; nt 2229-2531) što dovodi do „skraćenog“, represorskog oblika proteina GLI3 (GLI3R, 677 aa, 83 kDa). Kada se protein pocijepa, odcijepljena C-terminalna domena se razgradi u proteasomu, a ostatak proteina djeluje kao represor.¹⁹

2.4. Mehanizmi procesiranja proteina GLI2 i GLI3 u represorske oblike

Usporedbom proteina GLI1, GLI2 i GLI3 na slici 3. možemo vidjeti kako GLI2 i GLI3 pokazuju velike sličnosti, velik dio aminokiselina je konzerviran, a poznato je da oba proteina potencijalno mogu imati funkcije aktivatora i represora. Istraživanje koje su proveli Pan i Wang (2007.) pokazalo je kako proteasomalno cijepanje proteina GLI2 u punoj duljini (GLI2FL) nije učinkovito te ne daje stabilan produkt, dok je produkt cijepanja GLI3FL vrlo stabilan.⁴ Posljedično, većina proteina GLI2 je postojana u svojoj punoj dužini (GLI2A veličine 185 kDa), dok je najmanje polovica GLI3 proteina uspješno procesirana i prisutna kao transkripcijski represor, GLI3R. Istraživanja su pokazala kako se omjer GLI2A/GLI2R vrlo malo promijeni u usporedbi s omjerom GLI3A/GLI3R u prisutnosti i odsutnosti primarnog signala SHH. Takvo opažanje daje naslutiti kako je GLI3 uglavnom ima represorsku ulogu dok GLI2 aktivatorsku.

Proteini GLI2 i GLI3 se procesiraju različitim mehanizmima.¹³

U odsutnosti SHH, GLI3-FL se u citoplazmi veže na kompleks SUFU. Kompleks SUFU aktivira Gpr161 koji aktivira djelovanje PKA čime je moguća fosforilacija GLI3. PKA fosforilira GLI3 na serinskim ostacima 849, 865, 877, 907, 980 i 1006 (**slika 6.**, crveno obojani serinski ostaci). Fosforilacija nadalje vodi do dodatne fosforilacije proteina GLI3 pomoću GSK3 β na aminokiselinama 861, 873 i 903. Nakon toga, GLI3 veže β TrCP na aminokiselinama 855, 856, 864 i 894, koji aktivira kompleks SCF $^{\beta$ TrCP. Aktivacija rezultira ubikvitinacijom GLI3 na lizinskim ostacima 773, 778, 784 i 800 pomoću SCF $^{\beta$ TrCP-a pri čemu proteasomalnom razgradnjom nastaje GLI3R.^{3,31,32}

```

LLPGRSDLSGVDVTMLNMLNRRDSSASTISSAYLSSRRSSGISPCFSSRRSSSEASQAEGRPQNVSVADSYDPIST
830|      840|      850|      860|      870|      880|      890|      900|

DASRRSSSEASQSDGLPSLLSLTPAQYRLKAKYAAATGGPPPTPLPNMERMMLKTRLALLGDALEPGVALPPVHA
910|      920|      930|      940|      950|      960|      970|

PRRCS DGGAHGYGRRHLQPHDAPGHGVERRASDPVRTGSEGLALPRVPRFSSLSNPPAMATSAEKRSVLVQNYT
980|      990|     1000|     1010|     1020|     1030|     1040|     1050|

```

Slika 6. Shematski prikaz aminokiselinske sekvence (846-910 AA) proteina GLI3 kreiran pomoću računalnog programa SnapGene Viewer. Crvenom bojom su naznačeni serinski koji su moguća mjesta fosforilacije za PKA.

Degradacija proteina GLI2 regulirana je fosforilacijom i defosforilacijom. Istraživanjima provedenim na vinskoj mušici (*Drosophila melanogaster*) pokazano je kako je Ci (*Cubitus interruptus*, analog GLI proteinima u vinskoj mušici) fosforiliran pomoću PKA na svom C-terminalnom kraju, a fosforilacijom prva tri od mogućih pet mjesta fosforilacije za PKA aktiviraju daljnju fosforilaciju mjesta za koja se pretpostavlja da su mjesta fosforilacije kinaza CK1 i GSK3 β . Istraživanja su pokazala kako GLI2/3 i Ci imaju visoko konzervirana mjesta djelovanja za ranije spomenute kinaze. Uz fosforilaciju, obrada Ci također zahtijeva Slimb, podjedinicu koja čini dio SCF ubikvitin ligaze, međutim njihova međudjelovanja nisu poznata.³³ Obzirom da su Ci i proteini GLI transkripcijski faktori, Ci u vinskoj mušici, a proteini GLI u sisavaca, očekivani su slični mehanizmi degradacije obzirom na stupanj konzerviranosti.⁶ Pretpostavlja se da PKA fosforilira GLI2 na serinskim ostacima 789, 805, 817 i 848 (**slika 7.** podebljani serini). Nadalje, GSK3 β fosforilira na mjestima 801, 813 i 844, također na serinskim ostacima (**slika 7.**, zaokruženi serini), a CK1 na 792, 808, 820 i 851 serinskim ostacima (**slika 7.** uokvireni serini). Nadalje, ranije opisanom hiperfosforilacijom β TrCP izravno veže za GLI2. Poznata su dva mjesta vezanja β TrCP na GLI2 (**slika 7.** debelo podcrtano). To nadalje inducira GLI2 degradaciju pomoću kompleksa SCF $^{\beta$ TrCP.^{4,30}

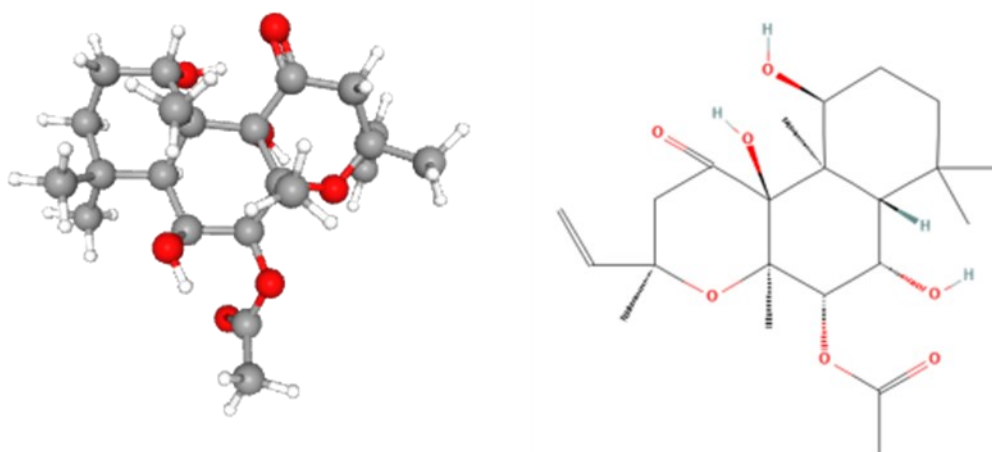


Slika 7. Shematski prikaz aminokiselinske sekvence (874-855 AA) proteina GLI2 s naznačenim serinskim ostacima kao mogućim mjestima fosforilacije za PKA (podebljani serini), GSK3 β (zaokruženi serini) i CK1 (uokvireni serini). Nakon što su primarna mjesta za kinaze GSK3 β i CK1 fosforilirana, serinski ostaci koji mogu postati optimalna mjesta za fosforilaciju GSK3 i CK1 označeni su povlakama iznad odgovarajućih aminokiselina. Tanko podcrtane regije označavaju mjesta vezanja PKA, a dvije debele linije mjesta vezanja β TrCP. (Preuzeto i prilagođeno prema referenci)¹³

2.5. Utjecaji kemijskih tretmana na procesiranje proteina GLI3

2.5.1. Forskolin

Forskolin (FSK) pripada skupini labdan diterpenoida, dobiva se izolacijom iz biljke *Coleus forskohlii*. Derivat je geranilgeranil pirofosfata (GGPP), kao i većina ostalih diterpena izoliranih iz bilja. Osim što pripada skupini labdana diterpenoida, može se klasificirati i kao acetatni ester, organski heterociklički spoj, triol, ciklički keton i terciarni alfa-hidroksi keton.^{34,35,35}



Slika 8. Trodimenzionalni i strukturni prikaz forskolina (preuzeto prema referenci)³⁴

FSK je topljiv u lipidima, stoga može prodrijeti kroz stanične membrane. Direktno aktivira adenilat ciklazu što dovodi do proizvodnje cikličkog adenozin monofosfata (cAMP) i do povećanja njegove koncentracije u stanici. Povećanjem koncentracije cAMP-a, aktivira se cAMP ovisna protein-kinaza (PKA) tako što se na katalitičke podjedinice vežu po dvije cAMP molekule čime se mijenja konformacija proteina što dovodi do aktivacije katalitičkih podjedinica.^{36,37}

Nadalje, PKA fosforilira GLI zbog čega dolazi do proteasomalne degradacije. Istraživanja pokazuju kako cAMP agonisti, poput forskolina, mogu dovesti do inhibicije onkogene

aktivnosti SHH uslijed aktivacije transkripcije pojedinih gena. Pokazano je pomoću GLI-luciferaza izvjestiteljskog sustava (eng. *luciferase reporting system*) da FSK može u potpunosti suzbiti GLI-ovisnu aktivnost luciferaze. Luciferaza emitira svjetlost tijekom oksidacije svog kemijskog supstrata luciferina pri čemu se luminometrom bilježi količina emitiranog svjetla koja odgovara luciferaznoj aktivnosti. Gašenje aktivnosti luciferaze sugerira proteosomalnu degradaciju proteina GLI. Time je pokazano kako je aktivacija PKA dovoljna za inhibiciju SHH. Nadalje, FSK, kao cAMP agonist, može inhibirati čak i onkogenu SMO signalizaciju nastalu zbog onkogene mutacije na SMO.^{38,39}

2.5.2. Litijev klorid

Litijev klorid (LiCl) je ionski spoj koji pripada litijevim solima. Pojavljuje se u obliku bezbojne soli, a pokazuje toksična svojstva. Uporaba mu je vrlo široka, koristi se u pirotehnici, automobilske industriji, u medicini, organskoj sintezi, kao standard za kalibraciju higrometara, kao pesticid u pčelarstvu i u biotehnoškim te biokemijskim istraživanjima.^{40,41}

U biokemijskim istraživanjima njegova najviše se koristi kao imunomodulator. Može se koristiti za imunoprecipitaciju kromatina ili za selektivnu precipitaciju RNA. U ovom istraživanju fokus je stavljen na njegovu mogućnost blokiranja glikogen-sintaze-3-beta kinaze (GSK-3 β).^{42,43}

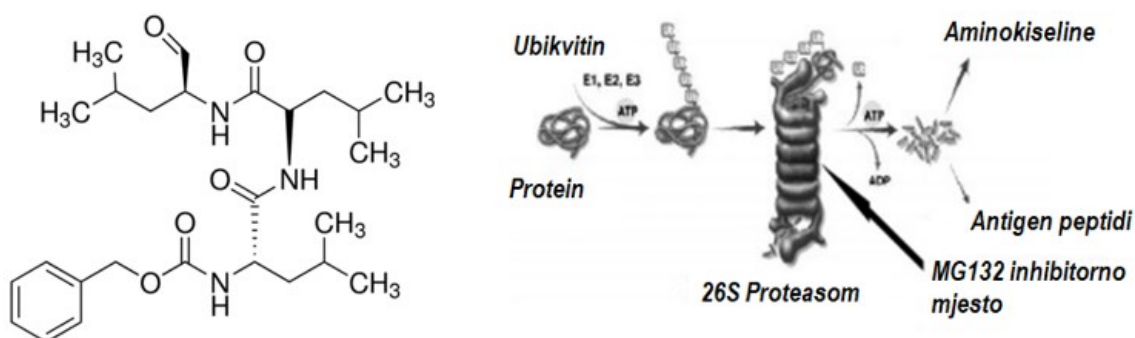
Inhibicijska svojstva litijeva klorida prvi put su otkrivena tijekom istraživanja bipolarnog poremećaja ponašanja kada je otkriveno da litij inhibira GSK3 β s IC50 od približno 2 mmol dm⁻³ što je nešto više od terapijske koncentracije u serumu. Pokazano je da je kinaza GSK3 β negativni regulator Wnt signalnog puta koji sudjeluje u regulaciji razvoja neurona i neuroplastičnosti. Poremećajima u signalnom putu Wnt može doći do izmjene ekspresije ciljnih gena koji su uključeni u signalizaciju neurotransmitera što nadalje utječe na regulaciju raspoloženja i ponašanja. Inhibicijom aktivnosti kinaze GSK3 β , pretpostavlja se da ioni litija povećava razinu beta-*katena*na, podjedinice kadherinskog proteinskog kompleksa, čime se aktivira Wnt singlani put, a time dolazi do regulacije ekspresije ciljnih gena.^{44,45}

Daljnja istraživanja potvrdila su da je inhibicijski učinak litija relativno selektivan na GSK3 β .⁴⁵ Pretpostavljaju se dva moguća načina inhibicije litijevim kloridom, kao direktna interakcija gdje ioni litija djeluju kao kompetitivni inhibitori s ionima Mg²⁺ te indirektno tako što aktivira put Akt/protein kinaza B što rezultira inhibicijom Ser-9 fosforilacijom.⁴⁶⁻⁴⁸ U signalnom putu

HH-GLI pokazano je kako litijev klorid potiče inhibitornu fosforilaciju kinaze GSK3 β koja na posttranslacijskoj razini regulira aktivnost proteina GLI. Na taj način, djelovanje GSK3 β na protein SUFU je onemogućeno što nadalje rezultira akumulacijom pune forme proteina GLI3 u citoplazmi.^{2,49}

2.5.3. MG132

MG132 je tripeptidni aldehid (karbobenzoksi-Leu-Leu-leucinal) koji se najčešće koristi kao reagens u istraživanjima za ispitivanje regulacije razgradnje proteina u stanicama.



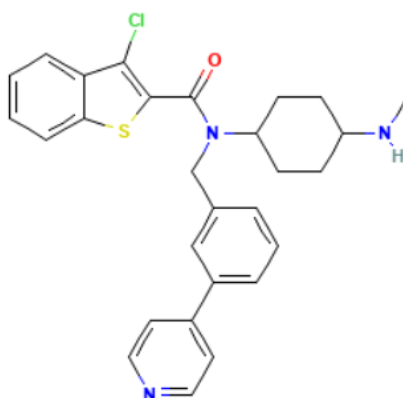
Slika 9. Kemijska struktura MG132 (lijevo); pojednostavljeni prikaz mehanizma djelovanja MG132 (desno) (preuzeto i prilagođeno prema referenci)^{50,51}

Stereoizomer (*R*)-MG132 je snažan, membranski permeabilan inhibitor proteasoma. (*R*)-MG132 učinkovitiji je inhibitor aktivnosti proteasoma sličnih kimotripsinu (ChTL), tripsinu (TL) i peptidilglutamil peptid hidrolizirajućeg proteasoma (PGPH) od (*S*)-MG132. Njegovo djelovanje temelji se na kovalentnom vezanju na aktivno mjesto β podjedinica što dovodi do inhibicije proteolitičke aktivnosti 2S kompleksa. Takva inhibicija proteasoma dovodi do smanjenja razgradnje proteina konjugiranih s ubikvitinom u stanicama. Posljedično, MG132 povećava razine specifičnih proteina u stanici koji bi se inače neometano razgradili. U HH-GLI signalnom putu, inhibicijom proteasoma očekuje se veći udio proteina GLI3FL obzirom da je inhibicijom onemogućeno procesiranje proteina GLI3FL, a time i stvaranje GLI3R. Očekivani efekt MG132 je aktivacija transkripcije ciljanih gena HH-GLI signalnog puta.^{50,51}

2.5.4. SAG (Smoothened agonist)

SAG (Smoothened agonist) spada u grupu agonista signalnog puta HH-GLI. Agonistima se nazivaju male molekule koje pospješuju aktivnost signalnog puta, a one mogu biti prirodne ili sintetičke. U prirodne agoniste ubrajamo ligand HH, no zbog kompleksne i skupe komercijalne proizvodnje dizajnirane i sintetizirane su male molekule koje, kao i ligand HH, potiču aktivnost signalnog puta.^{49,52}

Punog imena 3-kloro-N-[trans-4-(metilamino)cikloheksil]-N-[3-(piridin-4-il)benzil]-1-benzotiofen-2-karboksamid, pripada skupini 1-benzotiofena, organokloridnih spojeva, biarila, fenilpiridina, tercijarnih karboksamida te sekundarnih amino spojeva. Djeluje kao aktivator G proteina spregnutog s receptorom Smoothened (SMO). SAG aktivira SMO izravnim vezanjem na heptahelikalni snop, stabilizirajući specifičnu konformaciju SMO u cilijama i dovodeći do povećane ekspresije gena nizvodno.⁵³



Slika 10. Kemijska struktura SAG-a. (Preuzeto prema referenci)⁵⁴

2.6. Biološka uloga GLI3 u embrionalnom razvoju

Protein GLI3 je od izuzetne važnosti u embrionalnom razvoju pluća i mozga. Neophodan je za pravilan embrionalni razvoj, a njegova disfunkcija uzrokovana mutacijama manifestira se pojavom genetskih bolesti poput Greigov sindromom cefalopolisindaktilije (GCPS), Pallister Hall sindroma (PHS) i tibijalne hemimelije.¹⁹

Istraživanja rađena na miševima pokazala su kako GLI3 ima utjecaja na embrionalni razvoj mišjih pluća. Utvrđena je visoka ekspresija GLI3 na vrhu pomoćnog režnja na plućima

embrija, dok u miševa koji nose mutaciju na kromosomu 13 ($Gli3^{Xtl}$) odsustvo GLI3 uzrokuje promjene u obliku tri od pet plućnih režnjeva te dolazi do varijacije (smanjenja) veličine pluća.^{19,55,56}

Također, istraživanja su pokazala kako je GLI3 uključen u razvoj mozga, odnosno dvije moždane regije zaslužne za emocionalni razvoj i pamćenje (*Dentate gyrus* i hipokampus). Uz navedeno, GLI3 je važan faktor u razvoju dorzalnog telencefalona koji se tijekom embrionalnog razvoja razvija u moždani korteks. Zabilježeno je kako u odsustvu GLI3 dolazi do oštećenja dorzalnog telencefalnog spoja što rezultira smanjenjem veličine neokorteksa i izostankom dijelova hipokampusa u mišjim modelima. Ispitana je i uloga GLI3 u kontroli rasta cerebralnog korteksa pri čemu su korišteni miševi s mutacijom proteina Kif3a koji je motorni protein primarne cilije. Gubitkom proteina Kif3a dolazi do degradacije primarnih cilija, a što nadalje utječe na procesiranje GLI3 čime se modificira ekspresija ciljnih gena ciklina D1 i fibroblasta faktora rasta 15 (*fgf15*). Nekoliko istraživanja provedeno je na represorskoj formi proteina GLI3 (GLI3R). Protein GLI3R sudjeluje u proliferaciji dorzalne i ventralne subventrikularne zone, a uključen je u regulaciju formiranja *corpus callosum* tako što interakcijom s proteinom slit homolog 2 regulira ekspresiju Fgf i Wnt/ β -katenina. U istraživanjima provedenim na miševima pokazano je kako GLI3R regulira diferencijaciju gornjeg sloja kortikalnih neurona, ali i da GLI3R potiskuje V0 i V1 interneurone zbog obnove motornih neurona i V2 interneurona.^{19,25,57–59}

Osim istraživanja provođenima na plućima i mozgu, rađena su istraživanja na očima. Dokazano je kako gubitak GLI3 tijekom embrionalnog razvoja miševa može uzrokovati razne degeneracije, a daljnjim ispitivanjima dokazno je kako za razvoj nisu nužne obje forme proteina (GLI3FL i GLI3R). Analizom morfogeneze oka mišjih embrija kojima nedostaju GLI3FL i GLI3R te mišjih embrija u kojima nedostaje samo GLI3FL, dokazano da je GLI3R dovoljan za stvaranje morfološki normalnih embrija. Protein GLI3R kontrolira brojne ključne faktore u razvoju oka, a pokazano je kako upravlja razvojem leće i mrežnice putem reguliranja WNT/ β -CATENIN signalizacije.⁶⁰

Sva ova istraživanja pokazuju važnu ulogu proteina GLI3 tijekom embrionalnog razvoja te naglašavaju važnost istraživanja obje forme proteina obzirom na njihov različit utjecaj na razvoj.

2.7. Biološka uloga GLI3 u razvoju genetskih poremećaja

Istraživani su utjecaji proteina GLI3 na razvoj Greig cephalopolysyndactyly sindroma (GCPS), Pallister Hall sindroma (PHS) te na hemimeliju tibije.

Pacijenti koji pate od GCPS-a razvijaju postaksijalnu polisindaktiliju (tj. duplikaciju udova) šaka i stopala te makroencefaliju (uvećanu glavu). Ovakav genetski poremećaj uzrokovan je delecijom regije na kromosomu 7p14 na kojem se nalazi i gen *GLI3*. Uzrok fenotipa polidaktilije je mutacija unutar proteina GLI3 koja utječe na ravnotežu između represorskog i aktivatorskog oblika proteina, što izuzima mogućnost negativne regulacije SHH. Mutacije mogu nastati bilo gdje u proteinu, tako da nije rijedak N-terminalno skraćeni protein kojem potpuno ili djelomično nedostaje ZF domena ili mutacije u transaktivacijskoj domeni između 903 i 934 aminokiseline.^{19,61–63}

PHS se klinički identificira mezoaksijalnom (centralnom) polidaktilijom i hamartomom hipotalamusa (benignim tumorom hipotalamusa). Mutacije povezane s PHS-om obično su mutacije koje utječu na okvir čitanja proteinskog slijeda zbog čega translacijom nastaju skraćeni oblici proteina. Tako skraćeni protein pokazuje represorske funkcije slične GLI3R, a oponašajući njegovu funkciju, uz izostanak GLI3FL, dovodi do razvitka PHS-a. Također, istraživanja sugeriraju kako PHS može biti uzrokovan delecijom gvanozina na 2023 nukleotidu na eksonu 12 *GLI3* na kojem se nalazi regija odgovorna za procesiranje GLI3FL. Uz navedeno, identificirana je i regija između 717 i 1297 AA koja nosi nekoliko dodatnih mutacija koje uključuju početak i kraj transaktivacijske domene, uključujući regije nužne za ubikvintilaciju i fosforilaciju GLI3FL.^{19,64–66}

Još jedan genetski poremećaj razvoja udova za čiji razvoj je nužan protein GLI3 je hemimelija tibije koja uzrokuje hipoplastičnu tibiju ili čak njezino odsustvo. Ovo oboljenje je uzrokovano delecijom eksona 7 *GLI3* uzvodno od DNA vezne domene i transaktivacijske domene što dovodi do skraćene verzije proteina koji ne može negativno regulirati PTCH1 ili GLI1.^{67,68}

2.8. Biološka uloga GLI3 u imunološkom sustavu

Dosada je poznato da proteini GLI3 imaju regulatornu ulogu u prirođenom i adaptivnom imunitetu. Istraživanja su pokazala da GLI3 ima ulogu u razvoju imunoloških stanica, ali da može sudjelovati u upalnim procesima uzrokovanim bakterijskim infekcijama.⁶⁷ Dokazan je utjecaj GLI3 na razvoj T stanica istraživanjima na fetalnim stanicama pri čemu je pokazano

kako je GLI3 neophodan za diferencijaciju dvostruko negativnih u dvostruko pozitivne timocite. U prvom stadiju sazrijevanja, timociti ne ekspimiraju receptor za antigen (TCR, eng. *T-cell Antigen Receptor*) niti signalnu molekulu CD3, stoga se nazivaju dvostruko negativnim timocitima (CD4⁻ i CD8⁻). Daljnjim razvojem, uspješno se sintetizira preT receptor, a to nadalje uzrokuje sintezu koreceptorskih molekula CD4 i CD8, a timocite tada nazivamo dvostruko pozitivnima (CD4⁺ i CD8⁺). Učinak GLI3 je bio ovisan o dozi što sugerira njegovu izravnu uključenost u regulaciju transkripcije gena koji kontroliraju diferencijaciju T-stanica tijekom fetalnog razvoja.⁶⁹

Klaster diferencijacije 155 (CD155) pripada imunoglobulinima, a veže se na adhezijsku molekulu leukocita DNAM1 na površini NK stanica. Aktivacija signalnog slijeda pomoću liganda HH inducira ekspresiju CD155 koji u svom promotoru sadrži vezna mjesta za GLI. Pokazano je kako je ekspresija CD155 regulirana proteinima GLI.^{70,71} Također, neka istraživanja pokazuju kako je uočeno smanjenje broja B stanica (CD19⁺, B220⁺ i CD19⁺ B220⁺) ovisno o prisustvu GLI3 u embrijima.^{67,72}

2.9. Biološka uloga GLI3 u tumorima

GLI3 regulira različite biološke procese koji su važni za rast i napredovanje stanica raka, ali nekoliko studija je dokazalo kako GLI3 može djelovati kao supresor tumora. Iako su takve studije rijetke, dokazuju da GLI3 može djelovati i kao inicijator i kao supresor tumora.

Tako primjerice u istraživanju provedenom na glioblastomu koje su proveli Huang i sur. (2014.) vidljiva je smanjena ekspresija GLI3 nakon tretmana inhibitorom autofosforilacije fokalne-adhezijske kinaze (FAK) 'Y15' u kombinaciji s kemoterapeutikom temozolomidom. Oba lijeka djeluju sinergistički, ali molekularni mehanizam djelovanja nije poznat. Poznato je da induciraju zaustavljanje u kontrolnoj točki G2/M staničnog ciklusa i apoptozu.⁷³ Ranije spomenute kontrolne točke staničnog ciklusa kontroliraju uvjete, redosljed i vrijeme prelaska iz jedne faze u drugu fazu staničnog ciklusa kako bi se procesi u staničnom ciklusu precizno odvijali. Kontrolna točka G2/M se nalazi se na prijelazu iz interfaze u mitozu kada je stanica spremna za diobu. Ta kontrolna točka primarno provjerava je li replikacija DNA ispravno provedena te postoje li oštećenja i mutacije DNA. Ukoliko mutacije i oštećenja postoje, dolazi do zaustavljanja staničnog ciklusa negativnim regulatorima.⁷⁴

U PSH-u, Craig i sur. (2008) pokazali su kako skraćeni mutirani GLI3 svojim represorskim djelovanjem mogao bi imati utjecaj na stvaranje hamartoma hipotalamusa zbog smanjene aktivnosti promotora GLI, ali su potrebna daljnja istraživanja koja bi utvrdila povezanost.⁷⁵

Istraživanja također pokazuju kako GLI3 sudjeluje u razvitku oralnog karcinoma skvamoznih stanica (OSCC). Eksperimenti pokazuju kako je ekspresija GLI3 značajno povećana u podtipu matičnih stanica raka, što je potvrđeno i u uzorcima *in vivo*. Brojna izvješća pokazuju da GLI3 regulira matične stanice raka u OSCC reguliranjem relevantnih markera za EMT (eng. *Epithelial-to-mesenchymal transition*). Osim toga, GLI3 regulira preživljavanje i invaziju stanica, a korelira i s veličinom tumora *in vivo*. Budući da su matične stanice raka otporne na većinu kemoterapija zbog nepravilne diobe stanica, GLI3 bi mogao biti potencijalna meta za senzibiliziranje tih stanica na kemoterapijske agense. Pokazano je kako su razine GLI3 također pozitivno korelirale s višom ekspresijom markera matičnih stanica raka, a smanjenje razina GLI3 posredovano shRNA dovelo je do smanjenja populacije CD44^{high} (matične stanice raka), dok je populacija CD44^{low} bila nepromijenjena u OSCC.^{2,76,77}

Matične stanice raka želuca (sortirane na temelju površinske ekspresije CD44⁺ i CD24⁺) pokazale su 80 puta veću ekspresiju mRNA GLI3 nego fenotip CD44^{low} CD24^{low}. Istraživanje je pokazalo kako je povećanje ekspresije mRNA GLI3 je pozitivno korelirano s ekspresijom mRNA SHH i PTCH1.⁷⁸ Druga povezana istraživanja su pokazala kako SHH sudjeluje u razvitku raka želuca, stoga postoji mogućnost da GLI3 posreduje u aktivnostima izazvanim aktivacijom SHH, ali potrebne su dodatne studije kako bi se pronašla moguća povezanost.^{79,80}

Također, Fu i sur. (2016.) su pokazali kako posttranslacijske modifikacije GLI3FL pomoću histon-lizin-metiltransferaze SET7 povećavaju stabilnost GLI3FL i njegovu sposobnost da veže promotorsku regiju GLI1 nakon tretiranja SHH. Istraživanje je pokazalo kako stanična linija A549 koja eksprimira GLI3FL s mutacijama u mjestima metilacije SET7 u mišjem modelu ksenografta pokazuje manju migraciju, invazivnost te smanjeni volumen tumora u usporedbi s miševima kojima je ubrizgan ksenograft A549 koji eksprimira divlji tip GLI3. Taj podatak potvrđuje onkogenu prirodu GLI3. Ciljanje SET7 bi mogla biti održiva terapijska strategija za smanjenje onkogenog učinka GLI3.⁸¹

Kod raka debelog crijeva, transkripti GLI3 bili su značajno povišeni nego u zdravom tkivu.^{76,82} Liječenje staničnih linija RKO i LOVO karcinoma debelog crijeva s GLI3 siRNA dovelo je do značajnog smanjenja stanične proliferacije. Dodatna istraživanja iz *in vitro* eksperimenata pokazala su da je liječenje pomoću siGLI3 smanjilo interakciju p53 i MDM2 te ubikvitilaciju

p53.⁸² U stanicama bez stresa, protein p53 je postojan u vrlo niskoj koncentraciji. U uvjetima stresa, protein p53 se nakuplja se u stanici, veže se u svom tetramernom obliku na elemente odgovora p53 i inducira transkripciju različitih gena koji su uključeni u kontrolu staničnog ciklusa, apoptozu, popravak DNK, diferencijaciju. Svojom aktivnošću, protein p53 štiti organizam od propagacije stanica koje nose oštećenu, a potencijalno i onkogeno mutiranu DNA. S druge strane, MDM2 je p53-specifična E3 ubikvitin-ligaza koja je glavni antagonist p53. U stanicama bez stresa, MDM2 stalno monoubikvitinira p53 čime posreduje njegovu razgradnju u proteasomu, blokira njegovu transkripcijsku aktivnost te pogoduje njegovom nuklearnom izvozu. Različiti stanični signali, poput oštećenja DNA ili aktivacije onkogeno, induciraju aktivaciju p53. Oštećenje DNA pogoduje fosforilaciji p53, narušavajući interakciju p53 i MDM2 u kompleksu kojeg sačinjavaju. Aktivirani onkogeni aktiviraju ARF protein, koji sprječava degradaciju p53 posredovanu MDM2.^{83,84}

Nekim istraživanjima dokazano je da GLI3 također modulira protein na membrani vakuole koji je regulator autofagije (VMP1). Tako su Lo Ré i sur. (2012.) pokazali kako se VMP1 aktivira onkogenim KRAS^{G12D} preko signalnog puta PI3K-AKT1-GLI3. U navedenom signalnom putu GLI3 interagira s p300 što olakšava vezanje GLI3 na promotorsku regiju VMP1. To pokazuje kako je GLI3 važan čimbenik u autofagiji, međutim, nepoznato je koji je faktor transkripcije uključen u regulaciju ekspresije GLI3 nizvodno od AKT1. Istraživanjima poznatih regulatora GLI3 kao što su PKA ili GSK3 moglo bi se utvrditi jesu li potrebne posttranslacijske modifikacije GLI3 za vezanje i aktiviranje VMP1. Također, ispitivanjem veznog mjesta za interakciju između GLI3 i p300 može se odrediti je li GLI3FL ili GLI3R zaslužan za regulaciju put KRASG12D-PI3K-AKT1-VMP1.⁸⁵

Osim u čvrstim tumorima, GLI3 ima sličnu ulogu u hematološkim onkogenim oboljenjima. Povišena ekspresija GLI3 zabilježena je u staničnim linijama Hodgkinovog limfoma. Također je pokazano da GLI3 igra ulogu u difuznom limfomu velikih B stanica (DLBCL).⁸⁶

Zabilježena su i protutumorska djelovanja proteina GLI3. Utvrđeno je da je GLI3 bio detektiran u neuronski diferenciranim meduloblastomima, dok je njihova detekcija izostala u neuronski nediferenciranim meduloblastomima kod koje je zabilježena smrtnost pacijenata bila veća. Dokazan je terapijski uspjeh nakon inhibicije HH signalizacije, što sugerira kako bi se GLI3R trebao koncentrirati unutar stanice i negativno regulirati ekspresiju gena povezanu s HH, a time i rast raka, što bi trebalo potvrditi dodatnim istraživanjima. Dodatno, brojne studije su izvijestile

da se transkripcijski faktori GLI mogu regulirati na HH-neovisan način što povećava mogućnost da GLI3 može regulirati ekspresiju gena neovisno o HH.^{67,87}

Drugo istraživanje koje su proveli Chaudhry i sur. (2017.) je pokazalo kako GLI3 može djelovati kao supresor tumora u pacijenata oboljelih od akutne mijeloidne leukemije (AML, eng. *Acute myeloid leukemia*). Pokazano je da su i GLI3FL i GLI3R eksprimirani u značajno nižim razinama u uzorcima oboljelih. Na temelju dobivenih podataka, odsutnost GLI3 u AML-u posljedica je hipermetilacije njegove promotorske regije. Globalna demetilacija pokazala je povećanje ekspresije proteina i GLI3FL i GLI3R *in vitro* i *ex vivo*. Takav porast GLI3FL i GLI3R također je bio vidljiv kada su AML stanične linije tretirane inhibitorom HH PF-04449913 (inhibitor SMO). Također je zabilježeno međusobno djelovanje između GLI3R, AKT1 i ERK1/2 proteina.⁸⁸

Postoji više inhibitora HH (ciklopamin, glasdegib, saridegib, vismodegib, sonidegib) koji su pokazali obećavajuće rezultate u borbi protiv karcinoma izazvanih HH. Ovi inhibitori ciljaju na SMO kako bi inhibirali ekspresiju gena povezanog s HH. Međutim, budući da je moguća regulacija GLI neovisna o HH (nekanonski signalni put), put bi i dalje mogao ostati aktivan unatoč inhibiciji SMO. Stoga su terapije koje inhibiraju vezanje transkripcijskih faktora GLI1 i GLI2 na DNA, kao što je GANT61, obećavajuće budući da djeluju izravno na GLI, ali ne i na SMO.^{67,77,89}

Većina istraživanja koja su istraživala GLI3 bila su fokusirana na aktivaciju tumora, dok su istraživanja fokusirana na supresivnu tumorsku ulogu GLI3 rijetka. Istraživanja koja su u svome fokusu imala obje forme proteina GLI3 su sugerirala kako GLI3FL izaziva kancerogeno djelovanje dok GLI3R ih smanjuje.⁶⁷

§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali

3.1.1. Standardne kemikalije

- Etanol ($\varphi = 70 \%$)
- DMSO (dimetil-sulfoksid)
- Forskolin ($c = 5 \text{ mmol dm}^{-3}$)
- MG132 ($c = 10 \text{ mmol dm}^{-3}$)
- SAG ($c = 400 \text{ } \mu\text{mol dm}^{-3}$)
- Litijev klorid ($c = 1 \text{ mol dm}^{-3}$)
- Paraformaldehid ($w = 3,6 \%$)
- Metanol
- DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol)
- Voda bez RNaza, redestilirana voda
- Izopropanol ($\varphi = 70 \%$)

3.1.2. Puferi i otopine

- TAE puffer (40 mol dm^{-3} Tris, 20 mmol dm^{-3} octena kiselina, 1 mmol dm^{-3} EDTA)
- TE puffer (10 mmol dm^{-3} Tris-HCl, 1 mmol dm^{-3} EDTA, pH=8,5)
- Fosfatni puffer PBS ($2,7 \text{ mmol dm}^{-3}$ KCl, 137 mmol dm^{-3} NaCl, 10 mmol dm^{-3} Na₂HPO₄, $1,8 \text{ mmol dm}^{-3}$ KH₂PO₄, pH 7,2)
- Puffer za nanošenje DNA (30% (v/v) glicerol, $0,25 \%$ (w/v) bromphenol blue, $0,25 \%$ (w/v) xylene cyanol)
- 4X LB puffer za nanošenje proteina ($0,2 \text{ mol dm}^{-3}$ Tris-HCl pH 6,8, $0,4 \text{ M}$ DTT, 8% SDS, 40% glicerol, $0,001 \%$ bromfenol blue)
- Puffer za elektroforezu proteina (1 mol dm^{-3} glicin, 50 mmol dm^{-3} Tris, 1% SDS)
- Puffer za prijenos proteina (200 mmol dm^{-3} Tris, $1,5 \text{ mol dm}^{-3}$ glicin + 10% metanol)
- Puffer TBST (50 mmol dm^{-3} Tris, 150 mmol dm^{-3} NaCl, $0,05 \%$ (v/v) Tween 20, pH 7,5)

- Pufer RIPA (25 mmol dm⁻³ Tris-HCl, 1 % Na-deoksiholat, 1 % Nonidet P-40, 150 mmol dm⁻³ NaCl, 0,1 % SDS) uz dodatak inhibitora Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail Tablets (*Roche*)
- Otopina za bojanje membrana (10 % metanol, 2 % octena kiselina, 0,1 % Naphtol Blue Black)
- Otopina za odbojavanje (50 % metanol, 7 % octena kiselina u vodi)
- 2 % otopina BSA (eng. *bovine serum albumin*) u TBST

3.1.3. Hranjivi mediji i dodaci za uzgoj bakterija

- Tekući Luria-Bertani (LB) (10 g dm⁻³ tripton, 5 g dm⁻³ ekstrakt kvasca, 10 g dm⁻³ natrijev klorid (NaCl)) (*Sigma*)
- ampicilin ($c = 100 \mu\text{L/mL}$) (*Sigma*)

3.1.4. Enzimi i nukleotidi

- „FastStart Taq DNA polimeraza” (*Roche*) s odgovarajućim 10x PCR reaction (*Roche*) puferom
- dNTP mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (*Roche*)
- T4 DNA ligaza (*New England Biolabs*)
- T4 DNA ligazni pufer (*New England Biolabs*)
- EcoRV (*New England Biolabs*)
- CutSmart Buffer (*New England Biolabs*)

3.1.5. Početnice

- BGH RV 5' TAGAAGGCACAGTCGAGG 3' (*Sigma Aldrich*)
- GLI3 ex8 F 5' AGCAGATCCTAAGCCGACAA 3' (*Sigma Aldrich*)
- RPLP0 F 5' GGCACCATTGAAATCCTGAGTGATGTG 3' (*Sigma Aldrich*)
- RPLP0 R 5' TTGCGGACACCCTCCAGGAAGC 3' (*Sigma Aldrich*)
- GLI3 exp F 5' CACTACCTCAAAGCGGGAAG 3' (*Sigma Aldrich*)
- GLI3 exp R 5' TGTTGGACTGTGTGCCATTT 3' (*Sigma Aldrich*)
- PTCH1 exp F 5' TCCTCGTGTGCGCTGTCTTCCTTC 3' (*Sigma Aldrich*)
- PTCH1 exp R 5' CGTCAGAAAGGCCAAAGCAACGTGA 3' (*Sigma Aldrich*)

- V1.5 F 5' GGACTTTCCAAAATGTCG 3' (*Sigma Aldrich*)

3.1.6. Antitijela

- Zečji anti-GLI3 (GTX104362, *Gene Tex*)
- Mišji anti- β -aktin (8H10D10, *Cell Signaling*)
- zečji anti-PTCH1 (VH143363, *ABClonal*)
- anti-mišje sekundarno antitijelo konjugirano s peroksidazom hrena (HRP) (554002, *BD Pharmingen*)
- anti-zečje sekundarno antitijelo konjugirano s peroksidazom hrena (HRP) (554021, *BD Pharmingen*)
- anti-zečje sekundarno antitijelo konjugirano s Alexa 594 (8889S, *Cell Signaling*)

3.1.7. Markeri veličine i boje

- Midori Green (*Bulldog Bio Inc.*)
- MassRuler Express Forward DNA Ladder Mix (*Thermo Scientific*)
- CozyHi Prestained Protein Ladder (*highQu*)

3.1.8. Komercijalni kompleti

- komplet za izolaciju plazmidne DNA NucleoBond® Xtra Midi (*MACHEREY-NAGEL*)
- Xfect™ Transfection Reagent (*Takara, USA*)
- Pierce BCA Protein Assay (*Thermo Scientific, USA*)
- NucleoZOL (*MACHEREY-NAGEL*)
- SuperSignal West PICO (*Thermo Scientific, SAD*)
- SuperSignal West FEMTO (*Thermo Scientific, SAD*)
- Protein Block Serum-Free (*Dako*)

3.1.9. Stanične linije

- Stanična linija ljudskog melanoma A375 (CRL-1619, *ATCC*)
- Stanična linija ljudskih fibroblasta prostate WPMY-1 (CRL-2854, *ATCC*)

3.1.10. Hranjivi mediji i dodaci za uzgoj ljudskih stanica

- DMEM – Dulbecco's Minimal Essential Medium (*Sigma Aldrich*)
- RPMI 1640 medij (*Sigma Aldrich*)
- FBS - fetalni goveđi serum (*Sigma Aldrich*)
- Penicilin 10 000 IU / streptomycin 10 mg/mL (100 x otopina) (*Sigma Aldrich*)

3.1.11. Plazmidni vektori i inserti

- gblock „Gene Block GLI3R“ (*IDT*)
- plazmidni vektor pcDNA3 (*Addgene*)
- plazmidni vektor pcDNA4TOGLI3 (*dar od dr. Stevanović*)

3.1.12. Bakterijski sojevi

- *Escherichia coli* soja „Mach1 T1R“

3.1.13. Ostalo

- Obrano mlijeko u prahu 1 % m.m. (*Dukat*)
- Nitrocelulozna membrana (Amersham Protran BA83, *GE Healthcare*)
- Tripsin (0,05 % w/v + 1 mmol dm⁻³ EDTA)
- Metilensko modriilo (*Kemika*)

3.1.14. Pribor

- Mikroeprovete od 0.2 mL
- Mikroeprovete od 2 mL
- Automatske pipete s pripadajućim nastavcima (0.1 µL – 1000 µL)
- Epravete *Falcon*® (15 mL i 50 mL)
- Petrijeve posudice za stanice 10 cm (*TPP*)
- Staklene pipete (5 mL i 10 mL)
- Bürker-Türkova komorica (hemocitometar) (*Thoma IsoLab*)
- Mikrotitarske ploče sa 6 i 24 bunarića (*TPP*)
- Strugač za stanice (*Sarstedt*)
- Ledeni blok

- Vlažna komora

3.1.15. Instrumenti

- Uređaj za PCR GeneAmp PCR System 2720 (*Applied Biosystems*)
- Termoblok s mogućnošću protresanja (*TS-100C, Biosan*)
- Horizontalni sustav za elektroforezu Mini PROTEAN Tetra (*Bio-Rad*)
- UVITEC Alliance 4.7 (*UVITEC Cambridge, UK*)
- UVITEC Alliance Q9 mini (*UVITEC Cambridge, UK*)
- Spektrofotometar NanoPhotometer (*Implen, Njemačka*)
- Termostatirana tresilica Unimax 1010 (*Heidolph*)
- Vortex miješalica PV-1 (*Grant-bio*)
- Centrifuga 5415R (*Eppendorf*)
- Centrifuga PlateFuge (*Sigma Aldrich*)
- Centrifuga Harrier 18/80 (*Sanyo*)
- Svjetlosni mikroskop BIB-100 (*Boeco*)
- Stanični inkubator (*Kambič*)
- Spektrofotometar za pločice Labsystems Multiskan MS (*Thermo Fisher*)
- Tresilica SHRK07AL2 (*Ohaus*)

3.2. Metode

3.2.1. Konstrukcija vektora za ekspresiju represorskog oblika proteina GLI3 u stanicama čovjeka

3.2.1.1. Dizajn inserta „Gene Block Gli3R“

Korištenjem online servisa NCBI (eng. *National Center for Biotechnology Information*) pretražena je i preuzeta nukleotidna sekvenca mRNA gena *GLI3* u FASTA formatu (NM_000168.6:282-5024 Homo sapiens GLI family zinc finger 3 (*GLI3*), mRNA, proteinska sekvenca je dostupna pod pristupnim brojem NP_000159.3). Pregledavanjem literature, pronađen je konstruirani plazmidni vektor za represorski oblik proteina *GLI3* (hGli3 NTOTAL u AINGpCAGGS, (Addgene plasmid # 121973 ; <http://n2t.net/addgene:121973> ; RRID:Addgene_121973)). Temeljem istraživanja koja su proveli Tempé i sur. (2006.) te Pan i Wang (2007) pronađene su aminokiseline koje se fosforiliraju prilikom procesiranja, a prema

navedenim radovima uzet je raspon od 648 do 680 aminokiselina unutar kojega se nalazi potencijalno mjesto cijepanja. Analizom sekvence vektora hGli3 NTOTAL u AINGpCAGGS te usporedbom sa sekvencom mRNA i proteina GLI3, moguće je detektirati i dizajnirati insert koji bi odgovarao represorskom obliku proteina GLI3. Na krajeve dizajniranog *Gene blocka* dodana su restriksijska mjesta kako bi se olakšalo kloniranje u željeni ekspresijski vektor.

Dizajnirana sekvenca pohranjena je u FASTA formatu te je naručena od tvrtke Integrated DNA Technologies, Inc., SAD, koja je sintetizirala sintetsku dvolančanu DNA koja odgovara željenoj dizajniranoj sekvenci. Dizajnirani insert dostavljen je u obliku liofilizirane DNA koja se otopi i klonira u plazmidni vektor.

Da bi se konstruirao vektor za ekspresiju represorskog oblika proteina GLI3, provedeno je kloniranje u nekoliko koraka. Prvo se pocijepa prazni vektor željenim restriksijskim enzimom, a onda i konstruirani „*Gene Block Gli3R*“. Potom se izvrši ligacija kako bi se insert ugradio u vektor. Nakon ligacije, kompetentne bakterije se transformiraju, potom slijedi njihov uzgoj na hranjivoj podlozi i naposljetku se narasle kolonije analiziraju pomoću PCR reakcije.

3.2.1.2. Digestija plazmidnog vektora i inserta

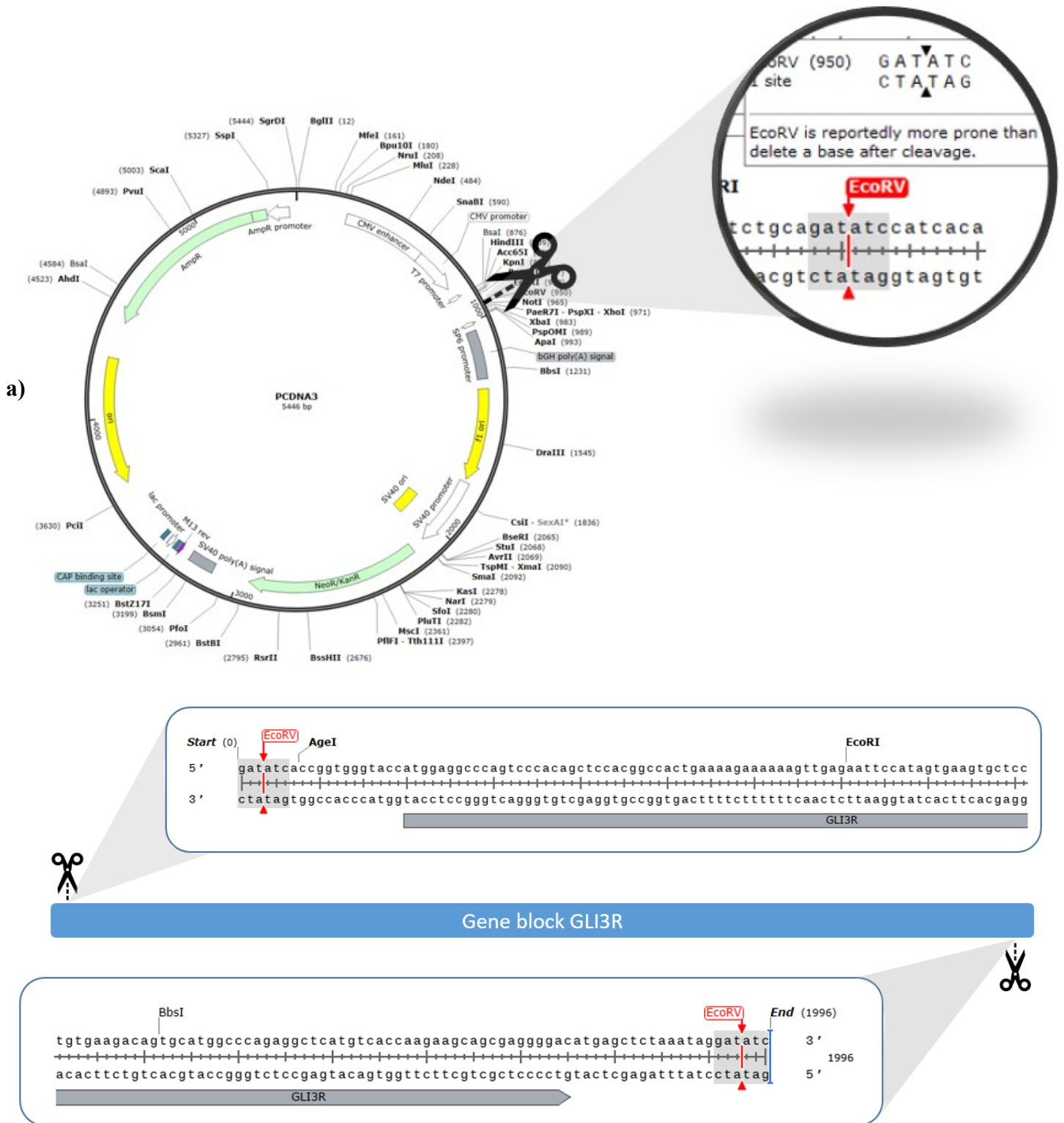
Pripremljena je reakcijska smjesa za digestiju vektora pcDNA3 (veličine 5446 bp) koristeći enzim *EcoRV* u pripadajućem CutSmart puferu. Pripremljena je i druga reakcijska smjesa za digestiju „*Gene Block Gli3R*“ inserta koristeći isti enzim. Specifičnost enzima *EcoRV* je što on stvara tupe krajeve pa se tome trebaju prilagoditi i uvjeti reakcije ligacije tupih krajeva (eng. *blunt end ligation*). Sastav reakcijskih smjesa naveden je u **Tablici 1.** i **tablici 2.** Provedena je inkubacija od 30 minuta na 37 °C. Po isteku vremena inkubacije, reakcijska smjesa je inaktivirana inkubacijom od 20 minuta pri 65 °C. Mjesta cijepanja vektora i „*Gene Block Gli3R*“ prikazana su na **Slici 11.**

Tablica 1. Sastav reakcijske smjese za digestiju vektora pcDNA3

Reagens	Volumen/ μL	Konačna koncentracija
pcDNA3	1,7	50 ng/ μL
EcoRV (20 000 U/mL)	1,0	2 U
CutSmart Buffer 10x	2,0	1x
H ₂ O	15,3	/
UKUPNI VOLUMEN	20,0	

Tablica 2. Sastav reakcijske smjese za digestiju Gene Block GLI3R fragmenta

Reagens	Volumen/ μL	Konačna koncentracija
Gene Block GLI3R fragment	8,0	8 ng/ μL
EcoRV (20 000 U/mL)	1,0	2 U
CutSmart Buffer 10x	1,0	1x
H ₂ O	/	/
UKUPNI VOLUMEN	10,0	



Slika 11. (a) Mjesto cijepanja vektora pcDNA3 pomoću enzima EcoRV prikazano na plazmidnoj mapi (b) Shematski prikaz Gene Block GLI3R fragmenta i cijepanja njegovih krajeva pomoću enzima EcoRV

3.2.1.3. Ligacija plazmidnog vektora i inserta

U sljedećem koraku ugradi se insert u plazmidni vektor ligacijom. Priređena je ligacijska reakcijska smjesa T4 DNA ligaze, T4 DNA ligaznog pufera, vode te pocijepanih vektora i inserta dobivenih u prethodnom koraku u masenom omjeru 1:1 kako je prikazano u **tablici 3**. Omjer je izračunat pomoću kalkulatora koji u obzir uzima duljine fragmenata, a koji se može pronaći na web adresi <https://nebiocalculator.neb.com/#!/ligation>.

Tablica 3. Sastav reakcijske smjese za ligaciju vektora pcDNA3 i Gene Block fragmenta GLI3R.

Reagens	V/ μ L
Digestirani pcDNA ($\gamma=50$ ng/ μ L)	1,00
Digestirani <i>Gene Block</i> Gli3R ($\gamma=8$ ng/ μ L, za omjer 1:1 potrebno 17,59 ng)	2,13
T4 DNA ligaza	1,00
T4 DNA ligazni pufer	2,00
H ₂ O	13,81
UKUPNI VOLUMEN	20,00

Reakcijska smjesa inkubirana je dva sata na sobnoj temperaturi, a potom je ligaza inaktivirana 10 minuta na termobloku zagrijanom na 65 °C.

3.2.1.4. Transformacija kompetentnih bakterija

Po završetku ligacije, kompetentne bakterije su transformirane ligacijskom smjesom. Kompetentne bakterije *Escherichia coli* soja „Mach1 T1R“, koje se čuvaju pohranjene na -80 °C, otopljene su na ledu 10 minuta. Dodano je 20 μ L ligacijske smjese u mikroeprevetu u kojoj se nalaze bakterije te su bakterije oprezno promiješane kružnim pokretima pomoću nastavka za automatsku pipetu. Bakterijska smjesa inkubirana je 10 minuta na ledu. Nakon inkubacije na ledu uslijedila je inkubacija 45 sekundi na termobloku pri 42 °C (tzv. *heat shock*). Smjesa je potom vraćena na led dvije minute. Dodano je 250 μ L LB medija te se mikroepreveta s bakterijskom smjesom inkubirala 1 sat na 37 °C uz protresanje. Nakon inkubacije, sav sadržaj mikroeprevete (oko 300 μ L) je razmazan na pripremljene selektivne hranjive ploče načinjene

od LB medija, agara (1 % w/v) te odgovarajućeg antibiotika (ampicilin, 100 µg/mL). Ploče su ostavljene pri sobnoj temperaturi 10 minuta kako bi se bakterijska smjesa upila u podlogu. Hranjive podloge stavljene su u bakterijski inkubator na 37 °C preko noći, okrenute naopako kako ne bi došlo do kondenzacije na poklopcu koja bi mogla oštetiti bakterijske kolonije.

3.2.1.5. Ispitivanje bakterijskih kolonija lančanom reakcijom polimeraze

Lančana reakcija polimerazom (PCR, eng. *polymerase chain reaction*) je metoda koja se temelji na umnažanju ciljnog dijela DNA *in vitro* pomoću DNA polimeraze i odgovarajućeg para oligonukleotidnih početnica (eng. *primers*), koje omeđuju željeni segment. PCR na kolonijama (eng. *colony PCR*) omogućuje identifikaciju onih kolonija koje sadrže uspješno transformirani plazmid od interesa. Specifičnost PCR reakcije na kolonijama je ta što kao kalup se ne koristi pročišćena DNA već se uzima mala količina bakterijskih kolonija. Dobrim odabirom početnica, osim prisustva željenog plazmida, moguće je odrediti i smjer ugrađenog inserta.

Pomoću PCR reakcije na kolonijama umnožen je segment veličine 996 pb koji je prikazan na **slici 12.** (plavo obojano), a koji je omeđen početnicama „BGH RV“ i „GLI3 ex 8“.

Početnica „GLI3 ex8 F“ nalazi se u sredini slijeda kloniranog inserta *Gene Block Gli3R*, a „BGH RV“ nalazi se nizvodno od mjesta ligacije čime se obuhvaća dio GLI3R inserta i dio plazmida. Na taj način, dobivenim produktom potvrđena je uspješnost ligacije i pravilna orijentacija inserta.



Slika 12. Položaj početnica *GLI3 ex8 F* i *BGH RV* koje se koriste za umnažanje specifičnog odsječka plazmida *pcDNA3* s pravilno ugrađenim fragmentom *GLI3R*. na mapi se jasno vidi položaj početnica (jedna početnica se nalazi unutar inserta, a druga na okosnici plazmida, istaknuto plavom bojom na slici).

Na petrijevoj posudici markerom su brojevima obilježene željene bakterijske kolonije koje su se analizirale. Broj kolonija za analizu ovisi o broju naraslih kolonija, a u ovom radu analizirano je ukupno 25 kolonija. Priređena je matična otopina (eng. *master mix*) reakcijske smjese za ukupno 28 uzoraka (25 uzoraka + negativna kontrola + pogreška kod pipetiranja). Sastav matične otopine za jedan uzorak i 28 uzoraka prikazan je **tablicom 4**.

Tablica 4. Sastav matične otopine za colony PCR

Komponenta	Početne koncentracije	Konačne koncentracije	1x matična otopina / μ L	28x matična otopina / μ L
qH ₂ O	/	/	7,72	216,16
Pufer	10x	1x	1,00	28,00
Početnica „GLI3 ex8 F“	100 μ mol dm ⁻³	5 mmol dm ⁻³	0,50	14,00
Početnica „BGH RV“	100 μ mol dm ⁻³	5 mmol dm ⁻³	0,50	14,00
dNTP	10 mmol dm ⁻³	0,2 mmol dm ⁻³	0,20	5,60
FastStart Taq DNA polimeraza	100 U	0,8 U	0,08	2,24
Ukupni volumen	/	/	10,00	280,00

Ukupan volumen reakcijske smjese za svaki uzorak iznosi 10 μ L, tako je priređeno 26 mikroepreveta od 0,2 mL (25 uzoraka + negativna kontrola) te 25 mikroepreveta od 2 mL napunjenih sa 1 mL LB medija s odgovarajućim antibiotikom (ampicilin, 100 μ g/mL). Svakoj koloniji dodijeljen je redni broj koji odgovara mikroeprevetama. U svaku eprvetu od 0.2 mL otpipetirano je 10 μ L reakcijske smjese, a pomoću sterilnog vrha nastavka za automatsku pipetu dodana je mala količina bakterijske kolonije. Ostatak kolonija s vrha nastavka dodan je u LB medij s antibiotikom kako bi se priredila početna bakterijska kultura (eng. *starter*). U negativnu kontrolu nije stavljena bakterijska kolonija, dakle ona se sastoji samo od matične otopine.

PCR program je prikazan u **tablici 5**.

Tablica 5. Shematski prikaz PCR programa (prikazane su temperature i trajanje ciklusa) korištenog za PCR na kolonijama.

Temperatura	Vrijeme/min	
94 °C	4:00	
94 °C	0:30	} 45 x
55 °C	0:45	
72 °C	2:00	
72 °C	7:00	
4 °C	∞	

Pripremljene bakterijske početne kulture inkubirane su na termobloku 1 sat pri 37 °C uz konstantno protresanje, a zatim su spremljene na +4 °C nekoliko dana dok ne budu potrebne za daljnje korake.

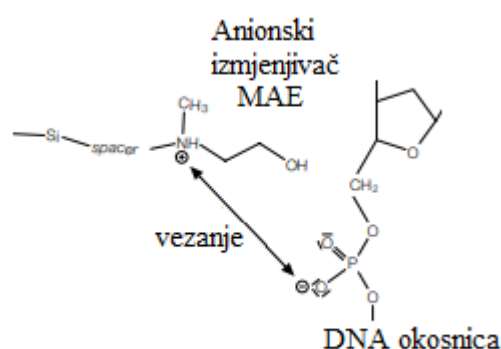
Rezultati PCR reakcije analizirani su elektroforezom na 1 %-tnom agaroznom gelu. 0.8 g agaroze otopljeno je zagrijavanjem u mikrovalnoj pećnici u 80 mL TAE pufera. Potom je dodano 3 µL Midori green boje i smjesa je izlivena u kalup za gel te je dodan odgovarajući češljic. Gel je ostavljen oko 30 minuta da se ohladi i polimerizira, potom je češljic uklonjen, a kalup je uronjen u kadnicu za elektroforezu napunjenu TAE puferom. U prvu jažicu gela nanoseno je 4 µL markera MassRuler Express Forward DNA Ladder Mix. U ostale jažice dodani su redom uzorci (V(uzorak, 1,...,25, negativna kontrola) = 2,5 µL, pomiješani s 1 µL boje za nanošenje DNA). Pokrenut je sustav za elektroforezu pri uvjetima od 100 V stalnog napona tijekom 25 minuta. Po završetku elektroforeze, gel je uslikan pomoću CCD kamere UVITEC Alliance 4.7 (UVITEC Cambridge, UK).

3.2.1.6. Izolacija plazmidne DNA iz bakterija

Nakon analize bakterijskih kolonija odabrana je početna kultura one kolonije koja nosi *Gene Block* Gli3R insert. Pripremljeno je 100 mL LB medija u koji je dodan odgovarajući antibiotik (ampicilin, 100 µg/mL). U tako pripremljen hranjivi medij dodan je cijeli volumen početne kulture (1 mL). Bakterije su se uzgajale preko noći na 37 °C u termostatoranoj miješalici uz miješanje na oko 180 okretaja po minuti.

Za izolaciju željene plazmidne DNA iz bakterija korišten je komplet Nucleobond Xtra Midi (MACHEREY-NAGEL) prema priloženom protokolu od strane proizvođača. Sastav korištenih

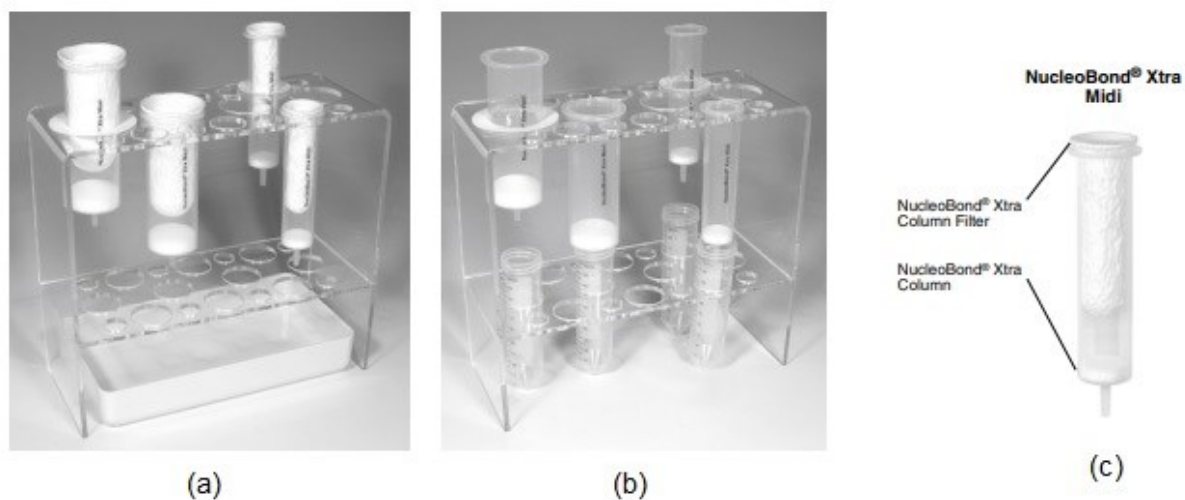
pufera je zaštićen autorskim pravima i nije poznat, a sustav pročišćavanja se temelji na modificiranoj alkalnoj lizi gdje se bakterije liziraju u alkalnim uvjetima nakon čega se lizat neutralizira, pri čemu se denaturirana genomska DNA i proteini talože centrifugiranjem. Plazmidna DNA se neoštećena veže na kolonu koja je u osnovi anionski izmjenjivač punjen smolom na bazi silike. Punilo se sastoji od hidrofobnijih makroporoznih zrnaca silicija modificiranih s metil-amino-etanolom kao anionskim izmjenjivačem (na taj način je osiguran gusto raspoređen pozitivan naboj kroz kolonu) (**Slika 13.**). Kolona na sebe specifično veže negativno nabijenu fosfatnu okosnicu DNA što omogućava eluciju svih prisutnih onečišćenja. Pomakom pH vrijednosti u blago alkalne uvjete doći će do neutralizacije pozitivnog naboja smole, stoga se pročišćena DNA eluira s puferom koji sadrži visok udio soli.



Slika 13. Izolacija DNA se temelji na anionsko-izmjenjivačkoj kromatografiji. Promjenom pH vrijednosti otopine, fosfatna okosnica DNA mijenja svoj naboj (pri niskim pH negativno nabijena). Modifikacijom punila s metil-amino-etanolom osiguran je pozitivan naboj unutar kolone čime se negativno nabijena okosnica privremeno veže na kolonu. (Preuzeto i prilagođeno prema referenci)⁹⁰

Prekonoćna bakterijska kultura prelivena je u dvije epruvete Falcon (50 mL) te su se epruvete centrifugirale 15 minuta na 4 °C pri 5 000 × g. Po završetku centrifugiranja supernatant se odlio, a talog stanica se resuspendiran u 8 mL pufera za resuspenziju (RES pufer) pazeći da ne zaostane čvrstih nakupina taloga. Prilikom resuspendiranja talozi iz epruveta Falcon su spojeni u jednu od epruveta tako što se 8 mL RES pufera prvo otpipetiralo u jednu epruvetu i resuspendiralo, a onda je suspenzija oprezno prebačena u drugu epruvetu. U suspenziju je dodano 8 mL pufera za lizu (LYS pufer) te je epruveta oprezno okrenuta 2 do 3 puta kako bi se spriječilo stvaranje pjene. Plavo obojena suspenzija talog+RES+LYS ostavljena je 5 minuta na sobnoj temperaturi. Kolona za pročišćavanje DNA i filter su postavljene na pripadajući stalak te su ekvilibrirane s 12 mL pufera za ekvilibraciju (EQU pufer). Suspenzija talog+RES+LYS

po isteku vremena su neutralizirane s 8 mL pufera za neutralizaciju (NEU pufer) te su blago invertirane 5 puta, sve do kada se otopina obezbojila i pojavio se pahuljasti talog koaguliranih proteina. Nakon neutralizacije, suspenzija je oprezno i polako prebačena na filter u kolonu za pročišćavanje DNA. Nakon kompletne elucije, kolona je isparana s 5 mL EQU pufera. Nakon ispiranja, uklonjen je filter s kolone i dodano je 8 mL pufera za ispiranje (WASH pufer). Pripremljena je epruveta Falcon (15 mL) u koju je eluirana vezana DNA s kolone dodatkom 5 mL pufera za eluciju (ELU pufer). U epruvetu je dodano 3,5 mL izopropanola kako bi se potakla precipitacija plazmidne DNA. Otopina u epruveti je dobro izvorteksirana, potom je razdijeljena na šest alikvota po 2 mL i centrifugirana 20 minuta na 4 °C pri 15 000 × g. Supernatant je oprezno uklonjen pipetiranjem, a na talog je dodano 0,5 mL etanola ($\varphi(\text{EtOH}) = 70\%$) te je centrifugirano 5 minuta na sobnoj temperaturi pri 15 000 × g. Etanol je uklonjen, a talog je dobro posušen i resuspendiran u 100 μL TE pufera.



Slika 14. Korišteni komplet Nucleobond Xtra Midi. (a) Kolone s filterom. Filter papir onemogućava prolazak koaguliranih proteina i nečistoća. (b) Sustav za ispiranje DNA s kolone. Ispiranje se vrši promjenom pH otopine pri čemu se mijenja naboj okosnice DNA te se DNA ispire. (c) Uvećana kolona s filter papirom. (Preuzeto prema referenci) ⁹⁰

Koncentracija plazmidne DNA izmjerena je pomoću spektrofotometra NanoPhotometer (Implen, Njemačka). Za kalibraciju korišteno je 1 μL TE pufera koji je također bio korišten za otapanje taloga. Na spektrofotometar nanoseno je po 1 μL uzorka.

3.2.1.7. Sekvenciranje izolirane plazmidne DNA

Jedan alikvot plazmidne DNA dan je na sekvenciranje (γ (pcDNA3-GLI3R) = 1018,89 ng/mL). Korištene su početnice V1.5 (F) i BGH RV.

3.2.2. Validacija vektora za ekspresiju represorskog oblika proteina GLI3 u stanicama čovjeka

3.2.2.1. Rad sa staničnim kulturama

Rad sa staničnim kulturama odvija se u posebnom laboratoriju u kojemu su osigurani sterilni uvjeti kako bi se izbjegle moguće kontaminacije. Sav pribor, laboratorijsko posuđe, otopine i ostali materijali moraju biti sterilni. Radne površine u laboratoriju, kao i laminar, prije i nakon početka rada je potrebno sterilizirati pomoću 70 %-tnog alkohola. Prema potrebi, laboratorij se sterilizira i pomoću UV lampi.

Za rad se koriste dvije stanične linije: A375 i WPMY-1. Ove stanične linije su odabrane jer pokazuju različitu razinu ekspresije proteina GLI3: linija A375 pokazuje visoku razinu ekspresije, dok WPMY-1 pokazuje nisku. Stanice su svaki dan pregledavane pomoću svjetlosnog mikroskopa, pri čemu je bilo važno obratiti pažnju na moguće kontaminacije te pratiti gustoću stanica i/ili broj mrtvih stanica koje plutaju u mediju. Korištena su dva medija DMEM (za A375) i RPMI (za WPMY-1). Oba medija kompletirana su s 10 % FBS i antibioticima penicilin i streptomycin (konačna koncentracija od 60 to 120 ng/mL penicilina i od 50 do 100 (μ g/mL) streptomicina).

Kako bi stanične kulture preživjele, medij je mijenjan svaka dva do tri dana, ovisno o boji medija i broju mrtvih stanica. Pipetom je uklonjen stari medij iz petrijevke i odložen je u odgovarajući otpad, a čistom sterilnom pipetom je dodano 10 mL svježeg medija.

Kada su stanice postale konfluentne, bilo je potrebno razrijediti ih. Medij je otpipetiran, a stanice su isprane s 5 mL fosfatnog pufera PBS-a kako bi ostatci medija koji mogu inhibirati djelovanje tripsina tijekom tripsinizacije bili uklonjeni. Potom je dodano 1 mL tripsina (0,05 % w/v + 1 mmol dm⁻³ EDTA) uz blago miješanje petrijevke kako bi se stanice uspješno tripsinizirale tj. odvojile od dna petrijevke. Djelovanje tripsina je zaustavljeno nakon 5 minuta dodatkom 5 mL medija. Po dodatku medija, stanice je bilo potrebno dobro resuspendirati pomoću pipete kako bi se uklonili mogući stanični agregati. Odvojen je 1 mL resuspendiranih

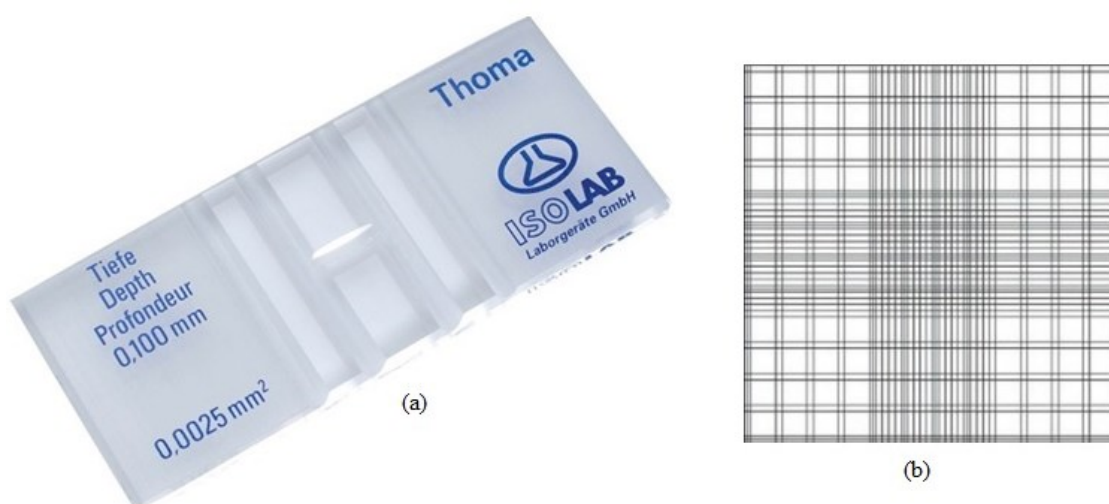
stanica u petrijevku, a ostatak stanica je bačen u odgovarajući otpad. Petrijevka je nadopunjena s medijem do 10 mL.

3.2.2.2. Nasađivanje stanica za pokuse

Za pokuse su korištene ploče za uzgoj sa 6 i 24 bunarića.

Stanice je bilo potrebno tripsinizirati kako je opisano u prethodnom ulomku. Tripsinizirane stanice su prebačene u čistu sterilnu staklenu epruvetu i pipetom su promiješane kako bi bile što homogenije. Prije nasađivanja stanica na ploče za uzgoj, stanice je bilo potrebno prebrojati kako bi uvjeti pokusa bili optimizirani.

Brojanje stanica radilo se pomoću Bürker - Türkove komorice odnosno hemocitometra koji je prikazan na **slici 15**. Pomiješano je 20 μL stanica s 80 μL metilenskog modrila kako bi pri brojanju se lakše razlikovalo žive stanice (nebojane) od mrtvih stanica (obojane plavo).



Slika 15. (a) Hemocitometarska komorica po Bürker-Türku; staklene izrade s precizno izrezbarenom mrežom s točno definiranim dimenzijama (b). Prije upotrebe komorica mora biti suha i čista. Komorica se pripremi tako što se bridovi lagano navlaže te se na nju nalijepi pokrovno stakalce. (Preuzeto prema referenci)^{91,92}

- a) Potrebni volumen stanica za ploče za uzgoj sa 6 bunarića (200 000 stanica po bunariću) izračunat je pomoću formule:

$$\frac{\text{broj prebrojanih stanica}}{0,4} \times 5 \times 10^3 = N \text{ broj stanica/mL}$$

$$\frac{2 \times 10^5 \text{ broj stanica}}{N \text{ broj stanica/mL}} = X \text{ mL}$$

Izračunati volumen stanične kulture X otpipetiran je u bunariće te se u svaki bunarić dodao hranjivi medij do 2 mL. Tako pripremljena mikrotitarska ploča stavljena je u stanični inkubator preko noći pri temperaturi od 37 °C.

- b) Potrebni volumen stanica za ploče za uzgoj s 24 bunarića (50 000 stanica po bunariću) izračunat je pomoću formule:

$$\frac{\text{broj prebrojanih stanica}}{0,4} \times 5 \times 10^3 = N \text{ broj stanica/mL}$$

$$\frac{5 \times 10^4 \text{ broj stanica}}{N \text{ broj stanica/mL}} = X \text{ mL}$$

Izračunati volumen stanične kulture je otpipetiran u bunariće te se u svaki bunarić dodao hranjivi medij do 1 mL. Tako pripremljena mikrotitarska ploča stavljena je u stanični inkubator preko noći pri temperaturi od 37 °C.

3.2.2.3. Tretmani stanica

Na ploče za uzgoj sa 6 bunarića nasađeno je 2×10^5 stanica po bunariću stanične linije A375 kako je opisano u ulomku 3.2.2.2. *Nasađivanje stanica za pokuse.*

Stanice su tretirane s tretmanima navedenim u **tablici 6.** tako što je otpipetiran potreban volumen pojedinog tretmana u 2 mL hranjivog medija DMEM.

Tablica 6. Korišteni stanični tretmani s pripadajućim početnim i konačnim koncentracijama

Tretman	Početna koncentracija / mmol dm ⁻³	Konačna koncentracija / μmol dm ⁻³	V/ μL
Forskolin	5,0	20,0	8,0
MG132	10,0	10,0	2,0
LiCl	1,0×10 ⁶	1,0×10 ⁴	20,0
SAG	0,4	2,5	12,5

Tretman s DMSO je pripremljen tako što se u 2 mL medija dodalo 12,5 μL DMSO. DMSO se koristio kao kontrola otapala, da bi se utvrdilo da samo otapalo (DMSO) ne dovodi do učinaka koje vidimo na stanicama. Zbog toga je volumen DMSO najveći volumen otapala koji se koristio u ovim pokusima, odnosno navedenih 12,5 μL.

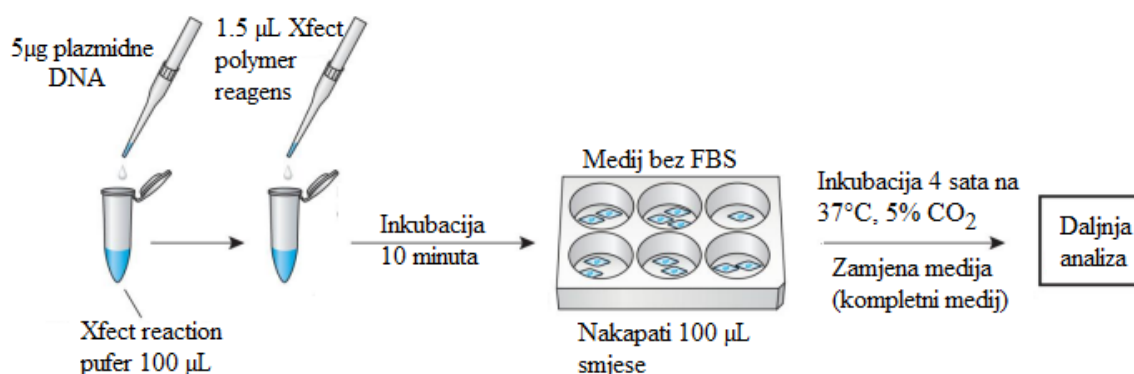
Ukoliko se tretmani rade za stanice nasađene u mikrotitarske ploče s 24 bunarića, ukupan volumen po bunariću iznosio je 1 mL.

Sve tretmane osim MG132 inkubiramo pri 37 °C, 5 % CO₂ tijekom 24 sata. Tretman s MG132 inkubiran je pri 37 °C, 5 % CO₂ tijekom 4 sata.

3.2.2.4. Transfekcija stanica

Transfekcijom stanica dolazi do prolazne ekspresije represorskog oblika proteina GLI3 s plazmida u citoplazmi transfecirane stanice.

Za transfekciju koristi se komplet Xfect RNA Transfection Reagent prema priloženom protokolu u kompletu koji je shematski prikazan na **slici 16**.



Slika 16. Shematski prikaz protokola kompleta Xfect RNA Transfection Reagent (Preuzeto i prilagođeno prema referenci)⁹³

Stanične linije A375 i WPMY-1 su dan prije provođenja transfekcije nasadene prema potrebi pokusa na mikrotitarske ploče sa 6 bunarića kako je opisano u ulomku 3.2.2.2. *Nasađivanje stanica za pokuse.*

U sterilnu epruvetu od 2 mL dodano je 5 µg plazmidne DNA, a čiji volumen je izračunat na temelju poznate koncentracije ishodne otopine prema **tablici 7**. Plazmid pcDNA3 koji ne nosi nikakav insert koristi se kao negativna kontrola za obje stanične linije. Stanična linija WPMY-1 je transfecirana plazmidnim vektorom za ekspresiju pune forme proteina GLI3 (konstrukt pcDNA4TOGLI3) i plazmidnim vektorom za ekspresiju represorske forme proteina GLI3 (konstrukt pcDNA-GLI3R) kako bi se optimiziralo vrijeme transfekcije, a stanična linija A375 samo konstruktom pcDNA-GLI3R kako bi bio ispitan efekt transfekcije.

Tablica 7. Korištene plazmidne DNA za transfekciju stanica s pripadajućim početnim koncentracijama

Plazmidna DNA	Koncentracija ($\mu\text{g}/\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$)	Stanična linija
pcDNA3	582,90	A375, WPMY-1
pcDNA4TOGLI3	343,00	WPMY-1
pcDNA3-GLI3R	1019,28	A375, WPMY-1

Potom je dodano 100 µL Xfect pufera te se epruveta dobro vorteksirala 10 sekundi. U smjesu pufera i plazmidne DNA dodano je 1,5 µL Xfect polymer reagensa nakon čega je ponovljeno vorteksiranje te se smjesa inkubirala na sobnoj temperaturi 10 minuta. Iz bunarića je uklonjen stari medij, a stanice su isprane PBS-om. Stanicama je dodano 2 mL medija koji ne sadrži fetalni goveđi serum (FBS, eng. *Fetal bovine serum*) kako bi se spriječila inhibicija transformacije. Po isteku vremena inkubacije, u svaki bunarić je nakapano 100 µL smjese Xfect pufera, Xfect polimera i plazmidne DNA. Ploče za uzgoj su inkubirane 4 sata na 37 °C u atmosferi s 5 % CO₂. Po isteku vremena inkubacije medij je zamijenjen s kompletnim odgovarajućim medijem za svaku staničnu liniju te je vraćen u inkubator na 24 ili 48 sati, ovisno o potrebama pokusa. Navedeni protokol optimiziran je za mikrotitarske ploče sa 6 bunarića, a ukoliko se transfekcija radila u mikrotitarskim pločama s 24 bunarića, uzeta je ¼ reakcijske smjese po bunariću.

3.2.2.5. Izolacija proteina iz stanica

Za izolaciju proteina iz stanica korišten je pufer za lizu (RIPA pufer + inhibitor proteaza) uz sonikaciju.

RIPA pufer omogućava ekstrakciju proteina iz citoplazme, membrana i jezgre, a temelji se na djelovanju ionskih deterdženata poput natrijeva deoksikolata ili natrijeva dodecil sulfata u blago bazičnim uvjetima uz prisustvo natrijeva klorida i neionskog surfakanta Triton X-100.

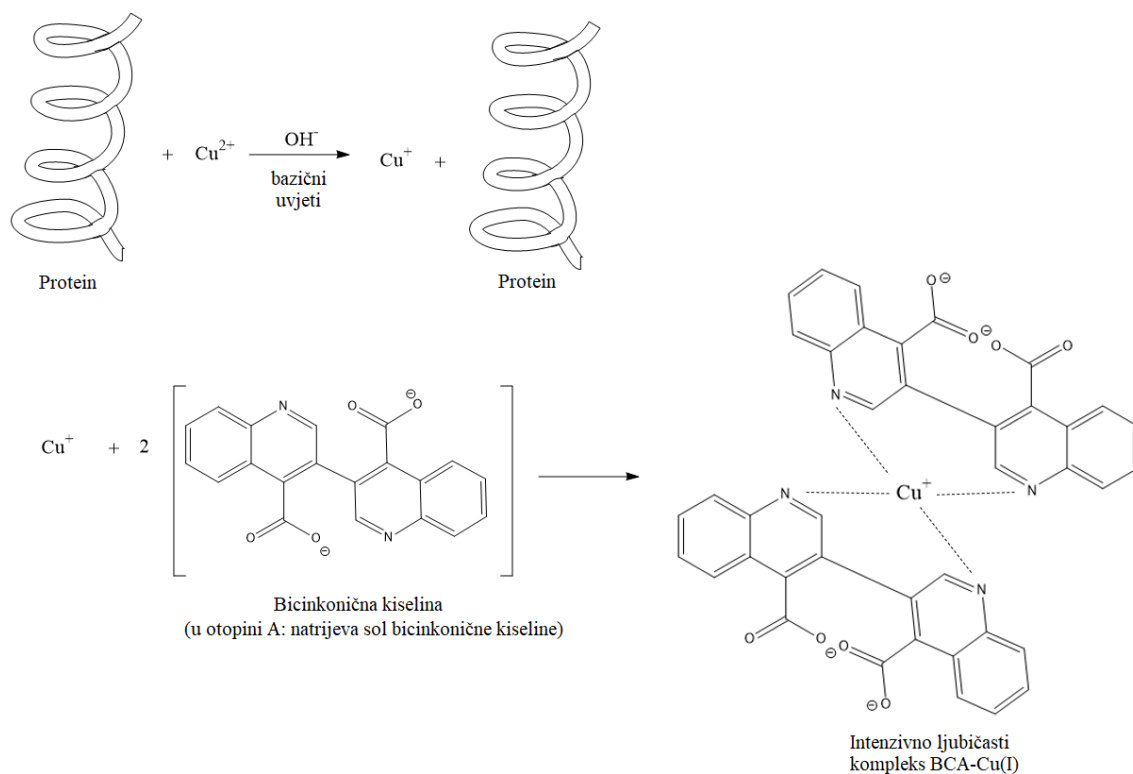
Stanicama koje su inkubirane 24 sata na mikrotitarskoj ploči uklonjen je medij te su se stanice isprale PBS-om nekoliko puta, obavezno u sterilnim uvjetima kako se ne bi kontaminirale stanice koje se inkubiraju 48 sati ukoliko takve postoje. Dodan je 1 mL PBS-a te su pomoću strugala stanice oprezno i temeljito sastrugane s dna bunarića. Stanice u PBS-u su otpipetirane u epruvete od 2 mL te su centrifugirane 5 minuta na $12\,000 \times g$. Supernatant je odliven te je stanični talog pohranjen na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Postupak je ponovljen za stanice koje su se inkubirale 48 sati.

Stanični talozi su se resuspendirali u 50 μL pufera za lizu te su držani cijelo vrijeme na ledu. Resuspendirane stanice su sonicirane dva puta po 15 sekundi (sonda debljine 1 mm, amplituda 80 %, cycle 1) pomoću sonikatora Labsonic M. Nakon sonikacije, smjesa je centrifugirana 30 minuta na $16\,000 \times g$ pri temperaturi od $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Supernatanti su prebačeni u čiste epruvete i pohranjeni na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ do upotrebe.

3.2.2.6. Mjerenje koncentracije proteina BCA metodom

Koncentracija proteina u staničnim lizatima određena je metodom bicinkonične kiseline (BCA, eng. *Bicinchoninic acid assay*). Metoda je temeljena na biuretskoj reakciji odnosno interakciji BCA otopine, točnije bakrovih (II) iona u bazičnim uvjetima, i proteina iz staničnog lizata. Nastaje kompleks, a bakrovi (II) ioni se reduciraju u bakrove (I) ione. Bakrovi (I) ioni reagiraju s bicinkoničnom kiselinom dajući specifičan ljubičasto obojan produkt kako je prikazano shematski na slici 17.



Slika 17. Shematski prikaz Biuretske reakcije. U reakciji dolazi do redukcije bakrovih (II) iona, pri čemu bakrovi (I) ioni reagiraju s bicinkoničnom kiselinom dajući ljubičasti kompleks apsorpcijskog maksimuma na valnoj duljini od 562 nm.

Nastali produkt otopljen u vodi daje apsorpcijski maksimum na valnoj duljini od 562 nm. Pomoću spektrofotometra moguće je izmjeriti apsorbanaciju toj valnoj. Da bi se odredila nepoznata koncentracija proteina, prethodno je potrebno napraviti kalibracijsku krivulju poznatih standarda pomoću koje se matematičkim metodama izračuna željena nepoznata koncentracija.

Uzeta je mikrotitarska ploča s 96 bunarića te su na njoj označena mjesta u koja će se dodati standardi i uzorci, potrebno je označiti sve duplo jer će se raditi duplikati. Pripremljen je BCA reagens tako što su pomiješane vodene otopine A (natrijev karbonat, natrijev hidrogenkarbonat, bicinkonična kiselina, natrijev tartarat u $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ natrijevom hidroksidu) i otopine B (bakrov(II) sulfat ($w(\text{CuSO}_4) = 4\%$)) u omjeru 50:1. U sve bunariće koji su označeni na pločici je dodano po 200 μL svježe pripremljenog BCA reagensa. U bunarićima koji se nisu koristili za mjerenje, razrijeđeni su proteinski uzorci tako što se pomiješalo 49,5 μL qH₂O i 5,5 μL staničnog lizata. U bunariće koji prethodno sadrže 200 μL BCA reagensa dodano je po 25

μL standarda po duplikatu (kao standardne otopine korištene su pripremljene otopine albumina goveđeg seruma (BSA, eng. *bovine serum albumin*) čije su koncentracije 0, 25, 500, 750, 1000, 1500 te 2000 $\mu\text{g/mL}$). Također, dodano je 25 μL razrijeđenog staničnog lizata po svakom duplikatu koji sadrži 200 μL BCA reagensa. Mikrotitarska ploča s 96 bunarića je lagano protresena i stavljena je na inkubaciju u inkubator pri temperaturi od 37 °C tijekom 30 minuta. Po isteku vremena inkubacije, izmjerena je apsorbancija na 562 nm na spektrofotometru (*Labsystems Multiskan MS, Finska*) te su dobiveni rezultati obrađeni.

3.2.2.7. Western analiza

Western analiza je imunokemijska metoda koja se sastoji od elektroforetskog razdvajanja proteina na gelu, prijenosa proteina na membranu te inkubacije s antitijelima. Razdvojeni proteini se pod utjecajem električnog polja prenesu na nitroceluloznu membranu koja se nakon toga blokira vezanjem proteina iz mlijeka na prazna mjesta na membrani kako bi se spriječilo nespecifično vezanje antitijela. Naposljetku, membrana se inkubira u primarnom, a onda u sekundarnom antitijelu. Sekundarno antitijelo spregnuto je s enzimom zbog čega dodatkom specifičnog supstrata dolazi do otpuštanja kemilumiscentnog signala koji omogućava specifičnu detekciju ciljnog proteina.

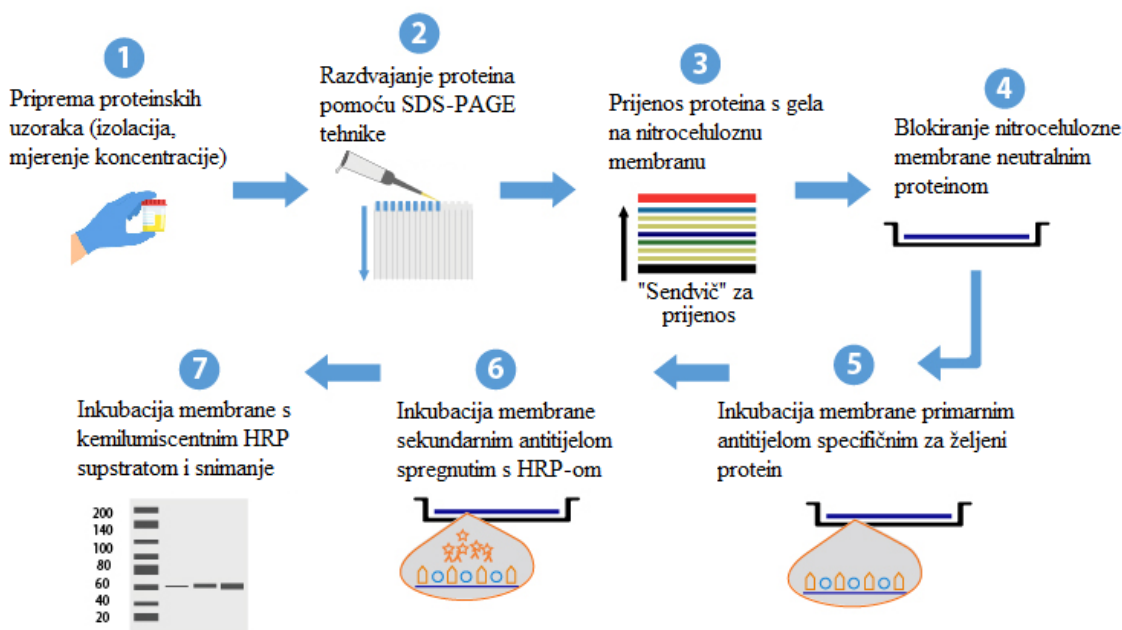
Western analizom analiziralo se prisustvo i količina aktivatorskog i represorskog oblika proteina GLI3 nakon pojedinih tretmana i transfekcije.

Analizirane su stanične linije A375 bez tretmana, potom s tretmanima s forskolinom, MG132, SAG, DMSO, litijevim kloridom te nakon transfekcije s pcDNA3-GLI3R vektorom.

Također, analizirana je stanična linija WPMY-1 nakon transfekcije s praznim vektorom pcDNA3, vektorom pcDNA4TOGLI3 i vektorom pcDNA3-GLI3R.

Stanične linije su nasađene na mikrotitarske ploče sa 6 bunarića prema opisu u poglavlju 3.2.2.2. *Nasađivanje stanica za pokuse* te su tretirane i transformirane prema poglavljima 3.2.2.3. *Tretmani stanica* i 3.2.2.4. *Transfekcija stanica*.

Shematski prikaz metode prikazan je na **slici 18**.



Slika 18. Western analiza prikazana po fazama izvođenja. (Preuzeto i prilagođeno prema referenci)⁹⁴

Prvi korak u western analizi je elektroforeza staničnih lizata na poliakrilamidnom gelu u prisutnosti natrijeva dodecil sulfata (SDS-PAGE, eng. *sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis*). SDS-PAGE se temelji na razdvajanju molekula po molekularnoj masi, a da bi takvo odvajanje bilo moguće potrebno je dodati anionski deterdžent natrijev dodecil sulfat (SDS, eng. *sodium dodecyl sulphate*). SDS će se vezati na polipeptidnu okosnicu proteina pri čemu dolazi do denaturacije te maskiranja naboja u negativni, a čime je omogućeno razdvajanje proteina na temelju molekularne mase jer će proteini pod utjecajem električnog polja putovati prema pozitivno nabijenom polu.

Napravljen je gel za razdvajanje koji se prvi dodaje između dvaju stakala na nosaču. Pomiješane su komponente prikazane u **tablici 8.**, a TEMED (N,N,N',N'-tetrametiletildiamin) se dodavao neposredno prije izlivanja smjese između stakala budući da gel dodatkom TEMED-a počinje polimerizirati. Amonijev persulfat (APS) inicira reakciju polimerizacije dok TEMED katalizira reakciju.

Tablica 8. Uputa za pripremu korištenog gela za razdvajanje i gela za sabijanje

Reagens	Gel za razdvajanje	Gel za sabijanje
	V/mL	V/mL
Voda	3,97	2,80
30 % akrilamid-bisakrilamid (AAS)	1,87	0,58
1,5 M TRIS-HCl pufer, pH 8,8	2,00	0,00
1 M TRIS-HCl pufer, pH 6,8	0,00	0,42
10 % SDS	0,08	0,03
10 % amonijev persulfat (APS)	0,08	0,03
TEMED	0,008	0,003

Nakon što je gel za razdvajanje nanesen između stakala, dodan je izopropanol kako bi se spriječila inhibicija polimerizacije kisikom prisutnim u zraku, ali i da bi se i izravnao rub gela prije dodatka gela za sabijanje. Gel se polimerizirao 30 minuta, a nakon toga se izopropanol odliven i dodan je gel za sabijanje.

Analogno pripremi gela za razdvajanje, napravljen je gel za sabijanje prema **tablici 8**. Umetnuti su češljici za jažice i ostavljen je gel da polimerizira 30 minuta.

Na gel je nanoseno 50 µg proteina koji su pomiješani s 4X LB puferom za nanošenje. Prije nanošenja uzoraka na gel bilo je potrebno denaturirati proteinske uzorke pri 95 °C tijekom 10 minuta te su uzorci centrifugirani jednu minutu na najvećem broju okretaja.

Polimerizirani gel izvađen je iz plastičnog nosača te je postavljen sa staklom u sustav za vertikalnu elektroforezu Mini-Protean III (Bio-Rad, SAD). Sustav je napunjen s puferom za elektroforezu. U prvu jažicu je nanoseno 4 µL proteinskog markera CozyHi Prestained Protein Ladder (*highQu*), a u ostale jažice uzorci koji sadrže 50 µg proteina i 4X LB pufer. Elektroforeza je provedena 15 minuta na 90 V, potom je povećana na 110 V tijekom 1,5 sati, sve dok plava fronta nije došla skoro do dna stakla.

Po završetku SDS-PAGE, stakalca s gelom su izvađena iz sustava te je izvađen poliakrilamidni gel iz stakalaca. Pomoću plastičnog rezača uklonjen je gel za sabijanje i napravljen je „sendvič“ za prijenos na membranu. Prozirna strana nosača je postavljena u kadu s puferom za prijenos, na nju je stavljen spužvasti umetak te 2 filter papira. Pažljivo je sve natopljeno puferom za prijenos i izvaljano malenim valjkom kako bi se istisnuli potencijalni

mjehurići zraka koji su zaostali. Potom je pažljivo pincetom dodana nitrocelulozna membrana, a na membranu poliakrilamidni gel i dva filter papira. Ponovno je sve izvaljano valjkom te je dodana druga spužvica. Plastični nosač je zaklopljen s crnom stranom uz pritiskanje kako bi se natopio puferom za prijenos. Nosač je postavljen u sustav za transfer te je prijenos provođen u puferu za prijenos 2 sata pri naponu od 100 V.

Po završetku prijenosa, potrebno je provjeriti jesu li proteini uspješno preneseni na nitroceluloznu membranu. Membrana je izvađena iz nosača te je postavljena u plastičnu posudicu. Dodana je otopina za bojanje membrana da prekrije membranu te je inkubirana uz miješanje dvadesetak sekundi. Membranu je bilo potrebno odbojati kako bi se uočili proteini, a kako bi se uklonila boja koja nije vezana na proteine. Membrana je isprana dva puta u otopini za odbojavanje. Nakon toga, membrana je isprana 3 puta po 5 minuta na miješalici s puferom TBST.

Kada je membrana odbojana, odrezan je višak membrane, a membrana je razrezana na dva dijela obzirom na veličine prikazane markerom tako da je bilo moguće koristiti različita antitijela za proteine koje želimo detektirati. Membrane su bile prerezane na dva dijela tako da se na gornjem dijelu su se nalazili proteini od interesa GLI3 u punoj duljini (190 kDa, skraćeno GLI3FL) i GLI3 represorski oblik, (83 kDa, skraćeno GLI3R) a u donjem dijelu se nalazio referentni protein β -aktin (43 kDa) koji služi kao kontrola nanošenja uzoraka.

Pripremljena je 5 % otopina mlijeka u prahu u puferu TBST. Trakice membrana su prebačene u malene posudice i dodan je dio pripremljene otopine mlijeka u količini da prekrije membrane. Proteini iz mlijeka su se vezali na slobodna mjesta na membrani čime su nespecifična vezanja onemogućena. Inkubacija u mlijeku provođena je sat vremena uz blago protresanje na tresilici. Primarna antitijela su razrijeđena u 5 % mlijeku u prahu u puferu TBST (zečje anti-GLI3 antitijelo u omjeru 1:1000 (GTX104362, *Gene Tex*) i mišje anti- β -aktin antitijelo u omjeru 1:5000 (8H10D10, *Cell Signaling*)). Membrane su ispirane tri puta po pet minuta u puferu TBST, a onda su uronjene u mlijeko s primarnim antitijelom i postavljene su na rotator na temperaturi od 4 °C preko noći.

Slijedeći dan su pripremljene otopine sekundarnih antitijela u 5 % otopini mlijeka u prahu u TBST puferu (anti-mišje sekundarno antitijelo konjugirano s HRP u omjeru 1:6000 554002, *BD Pharmingen*) i anti-zečje sekundarno antitijelo konjugirano s HRP u omjeru 1:8000 (554021, *BD Pharmingen*)).

Membrane su ispirane tri puta po pet minuta u puferu TBST uz miješanje. Potom su na membrane dodane pripremljene otopine sekundarnih antitijela te su se inkubirale sat vremena uz miješanje na sobnoj temperaturi. Nakon isteka vremena inkubacije, membrane su ispirane tri puta po pet minuta u puferu TBST.

Pripremljena je smjesa kemiluminescentnih reagensa SuperSignal West PICO i SuperSignal West FEMTO (Thermo Scientific, SAD) u omjeru 3:1 te su dodana na membranu i inkubirana 5 minuta u mraku na prozirnoj acetatnoj foliji. Folija je preklopljena s drugom acetatnom folijom, višak reagensa je uklonjen te su membrane slikane pomoću CCD kamerom UVITEC Alliance Q9 Mini.

3.2.2.8. Imunofluorescencijska metoda (IF)

Imunofluorescencija pripada u imunokemijske metode gdje se na fiksirane stanice se dodaje odgovarajuće primarno, a potom sekundarno antitijelo koje je obilježeno fluorescentnom bojom. Vezanjem fluorescentne tvari, odnosno fluorofora, na sekundarno antitijelo neće doći do gubitka specifičnosti ili reaktivnosti. Fluorofor apsorbira specifično valno zračenje zbog čega se njegovi elektroni prevode u pobuđeno stanje, a emisijom svjetlosti određene valne duljine vraća se u svoje osnovno stanje što omogućava detekciju imunokompleksa.

Imunofluorescencijska metoda je korištena kako bi se lokalizirali proteini GLI3 i PTCH1 unutar staničnih odjeljaka.

Korištene su dvije stanične linije A375 i WPMY-1 koje su nasadene na mikrotitarsku ploču s 24 bunarića kako je opisano u poglavlju 3.2.2.2. *Nasađivanje stanica za pokuse*. Stanice su tretirane kako je opisano u poglavlju 3.2.2.3. *Tretmani stanica* i transfeciran je konstruirani vektor pcDNA3-GLI3R kao što je opisano u poglavlju 3.2.2.4. *Transfekcija stanica*.

Nakon inkubacije, iz svakog bunarića je uklonjen medij te su se stanične linije ispirale tri puta s 500 μ L PBS-a. Nakon što su stanice ispirane i uklonjen je sav medij, potrebno ih je fiksirati na dnu bunarića. U digestoru dodano je 500 μ L paraformaldehida ($w(\text{PFA}) = 3,6 \%$) u svaki bunarić te su stanice inkubirane 10 minuta na sobnoj temperaturi. Ponovljeno je ispiranje PBS-om kako je ranije opisano. Potom je bilo potrebno stanice permeabilizirati kako bi se omogućio ulazak antitijela u stanicu, stoga se u digestoru u svaki bunarić dodalo po 500 μ L metanola. Metanol se na stanicama inkubirao 10 minuta na sobnoj temperaturi. Ponovljeno je ispiranje s PBS-om. Kako bi se blokirala nespecifična vezanja antitijela, dodano je po 2 kapi Protein Block Serum-Free reagensa u svaki bunarić. Reagens je inkubiran 30 minuta pri sobnoj temperaturi,

a po isteku inkubacije reagens je uklonjen. Priređene su otopine s primarnim antitijelima za zečji anti-GLI3 (GTX104362, *Gene Tex*) (razrjeđenje 1:500 u 2 % BSA/TBST) i zečji anti-PTCH (VH143363, *ABClonal*) (1:500 u 2 % BSA/TBST). U odgovarajuće bunariće dodano je po 100 μ L pripadnog antitijela. Za negativnu kontrolu se umjesto primarnog antitijela stavilo 100 μ L 2 % BSA/TBST. Pripremljena je vlažna komora te su se stanice inkubirale na ravnoj površini preko noći na 4 °C.

Nakon inkubacije, bunarići su isprani s 500 μ L PBS-a tri puta. Pripremljeno je anti-zečje sekundarno antitijelo konjugirano s Alexa 594 (8889S, *Cell Signaling*) tako što je razrijeđeno u omjeru 1:500 u 2 % BSA/TBST. Dodano je po 100 μ L sekundarnog antitijela u svaki od bunarića. Mikrotitarska ploča se inkubirala 1 sat na sobnoj temperaturi u mraku. Po isteku vremena inkubacije, stanice u bunarićima su isprane pomoću PBS-a te je dodana boja DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol, 0,1 μ g/mL) koja je obojala jezgre u fluorescentnu plavu boju. Boja je inkubirana u mraku 5 minuta, bunarići su isprani s PBS-om kako je ranije opisano te je dodano po 500 μ L PBS-a u svaki bunarić. Ploče su uslikane na crvenom i plavom kanalu pomoću uređaja FLOID Cell Imaging Station (*Thermo Fisher*).

3.2.2.9. Izolacija RNA iz stanica

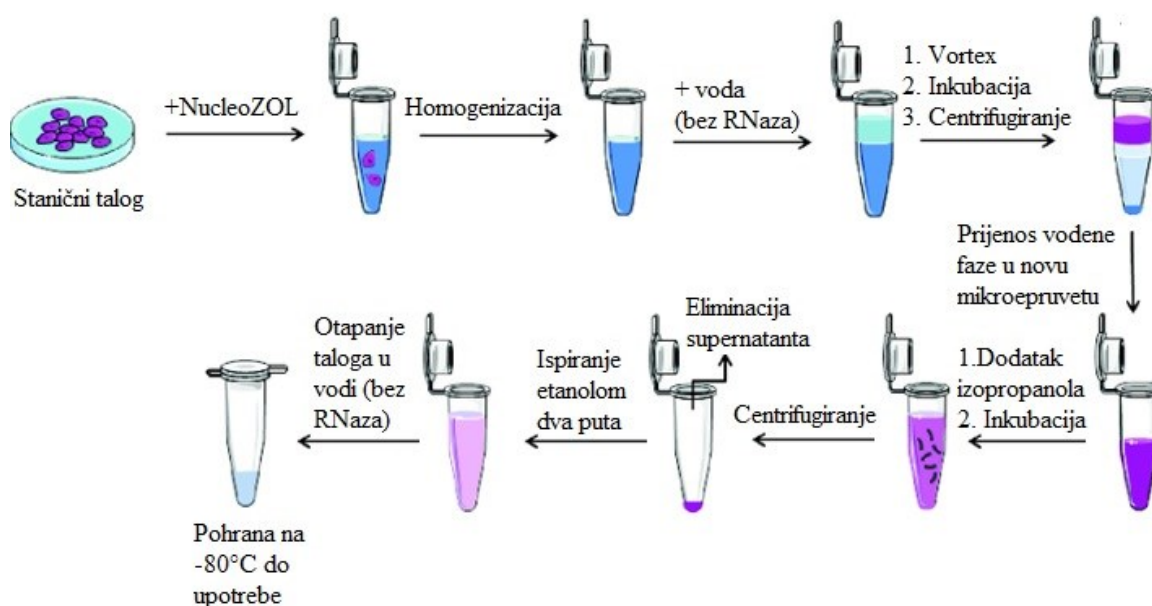
Potrebno je izolirati RNA iz stanica kako bi se načinila metoda RT-qPCR i kako bi se analizirala transkripcijska aktivnost aktivatorske i represorske forme proteina GLI3.

Za potrebe pokusa nasađena je mikrotitarska ploča sa 6 bunarića staničnom linijom A375 kako je opisano u poglavlju 3.2.2.2. *Nasađivanje stanica za pokuse*. Stanice su tretirane i transformirane prema opisu u poglavljima 3.2.2.3. *Tretmani stanica* i 3.2.2.4. *Transfekcija stanica*.

Po isteku vremena potrebne inkubacije, stanicama je uklonjen medij. Na stanice je dodano 200 μ L tripsina kako bi se stanice odvojile od dna bunarića kako je opisano u poglavlju 3.2.2.1. *Rad sa staničnim kulturama*. Tripsinizirane stanice su otpipetirane u mikroepruvete od 2 mL te su centrifugirane 5 minuta na 12 000 \times g. Supernatant se odlije te se stanični talog pohranio na -20 °C do upotrebe.

Za izolaciju RNA iz stanica koristio se komplet NucleoZOL prema uputama od proizvođača (shematski prikazano **na slici 19.**). Na taloge stanica u digestoru dodano je 500 μ L NucleoZOL otopine te pomoću pipete je talog dobro resuspendiran u otopini. U svaku mikroepruvetu dodano je 200 μ L vode bez RNaza i smjesa je vorteksirana barem 15 sekundi.

Dobro vorteksirana smjesa je inkubirana 5 minuta na sobnoj temperaturi. Mikroeprevete su centrifugirane 15 minuta na $16\ 000 \times g$ pri sobnoj temperaturi. Po završetku centrifugiranja, oprezno je prebačeno 700 μL supernatanta u čistu mikroeprevetu. Potrebno je paziti da se ne povuče plavi organski sloj koji sadrži DNA ili proteine. Na supernatant je dodano 700 μL izopropanola te se mikroepreveta inkubirala 5 minuta pri sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije, smjesu je bilo potrebno centrifugirati 10 minuta na $16\ 000 \times g$ pri sobnoj temperaturi. Supernatant se oprezno uklonio, a na talog je dodano 500 μL etanola ($\varphi(\text{EtOH}) = 75\%$) te se centrifugirao 3 minute na $10\ 000 \times g$ pri sobnoj temperaturi. Ispiranje etanolom je ponovljeno još jedan put. Etanol je oprezno otpipetiran pri tom pazeći da se ne povuče talog, a talog kada je posušen resuspendiran je u 20 μL qH₂O. Izolirana RNA je pohranjena do upotrebe na $-80\text{ }^\circ\text{C}$.



Slika 19. Shematski prikaz protokola kompleta NucleoZOL (Preuzeto i prilagođeno prema referenci)⁹⁵

3.2.2.10. Metoda RT-qPCR

Pomoću RT-qPCR (eng., *reverse transcriptase - quantitative polymerase chain reaction*) metode analizirana je transkripcijska aktivnost aktivatorskog i represorskog oblika proteina GLI3. Nakon uspješno izolirane RNA iz stanica, izmjerila se koncentracija pomoću uređaja

NanoPhotometer (*Implen, Njemačka*). Mikroeprevete s RNA je obavezno bilo držati na ledu cijelo vrijeme tijekom rukovanja.

U prvom koraku ove metode potrebno je RNA prevesti u komplementarnu DNA (cDNA), a to je moguće pomoću reverzne transkripcije. Priređena je matična otopina koja je sadržavala enzim reverznu transkriptazu pri čemu je sintetizirana željena jednolančana kopija cDNA. U drugom koraku metode, u PCR reakciji u stvarnom vremenu, praćena je količina nastalog produkta, dakle moguća je kvantifikacija.

Potrebno je sintetizirati 25 μL cDNA koncentracije $\gamma(\text{cDNA}) = 20 \text{ ng}/\mu\text{L}$. Budući da su poznate koncentracije RNA, računski se može doći do volumena koji odgovaraju 500 ng RNA. Izračunati volumeni su se otpipetirali u mikroeprevete od 0,2 mL te se na njih dodao volumen vode do konačnog volumena od 16,5 μL . Potom je pripremljena matična otopina prema **tablici 9.** koja je razdijeljena u jednakim alikvotima u sve mikroeprevete koje sadrže ranije dodanu RNA i vodu.

Tablica 9. Sadržaj matične otopine potrebne za sintezu željene jednolančane kopije DNA (cDNA) u reakciji reverzne transkripcije (volumeni vode i izolirane RNA prilagođeni su tako da njihov konačni volumen iznosi 16,5 μL , a masa otopljene RNA iznosi 500 ng).

Reagens	Početna koncentracija	Konačna koncentracija	Volumeni za 1 reakcijsku smjesu / μL
10 \times pufer za reverznu transkriptazu	10x	1x	2,50
dNTP	100 mmol dm ⁻³	4 mmol dm ⁻³	1,00
nasumične početnice	10x	1x	2,50
enzim reverzna transkriptaza	50 U/ μL	62,5 U	1,25
RNA (aq)	500 ng	30,3 ng/ μL	16,50
H ₂ O	/	/	1,25
Ukupni volumen			25,00

Nakon pripreme reakcijskih smjesa, mikroeprevete se postave u PCR uređaj ABI2720 (*Applied Biosystems*) i pokrene se odgovarajući program prikazan u **tablici 10.** Reakcijsku smjesu prije čuvanja na 4 °C bilo je potrebno zagrijati na 85 °C kako bi se enzim deaktivirao.

Tablica 10. Shematski prikaz korištenog PCR programa (prikazane su temperature i trajanja ciklusa) za reakciju reverzne transkripcije

Temperatura	Vrijeme/min
25 °C	10:00
37 °C	120:00
85 °C	5:00
4 °C	∞

Po završetku PCR programa, potrebno je prirediti reakcijske smjese za qPCR reakciju. Pripremljene su tri matične otopine, svaka s početnicama za željeni gen prema sastavu u **tablici 11**.

Tablica 11. Sastav matične otopine potrebne za qPCR reakciju.

Reagens	Početne koncentracije	Konačne koncentracije	Volumeni za 1 reakcijsku smjesu / μ L
Sso Advanced SYBR Green Supermix	2x	1x	5,0
Početnica F	100 μ mol dm ⁻³	3 μ mol dm ⁻³	0,3
Početnica R	100 μ mol dm ⁻³	3 μ mol dm ⁻³	0,3
reH ₂ O	/	/	3,4
RT PCR produkt (cDNA)	20 ng/ μ L	2 ng/ μ L	1,0
Ukupni volumen			10

Matična otopina je raspoređena u sve jažice na mikrotitarskoj ploči za qPCR, u triplikatu za svaki gen i tretman. Pripremljene su ujedno i negativne kontrole istoga sastava u koje je dodana redestilirana voda umjesto uzorka. Potom je dodano po 1 μ L RT-PCR produkta za svaki od tretmana. Ploča se dobro zalijepila pomoću prijanjajuće folije za PCR te se kratko centrifugirala u PlateFuge Microplate Centrifuge centrifugi. Pločice su postavljene u uređaj za qPCR CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) i pokrenut je program prema slijedećim

uvjetima: 95 °C 30 s, a zatim u 40 ciklusa (95 °C 5 s, 61 °C 5 s). Podaci su analizirani pomoću programa CFX Manager.

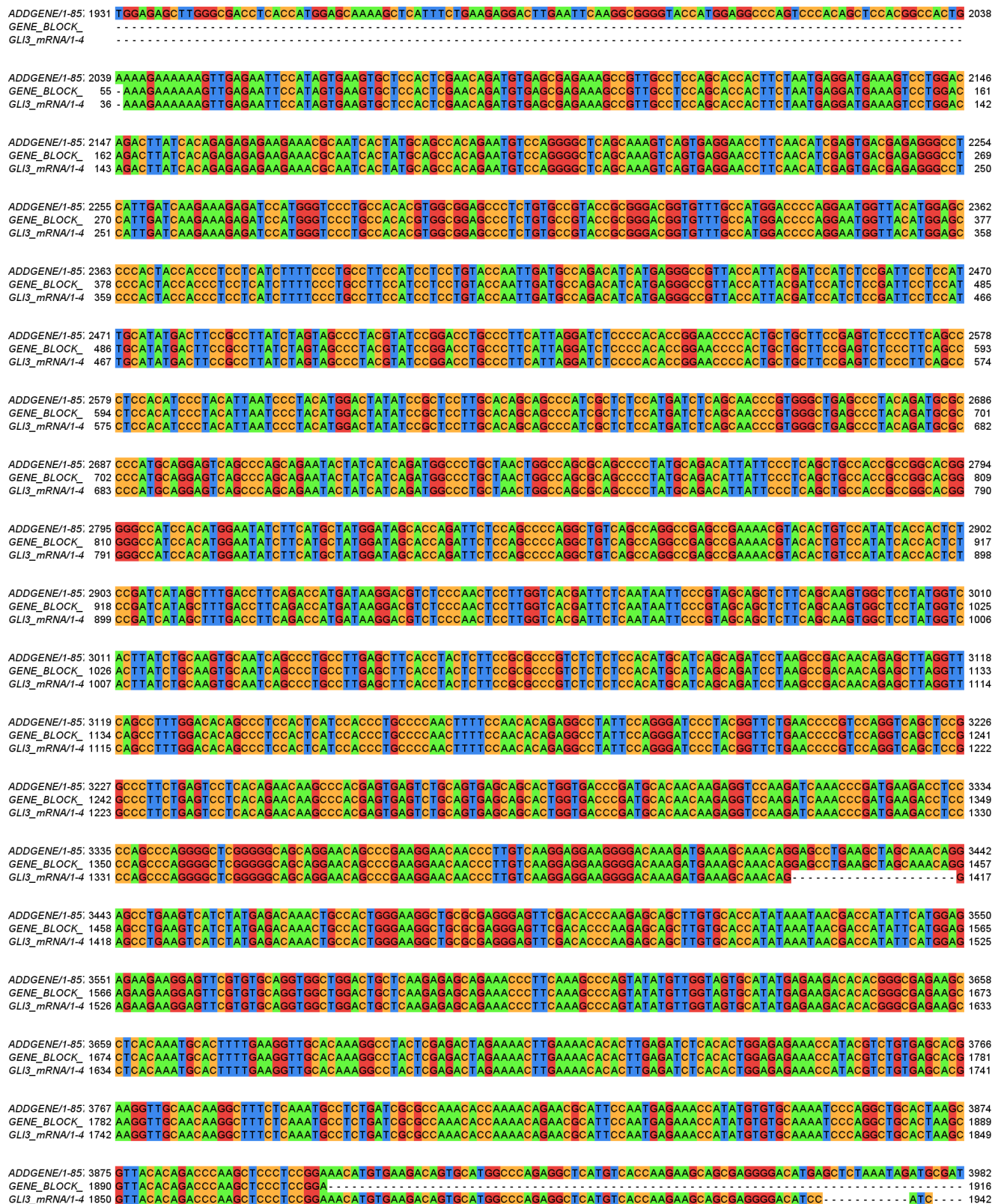
§ 4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Analiza konstruiranog vektora za ekspresiju represorskog oblika proteina GLI3 u stanicama čovjeka

4.1.1. Dizajn Gene Block fragmenta GLI3R

Da bi se dizajnirao *Gene Block* fragment, analizira se nukleotidna sekvenca vektora hGli3 NTOTAL u AINGpCAGGS te nukleotidna mRNA sekvenca *GLI3* uz pomoć računalnog programa *Jalview*. Usporedbom sekvenci utvrdi se pozicija tripleta za početak transkripcije (ATG) te pozicija STOP kodona na pretpostavljenom kraju GLI3R fragmenta. Kako se točno mjesto cijepanja proteina GLI3FL u GLI3R ne zna, kraj inserta dizajniran je na temelju vektora hGli3 NTOTAL u AINGpCAGGS i potencijalnih mjesta cijepanja predloženih u radovima Tempé i sur. (2006), te Pan i Wang (2007.) Podudaranje sekvenci odgovara nukleotidnom slijedu represora koji je potreban za dizajn *Gene block* fragmenta. Prilikom dizajniranja, važno je umetnuti nukleotidni slijed specifičan restriksijskim endonukleazama koje su potrebne za kloniranje. U slučaju ovog fragmenta, na oba kraja sekvence dodani su sljedovi koje prepoznaje enzim EcoRV (5'-GATATC^{-3'}).

Slika 20. prikazuje rezultate poravnanja pri čemu je vidljivo podudaranje nukleotidnih sekvenci vektora hGli3 NTOTAL u AINGpCAGGS, konstruiranog *Gene Block* fragmenta te mRNA sekvence *GLI3*. Time se može potvrditi ispravnost nukleotidne sekvence dizajniranog *Gene Block* fragmenta.

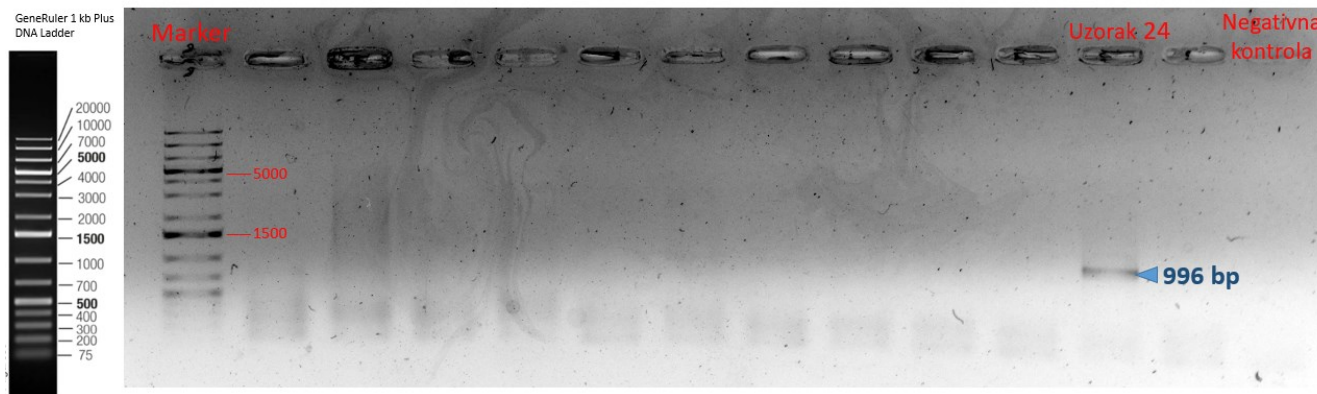


Slika 20. Nukleotidni sljedovi pomoću kojih je potvrđena ispravnost dizajniranog Gene Block fragmenta poravnati računalnim programom Jalview. Prikazane su redom sekvence vektora hGli3 NTOTAL u AINpCAGGS, konstruirani Gene Block fragment te mRNA sekvenca GLI3 pomoću Jalview računalnog programa. Svaki nukleotid nosi pripadajuću boju čime se lakše mogu odrediti podudaranja među sekvencama.

4.1.2. Identifikacija transformiranih bakterijskih kolonija

Prilikom transformacije najčešće manji dio kompetentnih bakterijskih stanica uspješno primi stranu molekulu DNA koja može, ali i ne mora sadržavati željeni insert, ovisno o učinkovitosti ligacije. Kako bi se identificirala bakterijska kolonija koja nosi ispravan plazmid potrebno je ispitati prisustvo željenog inserta u bakterijskim kolonijama.

Prvi probir kolonija se temelji na odabiru plazmidnog vektora s genom za rezistenciju na specifičan antibiotik, zbog čega se bakterije uzgajaju u hranjivom mediju s dodatkom specifičnog antibiotika. Plazmidni vektor koji je korišten u ovom diplomskom radu nosi gen za rezistenciju na antibiotik ampicilin. Nakon transfekcije, stanice se kratko inkubiraju u hranjivom mediju bez antibiotika kako bi se gen za otpornost u antibiotiku eksprimirao. Tada se nasaduju na LB ploče koje sadrže antibiotik, kako bi samo bakterije koje nose plazmid uspješno narasle. Kolonije narasle na LB pločama se nadalje testiraju na prisustvo željenog inserta pomoću metode PCR na kolonijama, a kolonije pozitivne na željeni insert se umnože te se iz njih izolira plazmidna DNA. Colony PCR se koristi kao brza pretraga budući da su na hranjivoj podlozi mogle narasti i kolonije koje su transformirane praznim plazmidom. Očekuje se produkt veličine 996 pb, koji će se umnožiti samo iz onih kolonija koje sadrže plazmid s ugrađenim i ispravno orijentiranim fragmentom GLI3R. Na **slici 21**, jasno je vidljivo kako od ukupno 25 nasumično odabranih uzoraka samo jedna kolonija je pozitivna na željeni insert, odnosno vidljiv je produkt veličine 996 pb. Može se zaključiti kako su svi uzorci, osim uzorka 24, transformirani praznim plazmidom ili plazmidom s insertom u pogrešnoj orijentaciji. Uzorak 24 se dalje podvrgne sekvenciranju kako bi se transformacija potvrdila odnosno kako bi se utvrdilo je li insert pouzdano ugrađen u pravome smjeru.

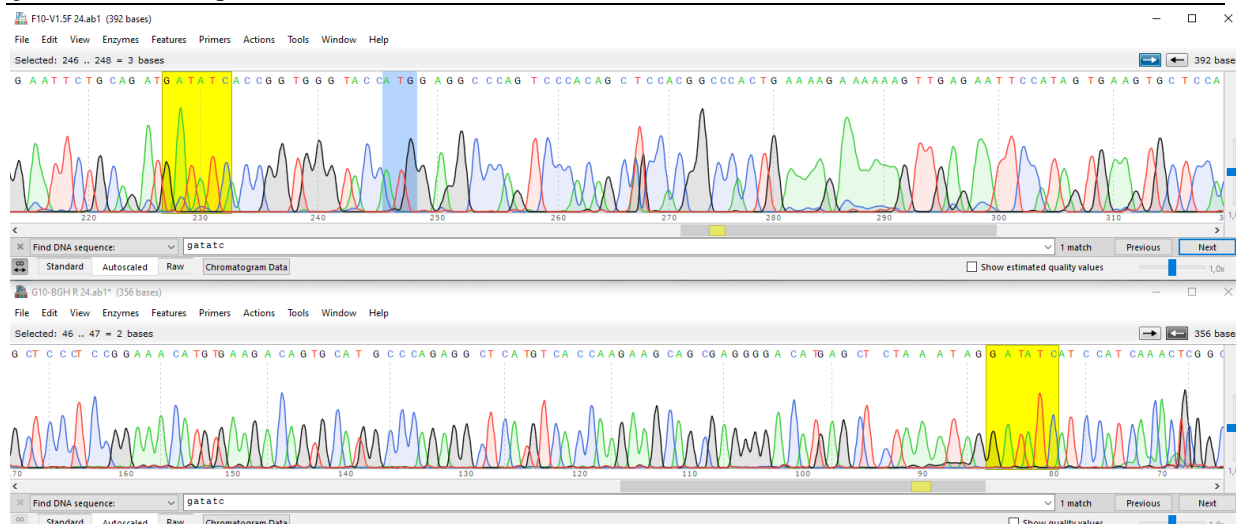


Slika 21. Agarozni gel (1 %) s uzorcima 13-25 nakon colony PCR. Usporedbom markera priloženog od proizvođača, te fragmenata markera na gelu (označenim slovom M) mogu se uočiti fragmenti za orijentaciju veličine 1500 pb i 5000 pb. Usporedbom vrpce uzorka 24, može se zaključiti kako on odgovara veličini fragmenta od oko 1000 pb.

4.1.3. Sekvenciranje plazmidne DNA

Sekvenciranje se provodi u dvije reakcije, od čega jedna započinje u vektoru ispred restrikcijskog mjesta EcoRV (početnica V1.5F), očitava sekvencu u 5'→3' smjeru i zahvaća početak GLI3R inserta. Druga početnica (BGH R) veže se u vektoru iza restrikcijskog mjesta EcoRV na komplementarni lanac i očitava sekvencu u 5'→3' smjeru te tako zahvaća kraj GLI3R inserta. Rezultate sekvenciranja potrebno je interpretirati i analizirati uz pomoć računalnog programa *SnapGene Viewer*. Potrebno je usporediti sekvencu konstrukta pcDNA3-GLI3R i kromatogram sekvenciranog uzorka.

Prvo se analizira slijed obuhvaćen početnicom V1.5F uzvodno od inserta. Detektira se željeni „početak“ inserta, odnosno pomoću tražilice se na kromatogramu dobivenim sekvenciranjem pretraži nukleotidni slijed koji odgovara nekom specifičnom poznatom nukleotidnom slijedu. U ovom slučaju, radi lakšeg snalaženja, odabran je slijed kojeg prepoznaje enzim EcoRV (5'-GATATC^{-3'}) kojeg računalni program sam detektira i naznači na sekvenci (**slika 22**, žuto). Tada se provjerava izgled pikova kromatograma i provjerava odgovara li slijed predviđenom. Kod analize kromatograma potrebno je provjeriti koliko su pikovi jednoznačni i postoje li nespecifični signali ispod pikova koji bi mogli ukazivati na kontaminaciju. Kao što je vidljivo iz **slike 22.**, kromatogrami su čisti, jednoznačni, i bez pozadinskog šuma, što znači da je analizirani plazmid čist, te da slijed odgovara očekivanom.



Slika 22. Kromatogrami rezultata reakcije sekvenciranja u 5'→3' smjeru (gore), te u 3'→5' smjeru, invertirano u 5'→3' smjer radi lakšeg očitavanja (dolje). Žutom bojom označena su mjesta koja prepoznaje restriksijski enzim *EcoRV*, a plavom mjesto početka transkripcije (ATG).

Sekvence se usporede pomoću alata BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Uspoređene sekvence prikazane su na slici 23., pri čemu sekvenca označena s Query predstavlja sekvencu dobivenu iz kromatograma nakon sekvenciranja, a Sbjct očekivanu sekvencu dobivenu umetanjem dizajniranog *Gene Block* fragmenta u vektor pomoću računalnog programa SnapGene Viewer.

Sequence ID: Query_31595 Length: 249 Number of Matches: 1

Range 1: 1 to 249 [Graphics](#)[▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

NW Score	Identities	Gaps	Strand
466	249/255(98%)	6/255(2%)	Plus/Plus
Query 1	TAATACGACTCACTATAGGGAGACCCAAGCTTGGTACCGAGCCTCGGATCCACTAGTAAC		60
Sbjct 1	TAATACGACTCACTATAGGGAGACCCAAGCTTGGTACCGAGC-TCGGATCCACTAGTAAC		59
Query 61	GGCCCCCAGTGTGCTGGAATTCTGCAGATGATATCACCGGTGGGTACCATGGAGGCCCA		120
Sbjct 60	GGCC-GCCAGTGTGCTGGAATTCTGCAGAT---ATCACCGGTGGGTACCATGGAGGCCCA		115
Query 121	GTCCCACAGCTCCACGGCCCACTGAAAAGAAAAAGTTGAGAATTCATAGTGAAGTGCT		180
Sbjct 116	GTCCCACAGCTCCACGGCC-ACTGAAAAGAAAAAGTTGAGAATTCATAGTGAAGTGCT		174
Query 181	CCACTCGAACAGATGTGAGCGAGAAAGCCGTTGCCTCCAGCACCACTTCTAATGAGGATG		240
Sbjct 175	CCACTCGAACAGATGTGAGCGAGAAAGCCGTTGCCTCCAGCACCACTTCTAATGAGGATG		234
Query 241	AAAGTCCTGGACAGA	255	
Sbjct 235	AAAGTCCTGGACAGA	249	

Description	Score	Percent Ident	Accession
None provided	466	98.00%	Query_31595

Slika 23. Rezultati poravnavanja dijelova sekvenci online alatom BLAST. „Query“ predstavlja sekvencu dobivenu iz kromatograma nakon sekvenciranja s početnicom V1.5F., a „Sbjct“ očekivanu sekvencu konstrukta pcDNA3-GLI3R.

Usporedbom sekvenci vidljiv je nukleotidni slijed (GAT) koji je umetnut u slijed dobiven sekvenciranjem kako je prikazano na **slici 23**. Umetnuti slijed se nalazi uzvodno od START kodona (ATG) (**slika 22.**, plavo) što znači da neće imati utjecaja na translaciju, a posljedično ni na eksprimirani protein.

Kako bi se analizirao slijed obuhvaćen početnicom BGH RV s početkom nizvodno od inserta, analogno prethodnom postupku, za specifično mjesto također je uzet nukleotidni slijed kojeg prepoznaje endonukleaza EcoRV (**slika 22.**, žuto), a to je ujedno i završetak sekvence dizajniranog *Gene Block*-a. Rezultati analize BLAST alatom su prikazani na **slici 24**.

Sequence ID: Query_17875 Length: 278 Number of Matches: 1

Range 1: 1 to 278 [Graphics](#)[▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

NW Score	Identities	Gaps	Strand
547	277/278(99%)	1/278(0%)	Plus/Plus
Query 1	TAGAAAACCTTGAAAACACACTTGAGATCTCACACTGGAGAGAAACCATACGTCTGTGAGC		60
Sbjct 1	TAGAAAACCTTGAAAACACACTTGAGATCTCACACTGGAGAGAAACCATACGTCTGTGAGC		60
Query 61	ACGAAGGTTGCAACAAGGCTTTCTCAAATGCCTCTGATCGCGCCAAACACAAAACAGAA		120
Sbjct 61	ACGAAGGTTGCAACAAGGCTTTCTCAAATGCCTCTGATCGCGCCAAACACAAAACAGAA		120
Query 121	CGCATTCCAATGAGAAACCATATGTGTGCAAAATCCCAGGCTGCACTAAGCGTTACACAG		180
Sbjct 121	CGCATTCCAATGAGAAACCATATGTGTGCAAAATCCCAGGCTGCACTAAGCGTTACACAG		180
Query 181	ACCCAAGCTCCCTCCGGAAACATGTGAAGACAGTGCATG-CCCAGAGGCTCATGTCACCA		239
Sbjct 181	ACCCAAGCTCCCTCCGGAAACATGTGAAGACAGTGCATGGCCAGAGGCTCATGTCACCA		240
Query 240	AGAAGCAGCGAGGGGACATGAGCTCTAAATAGGATATC	277	
Sbjct 241	AGAAGCAGCGAGGGGACATGAGCTCTAAATAGGATATC	278	

Description	Score	Percent Ident	Accession
None provided	547	100.00%	Query_17875

Slika 24. Rezultati poravnavanja dijelova sekvenci online alatom BLAST. „Query“ predstavlja sekvencu dobivenu iz kromatograma nakon sekvenciranja s početnicom BGH R, a „Sbjct“ očekivanu sekvencu konstrukta pcDNA3-GLI3R.

Pregledom kromatograma potvrđena je ispravna ugradnja i orijentacija GLI3R fragmenta u ekspresijski vektor. Na slikama 23. i 24. također su vidljivi nukleotidi koji su umetnuti ili nedostaju. Oni su posljedica nesavršenosti računalnog programa. Naime, moguće je da računalni program neispravno prepozna i konvertira pik u sekvencu, a kako bi se takve pogreške minimizirale potrebno je pregledati kromatogram i ustanoviti nalazi li se pik na kromatogramu. Utvrđivanjem postojanja pika na kromatogramu, možemo zaključiti kako se radi o pogrešci računalnog softvera. Na kromatogramu su vidljivi pikovi koji reprezentiraju nukleotide. Pregledom pikova može se zaključiti da su zadovoljavajuće kvalitete i jasnoće čime je potvrđena točnost ugradnje željenog inserta (pikovi su jasni, a preklapanja pikova su minimalna što ukazuje na zadovoljavajuću kvalitetu).

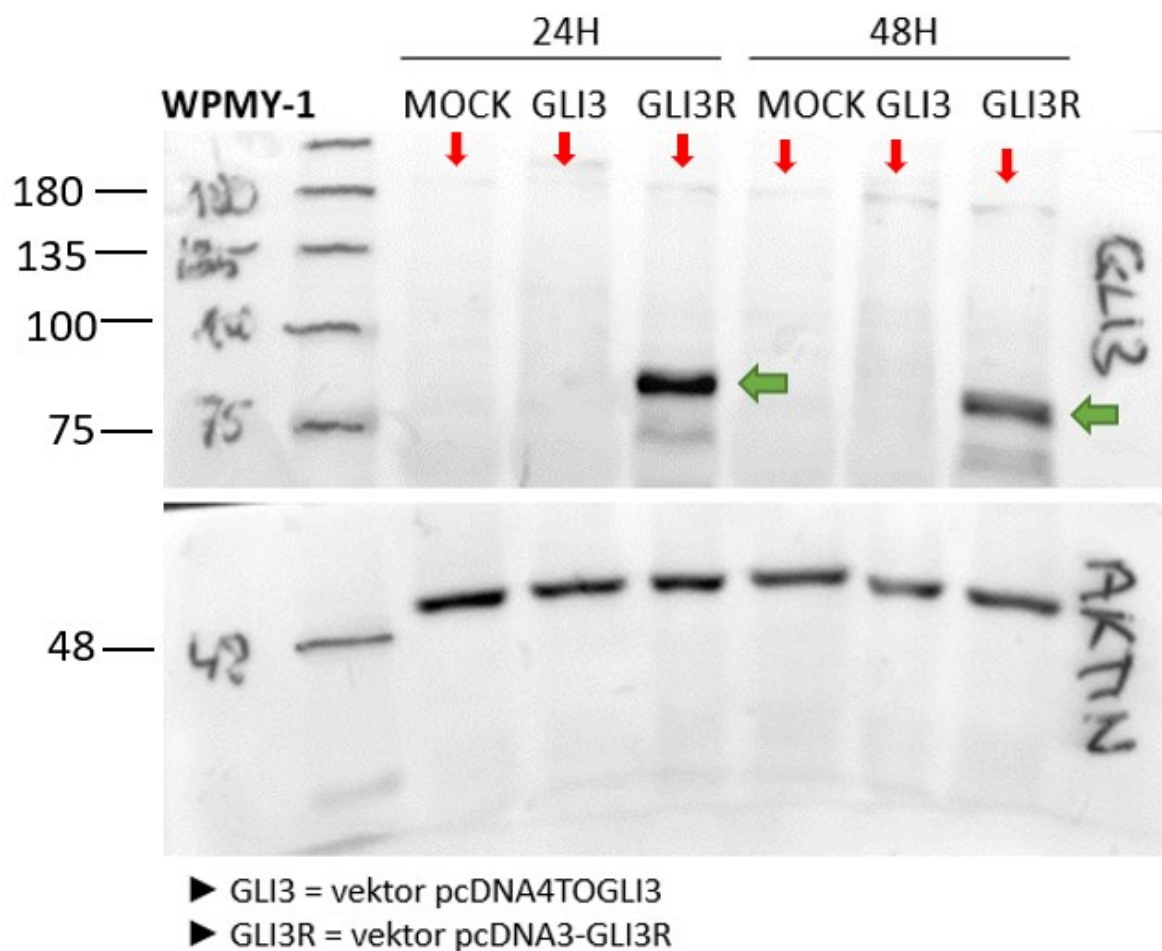
4.2. Validacija vektora za ekspresiju represorskog oblika proteina GLI3 u stanicama čovjeka

4.2.1. Optimizacija uvjeta vremena transfekcije ekspresijskog vektora *pcDNA4TOGLI3* i *pcDNA3-GLI3R*

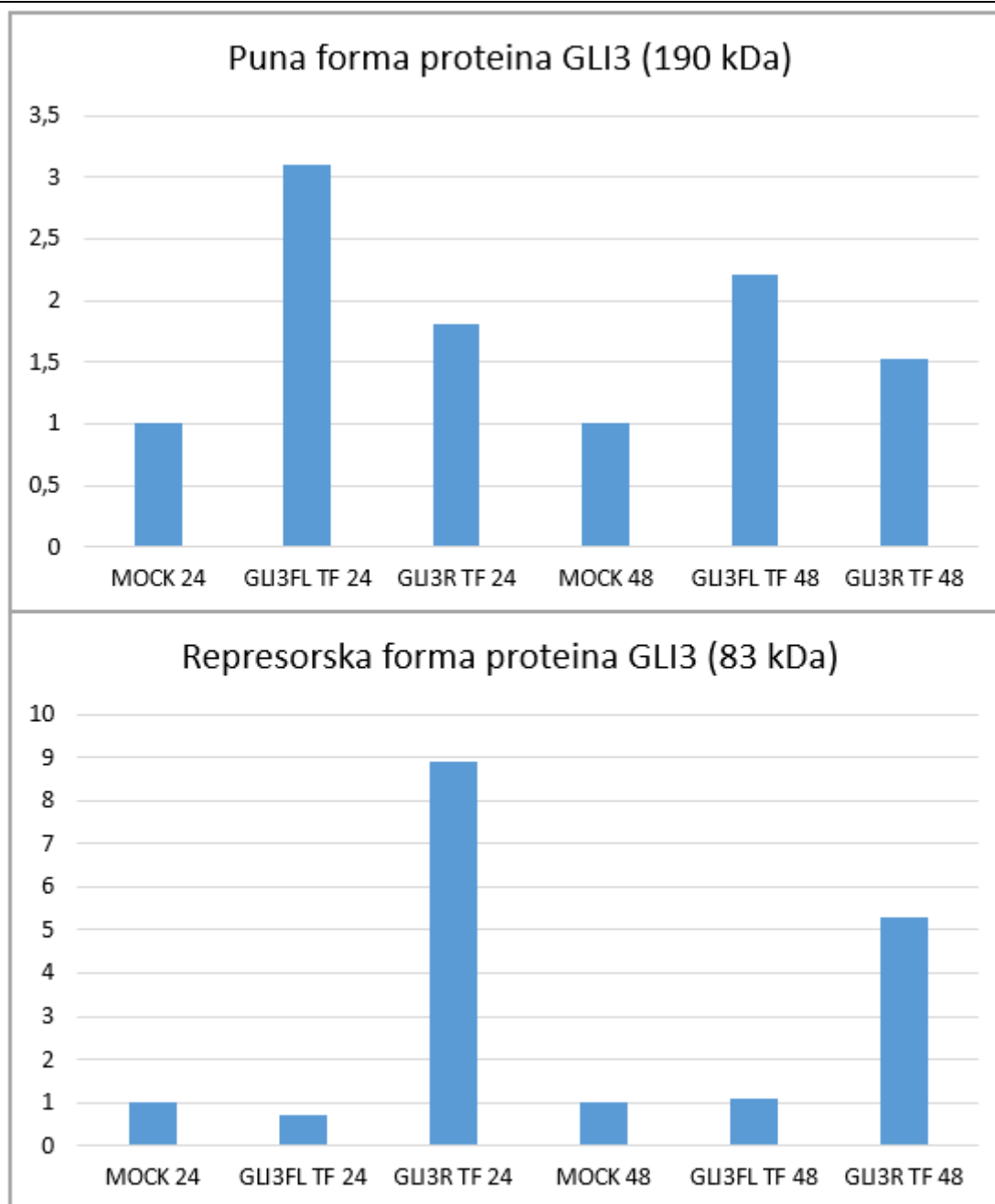
Poznato je da transfekcijom stanica dolazi do prolazne proteinske ekspresije transkripcijskog faktora GLI3 s plazmida u transfeciranim stanicama, stoga je potrebno optimizirati uvjete vremena transfekcije za potrebe daljnjih eksperimenata.

Pomoću western analize praćena je ekspresija proteina GLI3 u punoj formi (GLI3FL, 190 kDa) te ekspresija njegove represorske forme (GLI3R, 83 kDa) nakon inkubacije u trajanju od 24 sata te 48 sati. Kako bi se učinkovito optimizirala transfekcija, korištena je stanična linija stanična linija fibroblasta prostate (WPMY-1) zbog svoje niske razine ekspresije proteina GLI3 u netretiranim stanicama. Na **slici 25.** prikazani su rezultati dobiveni western analizom. Na snimljenoj membrani jasno je vidljivo kako je proteinska GLI3R najjača nakon inkubacije u trajanju od 24 sata, dok nakon 48 sati opada. Vrpce dobivene snimanjem membrane se kvantificiraju uz pomoć računalnog programa *ImageJ*. Vrijednosti intenziteta signala proteinskih vrpce normalizirane su prema vrijednostima intenziteta signala vrpce referentnog proteina β -aktina te prema stanicama transfeciranim praznim vektorom (mock). Transfekcija praznim vektorom koristi se kao kontrola kako bismo bili sigurni da su dobiveni rezultati posljedica ekspresije inserta, a ne posljedica samih uvjeta transfekcije. Dobiveni rezultati su kvantitativno prikazani na **slici 26.**, što potvrđuje raniju opservaciju na membrani.

GLI3 pune duljine također se najjače ekspresira 24h nakon transfekcije, dok se nakon 48h ta vrpca gubi. GLI3 pune duljine na membrani se detektira iznad vrpce endogeno prisutnog proteina jer taj ekspresijski vektor nosi gen za GLI3 s dodatnim biljekom na 5' kraju proteina (5 x MYC) koji povećava ukupnu veličinu proteina.⁹⁶



Slika 25. Membrana dobivena western analizom. Korištena je stanična linija WPMY-1. Vizualizirani su proteini GLI3 i β -aktin kao referentni protein. Stanice su transfecirane vektorima pcDNA4TOGLI3 (koji eksprimira protein GLI3 u punoj formi s 5 x MYC biljekom, na slici označen s GLI3) i pcDNA3-GLI3R (koji eksprimira represorsku formu proteina GLI3, na slici označen s GLI3R). Također, prikazane su stanice transfecirane praznim vektorom označene s MOCK. Transfekcija se provodila u dva vremena inkubacije, 24 sata te 48 sati. Crvenim strelicama označene su vrpce koje odgovaraju proteinu GLI3 u punoj formi, a zelenim strelicama represorska forma proteina GLI3.



► GLI3FL TF = transfecirani vektor pcDNA4TOGLI3

► GLI3R TF = transfecirani vektor pcDNA3-GLI3R

Slika 26. Kvantifikacija rezultata dobivenih western analizom. Za kvantifikaciju korišten je računalni program ImageJ pomoću kojeg su izmjereni intenziteti signala na membrani. Vrijednosti intenziteta signala proteinskih vrpca normalizirane su prema vrijednostima intenziteta signala vrpca referentnog proteina β -aktina te prema netretiranim (na slici označene s MOCK) stanicama.

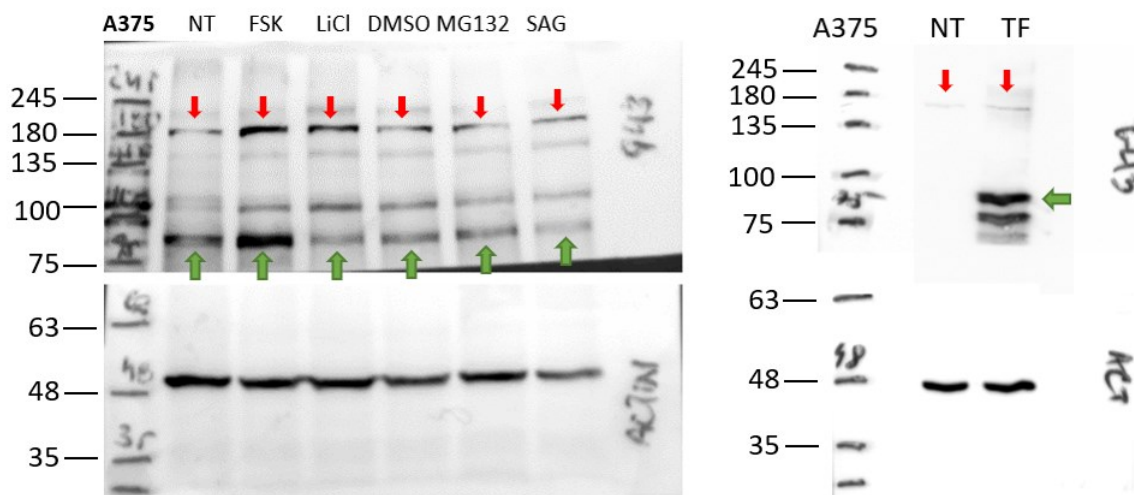
4.2.2. Utjecaj tretmana i transfekcije na ekspresiju proteina GLI3FL i GLI3R u staničnim linijama A375 i WPMY-1

Da bi se uspješno provela validacija konstruiranog vektora pcDNA3-GLI3, na stanične linije melanoma A375 su dodani spojevi koji mijenjaju omjer aktivatorskog i represorskog oblika proteina GLI3, te su rezultati proteinske ekspresije uspoređeni s očekivanima. Također, jedan uzorak stanične linije A375 je transfeciran konstruiranim vektorom pcDNA3-GLI3R u skladu s uvjetima optimizacije vremena te je ekspresija uspoređena s ostalim rezultatima. **Tablica 13.** sažeto prikazuje očekivano djelovanje svakog od tretmana.

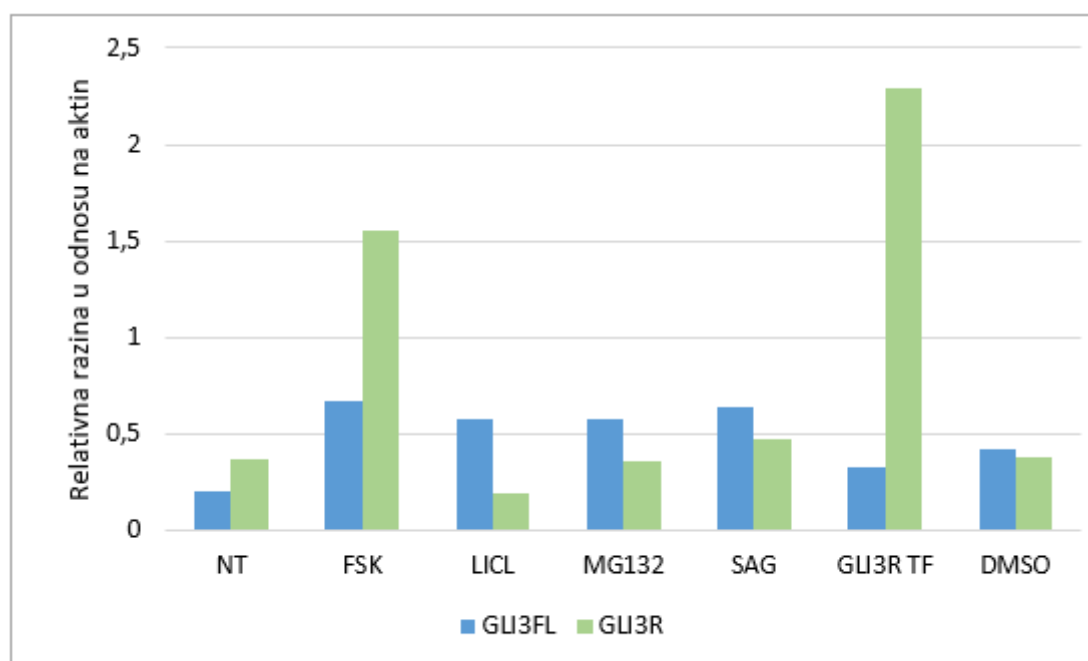
Tablica 12. Sažeti prikaz očekivanih utjecaja tretmana na signalni put HH-GLI.

Tretman	Molekularna meta	Očekivani efekt	Referenc e
Forskolin (FSK)	Aktivator PKA	PKA je nužna za proteolitičko cijepanje GLI3FL, očekujemo veći udio GLI3R (83 kDa)	29, 30
Litijev klorid (LiCl)	Promovira fosforilaciju Ser9 na GSK3 β , onemogućava funkciju GSK3 β	GSK3 β fosforilira SUFU, što je nužan preduvjet za proteolitičko cijepanje GLI3FL, očekujemo veći udio GLI3R (83 kDa)	33, 34
MG132	Inhibitor 26S proteasoma	Inhibira cijepanje GLI3FL u represorski oblik, očekujemo veći udio GLI3FL (190 kDa)	39, 40
SAG	Aktivator koreceptora SMO	Pospješuje aktivnost signalnog puta, očekujemo veći udio GLI3FL (190 kDa)	43

Na **slici 27.** prikazani su rezultati dobiveni western analizom, a snimljeni signali na membranama su analizirani i kvantificirani pomoću *ImageJ* računalnog programa. Vrijednosti intenziteta signala proteinskih vrpca normalizirane su prema vrijednostima intenziteta signala vrpca referentnog proteina β -aktina te prema netretiranim stanicama. Rezultati kvantifikacije su grafički prikazani pomoću računalnog programa *Microsoft Office Excel*, a nalaze se na **slici 28.**, dok je izračunati omjer GLI3FL/GLI3R je prikazan na **slici 29.**

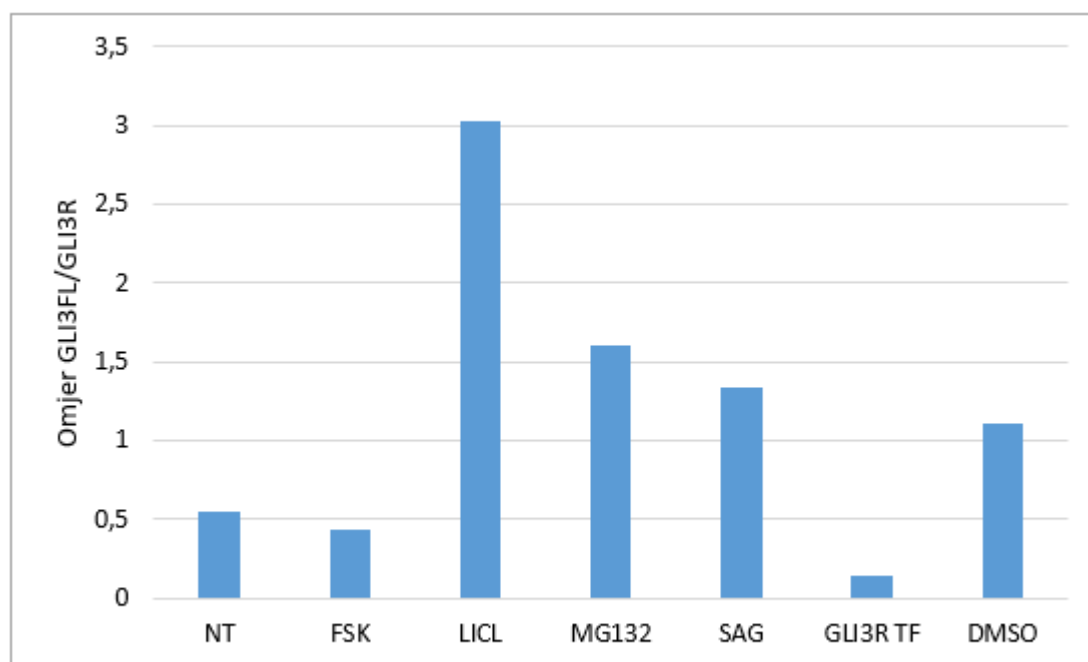


Slika 27. Membrana dobivena western analizom. Korištena je stanična linija A375. Vizualizirani su proteini GLI3 i β -aktin kao referentni protein. Prikazane su netretirane stanice (NT), stanice tretirane tretmanima forskolinom (FSK), litijevim kloridom (LiCl), DMSO kao kontrola otapala, MG132 i agonistom SAG. Također, stanice su transfecirane vektorom pcDNA3-GLI3R (koji ekspirira represorsku formu proteina GLI3). Crvenim strelicama označene su vrpce koje odgovaraju proteinu GLI3 u punoj formi, a zelenim strelicama represorska forma proteina GLI3.



► GLI3R TF = transfecirani vektor pcDNA3-GLI3R

Slika 28. Kvantifikacija rezultata dobivenih western analizom. Za kvantifikaciju korišten je računalni program ImageJ pomoću kojeg su izmjereni intenziteti signala na membrani. Dobiveni podaci su obrađeni pomoću računalnog programa Microsoft Office Excel. Vrijednosti intenziteta signala proteinskih vrpce normalizirane su prema vrijednostima intenziteta signala vrpce referentnog proteina aktina.



► GLI3R TF = transfecirani vektor pcDNA3-GLI3R

Slika 29. Omjer GLI3FL/GLI3R dobiven kvantifikacijom western analize. U omjer su uzete relativne razine GLI3FL i GLI3R u odnosu na aktin.

Usporedbom rezultata dobivenih western analizom s očekivanim efektima tretmana može se zaključiti kako se stanična linija ponašala u skladu s pretpostavljenim očekivanjima pri svim tretmanima osim u stanicama tretiranim litijevim kloridom. Tretman litijevim kloridom trebao bi inhibirati aktivnost GSK3 β , što bi trebalo dovesti do smanjene fosforilacije SUFU i akumulacije GLI3FL u citoplazmi, te posljedične razgradnje do represorskog oblika GLI3R. Zamijećena je akumulacija GLI3FL, međutim nije došlo do povećanog procesiranja u GLI3R. Kako je ustanovljeno da je fosforilacija kinazom GSK3 β nužna za kasnije procese obilježavanja ubikvitinom prije usmjeravanja prema proteasomu, moguće je da nedostatkom aktivnosti GSK3 β nisu ispunjeni potrebni preduvjeti za uspješno upućivanje GLI3FL prema proteasomu. Također, može se zaključiti da je transfecirani vektor pcDNA3-GLI3R uspješno konstruiran zbog vrlo visoke ekspresije represorske forme proteina GLI3 (GLI3R 83 kDa) nakon transfekcije vektorom, posebice ukoliko ekspresiju usporedimo s rezultatima dobivenima nakon tretmana forskolinom za kojeg se očekuje inhibitorni učinak na signalni put uz očekivani veći udio represorske forme proteina GLI3.^{97,98} Posljedično, udio GLI3FL je niži u tretmanima forskolinom i u transfeciranim stanicama u usporedbi s netretiranim stanicama (prema **slici 29**). Tretmanima MG132 i SAG potiče se povećan udio GLI3FL što je i pokazano na **slici 29**.

4.2.3. Lokalizacija proteina *GLI3FL* i *GLI3R* u staničnim linijama *A375* i *WPMY-1*

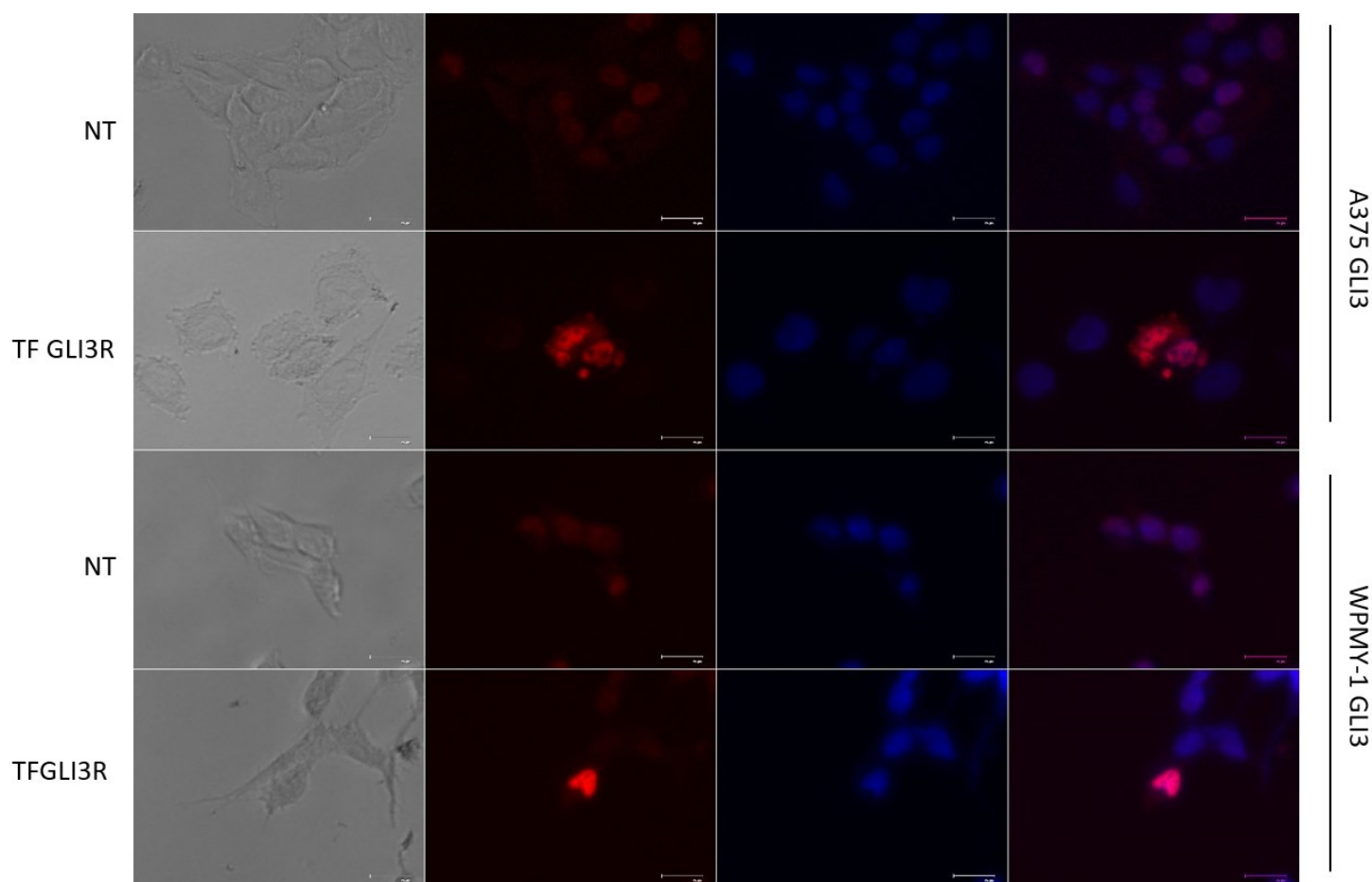
Metodom imunofluorescencije odredila se lokacija proteina *GLI3* i *PTCH1* unutar staničnih odjeljaka kako bi se ustanovilo smješta li se konstruirani *GLI3R* u ispravni stanični odjeljak. *PTCH1* je protein koji se koristi kao marker aktivnosti signalnog puta *HH-GLI*.

Na slikama **30.-36.** prikazane su snimke stanica snimane pri bijelom svijetlu, potom u crvenom kanalu (detektira se sekundarno antitijelo označeno fluorescentnom bojom Alexa 594 koje se vezalo na primarna antitijela vezana na proteine *GLI3* ili *PTCH1*) i u plavom kanalu (detektiraju se jezgre stanica koje su obojane bojom *DAPI*). Pomoću računalnog programa *Fiji* preklapljeni su crveni i plavi kanali kako bi se vidjelo preklapanje struktura. .

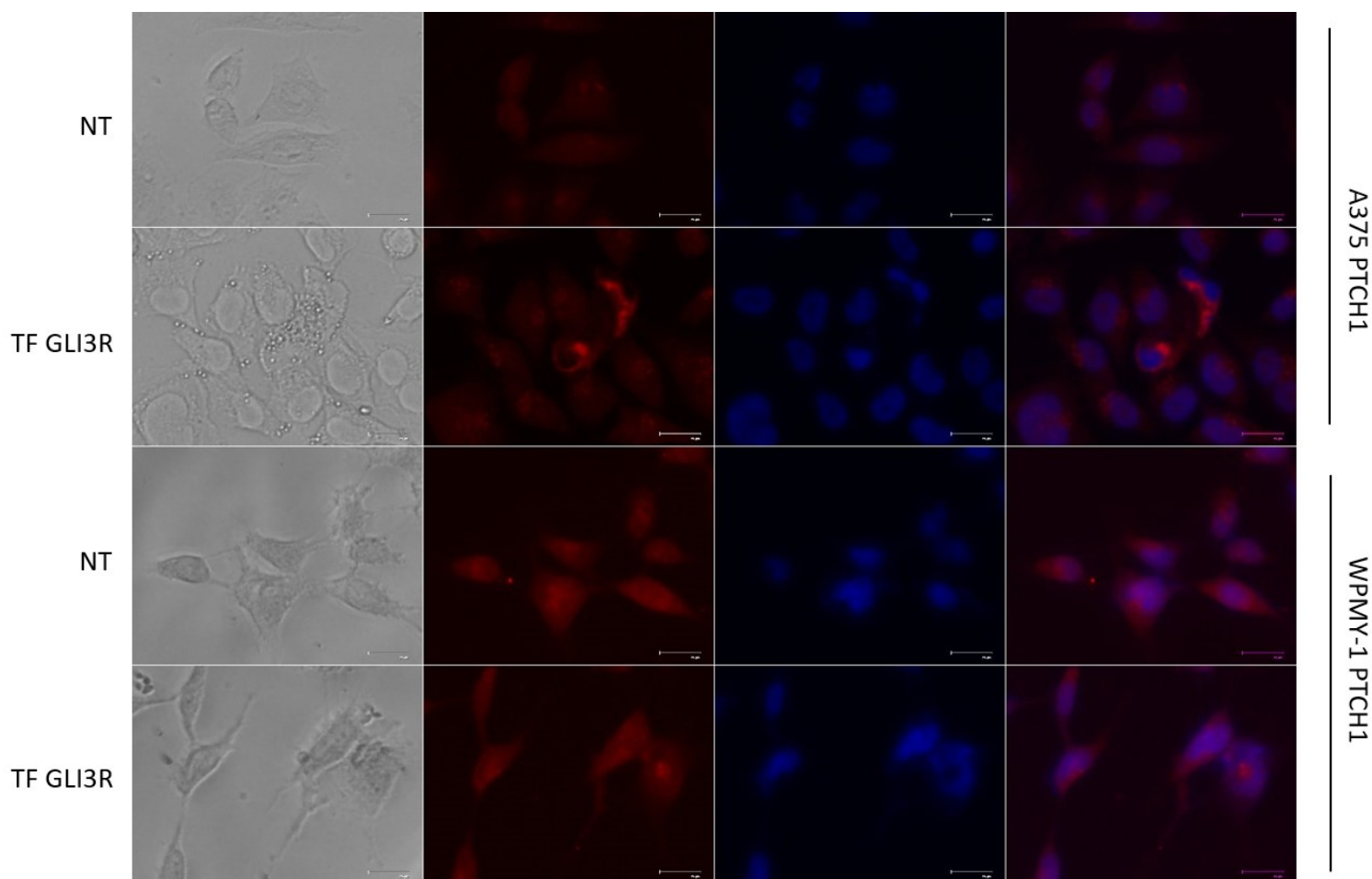
Rezultati imunofluorescencije pokazuju da su proteini *GLI3* smješteni u jezgri i citoplazmi u obje stanične linije, što je u skladu s očekivanjima budući da se radi o transkripcijskom faktoru. Također je vidljivo da je u bazalnim uvjetima intenzitet bojanja *GLI3* slab, osim u stanicama transfeciranim *GLI3R* vektorom gdje se signal izrazito pojačava (**slika 30. i 31.**). Signali uglavnom lokaliziraju u jezgrama stanica, što je također očekivano obzirom da se *GLI3FL* kao aktivator nalazi u jezgri stanica, a svi tretmani osim onoga s forskolinom djeluju aktivatorski na signalni put. Represorski oblik se djelomično nalazi u citoplazmi (nastaje u proteasomima cijepanjem iz *GLI3FL*, a onda se transportira u jezgru kako bi inhibirao transkripciju), a djelomično u jezgri gdje djeluje kao represor. Kod transfeciranih stanica vidi se jaki crveni signal, odnosno može se zaključiti kako transfecirane stanice sadrže veliku količinu proteina *GLI3*. Također, može se pretpostaviti da većina signala dolazi od represora na temelju rezultata dobivenih prijašnjim pokusima, ali to nije moguće utvrditi metodom imunofluorescencije jer se ovom metodom istovremeno detektiraju oba oblika proteina *GLI3*.

Analizom lokalizacije proteina *PTCH1* možemo uočiti visoke koncentracije proteina uz jezgru stanica te odsustvo proteina unutar jezgre. Obzirom da se radi o transmembranskom receptoru signalnog puta s 12 transmembranskih domena, rezultat je očekivan. Može se pretpostaviti kako lokalizirane visoke koncentracije proteina vjerojatno odgovaraju Golgijevom aparatu na kojem se nalazi navedeni receptor.^{99,100} Pregledom baze podataka The Human Protein Atlas (<https://www.proteinatlas.org/>) ustanovljeno je da se protein *PTCH1* detektira u Golgijevom aparatu, te da su ovi rezultati u skladu s prethodno opaženima.

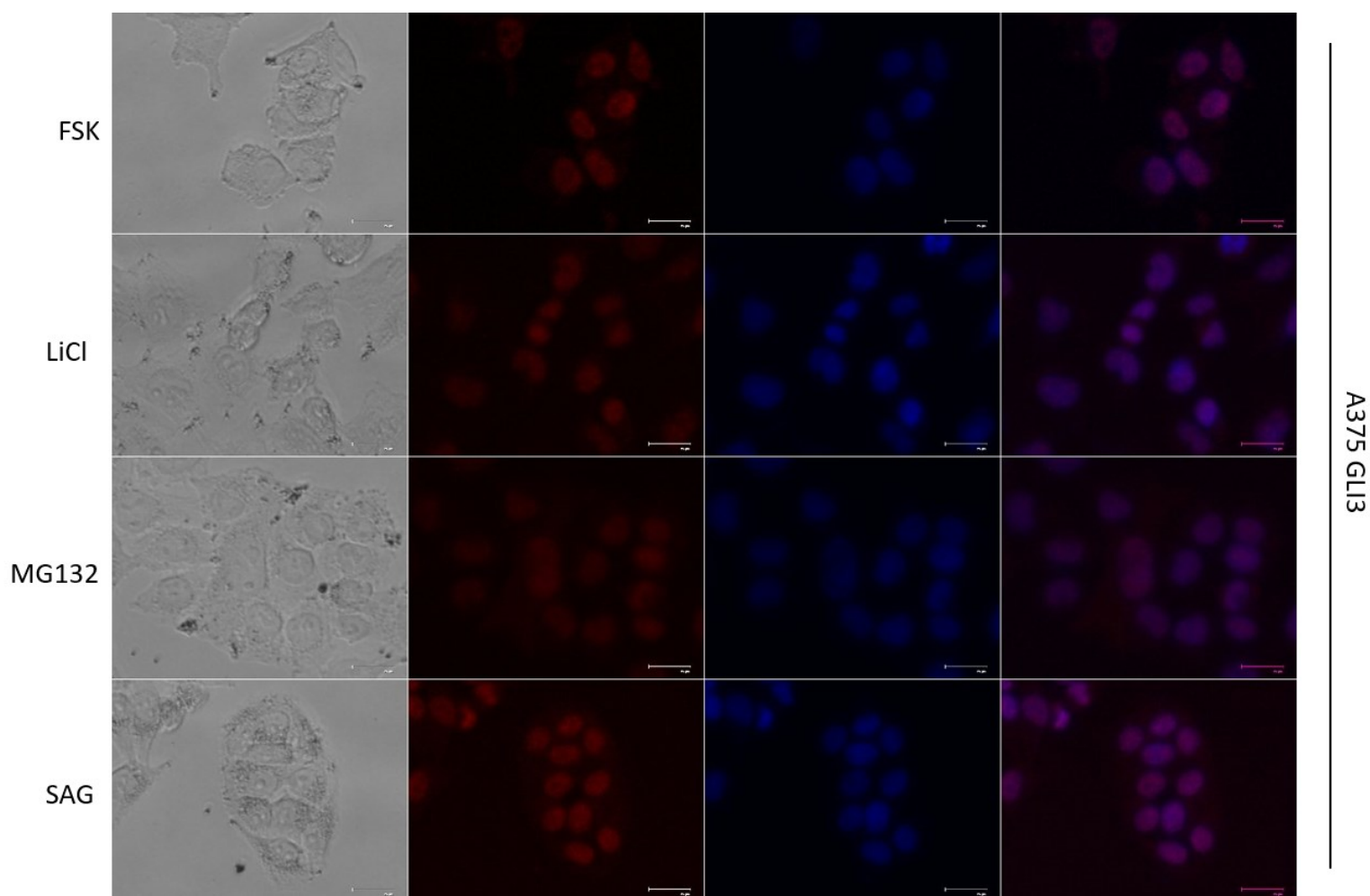
Tretmani spojevima generalno ne utječu na promjenu lokalizacije detektiranih proteina u stanicama (**slike 32.-36.**).



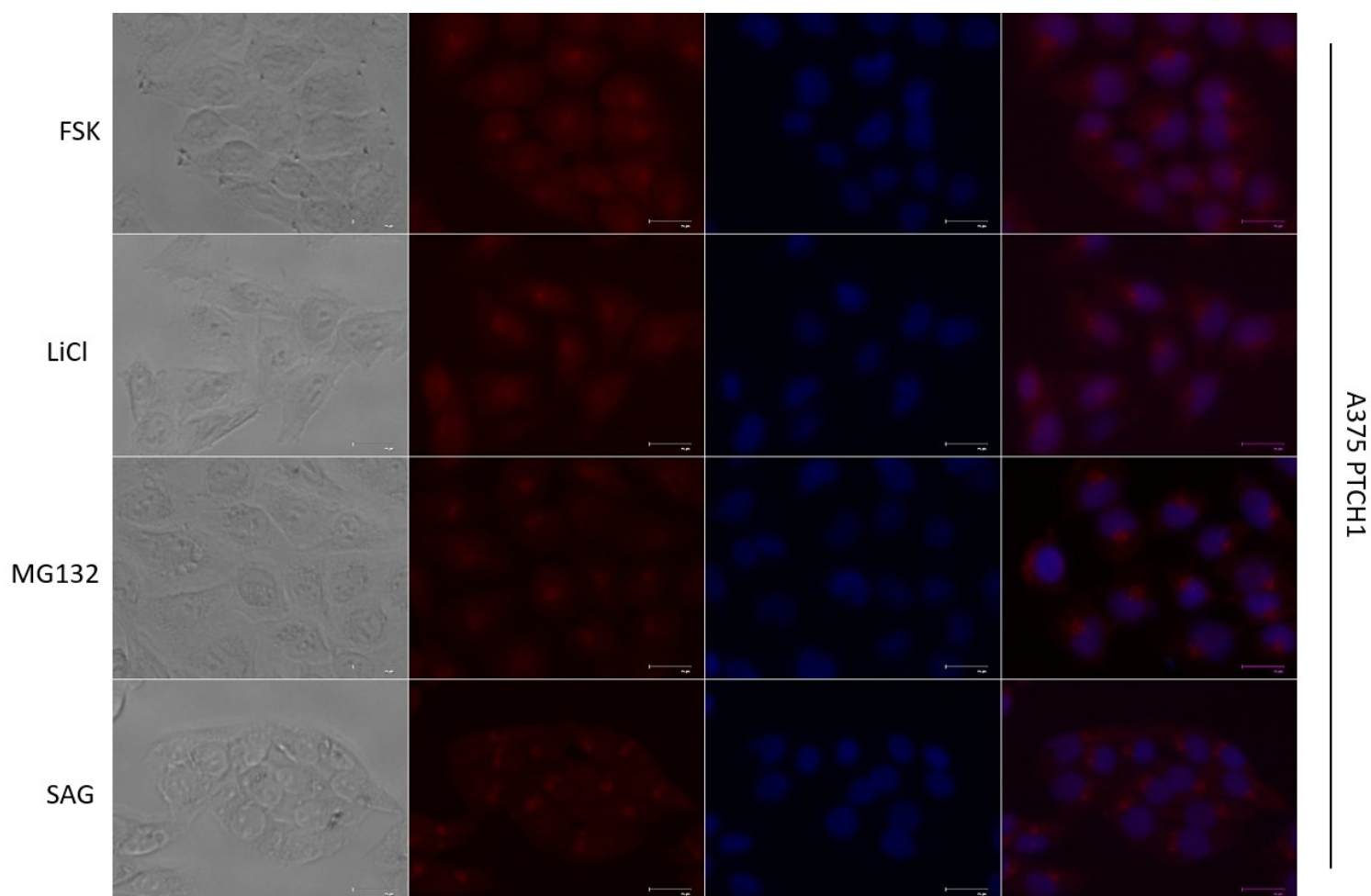
Slika 30. Lokalizacija proteina GLI3 u staničnim linijama A375 i WPMY-1 u netretiranim uvjetima i nakon transfekcije ekspresijskim vektorom za GLI3R. Na slici u prvom stupcu se nalaze snimke snimljene pri bijeloj svjetlosti (vidljiva je morfologija stanica); u drugom stupcu je prikazano bojanje proteina GLI3 (crveno); u trećem stupcu su prikazane jezgre obojene DAPI bojom (plavo); a u četvrtom stupcu prikazan je preklopljeni prikaz crvenog i plavog kanala.



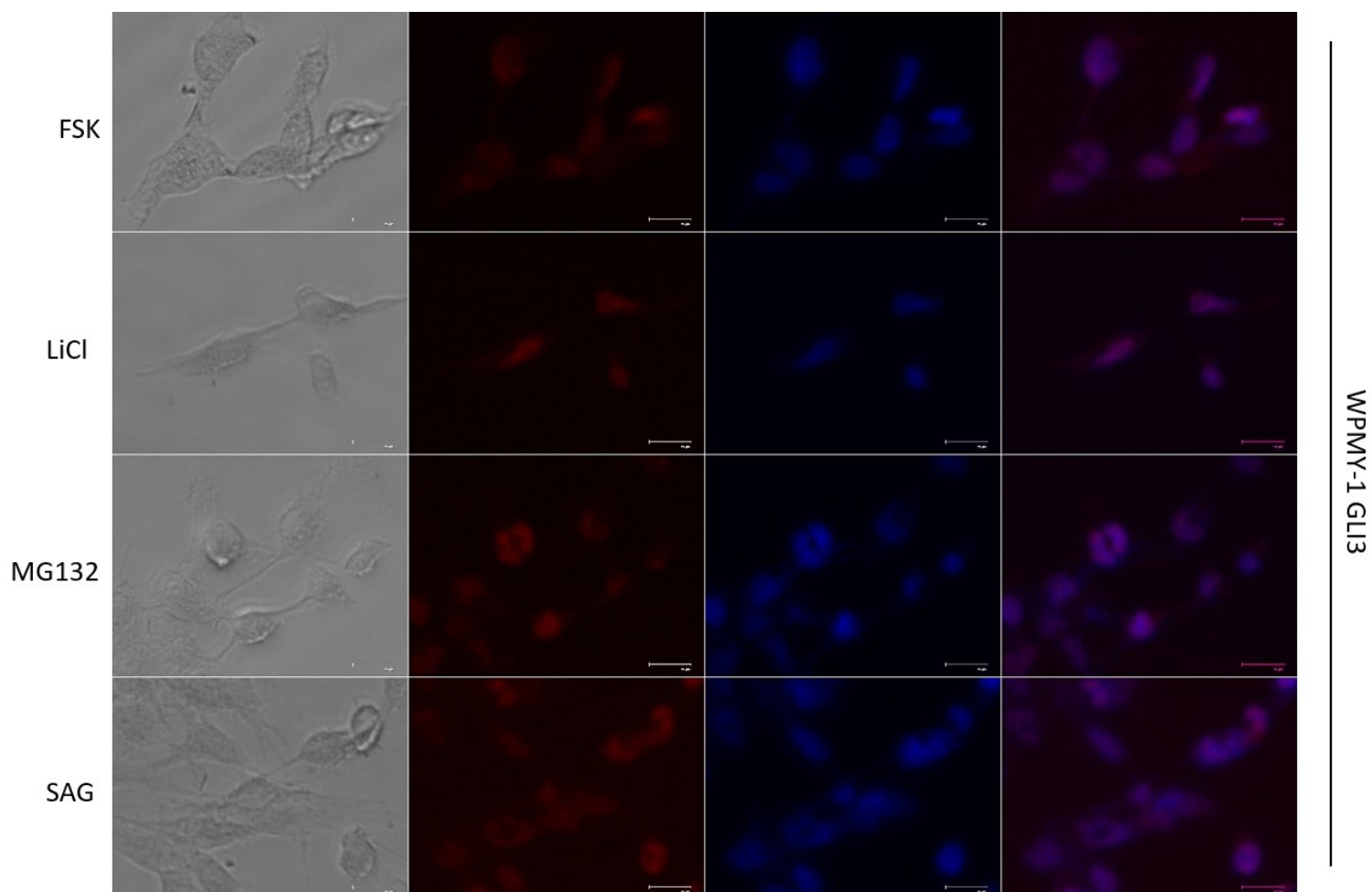
Slika 31. Lokalizacija proteina *PTCH1* u staničnim linijama *A375* i *WPMY-1* u netretiranim uvjetima i nakon transfekcije ekspresijskim vektorom za *GLI3R*. Na slici u prvom stupcu se nalaze snimke snimljene pri bijeloj svjetlosti (vidljiva je morfologija stanica); u drugom stupcu je prikazano bojanje proteina *PTCH1* (crveno); u trećem stupcu su prikazane jezgre obojene *DAPI* bojom (plavo); a u četvrtom stupcu prikazan je preklopljeni prikaz crvenog i plavog kanala.



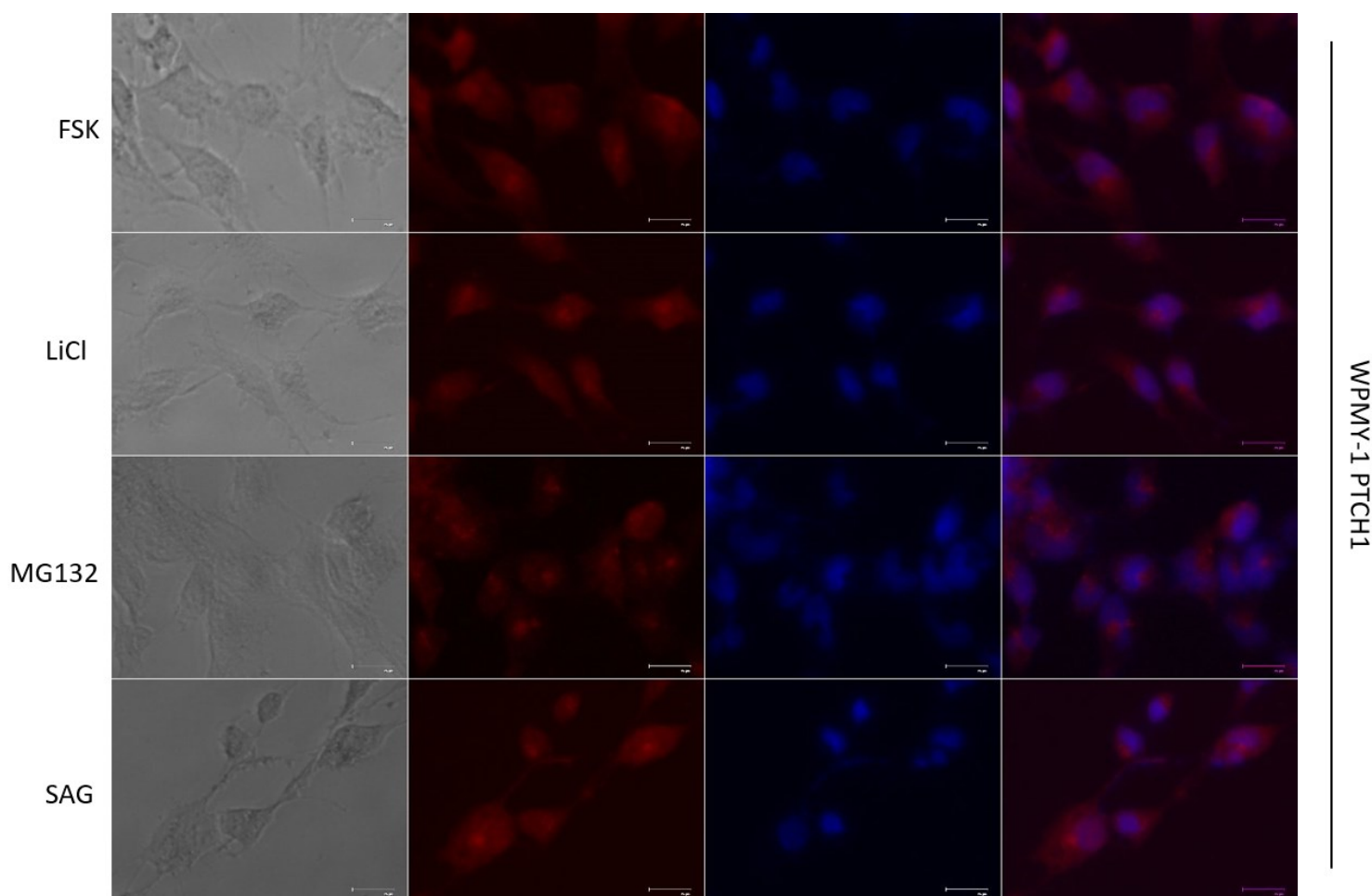
Slika 32. Lokalizacija proteina GLI3 u staničnoj liniji A375 nakon tretmana forskolinom, litijevim kloridom, MG132 i SAG-om.. Na slici u prvom stupcu se nalaze snimke snimljene pri bijeloj svjetlosti (vidljiva je morfologija stanica); u drugom stupcu je prikazano bojanje proteina GLI3 (crveno); u trećem stupcu su prikazane jezgre obojene DAPI bojom (plavo); a u četvrtom stupcu prikazan je preklopljeni prikaz crvenog i plavog kanala.



Slika 33. Slika 34. Lokalizacija proteina PTCH1 u staničnoj liniji A375 nakon tretmana forskolinom, litijevim kloridom, MG132 i SAG-om.. Na slici u prvom stupcu se nalaze snimke snimljene pri bijeloj svjetlosti (vidljiva je morfologija stanica); u drugom stupcu je prikazano bojanje proteina PTCH1 (crveno); u trećem stupcu su prikazane jezgre obojene DAPI bojom (plavo); a u četvrtom stupcu prikazan je preklopljeni prikaz crvenog i plavog kanala.



Slika 35.. Lokalizacija proteina GLI3 u staničnoj liniji WPMY-1 nakon tretmana forskolinom, litijevim kloridom, MG132 i SAG-om.. Na slici u prvom stupcu se nalaze snimke snimljene pri bijeloj svjetlosti (vidljiva je morfologija stanica); u drugom stupcu je prikazano bojanje proteina GLI3 (crveno); u trećem stupcu su prikazane jezgre obojene DAPI bojom (plavo); a u četvrtom stupcu prikazan je preklopljeni prikaz crvenog i plavog kanala.



Slika 36. Lokalizacija proteina *PTCH1* u staničnoj liniji *WPMY-1* nakon tretmana forskolinom, litijevim kloridom, *MG132* i *SAG*-om.. Na slici u prvom stupcu se nalaze snimke snimljene pri bijeloj svjetlosti (vidljiva je morfologija stanica); u drugom stupcu je prikazano bojanje proteina *GLI3* (crveno); u trećem stupcu su prikazane jezgre obojene *DAPI* bojom (plavo); a u četvrtom stupcu prikazan je preklopljeni prikaz crvenog i plavog kanala.

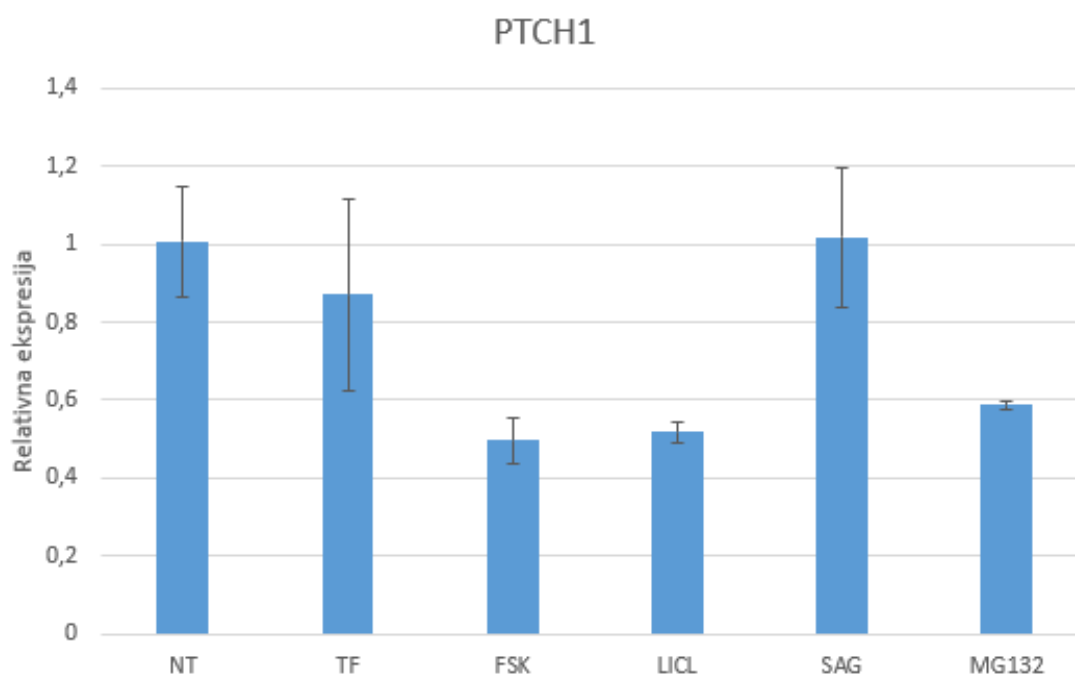
4.2.4. Utjecaj tretmana i transfekcije na ekspresiju gena *GLI3* i *PTCH1* u staničnoj liniji *A375*

Prethodno napravljeni pokusi pokazuju kako svaki od tretmana i transfekcija imaju utjecaj na ekspresiju proteina u stanicama. Za ispitivanje učinka spojeva i transfekcije *GLI3R* na ekspresiju gena korištena je samo stanična linija *A375*, zato jer ona ima dovoljno jaku bazalnu ekspresiju proteina *GLI3* da bi se djelovanje spojeva moglo pratiti nakon tretmana spojevima, te usporediti s učinkom transfekcije *GLI3R*.

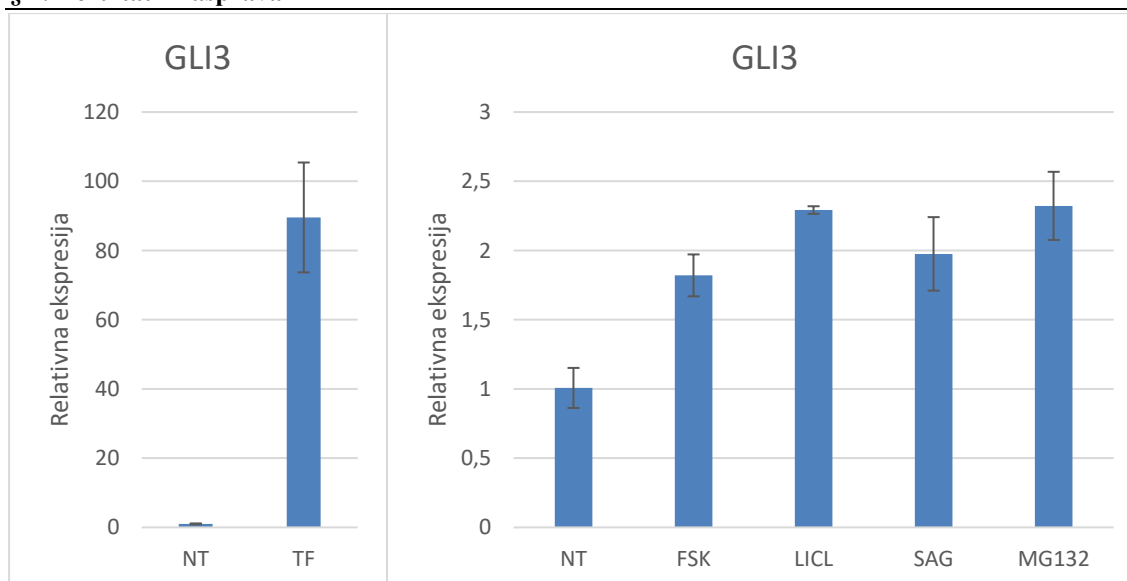
Da bi se ispitao utjecaj tretmana i transfekcije na ekspresiju gena *GLI3* i *PTCH1* u staničnoj liniji *A375* primijenjena je metoda RT-qPCR. Podaci su snimljeni u računalnom programu Bio-

Rad CFX Manager, koji dolazi s uređajem za RT-qPCR koji je korišten u ovom radu (CFX96), te dodatno obrađeni u *Microsoft Office Excel* programu. Dobivene *Ct* vrijednosti prvo se normaliziraju prema endogenoj kontroli (*RPLP0*, $\Delta Ct = Ct(\text{gen od interesa}) - Ct(RPLP0)$), a onda prema netretiranim stanicama ($\Delta\Delta Ct = \Delta Ct(\text{tretman}) - \Delta Ct(\text{netretirane})$). Potom se izračuna relativni omjer RNA u uzorku prema formuli: $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ (eng. *fold change*, *FC*). Dobiveni podaci se prikazuju grafički kako je prikazano na slikama 37. i 38.

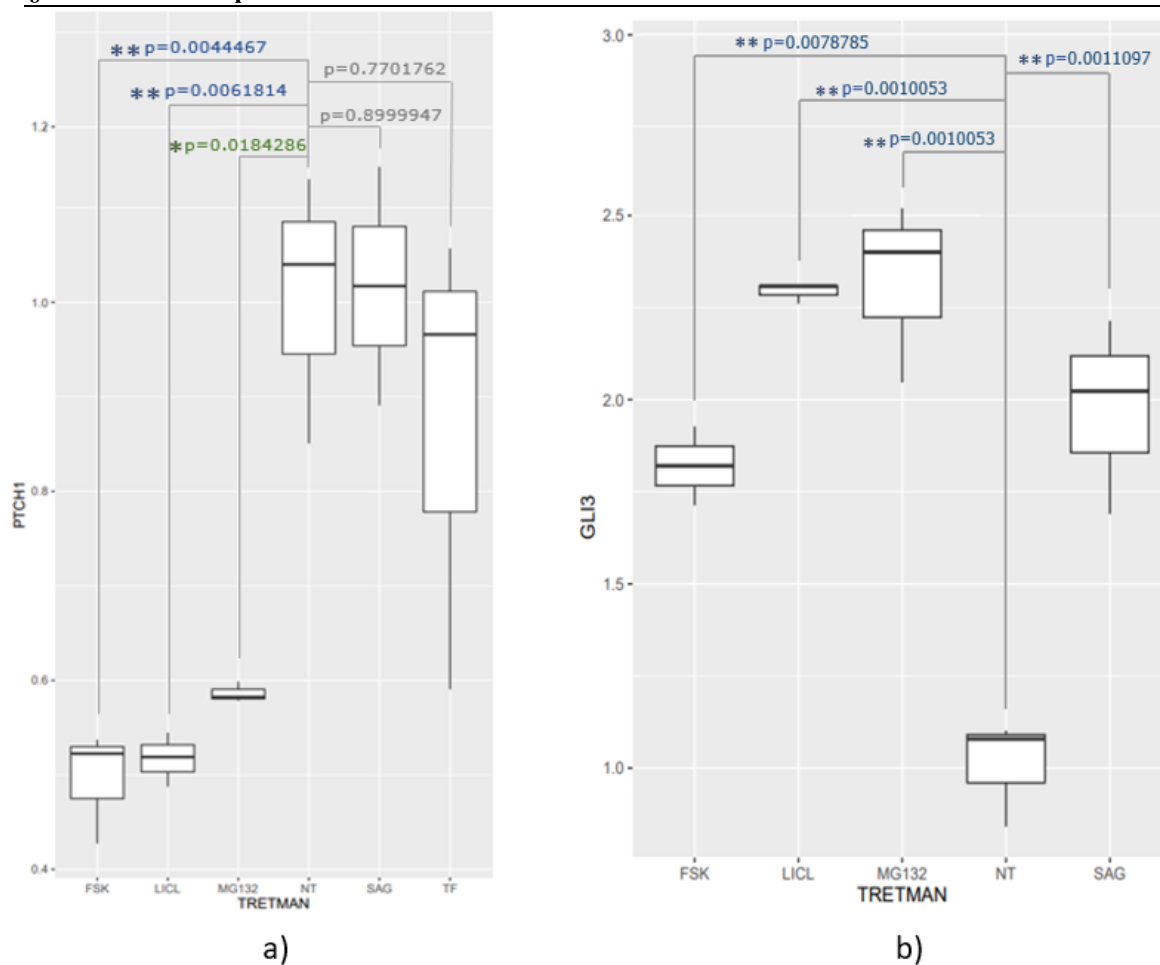
Razlika u genskoj ekspresiji netretiranih, tretiranih te transfeciranih stanica testirana je pomoću jednosmjerne analize varijance (*one-way ANOVA*) uz korištenje *Tukeyovog HSD post hoc* testa kako bi se usporedio svaki pojedini tretman i transfekcija s netretiranim stanicama. Statistička analiza provedena je pomoću računalnog programa *R* i *R Studio*. Također, rezultati *Tukey HSD post hoc* testa su grafički prikazani na slici 39.



Slika 37. Relativna genska ekspresija gena *PTCH1* u stanicama A375 nakon tretmana spojevima i transfekcije vektorom. Prikazani su rezultati relativne genske ekspresije za netretirane stanice (NT), transformacije *pcDNA3-GLI3R* vektorom (TF), tretman forskolinom (FSK), litijevim kloridom (LiCl), SAG-om te MG132.



Slika 38. Relativna genska ekspresija gena *GLI3* u stanicama A375 nakon transfekcije vektorom i tretmana spojevima. Prikazani su rezultati relativne genske ekspresije za netretirane stanice (NT), transformacije pcDNA3-GLI3R vektorom (TF), tretman forskolinom (FSK), litijevim kloridom (LiCl), SAG-om te MG132. Relativna ekspresija *GLI3* nakon transfekcije prikazana je na odvojenom grafu zbog razlike u skalama, kako bi rezultati bili pregledniji.



Slika 39. „Box plot“ prikaz podataka dobivenih metodom RT-qPCR. Za statističku obradu korišten je računalni program R i R Studio. Nakon ANOVA testa proveden je Tukey HSD post hoc test kako bi se međusobno usporedili svaki pojedini tretmana odnosno transfekcija s netretiranim stanicama. Plavo obojane p vrijednosti (**) označavaju $p < 0,01$, a zeleno obojane p vrijednosti (*) označavaju $p < 0,05$. Na slici a) nalazi se „box plot“ prikaz podataka izmjenjenih za gensku ekspresiju *PTCH1* (rezultat dobiven ANOVA testom je $p=0,000465038$). Na slici b) se nalazi „box plot“ prikaz podataka izmjenjenih za gensku ekspresiju *GLI3* (iz ANOVA testa izostavljen je rezultat transfekcije, a rezultat dobiven testom je $p=8,94006E-05$; proveden je T-test na podacima za netretirane stanice i transfecirane stanice, a njegov rezultat je $p=0,010544656$).

Analizom dobivenih podataka dobiveno je kako genska ekspresija *PTCH1* opada u tretmanima s forskolinom, litijevim kloridom te MG132. Sama transfekcija *GLI3R* nema učinka na ekspresiju gena *PTCH1*, što je neočekivani rezultat jer se smatra kako je *PTCH1* pod direktnom kontrolom signalnog puta HH-GLI i trebao bi se utišati inhibicijom signalnog puta. Moguće je da bi se učinak na ekspresiju *PTCH1* vidio nakon dužeg vremena, međutim to iz ovih podataka

nije moguće tvrditi. Tretman aktivatorom SAG također nije pokazao očekivani učinak pojačanja ekspresije *PTCH1*, međutim kako se radi o stanicama melanoma, u kojima je ovaj signalni put pojačano aktivan, moguće je da se ne može dodatno stimulirati dodatkom aktivatora. Preostali tretmani djeluju inhibirajuće na signalni put čime je značajno smanjena genska ekspresija *PTCH1*.

Genska ekspresija *GLI3* značajno raste u transfeciranim stanicama, što je i očekivano jer se eksprimira s plazmida koji je unesen u stanice. U usporedbi s netretiranim stanicama, zabilježen je značajan porast genske ekspresije *GLI3* za svaki od tretmana što je u skladu s očekivanim rezultatima obzirom da svaki od tretmana ima aktivacijski ili inhibitorški učinak na signalni put. Obzirom da se radi o regulatornim proteinima signalnog puta, očekivan je porast njihove ekspresije u stanicama zbog utjecaja tretmana na aktivaciju ili inaktivaciju puta.

§ 5. ZAKLJUČAK

Na temelju rezultata provedenog istraživanja može se zaključiti:

- Uspješno je konstruiran fragment „GeneBlock GLI3R“ koji nosi sekvencu represorskog oblika proteina GLI3.
- Konstruirani fragment „GeneBlock GLI3R“ uspješno je kloniran u plazmidni vektor pcDNA3.
- Točnost vektora za ekspresiju represorskog oblika proteina GLI3 je potvrđena sekvenciranjem.
- Optimizirani su uvjeti transfekcije ekspresijskog vektora te transfekcija konstrukta pcDNA3-GLI3R dovodi do povećane proteinske ekspresije represorskog oblika proteina GLI3
- Transfekcija pcDNA3-GLI3R ima jači učinak na povećanje ekspresije GLI3R od bilo kojeg tretmana spojevima
- Proteini GLI3 su lokalizirani i u jezgri i u citoplazmi analiziranih staničnih linija (A375 i WMPY-1).
- Genska ekspresija *GLI3* značajno raste u transfeciranim stanicama, što je u skladu s očekivanjima, ali ne mijenja značajno ekspresiju ciljnog gena *PTCH1*, što je neočekivano

§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA

APS	amonijev persulfat (eng. <i>Ammonium persulfate</i>)
BCA	bicinkonična kiselina (eng. <i>Bicinchoninic acid</i>)
BSA	albumin iz goveđeg seruma (eng. <i>Bovine serum albumine</i>)
cAMP	ciklički adenzin monofosfat (eng. <i>Cyclic adenosine monophosphate</i>)
cDNA	komplementarna DNA (eng. <i>Complementary DNA</i>)
CK1	kazeinska-kinaza (eng. <i>Casein Kinase 1</i>)
DMEM	eng. <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	dimetilsulfoksid (eng. <i>Dimethyl sulfoxide</i>)
EDTA	etilendiamintetraoctena kiselina
FSK	Forskolin
GCPS	Grieg cephalopolysyndactyly sindrom
GLI1	protein GLI1
GLI1	gen Gli1
GLI2	gen Gli2
GLI2	protein GLI2
GLI3	gen Gli3
GLI3	protein GLI3
GLI3FL	puna forma proteina GLI3
GLI3R	represorski oblik proteina GLI3
GSK3β	glikogen-sintaze-3 β kinaza (eng. <i>Glycogen synthase kinase 3β</i>)
HH-GLI	Hedgehog-GLI
IFT	intraflagelarni transport (eng. <i>Intraflagellar transport</i>)
KRAS	protoonkogen KRAS (eng. <i>KRAS Proto-Oncogene</i>)
LB	pufer za nanošenje (eng. <i>loading buffer</i>)
LiCl	litijev klorid
OSCC	karcinom oralnih skvamoznih stanica
PCR	lančana reakcija polimerazom (eng. <i>Polymerase chain reaction</i>)
PHS	Pallister Hall sindrom
PKA	protein-kinaza A (eng. <i>Protein kinase A</i>)

PTCH1	protein Patched1 (eng. <i>Patched 1</i>)
SCF(βTrCP)	Kompleks ubikvintin ligaze E3 (eng. <i>The ubiquitin ligase E3</i>)
SCUBE2	protein SCUBE2
SDS	natrijev dodecil sulfat (eng. <i>Sodium dodecyl sulfate</i>)
SMO	(eng. <i>Smoothened</i>)
SUFU	(eng. <i>Supressor of Fused</i>)
TEMED	Tetrametiletilendiamin (eng. <i>Tetramethylethylenediamine</i>)
ZF	Cinkovi prsti (eng. <i>Zinc fingers</i>)
β-ACT	beta-aktin (eng. <i>β-actin</i>)

§ 7. LITERATURNI IZVORI

1. M. Sabol, D. Trnski, V. Musani, P. Ozretić, S. Levanat, *Int. J. Mol. Sci.* **19** (2018) 2562.
2. V. Zubčić, N. Rinčić, M. Kurtović, D. Trnski, V. Musani, P. Ozretić, S. Levanat, D. Leović, M. Sabol, *Int. J. Mol. Sci.* **21** (2020).
3. D. Tempé, M. Casas, S. Karaz, M.-F. Blanchet-Tournier, J.-P. Concordet, *Mol. Cell. Biol.* **26** (2006) 4316–4326.
4. Y. Pan, B. Wang, *J. Biol. Chem.* **282** (2007) 10846–10852.
5. X. Wen, C. K. Lai, M. Evangelista, J.-A. Hongo, F. J. de Sauvage, S. J. Scales, *Mol. Cell. Biol.* **30** (2010) 1910–1922.
6. E. W. Humke, K. V. Dorn, L. Milenkovic, M. P. Scott, R. Rohatgi, *Genes Dev.* **24** (2010) 670–682.
7. S. Eaton, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9** (2008) 437–445.
8. R. K. Mann, P. A. Beachy, *Annu. Rev. Biochem.* **73** (2004) 891–923.
9. P. A. Beachy, S. G. Hymowitz, R. A. Lazarus, D. J. Leahy, C. Siebold, *Genes Dev.* **24** (2010) 2001–2012.
10. C. Hui, S. Angers, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **27** (2011) 513–537.
11. R. Rohatgi, L. Milenkovic, M. P. Scott, *Science* **317** (2007) 372–376.
12. Y. Chen, J. Jiang, *Cell Res.* **23** (2013) 186–200.
13. Y. Chen, N. Sasai, G. Ma, T. Yue, J. Jia, J. Briscoe, J. Jiang, *PLoS Biol.* **9** (2011) e1001083.
14. J. Briscoe, P. P. Thérond, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **14** (2013) 416–429.
15. <https://www.cellsignal.com/pathways/hedgehog-signaling-pathway>. (datum pristupa 23. siječnja 2023)
16. D. Brennan, X. Chen, L. Cheng, M. Mahoney, N. A. Riobo, *Vitam. Horm.* **88** (2012) 55–72.
17. S. Pietrobono, S. Gagliardi, B. Stecca, *Front. Genet.* **10** (2019). <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fgene.2019.00556>. (datum pristupa 17. prosinca 2022)

18. S. J. Matissek, W. Han, A. Hage, M. Karbalivand, R. Rajsbaum, S. F. Elsawa, (2021) 2021.01.01.424866.
19. S. J. Matissek, S. F. Elsawa, *Cell Commun. Signal.* **18** (2020) 54.
20. K. W. Kinzler, J. M. Ruppert, S. H. Bigner, B. Vogelstein, *Nature* **332** (1988) 371–374.
21. K. W. Kinzler, B. Vogelstein, *Mol. Cell. Biol.* **10** (1990) 634–642.
22. M. Didiasova, L. Schaefer, M. Wygrecka, *Mol. J. Synth. Chem. Nat. Prod. Chem.* **23** (2018) 1003.
23. K. Lichti-Kaiser, G. ZeRuth, H. S. Kang, S. Vasanth, A. M. Jetten, *Vitam. Horm.* **88** (2012) 141–171.
24. X. Zheng, W. Zeng, X. Gai, Q. Xu, C. Li, Z. Liang, H. Tuo, Q. Liu, *Oncol. Rep.* **30** (2013) 2020–2026.
25. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=2737>. (datum pristupa 17. prosinca 2022.)
26. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NC_000007.14. (datum pristupa 17. prosinca 2022.)
27. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NM_000168.6. (datum pristupa 17. prosinca 2022.)
28. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/CCDS/CcidsBrowse.cgi?REQUEST=CCDS&DATA=CDS5465>. (datum pristupa 17. prosinca 2022.)
29. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/NP_000159.3/. (datum pristupa 17. prosinca 2022.)
30. Y. Pan, C. B. Bai, A. L. Joyner, B. Wang, *Mol. Cell. Biol.* **26** (2006) 3365–3377.
31. S. Mukhopadhyay, X. Wen, N. Ratti, A. Loktev, L. Rangell, S. J. Scales, P. K. Jackson, *Cell* **152** (2013) 210–223.
32. Y. Kise, A. Morinaka, S. Teglund, H. Miki, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **387** (2009) 569–574.
33. M. A. Price, D. Calderon, *Cell* **108** (2002) 823–835.
34. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/47936>. (datum pristupa 14. siječnja 2023.)
35. <https://www.sciencedirect.com/topics/pharmacology-toxicology-and-pharmaceutical-science/forskolin>. (datum pristupa 14. siječnja 2023.)
36. A. Koschinski, M. Zaccolo, *Sci. Rep.* **7** (2017) 14090.

37. Berg, J. Tymoczko, J. and Stryer, L., *Biochemistry*, 6th ed., WH Freeman, New York, 2006.
38. E. Makinodan, A. G. Marneros, *Exp. Dermatol.* **21** (2012) 847–852.
39. A. Zorić, N. Slade, *Metode U Mol. Biol.* (2007) 512–514.
40. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/433294>. (datum pristupa 14. siječnja 2023.)
41. U. Wietelmann, R. J. Bauer, *Lithium and Lithium Compounds*, in *Ullmanns Encycl. Ind. Chem.*, John Wiley & Sons, Ltd, 2000.
42. <http://www.sigmaaldrich.com/> (datum pristupa 14. siječnja 2023.)
43. M. E. Snitow, R. S. Bhansali, P. S. Klein, *Cells* **10** (2021) 255.
44. A. Muneer, *Clin. Psychopharmacol. Neurosci.* **15** (2017) 100–114.
45. R. S. Jope, M.-S. Roh, *Curr. Drug Targets* **7** (2006) 1421–1434.
46. W. J. Ryves, A. J. Harwood, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **280** (2001) 720–725.
47. E. Chalecka-Franaszek, D. M. Chuang, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96** (1999) 8745–8750.
48. H. Sun, Y. Jiang, Q. Yu, C. Luo, J. Zou, *J. Mol. Model.* **17** (2011) 377–381.
49. D. Trnski, Uloga protein-kinaze gsk3 β u aktivaciji signalnog puta hedgehog-gli u stanicama karcinoma debelog crijeva čovjeka, doktorski rad, Poslijediplomski interdisciplinarni sveučilišni studij Molekularne bioznanosti, 2015.
50. <http://www.sigmaaldrich.com/> (datum pristupa 14. siječnja 2023.)
51. N. Guo, Z. Peng, *Asia Pac. J. Clin. Oncol.* **9** (2013) 6–11.
52. <http://struna.ihjj.hr/naziv/agonist/35413/> (datum pristupa 14. siječnja 2023.)
53. R. Rohatgi, L. Milenkovic, R. B. Corcoran, M. P. Scott, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106** (2009) 3196–3201.
54. PubChem, (n.d.). <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5284330> (datum pristupa 14. siječnja 2023.)
55. B. Martin, E. Lapouble, Y. Chaix, *Sci. World J.* **7** (2007) 83–86.
56. J. C. Grindley, S. Bellusci, D. Perkins, B. L. M. Hogan, *Dev. Biol.* **188** (1997) 337–348.
57. Y. Litingtung, C. Chiang, *Nat. Neurosci.* **3** (2000) 979–985.
58. S. C. Goetz, K. V. Anderson, *Nat. Rev. Genet.* **11** (2010) 331–344.
59. T. Theil, *Development* **126** (1999) 3561–3571

60. A. Wiegering, P. Petzsch, K. Köhrer, U. Rütter, C. Gerhardt, *Dev. Biol.* **450** (2019) 141–154.
61. <https://rarediseases.org/rare-diseases/greig-cephalopolysyndactyly-syndrome/> (datum pristupa 16. siječnja 2023.)
62. E. Elson, R. Perveen, D. Donnai, S. Wall, G. C. M. Black, *J. Med. Genet.* **39** (2002) 804–806.
63. J. J. Johnston, I. Olivos-Glander, J. Turner, K. Aleck, L. M. Bird, L. Mehta, R. N. Schimke, H. Heilstedt, J. E. Spence, J. Blancato, L. G. Biesecker, *Am. J. Med. Genet. A.* **123A** (2003) 236–242.
64. <https://rarediseases.org/rare-diseases/pallister-hall-syndrome/> (datum pristupa 16. siječnja 2023.)
65. J. J. Johnston, J. C. Sapp, J. T. Turner, D. Amor, S. Aftimos, K. A. Aleck, M. Bocian, J. N. Bodurtha, G. F. Cox, C. J. Curry, R. Day, D. Donnai, M. Field, I. Fujiwara, M. Gabbett, M. Gal, J. M. Graham, P. Hedera, R. C. M. Hennekam, J. H. Hersh, R. J. Hopkin, H. Kayserili, A. M. J. Kidd, V. Kimonis, A. E. Lin, S. A. Lynch, M. Maisenbacher, S. Mansour, J. McGaughran, L. Mehta, H. Murphy, M. Raygada, N. H. Robin, A. F. Rope, K. N. Rosenbaum, G. B. Schaefer, A. Shealy, W. Smith, M. Soller, A. Sommer, H. J. Stalker, B. Steiner, M. J. Stephan, D. Tilstra, S. Tomkins, P. Trapane, A. C.-H. Tsai, M. I. Van Allen, P. C. Vasudevan, B. Zabel, J. Zunich, G. C. M. Black, L. G. Biesecker, *Hum. Mutat.* **31** (2010) 1142–1154.
66. S. Kang, J. M. Graham, A. H. Olney, L. G. Biesecker, *Nat. Genet.* **15** (1997) 266–268.
67. S. J. Matissek, S. F. Elsawa, *Cell Commun. Signal.* **18** (2020) 54.
68. S. Deimling, C. Sotiropoulos, K. Lau, S. Chaudhry, K. Sturgeon, S. Kelley, U. Narayanan, A. Howard, C. Hui, S. Hopyan, *J. Hum. Genet.* **61** (2016) 443–446.
69. A. L. Hager-Theodorides, J. T. Dessens, S. V. Outram, T. Crompton, *Blood* **106** (2005) 1296–1304.
70. D. J. Solecki, M. Gromeier, S. Mueller, G. Bernhardt, E. Wimmer, *J. Biol. Chem.* **277** (2002) 25697–25702.
71. R. A. Lam, J. Y. Chwee, N. Le Bert, M. Sauer, E. Pogge von Strandmann, S. Gasser, *Ann. Med.* **45** (2013) 384–394.

72. A. Solanki, C.-I. Lau, J. I. Saldaña, S. Ross, T. Crompton, *J. Exp. Med.* **214** (2017) 2041–2058.
73. G. Huang, B. Ho, J. Conroy, S. Liu, H. Qiang, V. Golubovskaya, *Anticancer Agents Med. Chem.* **14** (2014) 9–17.
74. <https://www.khanacademy.org/science/ap-biology/cell-communication-and-cell-cycle/cell-cycle/a/cell-cycle-phases>. (datum pristupa 25. siječnja 2023.)
75. D. W. Craig, A. Itty, C. Panganiban, S. Szelinger, M. C. Kruer, A. Sekar, D. Reiman, V. Narayanan, D. A. Stephan, J. F. Kerrigan, *Am. J. Hum. Genet.* **82** (2008) 366–374.
76. Y. Nakatani, M. Yamazaki, W. J. Chazin, S. Yui, *Mediators Inflamm.* **5** (2005) 280–292.
77. M. F. S. D. Rodrigues, L. Miguita, N. P. De Andrade, D. Heguedusch, C. O. Rodini, R. A. Moyses, T. N. Toporcov, R. R. Gama, E. E. Tajara, F. D. Nunes, *Int. J. Oncol.* **53** (2018) 2458–2472.
78. C. Zhang, C. Li, F. He, Y. Cai, H. Yang, *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **137** (2011) 1679.
79. D. M. Berman, S. S. Karhadkar, A. Maitra, R. Montes De Oca, M. R. Gerstenblith, K. Briggs, A. R. Parker, Y. Shimada, J. R. Eshleman, D. N. Watkins, P. A. Beachy, *Nature* **425** (2003) 846–851.
80. K. Xie, J. L. Abbruzzese, *Cancer Cell* **4** (2003) 245–247.
81. L. Fu, H. Wu, S. Y. Cheng, D. Gao, L. Zhang, Y. Zhao, *ELife* **5** (n.d.) e15690.
82. H. N. Kang, S. C. Oh, J. S. Kim, Y. A. Yoo, *Exp. Cell Res.* **318** (2012) 539–549.
83. P. Chène, *Nat. Rev. Cancer* **3** (2003) 102–109.
84. U. M. Moll, O. Petrenko, *Mol. Cancer Res.* **1** (2003) 1001–1008.
85. A. E. Lo Ré, M. G. Fernández-Barrena, L. L. Almada, L. D. Mills, S. F. Elswawa, G. Lund, A. Ropolo, M. I. Molejon, M. I. Vaccaro, M. E. Fernandez-Zapico, *J. Biol. Chem.* **287** (2012) 25325–25334.
86. W. O. Greaves, J. E. Kim, R. R. Singh, E. Drakos, K. Kunkalla, B. Sánchez-Espiridión, J. F. Garcia, L. J. Medeiros, F. Vega, *Hum. Pathol.* **42** (2011) 1643–1652.
87. H. Miyahara, M. Natsumeda, J. Yoshimura, R. Ogura, K. Okazaki, Y. Toyoshima, Y. Fujii, H. Takahashi, A. Kakita, *Neuropathology* **34** (2014) 1–10.
88. P. Chaudhry, M. Singh, T. J. Triche, M. Guzman, A. A. Merchant, *Blood* **129** (2017) 3465–3475.
89. H. Xie, B. D. Paradise, W. W. Ma, M. E. Fernandez-Zapico, *Cells* **8** (2019) 394.

90. <https://www.mn-net.com/nucleobond-xtra-midi-kit-for-transfection-grade-plasmid-dna-740410.50> (datum pristupa 23. siječnja 2023.)
91. https://www.researchgate.net/figure/The-Neubauer-chamber-grid_fig1_256436846 (datum pristupa 23. siječnja 2023.)
92. <http://catalog.isolab.de/2018/files/assets/basic-html/page-360.html>. (datum pristupa 23. siječnja 2023.)
93. Xfect™ Transfection Reagent Protocol-At-A-Glance (PT5003-2), Takara, USA
94. M. Moore, *Life Sci. Prod. Helvetica Health Care* (2022). <https://www.h-h-c.com/western-blot-procedures-analysis-and-purpose/> (datum pristupa 23. siječnja 2023.)
95. A.-S. Wilding, *Etude des mécanismes impliqués dans la mort oligodendrocytaire induite par la protéolipide-protéine mutée : rôle du stress du réticulum endoplasmique et identification des modulateurs à fort potentiel pour le traitement des pathologies dysmyélinisantes*, in 2017. <https://www.semanticscholar.org/paper/Etude-des-m%C3%A9canismes-impliqu%C3%A9s-dans-la-mort-induite-Wilding/72116c0be57f9ad36278cd0f151a1297a47824a0>. (datum pristupa 23. siječnja 2023.)
96. F. Ulloa, N. Itasaki, J. Briscoe, *Curr. Biol.* **17** (2007) 545–550.
97. A. F. Eleraky, G. K. Helal, M. F. Elshafie, R. S. Ismail, *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **48** (2021) 1024–1040.
98. N. N. El-Agroudy, R. N. El-Naga, R. A. El-Razeq, E. El-Demerdash, *Br. J. Pharmacol.* **173** (2016) 3248–3260.
99. V. Karin-Kujundzic, A. Covarrubias-Pinto, A. Skrtic, S. Vranic, L. Serman, *Int. J. Oncol.* **61** (2022) 1–11.
100. <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000185920-PTCH1/subcellular>. (datum pristupa 23. siječnja 2023.)

ŽIVOTOPIS

Osobni podatci

Ime i prezime: Lucija Brtan

Datum rođenja: 29. listopada 1996.

Mjesto rođenja: Zadar

Obrazovanje

2003.-2011. Osnovna škola Bartula Kašića, Zadar

2011.-2015. Gimnazija Jurja Barakovića, smjer: *opća gimnazija*, Zadar

2015.-2020. Preddiplomski sveučilišni studij kemije, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb

2020.-2023. Diplomski sveučilišni studij kemije, istraživački smjer, grane: *analitička kemija i biokemija*, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb

Nagrade i priznanja

2020.-2022. Stipendija Grada Zadra

Sudjelovanja u popularizaciji znanosti

2015.-2019. *Otvoreni dan kemije*, Kemijski odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb

2015.-2018. *Znanstvene čarolije*, Studentska sekcija Hrvatskog kemijskog društva