

Izazovi

U TRAŽENJU NOVIH LIJEKOVA

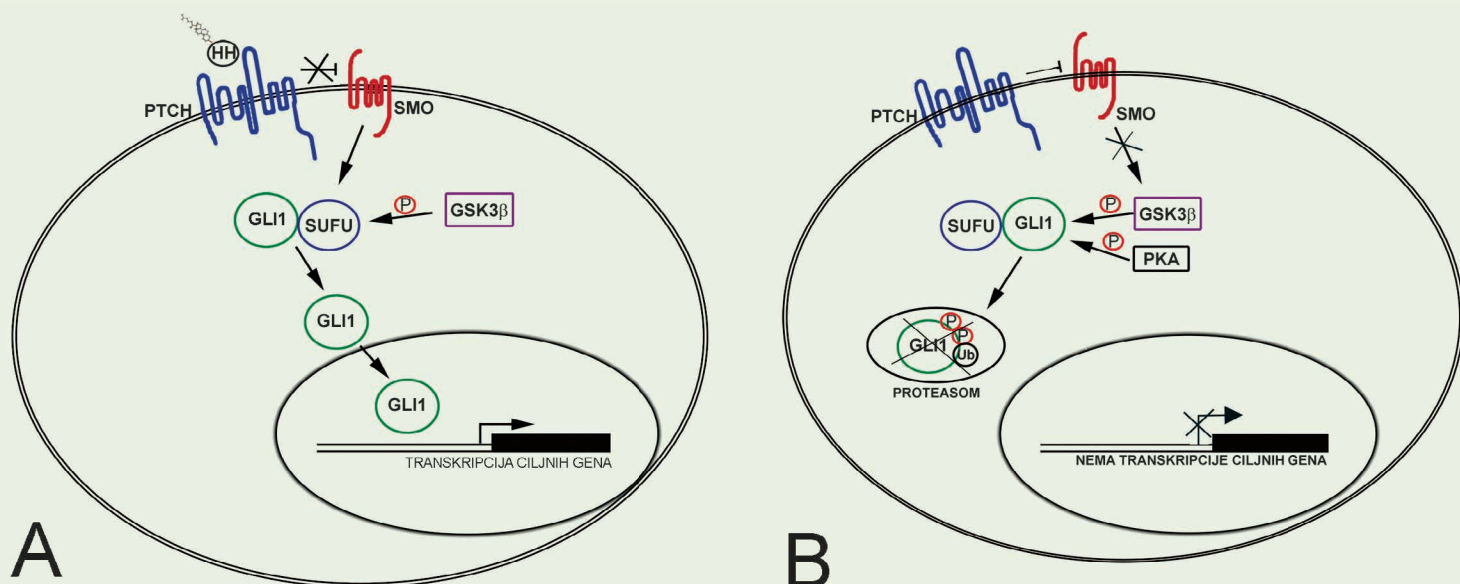
Sonja LEVANAT i Diana TRNSKI, Zagreb

Svaka stanica bilo kojega višestaničnog organizma živi u okruženju s drugim stanicama, komunicira putem raznih signala, prepoznaje razne glasnike, receptore, vezne proteine, ione, odnosno signale bilo na površini svoje ili susjednih stanica, i neprestano je u borbi za svoj opstanak. Danas znamo da razni putevi prijenosa signala doprinose rav-

noteži u stanici i organizmu, poput puteva proliferacije, regulacije staničnog ciklusa, puteva popravaka oštećenja, a i stanične smrti.

Signalni put Hedgehog-Gli

Priča o signalnom putu Hedgehog-Gli (HH-GLI) započinje osamdesetih godina prošlog stoljeća, kada su dobitnici Nobelove



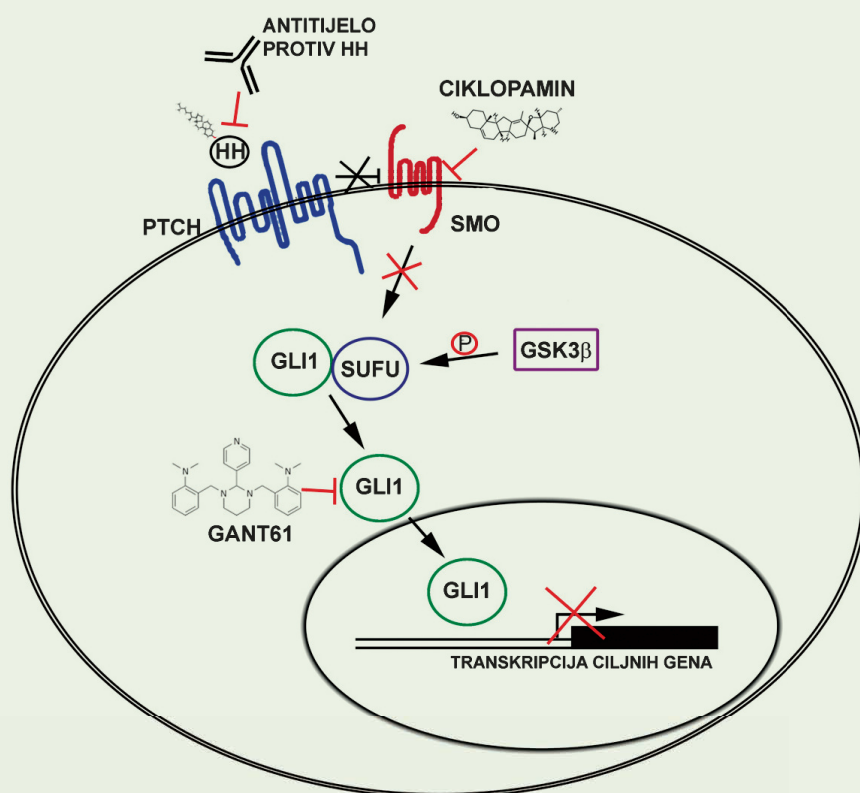
Slika 1. (a) Aktiviranje signalnog puta HH-GLI: vezanjem liganda HH na receptor PTCH otpušta se koreceptor SMO i signal se prenosi u stanicu, u citoplazmi se pokreće kaskada fosforilacija kojima se aktivira transkripcijski faktor GLI koji u jezgri djeluje na prepisivanje ciljnih gena. (b) Put nije aktivan: receptor je vezan na koreceptor i signal se ne prenosi u stanicu, transkripcijski faktor je neaktivan i prelazi u proteasom gdje se razgrađuje.

nagrade Christiane Nüsslein-Volhard i Eric Wieschaus uočili mutacije u vinskoj mušici koje dovode do razvojnih deformacija ličinke čiji je izgled podsjećao na bodlje ježa, pa je gen dobio ime *hedgehog* (hrv. jež) i kraticu HH. Njegova molekularna karakterizacija uslijedila je tek nakon desetak godina, a pokazala je da se radi o proteinu koji se izlučuje iz stanice i regulira razvoj susjednih stanica. Ubrzo nakon toga otkrivene su i tri varijante (homologa) kod sisavaca, *Sonic Hedgehog* (*Shh*), *Desert Hedgehog* (*Dhh*) i *Indian Hedgehog* (*Ihh*), kao i njihova evolucijski očuvana uloga u razvoju organizma. Glavne komponente toga signalnog puta također su identificirane uglavnom pomoću genetike vinske mušice. One su evolucijski konzervirane, a nazivi su u skladu s izgledom mutiranih ličinki vinske mušice. Prvi identificirani prijatelj signala (receptor) bio je transmembranski protein PTCH (engl. *patched*, hrv. zakrpan) za koji je nekoliko godina poslije utvrđeno da je tumorski supresor, važan regulator prijenosa signala, koji se aktivira vezanjem proteina HH. Ključnu ulogu imaju i koreceptor SMO (engl. *smoothened*, hrv. zaglađen), također transmembranski protein, te transkripcijski medijator signalnog puta *Cubitus interruptus* (Ci), koji se kod kralješnjaka naziva GLI. Protein GLI naziv je dobio po opakom tumoru glioblastomu u kojem je ustanovljena i do 50 puta veća njegova aktivnost nego u zdravim stanicama. Ubrzo je uslijedila i identifikacija proteina GLI2 i GLI3. Danas su poznate kristalne i molekulske strukture većine proteina ovog signalnog puta, a neke su razjašnjene tek nedavno.

Signalni put HH-GLI otkriven je u kontekstu embrionalnog razvoja, kako kod vinske mušice tako i kod viših organizama i ljudi, gdje je prepoznata njegova ključna uloga u pravilnom razvoju mnogih tkiva i organa. Međutim, nakon što je 1996. godine povezan s nastankom Gorlinovog sindroma, nasljedne bolesti karakterizirane razvojnim deformacijama te podložnosti velikom broju tumora, počelo je prepoznavanje njegove uloge, ne samo u razvoju nasljednih bolesti, već i u nastanku mnogih tumora, kao i njegova uloga u održavanju somatskih i tumorskih matičnih stanica.

Aktiviranje signalnog puta HH-GLI započinje vezanjem liganada HH na receptor PTCH zbog čega receptor otpušta svoj koreceptor SMO i signal se prenosi u stanicu, čime se u citoplazmi pokreće kaskada događaja, uglavnom niza fosforilacija, kojima se aktivira transkripcijski faktor GLI koji u jezgri djeluje na transkripciju ciljnih gena (sl. 1a). Uglavnom, dolazi do pojačane proliferacije stanica tijekom razvoja, migracija, diferencijacije; i ne samo to, danas znamo da sudjeluje u popravku oštećenja, zacjeljivanju rana i razvoju krvnih žila.

Zanimljivo je da je receptor PTCH otkriven zahvaljujući svojoj funkciji tumorskog supresora. Štoviše, jedan je od rijetkih tumorskih supresora koji se povezuje ne samo uz nastanak tumorskih oboljenja već i uz razvojne poremećaje. Ima ključnu ulogu u regulaciji aktivnosti signalnog puta HH-GLI. Primjerice, u nekim će okolnostima ostati vezan na koreceptor i signal



Slika 2. Blokiranje signalnog puta. Prvo otkriće bila je mala molekula ciklopamina, koja inaktivira ključnu molekulu SMO i onemogućuje prijenos signala prema transkripcijskom faktoru. Uskoro su nađene i druge razine koje mogu blokirati signalni put. Dakle, signalni put može se blokirati: na razini liganada (blokiranjem liganada antitijelom), na razini receptora (blokiranjem koreceptora SMO – ciklopamin i mnogi njegovi analozi), na razini transkripcijskog faktora GLI (nedavno otkriveni inhibitor Gant).

se neće prenositi u stanicu pa se transkripcijski faktor neće aktivirati (sl. 1b), dok će u drugima receptor vezati ligand i otkočiti koreceptor SMO pa će signalni put biti aktivan (sl. 1a).

Unatoč važnosti ovog puta prijenosa signala, to nije bila dovoljno velika senzacija, nego je jedan bizarni događaj ukazao na važnost puteva prijenosa signala i time otvorio nove mogućnosti za liječenje. Naime, ovce koje su se na ispaši hranile jednom vrstom ljiljana (*Veratrum californicum*) često su rađale mrtvu janjad s teškim malformacijama glave (npr. samo s jednim okom – ciklopija). Aktivna tvar koja je izolirana iz tog ljiljana je steroidni alkaloid nazvan ciklopamin. Otkriveno je da ciklopamin inhibira signalni put HH-GLI djelujući na razini koreceptora SMO. Ciklopamin se direktno veže za SMO i zaustavlja signalni put HH-GLI koji je ključan u ranom razvoju, te je zbog toga došlo do letalnih malformacija ploda (sl. 2.).

TKO SU AUTORICE OVOG ČLANKA

Dr. sc. Sonja Levanat, znanstvena savjetnica u trajnom zvanju, je voditeljica Laboratorija za nasljedni rak na Institutu Ruđer Bošković te profesorica na Sveučilištu u Zagrebu i Osijeku. Glavne aktivnosti vezane su za istraživanja vezana za rak uključujući genetičke aspekte raka i njihove proteine uključene u nastanak raka, tumorske supresore i nasljedni rak, promjene u signalnim putevima te dijelom i moguće primjene. Glavni fokus je signalni put Hh-Gli te mehanizmi i alteracije u odabranim tumorima. Dugogodišnja je članica Hrvatskog društva za biokemiju i molekularnu biologiju, bila je članica predsjedništva, a sada je članica Nadzornog odbora. Osnivačica je i sadašnja predsjednica Hrvatskog društva za istraživanje raka (HDIR) koje unutar svoje krovne organizacije, Europske organizacije za istraživanje raka (EACR), promovira istraživanje raka u Hrvatskoj te povezivanje bazičnih i kliničkih istraživanja u zemlji i šire.

Dr. sc. Diana Trnski diplomirala je molekularnu biologiju na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu 2008., a doktorirala 2015. godine. Od 2009. godine zaposlena je u Zavodu za molekularnu medicinu Instituta Ruđer Bošković u Laboratoriju za nasljedni rak. Glavni istraživački interes joj je signalni put Hedgehog-Gli u raznim tipovima tumora, ali primarno debelog crijeva. Članica je Hrvatskog društva za istraživanje raka te Hrvatskog društva za biokemiju i molekularnu biologiju.

Nakon ovog otkrića uslijedilo je traženje malih molekula koje mogu učinkovito blokirati proliferacijske signalne puteve i time usporiti ili zaustaviti rast stanica.

U kontekstu ovog signalnog puta danas znamo da se signalni put može blokirati (sl. 2.):

- na razini liganda (blokiranjem liganda antitijelom pa se on više ne može vezati na svoj receptor);
- na razini receptora (blokiranjem koreceptora SMO, ciklopamin i mnogi njegovi analozi)
- na razini transkripcijskog faktora GLI čime se sprječava prepisivanje gena (nedavno otkriveni inhibitor Gant).

Sva ta saznanja pomažu u razjašnjavanju mehanizama rasta tumorskih stanica i dizajnu novih koncepata liječenja tumora.

Literatura

1. Cooper M.K. i sur. (1998) Teratogen-mediated inhibition of target tissue response to Shh signaling. *Science* 280, 1603–1607.
2. Ingham P.W. i sur. (2011) Mechanisms and functions of Hedgehog signalling across the metazoa. *Nat. Rev. Genet.* 12, 393–406.
3. Hahn H. i sur. (1996) Mutations of the human homolog of *Drosophila patched* in the nevoid basal cell carcinoma syndrome. *Cell* 85, 841–851.
4. Levanat S. i sur. (1996) A two-hit model for developmental defects in Gorlin syndrome. *Nat. Genet.* 12, 85–87.
5. Levanat S. (2014) Hedgehog signaling and cross-talk therapeutic potential. *Periodicum Biologorum* 116, 335–436.
6. Nüsslein-Volhard C., Wieschaus E. (1980) Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature* 287, 795–801.
7. Ruppert J.M. i sur. (1988) The GLI-Kruppel family of human genes. *Mol. Cell. Biol.* 8, 3104–3113.
8. Scales S.J., de Sauvage F.J. (2009) Mechanisms of Hedgehog pathway activation in cancer and implications for therapy. *Trends Pharmacol. Sci.* 30, 303–312.
9. Villavicencio E.H. i sur. (2000) The Sonic Hedgehog–Patched–Gli pathway in human development and disease. *Am. J. Hum. Genet.* 67, 1047–1054.