



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Josipa Jelačić

ULOGA RECEPTORA ESTROGENA U BIOLOGIJI RAKA PLOČASTIH STANICA SLUZNICE GLAVE I VRATA

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2026.



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Josipa Jelačić

ULOGA RECEPTORA ESTROGENA U BIOLOGIJI RAKA PLOČASTIH STANICA SLUZNICE GLAVE I VRATA

DOKTORSKI RAD

Mentor: dr. sc. Petar Ozretić

Zagreb, 2026.



University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Josipa Jelačić

THE ROLE OF ESTROGEN RECEPTORS IN THE BIOLOGY OF HEAD AND NECK SQUAMOUS CELL CARCINOMA

DOCTORAL THESIS

Mentor: Dr. Petar Ozretić

Zagreb, 2026.

Ovaj je doktorski rad izrađen u Laboratoriju za nasljedni rak Zavoda za molekularnu medicinu Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu, pod vodstvom naslovnog docenta dr. sc. Petra Ozrećića, višeg znanstvenog suradnika, u sklopu Sveučilišnog dokorskog studija Biologije pri Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. LITERATURNI PREGLED.....	3
2.1. Rak pločastih stanica sluznice glave i vrata	3
2.2. Estrogeni i receptori estrogena u HNSCC-u	6
2.2.1. Estrogeni.....	7
2.2.1.1. Uloga estrogena u HNSCC-u	8
2.2.2. Receptori estrogena	9
2.2.2.1. Jezgrini receptori estrogena	10
2.2.2.2. Uloga jezgrinih receptora estrogena u HNSCC-u	12
2.2.2.3. Membranski receptori estrogena	13
2.2.2.4. Uloga membranskih receptora estrogena u HNSCC-u.....	17
2.2.3. Antiestrogeni u terapiji HNSCC-a	17
2.3. Signalni put Hedgehog-GLI	20
2.3.1. Kanonska i nekanonska aktivacija signalnog puta HH-GLI	20
2.3.2. Uloga signalnog puta HH-GLI u razvoju tkiva glave i vrata	23
2.3.3. Uloga signalnog puta HH-GLI u tumorigenezi HNSCC-a	24
2.3.4. Inhibicija signalnog puta HH-GLI u HNSCC-u.....	26
2.4. Interakcija između signalnih puteva ER i HH-GLI	29
3. MATERIJALI I METODE	33
3.1. Materijali	33
3.1.1. Kemikalije i puferi	33
3.1.2. Komercijalne otopine, enzimi, standardi i kompleti	35
3.1.3. Instrumenti i materijali	38
3.1.4. Plazmidi i početnice	39
3.1.5. Stanična kultura.....	42
3.1.6. Bakterijske stanice.....	42
3.1.7. Uzorci tkiva	43
3.1.8. Softveri	43
3.2. Metode.....	44
3.2.1. Prikupljanje uzoraka tkiva.....	44
3.2.2. Analiza ekspresije gena u uzorcima tkiva	44
3.2.2.1. Izolacija ukupne RNA iz uzoraka tkiva.....	45
3.2.2.2. Reverzna transkripcija	45
3.2.2.3. Kvantitativna lančana reakcija polimerazom (qPCR)	45
3.2.3. Analiza prisutnosti HPV-a u uzorcima tkiva tumora	46
3.2.3.1. Izolacija genomske DNA iz uzoraka tkiva	46
3.2.3.2. Detekcija HPV-a lančanom reakcijom polimerazom (PCR)	47
3.2.4. Primjena sustava CRISPR/Cas9 za ugradnju gena <i>ESR1</i> i <i>ESR2</i> u genom stanica....	48

3.2.4.1. Umnažanje gena <i>ESR1</i> i <i>ESR2</i> metodom PCR	48
3.2.4.2. Izrezivanje i pročišćavanje fragmenata gena <i>ESR1</i> i <i>ESR2</i> iz gela	49
3.2.4.3. Priprema vektora CRISPR/Cas9	50
3.2.4.4. Transformacija kompetentnih bakterija	52
3.2.4.5. Analiza bakterijskih kolonija metodom colony PCR	52
3.2.4.6. Izolacija plazmidne DNA iz bakterija	53
3.2.4.7. Provjera ispravnosti ugrađenih sekvenci gena <i>ESR1</i> i <i>ESR2</i> primjenom Sangerove tehnologije kapilarne elektroforeze	54
3.2.5. Rad sa staničnim kulturama	55
3.2.5.1. Uzgoj i rukovanje staničnim linijama u kulturi	55
3.2.5.2. Stabilna transfekcija stanica vektorima CRISPR/Cas9	56
3.2.5.3. Uspostava klonalnih staničnih linija s ciljanom ugradnjom gena <i>ESR1</i> ili <i>ESR2</i>	57
3.2.5.4. Analiza vijabilnosti stanica	57
3.2.5.5. Analiza migracijske sposobnosti stanica	60
3.2.5.6. Analiza invazivnosti stanica	60
3.2.5.7. Analiza sposobnosti formiranja kolonija	61
3.2.6. Protočna citometrija	62
3.2.6.1. Analiza staničnog ciklusa	62
3.2.6.2. Analiza apoptoze stanica	63
3.2.7. Analiza ekspresije proteina	63
3.2.7.1. Izdvajanje i određivanje koncentracije proteina	63
3.2.7.2. Detekcija proteina westernskom metodom otiska	64
3.2.7.3. Detekcija proteina imunofluorescentnim bojanjem	65
3.2.7.4. Određivanje interakcije između proteina metodom koimunoprecipitacije	66
3.2.8. Sekvenciranje RNA	67
3.2.8.1. Izolacija RNA i priprema uzoraka za sekvenciranje RNA	67
3.2.8.2. Priprema biblioteka cDNA i sekvenciranje RNA	68
3.2.8.3. Bioinformatička obrada i analiza podataka dobivenih sekvenciranjem	69
3.2.9. Statistička obrada rezultata	70
4. REZULTATI	72
4.1. Ekspresija receptora estrogena i komponenti signalnog puta HH-GLI u uzorcima tkiva tumora HNSCC-a i zdravom tkivu sluznice glave i vrata	72
4.1.1. Ekspresija receptora estrogena u tumorskom i zdravom tkivu sluznice glave i vrata	72
4.1.2. Ekspresija komponenti signalnog puta HH-GLI u tumorskom i zdravom tkivu sluznice glave i vrata	73
4.1.3. Povezanost ekspresije gena s kliničko-patološkim karakteristikama pacijenata	74
4.2. Uspostava i molekularna validacija <i>ESR1</i>^{KI} i <i>ESR2</i>^{KI} staničnih linija HNSCC-a	84
4.2.1. Konstrukcija CRISPR/Cas9 vektora za ugradnju <i>ESR1</i> i <i>ESR2</i>	85
4.2.2. Potvrda ugradnje sekvenci <i>ESR1</i> i <i>ESR2</i> Sangerovom metodom kapilarne elektroforeze	87
4.2.3. Analiza profila genske ekspresije u uspostavljenim klonalnim linijama	88
4.2.4. Analiza profila ekspresije proteina westernskom metodom otiska i imunofluorescentnim bojanjem u uspostavljenim klonalnim linijama	90
4.3. Funkcionalna karakterizacija uspostavljenih staničnih linija <i>ESR1</i>^{KI} i <i>ESR2</i>^{KI}	94
4.3.1. Utjecaj inhibicije receptora estrogena i signalnog puta HH-GLI na vijabilnost stanica	95

4.3.2. Utjecaj inhibicije receptora estrogena i signalnog puta HH-GLI na migracijsku sposobnost stanica	99
4.3.3. Utjecaj inhibicije receptora estrogena i signalnog puta HH-GLI na invazivnost stanica	102
4.3.4. Utjecaj inhibicije receptora estrogena i signalnog puta HH-GLI na sposobnost formiranja kolonija	106
4.3.5. Analiza staničnog ciklusa u uspostavljenim klonalnim staničnim linijama.....	108
4.3.6. Analiza apoptoze u uspostavljenim klonalnim staničnim linijama	111
4.4. Analiza interakcije receptora estrogena i proteina SHH	116
4.4.1. Koimunoprecipitacija ER α i ER β sa SHH	116
4.5. Transkriptomska analiza učinaka genetske i farmakološke modulacije signalnog puta estrogena i HH-GLI u stanicama HNSCC-a	117
4.5.1. Kvaliteta i osnovna statistika podataka dobivenih sekvenciranjem RNA.....	118
4.5.2. Analiza diferencijalno eksprimiranih gena	121
4.5.3. Analiza obogaćenih signalnih puteva i bioloških procesa	130
5. RASPRAVA	133
6. ZAKLJUČAK	158
7. LITERATURA.....	160
8. PRILOZI	179
PRILOG A: POPIS KRATICA	179
PRILOG B: DODATNE FUNKCIONALNE ANALIZE TRANSKRIPTOMSKIH PODATAKA.....	183
9. ŽIVOTOPIS	189

ZAHVALE

INFORMACIJE O MENTORU

Naslovni doc. dr. sc. Petar Ozretić, viši znanstveni suradnik, rođen je 1976. godine u Čakovcu, gdje je završio osnovnoškolsko i gimnazijsko obrazovanje. Diplomirao je 2005. godine na Biološkom odsjeku Prirodoslovno matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, smjer molekularna biologija. Diplomski rad pod nazivom „Polimorfizmi eksona 1, 2 i 3 tumorsupresorskog gena p16“ izradio je pod mentorstvom dr. sc. Sonje Levanat (Zavod za molekularnu medicinu, IRB, Zagreb). Doktorsku disertaciju pod nazivom „Functional Analysis of the 5' Untranslated Region of the *PTCH1* Gene, Transcript Variant 1b“ izradio je pod mentorstvom prof. dr. sc. Sonje Levanat (Zavod za molekularnu medicinu, IRB, Zagreb) i prof. dr. sc. Alberta Inge (Centre for Integrative Biology (CIBIO), Sveučilište u Trentu, Trento, Italija) i obranio 2013. godine na Sveučilišnom poslijediplomskom interdisciplinarnom doktorskom studiju Molekularne bioznanosti Sveučilišta J. J. Strossmayera u Osijeku. Stručno se usavršavao na više međunarodnih institucija: CIBIO, Trento, Italija; Karolinska Institutet, Stockholm, Švedska; DKFZ, Heidelberg, Njemačka i Medical University of Innsbruck, Innsbruck, Austrija. Od 2019. godine voditelj je Laboratorija za nasljedni rak Zavoda za molekularnu medicinu, IRB, Zagreb. Znanstveni interesi usmjereni su mu na istraživanje genetskih, epigenetskih i epitranskriptomskih mehanizama povezanih s nastankom raka te uloge mikrobioma u nastanku različitih ljudskih bolesti. Autor je ili koautor 64 znanstvena rada, koji su citirani preko 1300 puta (Scopus). Tehnički je urednik časopisa *Periodicum biologorum* te član uređivačkih i recenzijskih odbora većeg broja znanstvenih časopisa. Jedan je od osnivača Hrvatskog društva za istraživanje raka (HDIR), u kojem je od njegovog osnutka 2009. godine bio obavljao ulogu tajnika. Voditelj je dva kolegija na doktorskim studijima. Bio je mentor sedam obranjenih diplomskih radova i komentor jednog doktorskog rada. Sudjelovao je u vođenju i provođenju većeg broja znanstveno-istraživačkih, umreživačkih i tehničkih projekata te je član Nacionalnog vijeća za liječenje vođeno sveobuhvatnim genskim profiliranjem.

ULOGA RECEPTORA ESTROGENA U BIOLOGIJI RAKA PLOČASTIH STANICA SLUZNICE GLAVE I VRATA

JOSIPA JELAČIĆ
Laboratorij za nasljedni rak
Institut Ruđer Bošković

Rak pločastih stanica sluznice glave i vrata (HNSCC) biološki je heterogena bolest s izraženom spolnom nejednakosti u incidenciji te i dalje ograničenim terapijskim napretkom, zbog čega je cilj ovog istraživanja bio ispitati ulogu receptora estrogena (ER) i njihovu povezanost sa signalnim putem Hedgehog-GLI (HH-GLI). Analiza 160 svježih uzoraka tkiva pokazala je pojačanu ekspresiju *ESR1* i *ESR2* u tumorskom tkivu, dok *GPER1* i *SCN2A* nisu bili diferencijalno eksprimirani, ali su bili povezani s kliničko-patološkim obilježjima. U primarnim tumorima zabilježena je pojačana ekspresija *PTCH1* i *GLI1* te smanjena ekspresija *SHH*, koji je identificiran kao nezavisni prognostički čimbenik lošijeg ukupnog preživljenja. Stabilni modeli *ESR1^{KI}* i *ESR2^{KI}*, uspostavljeni primjenom tehnologije CRISPR/Cas9, korišteni su za ispitivanje funkcionalne modulacije navedenih signalnih puteva *in vitro*. Inhibitori faktora GLI, osobito arsenov trioksid, bili su učinkovitiji od inhibitora SMO-a, a kombinacija tamoksifena i arsenovog trioksida pokazala je izraženiji antitumorski učinak. Koimunoprecipitacijom je potvrđena fizička interakcija ER i SHH, dok je RNA-seq pokazao adaptivni odgovor u *ESR1^{KI}* te stresni i proapoptotski odgovor u klonu *ESR2^{KI}*. Ovim je radom po prvi put pomoću integriranog pristupa potvrđena funkcionalna i proteinska povezanost puteva ER i HH-GLI u HNSCC-u.

(192 stranice, 49 slika, 25 tablica, 275 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Ključne riječi: rak pločastih stanica sluznice glave i vrata, receptori estrogena, tamoksifen, arsenov trioksid, signalni put Hedgehog-GLI

Mentor: nasl. doc. dr. sc. Petar Ozretić, viši znanstveni suradnik

Ocjenjivači: 1. nasl. izv. prof. dr. sc. Maja Herak Bosnar, znan. savj. u trajnom izboru
2. prof. dr. sc. Inga Urlić
3. nasl. doc. dr. sc. Vjekoslav Tomaić, viši znanstveni suradnik

Zamjena: prof. dr. sc. Maja Matulić

THE ROLE OF ESTROGEN RECEPTORS IN THE BIOLOGY OF HEAD AND NECK SQUAMOUS CELL CARCINOMA

JOSIPA JELAČIĆ

Laboratory for Hereditary Cancer
Ruđer Bošković Institute

Head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) is a biologically heterogeneous disease with marked sex disparity in incidence and limited therapeutic progress. Therefore, this study aimed to investigate the role of estrogen receptors (ER) and their association with the Hedgehog-GLI (HH-GLI) signaling pathway. Analysis of 160 fresh tissue samples showed increased *ESR1* and *ESR2* expression in tumor tissue, whereas *GPER1* and *SCN2A* were not differentially expressed but were associated with clinicopathological characteristics. Primary tumors exhibited increased expression of *PTCH1* and *GLI1* expression, along with reduced expression of *SHH*, which was identified as an independent prognostic factor of poorer overall survival. Stable *ESR1*^{KI} and *ESR2*^{KI} models, established using the CRISPR/Cas9 technology, were used to investigate functional modulation of these signaling pathways *in vitro*. GLI inhibitors, particularly arsenic trioxide, were more effective than SMO inhibitors, and the combination of tamoxifen and arsenic trioxide demonstrated a stronger antitumor effect than single-drug treatments. Co-immunoprecipitation confirmed a physical interaction between ER and SHH, while RNA sequencing revealed an adaptive transcriptional response in *ESR1*^{KI} cells and stress-related, proapoptotic response in *ESR2*^{KI} cells. This study, for the first time using an integrated approach, confirms the functional and protein-level interplay between ER and HH-GLI signaling pathways in HNSCC.

(192 pages, 49 figures, 25 tables, 275 references, original in: Croatian)

Keywords: head and neck squamous cell carcinoma, estrogen receptors, tamoxifen, arsenic trioxide, Hedgehog-GLI signaling pathway

Supervisor: Asst. Prof. Dr. Petar Ozretić

Reviewers: 1. Assoc. Prof. Dr. Maja Herak Bosnar
2. Assoc. Prof. Dr. Inga Urlić
3. Asst. Prof. Dr. Vjekoslav Tomaić

Substitute: Assoc. Prof. Dr. Maja Matulić

1. UVOD

Rak pločastih stanica sluznice glave i vrata (eng. *head and neck squamous cell carcinoma*, HNSCC) heterogena je skupina tumora koja nastaje iz mukoznog epitela gornjih dišnih i probavnih puteva te i dalje predstavlja značajan javnozdravstveni problem zbog velike smrtnosti i izraženog narušavanja kvalitete života oboljelih [1]. Unatoč napretku u kirurškom liječenju, radioterapiji, kemoterapiji i uvođenju određenih oblika ciljane i imunoterapije, ishodi liječenja, osobito kod HPV-negativnih podtipova, ostaju nezadovoljavajući [2]. U tom kontekstu postoji potreba za identifikacijom pouzdanih bioloških biljega i novih terapijskih pristupa utemeljenih na razumijevanju molekularnih mehanizama bolesti. Jedna od specifičnosti HNSCC-a je izražena spolna razlika u incidenciji, pri čemu muškarci imaju višestruko veći rizik od obolijevanja u odnosu na žene [3]. Iako je dio te razlike povezan s poznatim čimbenicima rizika poput alkohola i pušenja, dostupni epidemiološki i eksperimentalni podatci upućuju da bi spolni hormoni i njihovi receptori, poput receptora estrogena, mogli dodatno modulirati biološko ponašanje tumora [4].

Estrogeni ostvaruju učinke putem jezgrinih receptora estrogena ER α i ER β (*ESR1* i *ESR2*), kao i putem membranskih receptora (GPER1 i SCN2A/NaV1.2), a u HNSCC-u dosad su djelomično opisane promjene njihove ekspresije i potencijalni prognostički značaj [5]. Istodobno, signalni put Hedgehog-GLI (HH-GLI), ključan u embriogenezi i regeneraciji tkiva, u brojnim je tumorima, uključujući HNSCC, aberantno aktiviran i dovodi se u vezu s proliferacijom, invazivnošću i rezistencijom na terapiju [6]. Budući da tumorska signalizacija u pravilu ne djeluje izolirano, nego kroz kompleksne signalne mreže, razumijevanje odnosa između signalnih puteva receptora estrogena i puta HH-GLI predstavlja racionalan smjer za istraživanje mehanizama koji doprinose progresiji i heterogenosti HNSCC-a. Naime, međudjelovanje navedenih signalnih puteva već je opisano u drugim tipovima tumora, posebno u tumorima ovisnim o hormonima, dok njihov biološki značaj i potencijalna interakcija u HNSCC-u do danas ostaju nedovoljno istražene [7,8]. Dodatnu osnovu za ovaj doktorski rad pruža naše prethodno istraživanje, u kojem je pokazano da je potencijalna interakcija između aktivne forme liganda SHH (SHH-N) i receptora estrogena ER α molekularno izvediva i stabilna prema računalnim simulacijama, s najvišim afinitetom među steroidnim receptorima [9].

Stoga je svrha ovog dokorskog rada sustavno razjasniti ulogu jezgrinih i membranskih receptora estrogena u HNSCC-u, odrediti njihovu povezanost s pokazateljima aktivnosti signalnog puta HH-GLI i procijeniti postoji li fizička interakcija liganda SHH s receptorima

estrogena. Takav integrirani pristup, koji kombinira analizu na uzorcima tkiva HNSCC-a s funkcionalnim modelima *in vitro*, usmjeren je na dobivanje rezultata relevantnih za razumijevanje biološke heterogenosti HNSCC-a te na identifikaciju potencijalnih dijagnostičkih i prognostičkih biljega te terapijskih mogućnosti, uključujući primjenu kombinirane inhibicije navedenih signalnih puteva.

Opći cilj ovog rada je ispitati ulogu receptora estrogena i opisati mehanizme njihova djelovanja i potencijalne interakcije sa signalnim putem HH-GLI u HNSCC-u. U tu svrhu, istraživanje je strukturirano tako da obuhvati analizu signalnih puteva receptora estrogena i puta HH-GLI na više bioloških razina, od kliničkih uzoraka tumorskog tkiva do eksperimentalnih staničnih modela, s ciljem razumijevanja signalnih mreža koje doprinose heterogenosti i progresiji HNSCC-a.

Metodološki, ovaj rad se temelji na integriranom pristupu koji uključuje analizu molekularnih obilježja tumorskog tkiva i funkcionalnu karakterizaciju u staničnim modelima HNSCC-a. Na razini tkiva određena je ekspresija gena jezgrinih (*ESR1* i *ESR2*) i membranskih receptora estrogena (*GPER1* i *SCN2A*) te pokazatelja aktivnosti signalnog puta HH-GLI (*SHH*, *PTCH1* i *GLI1*) primjenom kvantitativnog PCR-a. Istodobno je određena i prisutnost HPV-a u uzorcima tumora na izoliranoj genomskoj DNA. Dobiveni podatci ekspresije analizirani su u odnosu na kliničko-patološke karakteristike pacijenata, kako bi se procijenila biološka i potencijalna klinička relevantnost pojedinih obilježja. Na temelju dobivenih rezultata odabrani su geni *ESR1* i *ESR2* te dvije stanične linije HNSCC-a za uspostavu klonalnih modela sa stabilnom ekspresijom gena od interesa, primjenom sustava CRISPR/Cas9. U odabranim roditeljskim i uspostavljenim klonalnim linijama (CAL-27/SCC-25 *ESR1*^{KI} i CAL-27/SCC-25 *ESR2*^{KI}) provedena je modulacija receptora estrogena primjenom tamoksifena, kao i signalnog puta HH-GLI pomoću arsenovog trioksida, kako bi se procijenio učinak pojedinačne i kombinirane inhibicije na ključna biološka svojstva stanica: vijabilnost, migraciju, invaziju, sposobnost formiranja kolonija, raspodjelu staničnog ciklusa i apoptozu. Konačno, provedena je koimunoprecipitacija receptora ER α i ER β s ligandom SHH radi ispitivanja njihove moguće fizičke interakcije na razini proteinskih kompleksa, dok je transkriptomaska analiza temeljena na sekvenciranju RNA (RNA-seq) korištena za identifikaciju promjena na genskoj razini, povezanih s pojačanom aktivnošću *ESR1* i *ESR2* u staničnim modelima HNSCC-a.

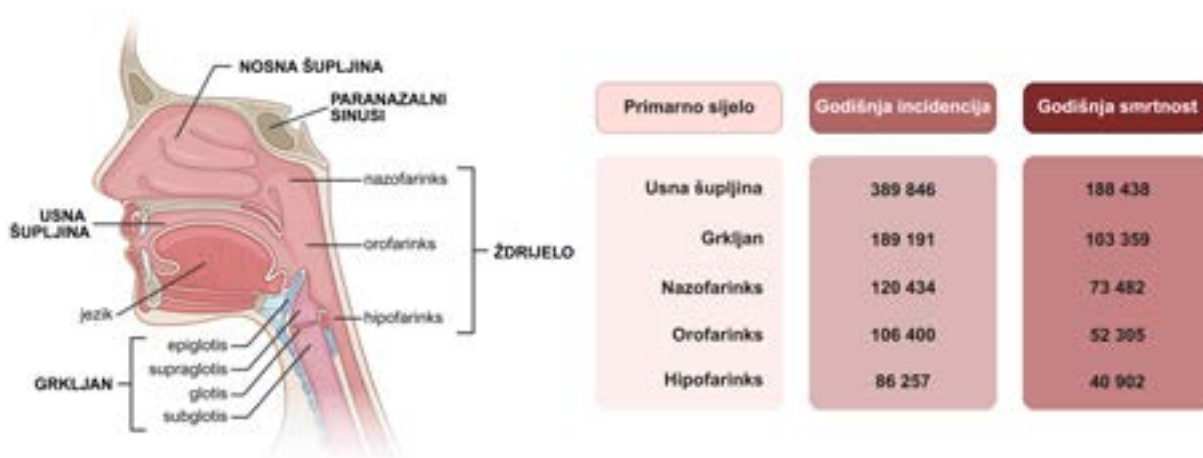
Osnovna hipoteza ovog doktorskog rada glasi da receptori estrogena imaju značajnu ulogu u biologiji raka pločastih stanica sluznice glave i vrata, da postoji interakcija između receptora estrogena i signalnog puta HH-GLI te da njihovom modulacijom možemo utjecati na preživljenje tumorskih stanica HNSCC-a.

2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Rak pločastih stanica sluznice glave i vrata

Rak pločastih stanica sluznice glave i vrata razvija se iz mukoznog epitela usne šupljine, ždrijela, grkljana ili sinonazalnog trakta i predstavlja najčešći oblik tumora koji nastaje u području glave i vrata. Prema dostupnim epidemiološkim podacima, uz uključivanje svih primarnih sijela, ovaj tip raka zauzima sedmo mjesto po učestalosti u svijetu, s više od 890 000 novih slučajeva i gotovo 460 000 zabilježenih smrtnih ishoda u 2022. godini (Slika 1.). Pojavnost ovog tipa tumora nastavlja rasti i očekuje se da će se povećati za 30 % do 2030. godine [1]. Riječ je o vrlo heterogenoj skupini tumora čija pojava varira između različitih regija svijeta i općenito je direktno povezana s nekoliko faktora rizika, poput dugogodišnje konzumacije alkohola i pušenja [10], izloženosti klimatskim i okolišnim zagađivačima [11] te infekcijama onkogenim sojevima papilomavirusa čovjeka (eng. *human papillomavirus*, HPV) i Epstein–Barrovim virusom [12]. Uz poznate čimbenike, dodatni rizici za nastanak HNSCC-a uključuju starenje, lošu oralnu higijenu i prehranu siromašnu povrćem. Također, sve češće postavlja se pitanje potencijalnog štetnog utjecaja električnih cigareta, čiji dugoročni učinci na razvoj HNSCC-a još nisu poznati i vjerojatno će se razjasniti tek u nadolazećim desetljećima [13]. Sve veći broj tumora orofarinksa dovodi se u vezu s prethodnom infekcijom onkogenim sojevima HPV-a, ponajprije HPV-16, a u manjoj mjeri i s HPV-18 te drugim sojevima [14]. S obzirom na to da su najčešći onkogeni sojevi HPV-a obuhvaćeni cjepivima odobrenima od strane Američke agencije za hranu i lijekove (eng. *Food and Drug Administration*, FDA), postoji mogućnost da se HPV-pozitivni (HPV+) karcinomi glave i vrata preveniraju kroz globalne kampanje cijepljenja, dok se, za razliku od njih, karcinomi usne šupljine i grkljana uglavnom povezuju s pušenjem te se isti klasificiraju kao HPV-negativni (HPV-) [13]. Stoga se kod HNSCC-a bez virusne etiologije dijagnoza najčešće postavlja u 66. godini života, dok su HPV-pozitivni orofaringealni i EBV-pozitivni nazofaringealni karcinomi češći u nešto mlađoj populaciji, s prosječnom dobi u trenutku dijagnoze od 53, odnosno 50 godina [15]. Iako je u posljednjim desetljećima zabilježeno blago poboljšanje u stopi preživljenja bolesnika s HNSCC-om, detaljne analize pokazuju da se to poboljšanje odnosi isključivo na HPV-pozitivne pacijente, dok kod HPV-negativnih nije zabilježen napredak u stopi preživljenja [2]. Također, pacijenti koji se izliječe od HNSCC-a imaju drugu najvišu stopu samoubojstava među onkološkim bolesnicima (63,4 na 100 000 osoba), odmah nakon oboljelih od raka gušterače.

Glavni čimbenici koji pridonose tome vjerojatno su psihološka patnja i smanjena kvaliteta života [16].



Slika 1. Anatomija primarnih sjela raka pločastih stanica sluznice glave i vrata te globalna godišnja incidencija i smrtnost prema primarnom sjelu za 2022. godinu. Prikaz primarnih sjela HNSCC-a: nosna šupljina, paranazalni sinusi, nosni dio ždrijela (nazofarinks), usni dio ždrijela (orofarinks), grkljanski dio ždrijela (hipofarinks), grkljan (larinks) s epiglotisom (poklopac grkljana), nadglotisom (supraglotis), glotisom i podglotisom (subglotis), usna šupljina, jezik i žlijezde slinovnice. Desno je prikazana globalna godišnja incidencija i smrtnost karcinoma glave i vrata prema primarnom sjelu [1]. Izrađeno pomoću BioRender.com.

Histološki, progresija do invazivnog oblika HNSCC-a uključuje niz promjena epitelnih stanica, od hiperplazije, preko displazije (blage, umjerene i teške), karcinoma *in situ* i, konačno, invazivnog karcinoma. Ipak, kod većine pacijenata ne postoji anamneza prethodne premaligne lezije. Iako se neke oralne premaligne lezije poput leukoplakije ili eritroplakije mogu razviti u invazivni tip raka, većina bolesnika s rakom usne šupljine se dijagnosticira u uznapredovalom stadiju bez prethodnih simptoma [13]. Također, zbog heterogenosti HNSCC-a, stanica iz koje nastaje tumor ovisi o anatomskom sjelu tumora, kao i uzročniku nastanka istog, no ovaj tip tumora najvjerojatnije potječe iz matičnih ili progenitorskih stanica koje se nakon onkogene promjene pretvaraju u tumorske matične stanice (eng. *cancer stem cells*, CSC). Upravo CSC, iako čine samo 1-3 % stanica u tumoru, predstavljaju glavnu metu za razvoj novih lijekova, pošto su najčešće otporne na terapiju [17].

Do danas nije razvijena učinkovita strategija probira za ovaj tip tumora, pa detaljan klinički pregled i dalje predstavlja osnovni alat za njegovo rano otkrivanje. Liječenje obično uključuje kiruršku resekciju, uz naknadno zračenje i kemoterapiju, ili njihovu kombinaciju, ovisno o sjelu, stadiju i karakteristikama bolesti [18]. Primarni cilj i planiranje liječenja služi maksimalnom očuvanju funkcije zahvaćenih tkiva i organa, kao i minimalnom narušavanju

estetike, kako bi se spriječila psihološka trauma i očuvala kvaliteta života pacijenata. Kod pacijenata s malim primarnim tumorom i najviše jednim zahvaćenim limfnim čvorom, izlječenje se u preko 80 % slučajeva postiže samo kirurškom resekcijom ili zračenjem [19]. Napredak u minimalno invazivnim kirurškim tehnikama, poput transoralne robotske i laserske resekcije te parcijalne laringektomije s očuvanjem grkljana, omogućio je širu primjenu kirurškog liječenja kod ovog tipa tumora [20]. S druge strane, kod uznapredovalih tumora, postoperativno zračenje ili kemoradijacija smanjuju rizik recidiva i poboljšavaju šansu za preživljenje [21]. Kemoradioterapija je preporučeni oblik liječenja kod pacijenata sa stadijem $\geq T3$ i više od jednog zahvaćenog limfnog čvora, pri čemu se najčešće koristi monoterapija cisplatinom [22]. Uslijed pojave brojnih nuspojava kod pacijenata liječenih cisplatinom u kombinaciji sa zračenjem, tijekom godina razvijale su se i druge terapije na bazi platine, kao i multikombinatorne terapije na bazi docetaksela, cisplatine i 5-fluorouracila (5-FU) [23]. Toksičnost izazvana kemoterapijom pokazala se ključnim problemom u liječenju HNSCC-a, pa je stoga ciljana molekularna terapija pokazala veliki potencijal u liječenju ovog tipa tumora. Do danas su otkrivene brojne ciljane mete HNSCC-a, uključujući receptor epidermalnog faktora rasta (eng. *epidermal growth factor receptor*, EGFR), zatim vaskularni endotelni faktor rasta (eng. *vascular endothelial growth factor*, VEGF) i fosfatidilinozitol 3-kinazu (eng. *phosphoinositide 3-kinase*, PI3K) [24]. EGFR jedna je od ključnih meta u terapiji raka, jer utječe na proliferaciju tumorskih stanica, apoptozu, angiogenezu i metastaziranje. U oko 90 % slučajeva HNSCC-a uočena je njegova pojačana ekspresija te je ista negativni prognostički faktor [25]. S obzirom na to, inhibicija EGFR-a bila je prva meta ciljane terapije HNSCC-a te su razvijene dvije vrste molekula za inhibiciju istog, koje se razlikuju u svom mehanizmu djelovanja. Monoklonska anti-EGFR antitijela vežu se za izvanstaničnu domenu EGFR-a i samim time sprječavaju vezanje liganda, dok se s druge strane inhibitori tirozin kinaze (eng. *tyrosine kinase inhibitors*, TKI) vežu za citoplazmatsku domenu EGFR-a i inhibiraju njegovu autofosforilaciju, natječući se s adenozin trifosfatom (eng. *adenosine triphosphate*, ATP) [26]. Jedini EGFR-inhibitor koji je do danas odobren od strane FDA za liječenje HNSCC-a je monoklono antitijelo cetuksimab (Erbitux). Iako je primarno odobren za liječenje metastatskog raka debelog crijeva, od 2008. godine odobren je i kao terapija kod lokalno uznapredovalog ili metastatskog HNSCC-a, u kombinaciji s kemo- ili radioterapijom [27]. Osim cetuksimaba, još su dva primarna antitijela odobrena od strane FDA za liječenje HNSCC-a, pri čemu su oba inhibitori proteina 1 programirane stanične smrti (eng. *programmed cell death protein 1*, PD-1), a riječ je o pembrolizumabu (Keytruda) i nivolumabu (Opdivo). Od lipnja 2025. godine pembrolizumab je odobren čak i kao perioperativna terapija (neoadjuvantno

i adjuvantno), uz dosadašnju primjenu kao druga linija obrane, nakon neuspjeha standardne kemoterapije na bazi platine (<https://www.fda.gov/drugs/resources-information-approved-drugs/fda-approves-neoadjuvant-and-adjuvant-pembrolizumab-resectable-locally-advanced-head-and-neck>). Kao što je već ranije spomenuto, iako se intenzivno istražuju brojne mete ciljane terapije, uključujući inhibitore VEGF-a, signalnog puta PI3K/AKT/mTOR (eng. *mammalian target of rapamycin*), receptora humanog epidermalnog faktora rasta 2 (eng. *human epidermal growth factor receptor 2*, HER2) i 3 (eng. *human epidermal growth factor receptor 3*, HER3), kao i eksperimentalna ciljana terapija, sve se one još uvijek nalaze u fazi kliničkih ispitivanja. Ipak, njihova buduća primjena u kombinaciji s tradicionalnim metodama liječenja mogla bi značajno unaprijediti ishod liječenja, smanjiti toksičnost te omogućiti bolju kontrolu bolesti [24].

2.2. Estrogeni i receptori estrogena u HNSCC-u

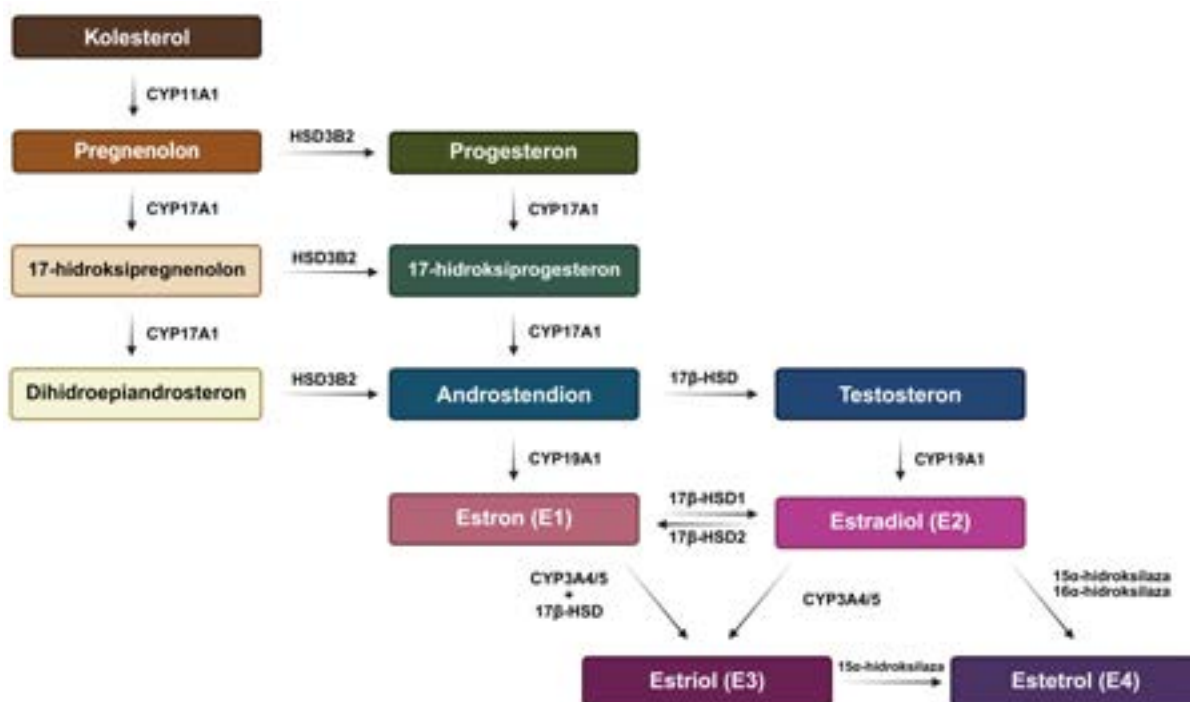
Specifičnost ove vrste tumora vezana je za razliku u pojavnosti između spolova, pri čemu muškarci imaju dva do sedam puta veći rizik za razvoj HNSCC-a u odnosu na žene [1]. Ovakva razlika u pojavnosti tumora ovisna o spolu karakteristična je za tzv. tumore ovisne o hormonima, kao što su tumori dojke [28], jajnika [29], prostate [30] i sl. Veći rizik od razvoja HNSCC-a kod muškaraca djelomično je povezan s načinom života i gore navedenim faktorima rizika, zbog dokazane veće učestalosti konzumacije alkohola i pušenja u odnosu na žene [3]. Svakodnevna konzumacija visokih doza alkohola dovodi do destrukcije jetre, a samim time i njenih metaboličkih procesa, uključujući proizvodnju spolnih hormona iz prekursora kolesterola [31]. S druge strane, Park i sur. pokazali su da je incidencija tumora grkljana gotovo 17 puta veća kod muškaraca u odnosu na žene, pri čemu oba spola nisu bila izložena pušenju i konzumaciji alkohola [4]. Takva povećana incidencija tumora grkljana kod muškaraca u potencijalnoj je korelaciji s hormonalnom kontrolom, pošto je grkljan sekundarni spolni organ koji prolazi kroz različite fiziološke promjene tijekom puberteta povezane s receptorima spolnih hormona, poput receptora estrogena [4]. Stoga su posljednjih godina istraživanja, osim na poznate faktore rizika, usmjerena i na otkrivanje potencijalne uloge spolnih hormona u nastanku HNSCC-a. Danas možemo slobodno reći da su promjene mikrookoliša endokrinog sustava također jedan od faktora rizika povezanih s nastankom HNSCC-a. Spolno-specifični rizik sugerira na to da ili postoje specifični faktori rizika kojima su podložni samo muškarci ili pak žene posjeduju određeni tip hormonalne i metaboličke obrane kao odgovor na faktore rizika

koji su zajednički kod oba spola [32].

2.2.1. Estrogeni

Estrogeni označavaju zajedničko ime skupine primarnih ženskih spolnih hormona, koju čine estron (E1), estradiol (E2), estriol (E3) i estetrol (E4). Isti su odgovorni za regulaciju funkcija ženskog reproduktivnog sustava i za razvoj sekundarnih spolnih karakteristika, a svoju funkciju obavljaju vezanjem na receptore estrogena. Kao i kod ostalih steroidnih hormona, njihova struktura temelji se na kosturu koji se sastoji od 17 atoma ugljika povezanih u četiri spojena prstena, tri cikloheksanska i jedan ciklopentanski. Svi članovi skupine estrogena sadrže 18 atoma ugljika i spadaju u skupinu steroida C18. U svojoj strukturi sadrže jednu fenolnu hidroksilnu skupinu, dok se na ciklopentanskom prstenu nalazi ketonska skupina (E1) ili jedna (E2), dvije (E3), odnosno tri (E4) hidroksilne skupine. Zbog sličnosti u strukturi, svi estrogeni se mogu vezati na jezgrine i membranske estrogenske receptore, no razlikuju se po afinitetu i jačini izazvanog biološkog odgovora [33].

Dominantna forma estrogena u reproduktivnom razdoblju žena je estradiol, pa se stoga pojam „estrogen“ često koristi kao sinonim za „estradiol“. S druge strane, E3 i E4 su povezani s trudnoćom, dok je E1 glavni oblik estrogena kod žena nakon menopauze [33]. Stvaranje estrogena regulirano je osovinom hipotalamus-hipofiza-jajnici, pri čemu hipotalamus luči gonadotropin-oslobađajući hormon (eng. *gonadotropin-releasing hormone*, GnRH) te potom isti potiče hipofizu na izlučivanje folikulostimulirajućeg (FSH) i luteinizirajućeg hormona (LH), a ti hormoni stimuliraju jajnike na sintezu estrogena kod premenopauzalnih žena. Kod žena se estrogen primarno sintetizira u jajnicima, a u manjoj mjeri i u nadbubrežnim žlijezdama te masnom tkivu, uz pomoć enzima aromataze. Aromataza je kodirana genom *CYP19A1* i pripada superobitelji citokroma P450 te katalizira pretvorbu androgena (testosteron, androstendion) u estrogene [34]. Muškarci također proizvode estrogen, uglavnom u stanicama reproduktivnog trakta, ali u znatno manjim količinama. I kod muškaraca, kao i kod žena u postmenopauzi, glavni izvor estrogena je lokalna sinteza u ekstragonadalnim tkivima, pri čemu potkožno masno tkivo predstavlja glavni izvor [35]. Estrogeni nastali ekstragonadalnom sintezom prvenstveno djeluju na lokalnoj razini putem parakrinih mehanizama regulacije [36]. Iako je ukupna količina lokalno proizvedenih estrogena mala, njihove koncentracije u tkivu mogu značajno utjecati na biološke procese. Kao i kod ostalih steroidnih hormona, primarni supstrat za nastanak estrogena je kolesterol, a posebno kolesterol lipoproteina niske gustoće (eng. *low-density lipoproteins*, LDL) [37]. Put biosinteze estrogena prikazan je na Slici 2.



Slika 2. Shematski prikaz biosinteze estrogena od kolesterola do estetrola. Biosinteza estrogena započinje konverzijom kolesterola u pregnenolon djelovanjem enzima CYP11A1. Pregnenolon se potom pretvara u progesteron uz sudjelovanje 3β-hidroksisteroid dehidrogenaze (HSD3B2) ili hidroksilira u 17-hidroksipregnenolon pomoću CYP17A1. Daljnjom aktivnošću CYP17A1 nastaje dehidroepiandrosteron (DHEA), koji se enzimom HSD3B2 pretvara u androstenedion. Androstenedion se 17β-hidroksisteroid dehidrogenazom (17β-HSD) reducira u testosteron. Aromatizacijom androstenediona i testosterona, uz djelovanje aromataze (CYP19A1), nastaju estron (E1) i estradiol (E2). Estron i estradiol međusobno se reverzibilno pretvaraju djelovanjem izoenzima 17β-HSD1 i 17β-HSD2. Daljnjom hidroksilacijom, pretežno putem CYP3A4/5, iz estrona i estradiola nastaje estriol (E3). Estetrol (E4) se sintetizira isključivo tijekom trudnoće u fetalnoj jetri iz estradiola i estriola djelovanjem 15α- i 16α-hidroksilaza te putem posteljice dopijeva u majčinu cirkulaciju. Preuzeto i prilagođeno prema [5].

2.2.1.1. Uloga estrogena u HNSCC-u

Dosadašnja istraživanja pokazala su da izloženost estrogenu može imati zaštitnu ulogu u razvoju HNSCC-a. Iako žene imaju 5 % manji rizik smrtnosti od karcinoma generalno u odnosu na muškarce, u Europi je zabilježena čak 12 % veća stopa preživljenja kod žena oboljelih od tumora glave i vrata [38]. Taj se povoljan učinak s godinama smanjuje, što upućuje na važnost ženskih spolnih hormona u poboljšanju ishoda bolesti i sugerira da prestanak njihove proizvodnje tijekom menopauze može dovesti do gubitka zaštitnog učinka. Slično tome, Hashim i sur. pokazali su da žene s višim razinama estrogena imaju manju vjerojatnost razvoja HNSCC-a, a osobito one koje su bile trudne, rodile prije 35. godine života ili su koristile hormonsku nadomjesnu terapiju [39]. Također, Freedman i sur. utvrdili su da kasniji nastup

menopauze ili primjena menopauzalne hormonske terapije smanjuje rizik od nastanka ove bolesti, dok je kombinirana terapija estrogenom i progestinom gotovo prepolovila taj rizik [40]. Međutim, drugo istraživanje nije pronašlo povezanost između konzumacije alkohola, pušenja te dobi menarhe ili menopauze s rizikom od raka usne šupljine kod postmenopauzalnih žena, ali je zabilježilo da terapija oralnim estrogenom ili kombinacijom estrogena i progestina povećava rizik od nastanka raka usne šupljine [41]. S druge strane, nekoliko istraživanja pokazalo je da konzumacija alkohola može narušiti hormonsku ravnotežu poticanjem aromatizacije androgena u estrogene, čime se mijenja fiziološki omjer androgena i estrogena [42,43].

U istraživanjima *in vitro* pokazano je da estradiol može usporiti rast ER-pozitivnih (ER+) staničnih linija karcinoma jezika, dok dihidrotestosteron nije imao značajan učinak [44]. S druge strane, Robbins i sur. nisu uočili učinak E2 na rast ER+ linija raka grkljana u uvjetima *in vitro*, ali su u uvjetima *in vivo* pokazali suprotan rezultat, gdje je E2 poticao rast tumora [45]. Nadalje, Yoo i sur. u svom su istraživanju pokazali niži omjer 2-hidroksiestrona (2-OHE1) i 16 α -hidroksiestrona (16 α -OHE1) u urinu kod pacijenata s HNSCC-om u odnosu na zdrave kontrole, što može upućivati na pomak prema proliferativnom metabolitu 16 α -OHE1. Također, nizak omjer 2-/16 α -OHE1 bio je povezan s povećanim rizikom od nastanka tumora glave i vrata neovisno o pušenju, što otvara mogućnost razmatranja njihove primjene kao biološkog markera povećanog rizika nastanka ovog tipa tumora [46].

Zanimljivo, nakon što je u HPV+ HNSCC-u otkrivena prekomjerna ekspresija ER α , ispitan je učinak estrogena kod istog tipa tumora. Otkriveno je da E2 može usporiti rast HPV+ stanica putem dva moguća mehanizma: represijom virusne transkripcijske duge kodirajuće regije (eng. *long coding region*, LCR) nakon tretmana s E2 ili pak pojačanom osjetljivosti stanica na estrogen uslijed ekspresije gena HPV-a E6 i E7, što je bilo praćeno inhibicijom rasta tumora. S druge strane, Shatalova i sur. pokazali su da izloženost estrogenu dovodi do inhibicije apoptoze u premalignoj staničnoj liniji oralne leukoplakije, što otvara mogućnost da estrogeni, ovisno o kontekstu, mogu utjecati na ponašanje i ishod premalighnih lezija [47].

2.2.2. Receptori estrogena

Estrogeni svoju funkciju ostvaruju vezanjem na receptore estrogena, koje prema substaničnoj lokalizaciji možemo podijeliti u dvije skupine: jezgrine (ER α i ER β , kodirani genima *ESR1* i *ESR2*) i membranske receptore estrogena (GPER1 i SCN2A) [33]. Vezanjem

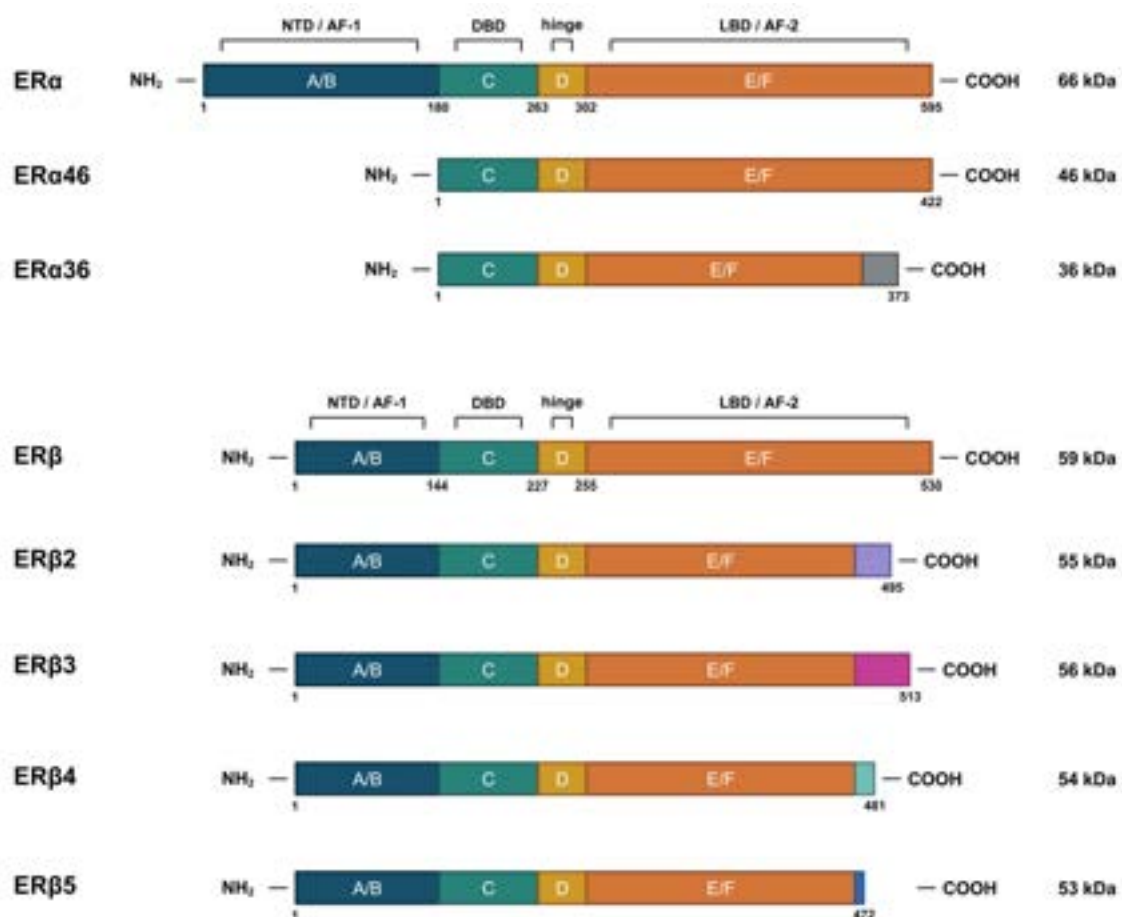
estrogena na receptore pokreće se aktivacija transkripcije određenih gena i/ili signalnih puteva, što dovodi do promjena u genskoj ekspresiji. Stoga se mehanizmi djelovanja receptora estrogena mogu svrstati u dvije osnovne kategorije – genomske i nengenomske učinke [33].

2.2.2.1. Jezgrini receptori estrogena

Jezgrini receptori estrogena ER α i ER β (eng. *nuclear estrogen receptors*, nERs) članovi su superobitelji jezgrinih receptora hormona, koji su ujedno i transkripcijski faktori. Usprkos sličnosti aminokiselinskih sekvenci DNA-vezujuće domene (97 % jednakosti) i prepoznavanja iste kanonske sekvence DNA (eng. *estrogen response element*, ERE), ER α i ER β se razlikuju u jačini transkripcijskog odgovora i pokazuju različite ekspresijske profile [48]. Jezgrini receptori imaju modularnu građu koja se sastoji od šest domena označenih slovima A-F od N-terminalnog prema C-terminalnom kraju (Slika 3.). N-terminalna domena (eng. *N-terminal domain*, NTD) obuhvaća domene A i B, predstavlja transaktivacijsku regiju receptora i sadrži regiju aktivacijske funkcije 1 (eng. *activation function 1*, AF-1), čija je aktivnost djelomično neovisna o prisutnosti liganda i ovisi o staničnom kontekstu. Domena C, odnosno domena za vezanje DNA (eng. *DNA-binding domain*, DBD), visoko je konzervirana među ER izoformama i bogata je cisteinskim ostatcima koji koordiniraju formiranje dva strukturno i funkcionalno različita cinkova prsta. Ti motivi omogućavaju specifično vezanje receptora za ERE u DNA, kao i nespecifične interakcije s fosfodieterskom okosnicom DNA. Unutar DBD-a nalazi se i domena odgovorna za dimerizaciju receptora. Domena D, poznata i kao zglobova domena (eng. *hinge domain*, HD), povezuje DBD i domenu za vezanje liganda (eng. *ligand binding domain*, LBD) te sadrži signal za ulazak u jezgri (eng. *nuclear localization signal*, NLS), koji posreduje translokaciju i zadržavanje receptora u jezgri. C-terminalna regija, koja uključuje domene E i F, predstavlja domenu LBD građenu od hidrofobne šupljine sastavljene od približno 75 % hidrofobnih bočnih ogranaka. U tu šupljinu se smješta ligand, inducirajući alosteričke konformacijske promjene potrebne za aktivaciju receptora. Sastavni dio domene LBD je i regija AF-2, čija je aktivnost ovisna o prisutnosti liganda te zajedno s regijom AF-1 omogućava regrutiranje koaktivatora i korepresora nakon vezanja receptora za DNA, čime se precizno regulira transkripcijska aktivnost ER. C-terminalna domena F predstavlja varijabilnu regiju receptora, koja modulira transkripcijsku aktivnost receptora i utječe na konformacijsku stabilnost LBD-a i diferencijalni odgovor na ligande i antiestrogene [49].

Gen *ESR1*, koji kodira za ljudski ER α , lokaliziran je na kromosomu 6. ER α se javlja u više izoformi, uključujući izoformu pune duljine (66 kDa) i nekoliko kraćih varijanti koje

nastaju kao rezultat alternativnog prekrajanja ili prisutnosti alternativnih kodona START. Kraće izoforme karakterizira odsutnost jedne (AF-1) ili obje transaktivacijske domene (AF-1 i AF-2), čime je ograničena njihova transkripcijska aktivnost [33]. Unatoč tome, one zadržavaju sposobnost dimerizacije s izoformom pune duljine te na taj način mogu inhibirati njenu AF-1 posredovanu aktivnost [50,51]. S druge strane, ER β kodiran je genom *ESR2*, koji se nalazi na kromosomu 14 [52]. Također se javlja u više izoformi, što uključuje izoformu pune duljine (59 kDa), nekoliko kraćih te produženu izoformu od 61 kDa. Kraće izoforme se razlikuju od proteina pune duljine u LBD-u, što utječe na njihov afinitet vezanja liganda i transkripcijsku aktivnost. Osim toga, utvrđeno je da ove izoforme preferencijalno stvaraju heterodimere s ER α pune duljine, a ne s ER β , čime inhibiraju njegovu transkripcijsku aktivnost [53]. To predstavlja primjer složene međusobne interakcije i raznolikog utjecaja koji dva jezgrina ER ostvaruju na estrogensku signalizaciju.



Slika 3. Strukturne i funkcionalne domene jezgrinih receptora estrogena ER α i ER β te njihovih izoformi. Jezgrini receptori estrogena imaju modularnu građu sastavljenu od šest domena (A-F), uključujući N-terminalnu transaktivacijsku domenu (NTD), visoko konzerviranu domenu za vezanje DNA (DBD), zglobnu („hinge“) domenu sa signalom za ulazak u jezgru (NLS) te C-terminalnu domenu za vezanje liganda (LBD). Prikazane su forme receptora ER α i ER β pune duljine, kao i izoforme koje se razlikuju u duljini i sastavu pojedinih domena, što utječe na njihovu transkripcijsku aktivnost i signalne funkcije. Izrađeno pomoću BioRender.com.

Aktivacija genske ekspresije kao odgovor na vezanje estrogena ili drugih agonista može se postići na dva načina. Prvi uključuje izravno vezanje kompleksa E2-ER na specifične sekvence DNA i njegovu interakciju s koaktivatorima i komponentama inicijacijskog kompleksa RNA polimeraze II. Drugi način je neizravan, pri čemu ER stupa u interakciju s drugim transkripcijskim faktorima, čime stabilizira njihovo vezanje za DNA i/ili regrutira koaktivatore u transkripcijski kompleks, bez izravnog vezanja ER na DNA [33,54]. Jezgrini receptori estrogena nalaze se u citoplazmi i nakon vezanja estrogena dolazi do konformacijske promjene receptora koja potiče translokaciju kompleksa E2-ER u jezgru, gdje se odvija dimerizacija. Nastali homo- ili heterodimer zatim se veže na ERE, smještene u promotorskim regijama gena, čime djeluje kao transkripcijski faktor [33,55,56]. Konsenzusna sekvenca ERE predstavlja invertirani ponovljeni motiv duljine 15 bp: 5'-AGGTCAnnnTGACCT-3', pri čemu 'n' označava bilo koji nukleotid. Istraživanja su pokazala da varijabilnost unutar sekvence ERE može modificirati konformaciju i/ili strukturu veznog mjesta za kofaktore, što posljedično utječe na selektivnost regrutiranja koaktivatora i korepresora. Ovi rezultati upućuju na to da varijacije u sekvenci ERE moduliraju alosteričku regulaciju aktivnosti nER-a, što može dovesti do diferencijalne ekspresije gena pod njihovom kontrolom [57]. Zanimljivo, pokazano je da heterodimeri α/β slabije induciraju transkripciju gena ERG (eng. *estrogen-responsive genes*, ERGs) od homodimera ER α , što se pripisuje razlikama u regiji AF-1 i regrutaciji koaktivatora te posljedično dovodi do različitih bioloških učinaka [48,58]. Međutim, procjenjuje se da oko 35 % gena ERG ne sadrži ERE ili slične sekvence u promotorskim regijama. U tim slučajevima ligandom aktivirani ER reguliraju ekspresiju putem interakcija s drugim transkripcijskim faktorima, bez izravnog vezanja na DNA, čime se značajno proširuje regulatorni utjecaj estrogena [33,35].

2.2.2.2. Uloga jezgrinih receptora estrogena u HNSCC-u

Pojačana ekspresija nER-ova zabilježena je u brojnim studijama tumora glave i vrata, pri čemu se ER β najčešće pojavljuje kao dominantno eksprimirani podtip kod planocelularnog karcinoma usne šupljine (eng. *oral squamous cell carcinoma*, OSCC) [47,59–61]. Ipak, određene studije izvještavaju o predominantnoj ekspresiji ER α u usnoj šupljini te kod tumora larinksa i hipofarinksa, uz čestu koekspresiju receptora estrogena i progesterona neovisno o primarnom sijelu tumora [62,63]. Uočeno je da ovi receptori imaju suprotne učinke na tumorske stanice, pri čemu ER α potiče proliferaciju u papilarnom karcinomu štitnjače, dok ER β pokazuje inhibitorno djelovanje [64,65]. Također, pojačana ekspresija ER β kod tumora orofarinksa

povezana je s povoljnijim ishodom bolesti i većom stopom preživljenja [66]. Slično tome, pojačana ekspresija ER α u korelaciji je s boljim stopama preživljenja (ukupno preživljenje, preživljenje specifično za bolest, bez progresije bolesti i bez recidiva) kod pacijenata s tumorom orofarinksa koji su primili primarnu kemoterapiju, a osobito kod HPV+ tumora orofarinksa, gdje ER α služi kao biljeg za bolje ukupno preživljenje [67,68]. S druge strane, u muškoj kohorti bolesnika s OSCC-om, ekspresija ER α povezana je sa smanjenim ukupnim i preživljenjem bez recidiva [69]. Dodatno, ekspresija ER α kod HNSCC-a najčešće je povezana s manjom veličinom tumora ($\leq T2$) i infekcijom HPV-om [70]. Iako točan mehanizam nižih stopa preživljenja u pojedinim kohortama ER α -pozitivnih (ER α +) pacijenata još nije razjašnjen, jedan od mogućih hormonskih izvora u HNSCC-u mogao bi biti estrogen koji sintetiziraju upalne stanice kao odgovor na karcinogene, što je ranije opisano u kontekstu raka pluća [71].

2.2.2.3. Membranski receptori estrogena

Osim transkripcijskih promjena i sinteze proteina, koje estrogen potiče putem klasičnih jezgrinih receptora estrogena, novija istraživanja sve više ističu značaj brzih staničnih odgovora koji se odvijaju u roku od nekoliko minuta posredstvom membranskih receptora estrogena (eng. *membrane estrogen receptors*, mERs). Određene forme ER α i ER β , uključujući njihove varijante nastale alternativnim izrezivanjem, poput ER α 36, lokaliziraju se na staničnoj membrani nakon posttranslacijskih modifikacija poput S-palmitoilacije [72] ili miristilacije [51]. Opisani su i drugi mER-ovi poput receptora estrogena povezanog s G-proteinom 1 (eng. *G protein-coupled estrogen receptor 1*, GPER1) [73], alfa podjedinice natrijevog kanala reguliranog naponom tipa 2 (eng. *sodium channel protein type 2 subunit alpha*, SCN2A) [74], Gq-mER [75] i ER-X [76]. Upravo je identifikacija membranskog receptora GPER1 označila važan korak u razumijevanju negenomskih mehanizama djelovanja estrogena [77].

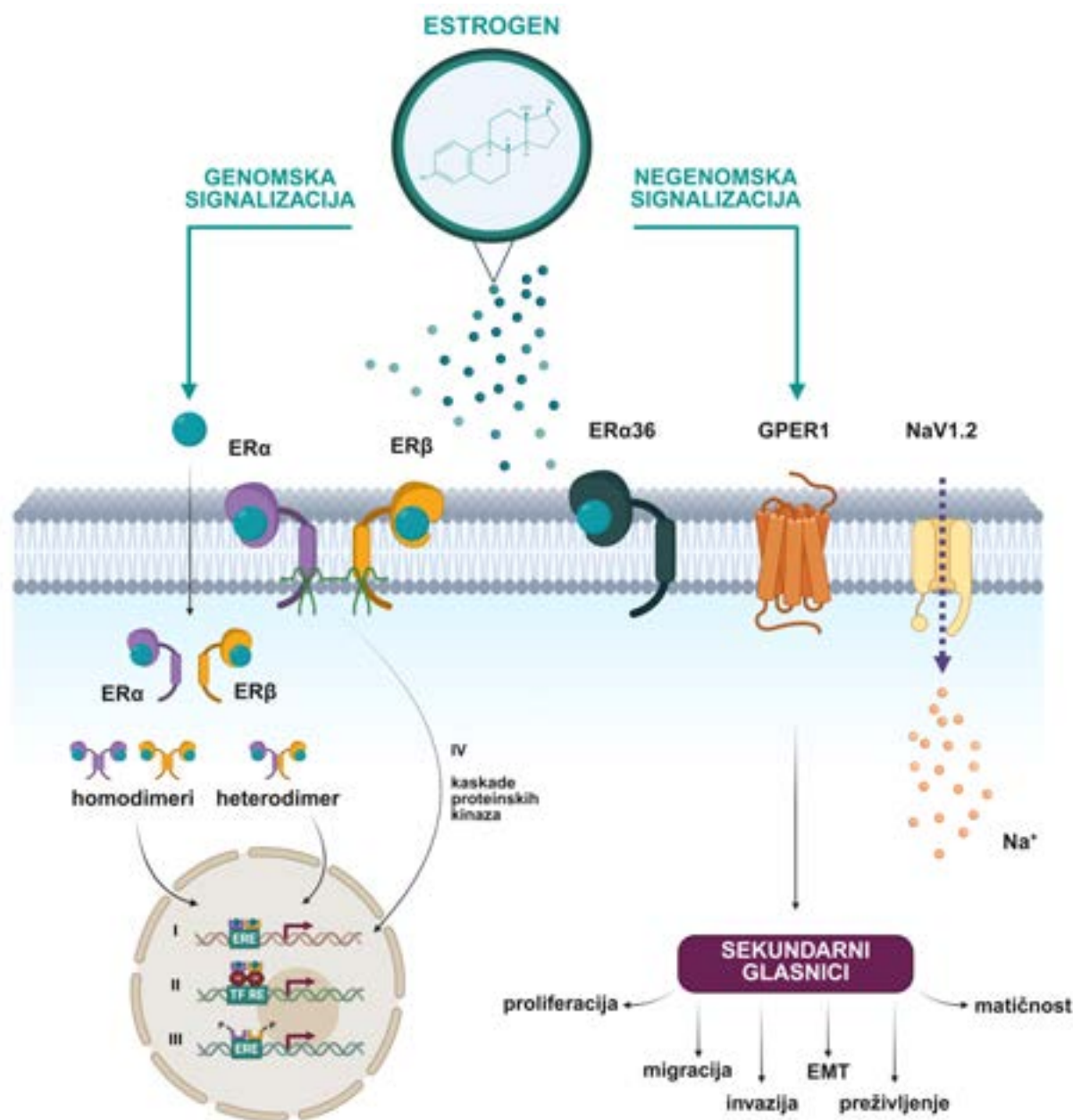
GPER1 pripada skupini receptora spregnutih s G-proteinom (eng. *G protein-coupled receptor*, GPCR) i kodiran je istoimenim genom. Kao tipičan predstavnik te obitelji proteina, građom se sastoji od sedam transmembranskih α -zavojnica te po četiri untarstanične i izvanstanične petlje. Izvanstanični segmenti posreduju u prepoznavanju i vezanju liganda, dok unutarstanični segmenti vežu G-proteine, čija aktivacija pokreće različite unutarstanične signalne kaskade [33,78]. Za razliku od većine GPCR-ova, GPER1 je u manjoj mjeri smješten na plazmatskoj membrani, dok se većinski nalazi se na membranama endoplazmatskog retikuluma i Golgijevog aparata [79], no njegova se stanična lokalizacija mijenja ovisno o okolišnim signalima te varira među različitim tipovima stanica i tkiva [80]. Gen koji kodira

GPER1, ranije označen kao *GPR30*, smješten je na kromosomu 7 [81]. Nakon što je 2000. godine pokazano da estrogen može aktivirati signalni put kinaze aktivirane mitogenom (eng. *mitogen-activated protein kinase*, MAPK) putem GPR30 [73], a pet godina kasnije potvrđeno da se estrogen specifično veže za taj receptor [82,83], receptor je preimenovan u GPER1, čime je istaknuta njegova funkcija membranskog receptora estrogena. Pošto je riječ o membranskom proteinu s dinamičkom strukturom, njegova izolacija, pročišćavanje i kristalizacija predstavljaju eksperimentalni izazov, pa njegova potpuna kristalna struktura još nije dostupna. Ipak, pomoću računalnih tehnika homolognog modeliranja razvijen je vrlo kvalitetan strukturni model proteina GPER1 [84] te je pokazano da se vezno mjesto za E2 nalazi unutar njegove egzoplazmatske i/ili transmembranske regije [85,86]. Aktivacija GPER1 vezanjem estrogena pokreće složenu mrežu unutarstaničnih signalnih puteva, koji u većini slučajeva uključuju prvotnu transaktivaciju EGFR-a. Posljedično GPER1 stimulira mobilizaciju kalcijevih iona, što može pridonijeti procesima tumorigeneze i metastaziranja. Nadalje, GPER1 aktivira više ključnih kinaznih kaskada, uključujući: signalni put MAPK/ERK koji potiče proliferaciju stanica, PI3K/AKT koji inhibira apoptozu i N-terminalnu kinazu c-Jun (JNK) koja u određenim okolnostima može inducirati apoptozu. Slično drugim GPCR-ovima, GPER1 aktivira adenilat-ciklazu, čime se povećava koncentracija cikličkog adenozin-monofosfata (cAMP), što rezultira aktivacijom proteinske kinaze A (PKA) [79,87,88]. Osim izravnog signalnog djelovanja, GPER1 može neizravno regulirati ekspresiju gena putem signalnih puteva koji dovode do fosforilacije i aktivacije transkripcijskih faktora [79]. Ipak, njegov utjecaj na gensku ekspresiju je ograničen u odnosu na nER-ove, koji kontroliraju transkripciju znatno šireg spektra gena [88].

SCN2A, u literaturi poznat i kao NaV1.2, natrijev je kanal reguliran naponom koji omogućava selektivan prolazak iona Na^+ kroz staničnu membranu [89]. Aktivacija kanala depolarizacijom membrane generira akcijski potencijal u pobudljivim stanicama poput neurona i mišićnih vlakana, dok u nepobudljivim stanicama kanali NaV imaju nekanonske regulatorne funkcije [90]. Brojni lijekovi i toksini mogu modulirati aktivnost NaV vezanjem na različite domene kanala. Tamoksifen (TAM), poznat kao selektivni modulator nER, pokazuje i inhibitorski učinak na kanale NaV [91]. Sula i sur. su pomoću rendgenske kristalografije otkrili dva mjesta vezanja TAM-a u blizini otvora kanala prema unutrašnjosti stanice, neovisna o poznatim veznim mjestima drugih liganada NaV [74]. Ova mjesta dijele strukturnu sličnost s veznim mjestom TAM-a kod nER-ova, uključujući glutaminske i asparaginske bočne ogranke koji stvaraju ključne vodikove veze s TAM-om na suprotnim krajevima molekule. Konačno, testovi *in vitro* potvrdili su da se TAM i njegovi metaboliti vežu s visokim afinitetom za NaV i

na taj način inhibiraju tok iona Na^+ kroz isti, što potvrđuje njegovu potencijalnu ulogu kao mER [74]. Novija istraživanja pokazuju da kanali NaV mogu doprinijeti procesima tumorske invazivnosti i metastaziranja. Iako točan mehanizam njihova djelovanja još nije u potpunosti razjašnjen, jedna od pretpostavki je da pojačana ekspresija kanala NaV u tumorskim stanicama i povećan priljev iona Na^+ dovodi do pojačane aktivacije izmjenjivača Na^+/H^+ NHE1 (eng. *sodium-hydrogen exchanger 1*). Aktivacija NHE1 rezultira sniženjem izvanstanične pH vrijednosti, što povećava hidrolitičku aktivnost katepsina i posljedično potiče razgradnju izvanstaničnog matriksa. Takve promjene u mikrookolišu tumora olakšavaju invaziju tumorskih stanica i razvoj metastaza [92].

ER α 36 je skraćena izoforma receptora ER α pune duljine (ER α 66), kodirana istim genom i identificirana 2005. godine [73]. Nastaje djelovanjem alternativnog promotora u prvom intronu, što joj omogućava neovisnu regulaciju ekspresije u odnosu na ER α 66 te je zabilježena u ER-negativnim (ER-) staničnim linijama raka dojke, koje ne eksprimiraju ER α 66 [93]. Za razliku od ER α 66, ER α 36 nema transaktivacijske domene AF-1 i AF-2, ali zadržava DNA-veznu domenu i djelomičnu LBD, pri čemu LBD sadrži jedinstvenu sekvencu od 27 aminokiselina, koja proširuje spektar vezanja liganda. Unatoč sposobnosti vezanja iste sekvence DNA kao i ER α 66 i ER β , ER α 36 zbog nedostatka vlastite transkripcijske aktivnosti djeluje kao negativni regulator njihovih transaktivacijskih aktivnosti ovisnih i neovisnih o estrogenu [93]. ER α 36 pretežno je lokaliziran na staničnoj membrani, vjerojatno zbog tri potencijalna mjesta miristilacije blizu N-terminalnog kraja, gdje sudjeluje u brznoj, negenomskoj signalizaciji [93–97]. Slično kao i GPER1, ER α 36 služi u prijenosu signala preko nekoliko ključnih signalnih kaskada, uključujući MAPK/ERK, PI3K/AKT i PKC/ERK. Aktivacija ovih puteva povezana je s proliferacijom tumorskih stanica, povećanim metastatskim potencijalom i otpornošću na apoptozu, što ER α 36 čini važnim čimbenikom u razvoju i progresiji različitih tipova tumora. Ova varijanta ER stoga predstavlja kritičnu poveznicu između klasične estrogenske signalizacije i brze, negenomske regulacije (Slika 4.), koja pridonosi malignim svojstvima tumorskih stanica [93–97].



Slika 4. Shematski prikaz jezgrinih i membranskih receptora estrogena te različitih mehanizama djelovanja estrogena putem genomske i nengenomske signalizacije. Na slici su prikazana četiri osnovna mehanizma estrogenog signaliziranja. (I) Izravni genomski put, u kojem se kompleks estradiol–estrogenski receptor (E2–ER) veže izravno na ERE u DNA te aktivira transkripciju ciljnih gena. (II) Neizravni genomski put, u kojem kompleks E2–ER regulira ekspresiju gena putem protein–protein interakcija s drugim transkripcijskim čimbenicima. (III) Put neovisan o ligandu, pri kojem dolazi do aktivacije ER ili njihovih koregulatora fosforilacijom, neovisno o vezanju estrogena. (IV) Negenomski put, koji uključuje aktivaciju različitih kaskada proteinskih kinaza kao odgovor na vezanje estradiola za membranske oblike ERα i ERβ, kao i za membranske ER - ERα36, GPER1 i NaV1.2. Preuzeto i prilagođeno prema [5].

2.2.2.4. Uloga membranskih receptora estrogena u HNSCC-u

Uloga membranskih receptora estrogena u tumorima općenito je znatno manje istražena u usporedbi s ulogom jezgrinih receptora. Ipak, pojedina istraživanja ukazuju na njihov potencijalni dijagnostički i prognostički značaj u tumorima glave i vrata. Pokazano je da GPER1 potiče pojačanu ekspresiju IL-6 te posljedično proliferaciju i migraciju stanica raka grkljana kao odgovor na bisfenol A, mimetik estrogena, pri čemu inhibicija GPER1, ali ne i ER α / β , uklanja taj učinak [98]. Također, bioinformatičkom analizom potvrđena je pojačana ekspresija *GPER1* u HNSCC-u u odnosu na zdravo tkivo, dok je niža ekspresija bila povezana s lošijom prognozom [99]. Što se tiče *SCN2A*, njegova uloga u HNSCC-u je još nedovoljno istražena, ali su pojačane razine *SCN2A* opažene u stanicama karcinoma jajnika s velikim metastatskim potencijalom [100]. U oralnim i orofaringealnim tumorima zabilježena je ugradnja gena L2 HPV-a u intron 16 lokusa *SCN2A*, što rezultira homozigotnim gubitkom lokusa *SCN2A* [101]. Također, uočena je razlika u ekspresiji *SCN2A* između pušača i nepušača s HNSCC-om, pri čemu je *SCN2A* bio jedan od gena s diferencijalno pojačanom ekspresijom koji razlikuju te skupine [102]. Što se tiče uloge ER α 36 u HNSCC-u, iako je ista također slabo istražena, dokazana je povezanost ER α 36 s pojačanom aktivnosti proteinske kinaze C (eng. *protein kinase C*, PKC), što rezultira pojačanom proliferacijom i preživljenjem, kao i pojačanom ekspresijom angiogenih i metastatskih čimbenika u stanicama raka grkljana kao odgovor na E2 [96]. U istom je kontekstu utvrđena i pozitivna korelacija između ekspresije ER α 36 i VEGF u uzorcima tumora grkljana, kao i između ekspresije ER α 36 i metastaziranja u regionalne limfne čvorove [96]. Dodatno, kod raka grkljana pokazana je obrnuta korelacija između ekspresije ER α 66 i ER α 36 i kliničkog stadija tumora, pri čemu ekspresija ER α 66 opada, a ER α 36 raste s agresivnošću tumora [103].

2.2.3. Antiestrogeni u terapiji HNSCC-a

Uzimajući u obzir proliferativni učinak estrogena, tumori ovisni o hormonima koji eksprimiraju ER-ove predstavljaju potencijalne kandidate za liječenje hormonskom terapijom, bilo inhibicijom sinteze estrogena ili blokiranjem njegovog djelovanja na tumorske stanice. U tu svrhu primjenjuju se tri glavne skupine lijekova: inhibitori aromataze, selektivni modulatori receptora estrogena (eng. *selective estrogen receptor modulators*, SERMs), koji mogu djelovati tkivno specifično i kao agonisti i kao antagonisti ER, te selektivni degradatori receptora estrogena (eng. *selective estrogen receptor degraders*, SERDs), koji se kao i SERM-ovi vežu

na mjesta vezanja estrogena na receptorima inducirajući njihovu degradaciju i samim time djeluju kao isključivi antagonisti ER-a [104]. Budući da veliki dio HNSCC-ova pokazuje pojačanu ekspresiju ER-ova, pretpostavlja se da antiestrogeni mogu imati terapijski potencijal u ovom tipu tumora.

Jedan od najpoznatijih i najviše istraživanih SERM-ova je tamoksifen, derivat trifeniletilena, koji se koristi desetljećima u terapiji tumora dojke ovisnih o hormonima. TAM djeluje kao kompetitivni inhibitor i djelomični agonist nER-ova, sprječavajući vezanje E2 i njegov učinak na stanice koje eksprimiraju nER-ove [105]. Vezanjem TAM-a na ligandsko mjesto nER-a dolazi do slične kaskade staničnih događaja kao i nakon vezanja E2, što uključuje disocijaciju šaperona, dimerizaciju receptora, translokaciju u jezgru i vezanje na ERE. Za razliku od kompleksa E2-ER, kompleks TAM-nER-DNA nije transkripcijski aktivan zbog specifičnih konformacijskih promjena, poput nefunkcionalne regije AF-2, koja je uz AF-1 potrebna za potpunu aktivnost nER-a. Djelomična agonistička aktivnost proizlazi upravo iz regije AF-1, čija je aktivnost regulirana putem signalnog puta MAPK te ovisi o tipu stanica i kontekstu promotora [105]. Što se tiče njene istražene uloge u HNSCC-u, pokazano je da kod tumora grkljana inhibira rast tumora *in vitro* i *in vivo*, iako je njegov inhibitory učinak bio niži *in vivo* [45]. Također, u drugom istraživanju *in vitro* pokazana je inhibicija rasta ER-staničnih linija različitih primarnih sijela pri višim dozama TAM-a u odnosu na ER⁺ staničnu liniju karcinoma dojke [106]. S druge strane, Grenman i sur. izvijestili su o tome da su tri ER-HNSCC linije bile otporne na djelovanje TAM-a, dok je isti značajno inhibirao rast tri ER⁺ stanične linije [107]. Ovakvi kontradiktorni rezultati ukazuju na varijabilan učinak TAM-a u HNSCC-u, ovisno o ekspresiji ER i specifičnom tipu tumora. Stoga je u uvjetima *in vitro* promatrana i primjena kombinirane terapije TAM-om i cisplatinom, kao potencijalni tretman za liječenje OSCC-a [108,109]. U drugoj studiji utvrđeno je da TAM usporava razvoj otpornosti na cisplatinu, neovisno o ekspresiji ER, afinitetu vezanja TAM-a za antiestrogenska vezna mjesta ili razlikama u nakupljanju lijekova u stanicama, već zbog međusobne interakcije između ta dva spoja [110]. Što se tiče mER-ova, pokazano je da se TAM veže s visokim afinitetom za GPER1 i SCN2A, pri čemu oponaša estrogenom inducirane efekte na GPER1 [83], odnosno inhibira protok natrijevih iona kroz kanal SCN2A [91]. Agonistički učinak TAM pokazuje i kod receptora ER α 36, pri čemu aktivira signalne puteve MAPK/ERK, PI3K/AKT i Src/EGFR/STAT5 te potiče proliferaciju stanica [93,94,111]. Sve veći broj istraživanja ukazuje na to da agonistički učinak TAM-a na signalne puteve koje pokreću mER-ovi predstavlja važan uzrok razvoja rezistencije na TAM [112,113].

Uz selektivne modulatore estrogenskih receptora, u terapiji tumora ovisnih o

hormonima primjenjuju se i selektivni degradatori receptora estrogena, među kojima se posebno ističe fulvestrant, koji za razliku od TAM-a nema opisane agonističke učinke. Odobren je za liječenje karcinoma dojke pozitivnih na hormonske receptore kod žena u postmenopauzi nakon neuspješne antiestrogenske terapije [114]. Vezanjem za nER, fulvestrant sprječava dimerizaciju receptora i translokaciju u jezgu, dok inaktivacija domena AF-1 i AF-2 čini kompleks fulvestrant-ER transkripcijski neaktivnim [115]. Fulvestrant djeluje kao SERD, na način da se veže na ER, blokira ga i ubrzava njegovu razgradnju te time u potpunosti inhibira genomske učinke signalizacije ER [114]. Za razliku od nER, fulvestrant ne inducira razgradnju ER α 36, što se pripisuje skraćenoj domeni za vezanje liganda u ovoj izoformi [51,116]. U modelu tumora hipofarinksa *in vitro*, fulvestrant i TAM povećavaju osjetljivost tumorskih stanica na zračenje i ubrzavaju induciranu apoptozu, što podupire mogućnost kombinirane primjene istih s radioterapijom u liječenju HNSCC-a. Ista studija pokazala je i da je pojačana ekspresija *ESR2* i *SMR3A* povezana sa značajno lošijim preživljenjem bez progresije bolesti i preživljenjem specifičnim za bolest, u odnosu na pacijente s niskom ekspresijom *SMR3A* te autori stoga zaključuju da ko-ekspresija *ESR2* i *SMR3A* može predstavljati rizik za neuspjeh terapije zračenjem [117]. Slično tome, u drugom istraživanju su oba lijeka inhibirala rast staničnih linija OSCC-a, odnosno TAM je smanjio transkripciju integrina β 1 i ekspresiju integrina α 3 na površini stanica, dok je fulvestrant smanjio prianjanje stanica na laminin-1 [118]. Još važnije, u premalignim staničnim linijama HNSCC-a, u kojima E2 inhibira apoptozu, fulvestrant pokazuje antagonistički učinak i potiče apoptozu, što sugerira potencijalnu terapijsku vrijednost antiestrogena u liječenju HNSCC-a [47].

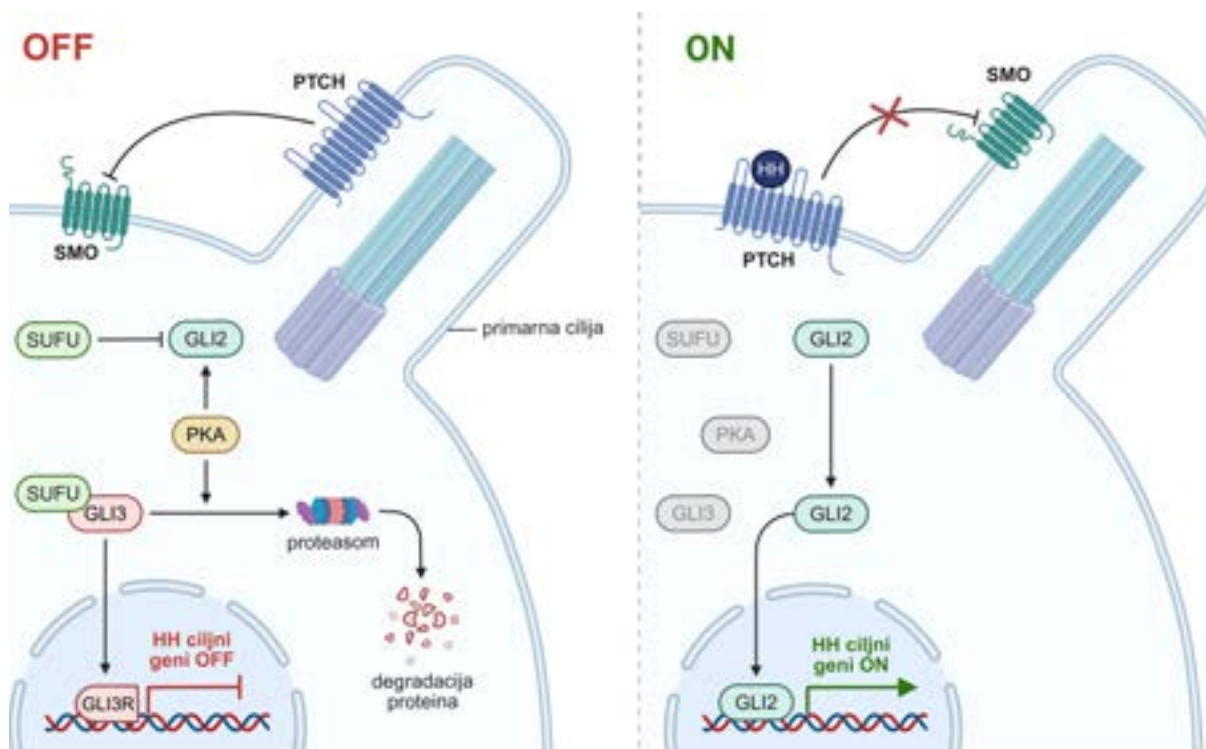
Posljednji antiestrogen s opisanim djelovanjem na stanice HNSCC-a je ormeloksifen, u literaturi poznat kao centchroman. Riječ je o SERM-u, prvotno sintetiziranom u Indiji kao nesteroidni oralni kontraceptiv [119]. Djeluje kao kompetitivni antagonist ER-a i potiče pretvorbu E2 u manje aktivni oblik E1 [120]. Iako je njegovo djelovanje proučavano uglavnom u ciljnim tkivima poput endometrija, jedna studija je pokazala da u staničnim linijama HNSCC-a ormeloksifen ima antiproliferativni i proapoptotski učinak, da inhibira signalne puteve AKT/mTOR i STAT3 (eng. *signal transducer and activator of transcription 3*), smanjuje sposobnost stvaranja kolonija i dovodi do promjena u proteinima povezanim s oštećenjem DNA i regulacijom staničnog ciklusa [121]. Ovi rezultati upućuju na potencijalnu terapijsku vrijednost ormeloksifena u liječenju HNSCC-a. Zaključno, dostupni podaci ukazuju na to da su antiestrogeni još uvijek nedovoljno istraženi u HNSCC-u, a kontradiktorni rezultati dosadašnjih istraživanja posljedica su heterogenosti ovog tipa tumora, kao i različitih istraživačkih pristupa, čime je otežano jasno tumačenje njihove uloge. Ipak, postojeći dokazi upućuju na njihov

terapijskih potencijal, osobito u kombinaciji s inhibitorima drugih signalnih puteva, poput signalnog puta Hedgehog-GLI, čiji će se mogući međuodnosi razmotriti u nastavku rada.

2.3. Signalni put Hedgehog-GLI

2.3.1. Kanonska i nekanonska aktivacija signalnog puta HH-GLI

Signalni put Hedgehog-GLI opisan je osamdesetih godina dvadesetog stoljeća, kada su Christiane Nüsslein-Volhard i Eric Wieschaus identificirali lokuse povezane s razvojnim deformacijama prilikom segmentacije kutikule ličinke vinske mušice (*Drosophila melanogaster*). Jedan od identificiranih lokusa, a ujedno i prva opisana komponenta signalnog puta HH-GLI, čija mutacija rezultira gubitkom pravilno raspoređenih ventralnih segmenata i isti postaju nepravilno raspoređeni, nalik ježevim bodljama, bio je nazvan *Hedgehog* (hrv. jež) [122]. Molekularna identifikacija liganda HH provedena je dvanaest godina kasnije te je pokazala da je riječ o sekretornom proteinu koji djeluje kao morfogen [123]. Nedugo potom identificirana su tri homologna liganda HH kod sisavaca: SHH (eng. *sonic hedgehog*), IHH (eng. *Indian hedgehog*) i DHH (eng. *desert hedgehog*). Dokazano je da navedeni homolozi imaju evolucijski očuvanu ulogu u rastu i razvoju organizama, pri čemu svaki od njih doprinosi regulaciji specifičnih razvojnih procesa [123]. I druge ključne komponente signalnog puta HH-GLI, uključujući receptor PTCH (eng. *patched*) i koreceptor SMO (eng. *smoothened*), opisane su na temelju fenotipskih promjena u morfologiji krila vinske mušice. S druge strane, prvi opisani član obitelji proteina GLI bio je GLI1, nakon što je utvrđeno da je istoimeni gen višestruko amplificiran u malignim gliomima [124], a ubrzo nakon toga opisani su i proteini GLI2 i GLI3 te je potvrđeno da svi djeluju kao transkripcijski faktori [125,126]. U kanonskoj aktivaciji signalnog puta HH-GLI, ključnu ulogu ima dostupnost liganda HH (Slika 5.). Naime, u odsutnosti liganda, receptor PTCH1 inhibira aktivaciju koreceptora SMO u primarnoj ciliji [127]. Iako pravi mehanizam ove inhibicije još uvijek nije u potpunosti razjašnjen, pretpostavlja se da PTCH1 neizravno regulira lučenje ili transport endogenih sterolnih inhibitora koreceptora SMO-a, dok drugi autori ističu kolesterol kao ključni aktivator SMO-a [128,129]. Inhibicija SMO-a sprječava njegovu akumulaciju u primarnoj ciliji i blokira daljnji prijenos signala, što rezultira zadržavanjem proteina GLI u kompleksu s proteinom SUFU (eng. *supressor of fused homolog*) u citoplazmi.



Slika 5. Kanonska aktivacija signalnog puta HH-GLI. Shema prikazuje signalni put HH-GLI u neaktivnom (lijevo) i aktivnom stanju (desno) u primarnoj ciliji. U neaktivnom stanju (lijevo), u odsutnosti liganda Hedgehog, receptor PTCH inhibira aktivnost proteina SMO, što rezultira zadržavanjem transkripcijskih faktora GLI2 i GLI3 u citoplazmi u kompleksu s proteinom SUFU. Posredovanjem PKA dolazi do proteolitičkog cijepanja GLI3 u represorski oblik (GLI3R), koji ulazi u jezgru i inhibira transkripciju HH ciljnih gena. U aktivnom stanju (desno), vezanjem liganda SHH na PTCH dolazi do uklanjanja inhibicije SMO, njegove akumulacije u primarnoj ciliji i aktivacije signalne kaskade. Time se omogućuje oslobađanje GLI2 iz kompleksa sa SUFU, njegova aktivacija i translokacija u jezgru, gdje djeluje kao transkripcijski aktivator ciljnih gena signalnog puta HH-GLI, uključujući PTCH1 i GLI1, čime se uspostavlja pozitivna povratna sprema signalnog puta. Izrađeno pomoću BioRender.com.

Vezanjem SUFU-a za proteine GLI maskira se vezno mjesto za transportni protein, importin (eng. *transportin-1*), čime je spriječen njihov ulazak u jezgru [130]. Formiranje kompleksa SUFU-GLI dovodi do aktivacije kinaza: PKA, CK1 (eng. *casein kinase 1*) i GSK3 β (eng. *glycogen synthase kinase 3 beta*), koje fosforiliraju proteine GLI. Fosforilirani proteini GLI postaju supstrat ubikvitinske ligaze E3 β TrCP (eng. *beta-transducin repeat containing E3 ubiquitin protein ligase*), koja ih obilježava ubikvitinom za proteasomalnu razgradnju. Kod proteina GLI1 razgradnja je potpuna, dok se GLI2 i GLI3 cijepaju u skraćene, represorske oblike (GLI2R i GLI3R) koji djeluju kao represori transkripcije [131,132]. S druge strane, kada je ligand HH prisutan i nakon što se veže na receptor PTCH1, dolazi do uklanjanja inhibicije SMO-a, što omogućava njegovu akumulaciju u primarnoj ciliji i prijenos signala prema citoplazmi. U tom slučaju dolazi do fosforilacije proteina SUFU, umjesto proteina GLI, od

strane GSK3 β , što u konačnici rezultira razdvajanjem kompleksa SUFU-GLI [133]. Nepocijepani proteini GLI potom ulaze u jezgru posredovanjem importina Kap β 2, gdje se vežu na promotore ciljnih gena uključenih u regulaciju proliferacije, staničnog ciklusa, apoptoze, epitelno-mezenhimalne tranzicije (EMT), autofagije i stanične adhezije [134] (Slika 5.).

Zbog složenosti signalnog puta HH-GLI, uz kanonsku, aktivaciju ovisnu o ligandu, razvili su se i različiti nekanonski mehanizmi koji dovode do različitih staničnih odgovora [6]. Nekanonska aktivacija signalnog puta obuhvaća sve oblike signalizacije koji odstupaju od klasičnog kanonskog puta, a do danas su opisana ukupno tri tipa takve signalizacije [135]. Tip I nekanonske signalizacije temelji se na djelovanju receptora PTCH1 putem mehanizama koji su funkcionalno različiti od njegovog klasičnog učinka inhibicije proteina SMO. Tip II uključuje procese posredovane SMO-om i neovisne o GLI1, poput aktivacije malih GTP-aza, dok tip III obuhvaća skupinu mehanizama koji aktiviraju transkripcijski faktor GLI1 neovisno o uzvodnoj signalizaciji PTCH1-SMO [136]. U tom slučaju GLI1 može biti aktiviran putem različitih signalnih puteva, a upravo međudjelovanje više signalnih puteva vjerojatno rezultira slabijim odgovorom na terapiju i razvojem otpornosti na lijekove [6,137]. Na primjer, pojačana aktivnost signalnog puta HH-GLI u stanicama raka dojke povezana je s adaptacijom na hipoksiju i poticanjem metastaziranja [6]. Također, signalni put HH-GLI u interakciji je sa signalnim putevima mTOR, MAPK i AKT, koji aktiviraju gene povezane s preživljenjem stanica, poput *BCL2*, što je pokazano kao poticajan mehanizam za progresiju HNSCC-a [137]. Nadalje, u onkogenu funkciju puta HH-GLI uključeni su i geni vezani uz proliferaciju (geni za cikline D1 i E1, MYC i komponente EGF-a), angiogenezu (komponente trombocitnog faktora rasta (eng. *platelet-derived growth factor*, PDGF) i VEGF-a) te migraciju i invaziju stanica putem EMT-a [138]. Upravo je migracija i invazija posredovana SHH-om pokazana u različitim tipovima tumora, pri čemu SHH potiče metastaziranje aktivacijom signalnog puta PI3K/AKT i aktivacije metaloproteinaze matriksa 9 (eng. *matrix metalloproteinase-9*, MMP-9) [139]. S obzirom na međusobnu povezanost puta HH-GLI s drugim signalnim putevima, jasno je da isti značajno utječe i na populaciju tumorskih matičnih stanica. Upravo disfunkcionalni signalni putevi HH-GLI, WNT, NOTCH, JAK/STAT, PI3K/PTEN i NF- κ B (eng. *nuclear factor kappa B*) česta su karakteristika CSC-ova [140] te se smatra da promjene u navedenim putevima doprinose njihovim ključnim svojstvima, uključujući samoobnavljanje i diferencijaciju. Međutim, međusobni međuođnosi signalnih puteva u normalnim i tumorskim matičnim stanicama i dalje su nedovoljno razjašnjeni [141].

2.3.2. Uloga signalnog puta HH-GLI u razvoju tkiva glave i vrata

Već na temelju studija koje su proveli znanstvenici Nüsslein-Volhard i Wieschaus bilo je jasno da signalni put HH-GLI ima važnu ulogu u embrionalnom razvoju, a otkriće da je evolucijski vrlo očuvan potaknulo je daljnja istraživanja uloge istog u embriogenezi sisavaca. Prvi dokaz o njegovoj ulozi u embrionalnom razvoju sisavaca potječe iz istraživanja Chianga i sur., u kojem je pokazano da mutacija *Shh* kod miševa najprije uzrokuje teške poremećaje razvoja notokorda, koji predstavlja zametnu os tijela, i podne ploče, ventralnog dijela neuralne cijevi, a kasnije i odsutnost distalnih struktura udova, ciklopiju odnosno razvoj jednog oka u sredini lica te odsutnost kralježnice i većine rebara [142]. Kasnija istraživanja dodatno su potvrdila važnost puta HH-GLI u pravilnoj morfogenezi brojnih tkiva i organa, uključujući i strukture glave i vrata, poput zubi, usana, nepca i žlijezda slinovnica [143]. Sukladno tome, poremećaji u signalizaciji tijekom rane embriogeneze dovode do različitih kongenitalnih kraniofacijalnih malformacija, uključujući holoprozencefaliju, rascjep usne i nepca te poremećaje dentalne morfogeneze [144–146]. Od tri opisana liganda signalnog puta, SHH predstavlja dominantni oblik u ljudi i ima temeljnu funkciju u formiranju i organizaciji tkiva glave i vrata [146], dok DHH ima važnu ulogu u razvoju spolnih stanica i sazrijevanju testisa te formiranju ovojnice perifernih živaca, a IHH primarno regulira razvoj hrskavice i kostiju [123]. Orofacijalni rascjepi (eng. *orofacial cleft*, OFC) najčešće su kongenitalne anomalije s incidencijom od 1/500 – 700 živorođene djece [147]. Genetske analize do danas su identificirale 24 mutacije u genu *PTCH1* u bolesnika s OFC-om, koje uzrokuju gubitak njegove funkcije [147]. Poremećaj regulacije signalnog puta HH-GLI rezultira nepotpunom fuzijom embrionalnih facijalnih nastavaka i posljedičnim razvojem rascjepa usne i/ili nepca [148]. Istraživanje Heynea i sur. eksperimentalno je to i potvrdilo, pokazavši da farmakološka inhibicija puta HH-GLI vismodegibom, inhibitorom proteina SMO, inducira OFC u mišjem modelu [149]. Što se tiče uloge signalnog puta HH-GLI u razvoju zuba, isti ima ključnu ulogu u nekoliko faza odontogeneze, uključujući formiranje krune i korijena te je ključan za pravilnu zubnu morfogenezu [150]. I zaključno, put HH-GLI smatra se važnim regulatorom populacije dentalnih matičnih stanica, što predstavlja temelj za razvoj novih regenerativnih terapijskih pristupa [151]. S obzirom na to da je signalni put HH-GLI tijekom embriogeneze ključan za precizno usklađenu morfogenezu i organizaciju tkiva glave i vrata, njegova reaktivacija u odraslom organizmu predstavlja jasan pokazatelj njegove potencijalno onkogene uloge u inicijaciji, razvoju i progresiji HNSCC-a, o čemu će biti više riječi u sljedećem poglavlju.

2.3.3. Uloga signalnog puta HH-GLI u tumorigenezi HNSCC-a

Iako je signalni put HH-GLI ključan u embriogenezi, diferencijaciji i proliferaciji stanica, on je u pravilu u odraslom organizmu inaktivan, dok je njegova aktivacija povezana s regeneracijom tkiva, a mutacije i funkcionalni poremećaji istog doprinose inicijaciji, progresiji, invaziji i preživljenju velikog broja tumora. S obzirom na to da pojedine komponente puta pripadaju skupini protoonkogeni (SHH, SMO i GLI) i tumor supresori (PTCH1 i SUFU), njihova prekomjerna aktivacija ili inaktivacija može dovesti do poremećene regulacije staničnih procesa koji pogoduju tumorigenezi [6]. U tumorigenezi se razlikuju četiri modela aktivacije puta HH-GLI. Tip I obuhvaća aktivaciju signalnog puta neovisnu o ligandu, koja je posredovana inaktivirajućim mutacijama u genima *PTCH1* i *SUFU*, aktivirajućim mutacijama *SMO* te amplifikacijama ili translokacijama *GLI1/GLI2*, što dovodi do konstitutivne aktivacije puta [6]. Tip II predstavlja autokrinu aktivaciju ovisnu o ligandu, gdje pojačana ekspresija liganda HH potiče proliferaciju tumorskih stanica koje ga i same proizvode. Ovaj se mehanizam javlja u tumorima dojke, jajnika, kože, pluća i kolona, uz stvaranje pozitivne povratne sprege aktivacije [152]. Tip III uključuje ligand-ovisnu parakrinu aktivaciju, u kojoj tumorsko tkivo prekomjerno eksprimira ligand HH djelujući na stanice strome, koje potom izlučuju čimbenike rasta poput VEGF-a i inzulinu sličnog faktora rasta 1 (eng. *insulin-like growth factor 1*, IGF-1), potičući angiogenezu i rast tumora [153]. Reverzna parakrina aktivacija, karakteristična za mijelome i limfome, nastaje kada stromalne stanice luče ligand HH koji potiče proliferaciju tumorskih stanica [154,155]. Tip IV označava alternativnu autokrinu ili parakrinu aberantnu aktivaciju puta u CSC-ovima, pri čemu HH-GLI potiče njihovo samoobnavljanje, diferencijaciju i proliferaciju, što doprinosi intratumorskoj heterogenosti [156]. Dodatno, gubitak aktivnosti tumorskog supresora p53 dodatno aktivira put HH-GLI i pojačava ekspresiju transkripcijskog faktora *NANOG*, važnog za samoobnavljanje embrionalnih matičnih stanica i reprogramiranje diferenciranih somatskih stanica u pluripotentne [157]. Iako mehanizmi aktivacije signalnog puta HH-GLI u HNSCC-u još uvijek nisu u potpunosti razjašnjeni, rezultati dosadašnjih istraživanja upućuju na to da bi u ovom tipu tumora mogla prevladavati reverzna parakrina aktivacija [158].

Uloga signalnog puta HH-GLI u tumorigenezi prvi put je opisana 1996. godine kod bolesnika s Gorlin-Goltzovim sindromom, rijetkom autosomno dominantnom bolesti koju karakterizira povećana incidencija odontogenih keratocista, bazocelularnog karcinoma (eng. *basal cell carcinoma*, BCC), meduloblastoma i rabdomiosarkoma [159]. Neovisna istraživanja pokazala su da inaktivirajuća mutacija *PTCH1* rezultira hiperaktivnošću koreceptora SMO kod

pacijenata oboljelih od ovog sindroma [160,161]. Gotovo dva desetljeća kasnije uvedena je inhibicija puta HH-GLI vismodegibom u kliničku praksu kod pacijenata s lokalno uznapredovalim ili metastatskim BCC-om te je pokazala dobru učinkovitost [162]. Na temelju ovih ohrabrujućih rezultata u idućim je godinama zabilježena aberantna aktivacija komponenti signalnog puta HH-GLI u brojim drugim tumorima, uključujući gliome, karcinom dojke, pluća, želuca i prostate [163–167] no to nije bilo slučaj s HNSCC-om, za koji i dalje postoje ograničena istraživanja, a posebno ona klinička. Prvo istraživanje signalnog puta HH-GLI u HNSCC-u pokazalo je da je pojačana ekspresija SHH povezana s lošijim ukupnim preživljenjem pacijenata [168]. Sljedeća istraživanja, najčešće imunohistokemijska, potvrdila su da su ključne komponente puta HH-GLI (SHH, PTCH1, SMO, GLI1-3) pojačano eksprimirane u tumorskom tkivu u odnosu na normalnu sluznicu [169,170]. Uočeno je i postupno pojačanje ekspresije proteina SHH počevši od normalne sluznice, preko displastičnih lezija, do invazivnog karcoma, što sugerira da je ovaj signalni put uključen u ranu fazu tumorigeneze [171]. Nekoliko studija pokazalo je da put HH-GLI ima ključnu ulogu u proliferaciji i invazivnosti HNSCC-a, pri čemu je upravo u uznapredovalim stadijima bolesti znatno češće zabilježena pojačana ekspresija njegovih ključnih komponenti [172–179]. Osim toga, nekoliko je studija pokazalo da SHH može utjecati na razvoj HNSCC-a koji invadira u mandibulu ili maksilu. Naime, pokazano je da SHH modulira diferencijaciju osteoklasta i potiče osteolizu, što rezultira uništenjem kosti [180,181]. Stoga navedeni rezultati predstavljaju potencijal za primjenu inhibitora signalnog puta HH-GLI kod tumora koji su invadirali u kosti. Na tragu toga, upravo je studija koju su proveli Qiao i sur. pokazala da primjena GDC-0449, inhibitora koreptora SMO, smanjuje osteolitičku aktivnost induciranu HNSCC-om u mišjem modelu [180]. Što se tiče korelacije između ekspresije komponenti signalnog puta HH-GLI i kliničkog ishoda kod bolesnika s HNSCC-om, ista još uvijek nije jasno definirana, no većina dosadašnjih istraživanja pokazala je da su pojačane razine SHH, PTCH1, SMO i GLI1 povezane s lošijim ukupnim preživljenjem, većom učestalošću recidiva i kraćim preživljenjem bez znakova bolesti [168,172,175,177,178,182,183]. Ipak, zabilježeni su i kontradiktorni rezultati, uključujući bolje preživljenje HPV- tumora s pojačanom ekspresijom GLI1 i GLI2 [184]. Na temelju svega navedenog, možemo zaključiti da su potrebna daljnja, metodološki ujednačenija istraživanja na većim kohortama, kako bi se jasnije odredio prognostički i biološki značaj signalnog puta HH-GLI u HNSCC-u.

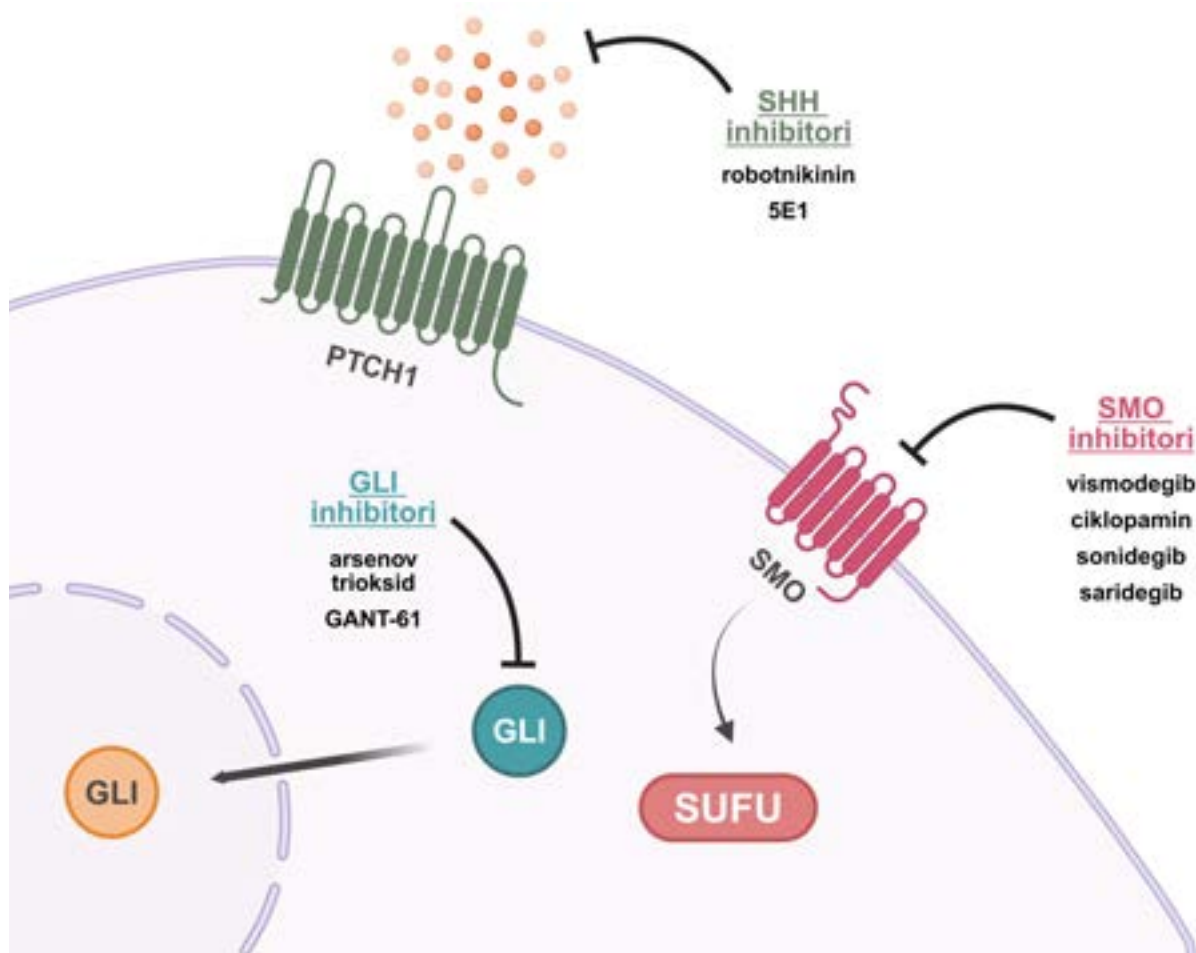
2.3.4. Inhibicija signalnog puta HH-GLI u HNSCC-u

Značajna uloga signalnog puta HH-GLI u razvoju brojnih tumora potaknula je intenzivna istraživanja ovog puta kao terapijske mete. Prvi otkriveni inhibitor signalnog puta HH-GLI bio je ciklopamin, steroidni alkaloid izoliran iz kukuruznog ljiljana (*Veratrum californicum*). Povezanost između ove biljke i inhibicije signalnog puta HH-GLI otkrivena je nakon opažanja pojave ciklopije kod janjadi ovaca koje su konzumirale kukuruzni ljiljan [185]. Iako je njegovo otkriće otvorilo put daljnjim istraživanjima puta HH-GLI, ciklopamin se zbog niske topljivosti i visoke toksičnosti više ne razmatra kao terapijska opcija [186]. U posljednjim desetljećima razvijeno je više od 50 inhibitora signalnog puta HH-GLI koji djeluju na različitim razinama signalne kaskade, a dio njih je ušao u preklinička i klinička ispitivanja [187]. Zanimljivo, prirodni spojevi poput kurkumina i resveratrola također pokazuju inhibitorski učinak na signalizaciju HH-GLI [188,189]. Slika 6. prikazuje potencijalne ciljne točke inhibicije u signalnoj kaskadi puta HH-GLI, pri čemu se inhibitori ovog puta mogu kategorizirati prema mjestu djelovanja kao inhibitori liganda SHH, koreptora SMO ili inhibitori transkripcijskih faktora GLI.

Inhibitori liganda SHH onemogućuju interakciju liganda s receptorom PTCH1 i na taj način potiskuju signalni put već u njegovoj inicijalnoj fazi. Prethodna istraživanja u različitim vrstama tumora pokazala su da je pojačana ekspresija SHH povezana s pojačanom signalizacijom HH-GLI [6]. Zbog toga farmakološka inhibicija liganda SHH predstavlja obećavajuću terapijsku strategiju koja se trenutno ispituje u prekliničkim modelima različitih tumora [190]. Unatoč tome, primjena inhibitora liganda SHH u HNSCC-u do sada nije opisana u dostupnoj literaturi.

Inhibitori koreptora SMO najčešći su inhibitori signalnog puta HH-GLI. Nakon odobrenja vismodegiba za liječenje neoperabilnog BCC-a 2012. godine dogodio se ključan iskorak u istraživanju inhibicije signalizacije HH-GLI [162]. Vrlo brzo nakon toga odobreni su sonidegib za primjenu kod pacijenata s BCC-om i glasdegib za liječenje pacijenata s akutnom mijeloičnom leukemijom [191,192], a razvijen je i veliki broj inhibitora SMO koji su ispitani između ostalog i u HNSCC-u. Glavno ograničenje ove terapije je razvoj rezistencije, što smanjuje dugoročnu učinkovitost [186]. Studija Mozeta i sur. pružila je prve dokaze da inhibicija signalnog puta HH-GLI može utjecati na biološke karakteristike stanica, analizirajući učinke ciklopamina, cisplatine i docetaksela na stvaranje kolonija kod stanica HNSCC-a [193]. Ciklopamin je značajno smanjio stvaranje kolonija, a u kombinaciji s cisplatinom ili docetakselom dodatno je povećao kemosenzitivnost stanica, što sugerira postojanje

sinergističkog učinka inhibicije puta HH-GLI i standardne kemoterapije [193]. Gan i sur. proširili su ove rezultate pokazavši da ciklopamin povećava radiosenzitivnost stanica HNSCC-a, blokirajući aktivaciju GLI1 [158], a Hehlhans i sur. potvrdili su ovaj učinak upotrebom vismodegiba, koji je doveo do smanjenja ekspresije GLI1 i jačeg odgovora na radioterapiju [194].



Slika 6. Ciljne razine djelovanja inhibitora signalnog puta HH-GLI. Shema prikazuje ključne razine inhibicije signalnog puta HH-GLI, uključujući inhibitore liganda SHH, koreptora SMO i transkripcijskih faktora GLI. Izrađeno pomoću BioRender.com.

Nedavna istraživanja na staničnim linijama OSCC-a dodatno su poduprla terapijski potencijal inhibitora SMO-a, budući da je pokazano da vismodegib inducira apoptozu, smanjuje proliferaciju i uzrokuje izražene morfološke promjene tumorskih stanica [195]. Iako je u više istraživanja potvrđeno da inhibitori SMO-a smanjuju ekspresiju ključnih komponenti signalnog puta HH-GLI [158,194,195], na temelju rezultata iz drugih solidnih tumora, s obzirom na čest razvoj rezistencije na inhibitore SMO-a predlaže se istovremena upotreba više inhibitora koji

ciljaju različite signalne puteve [196]. Kombinirana inhibicija signalnih puteva HH-GLI i EGFR pokazala je povoljne učinke u eksperimentalnim modelima, što je izuzetno važno s obzirom na to da je cetuksimab, monoklonalno antitijelo usmjereno na EGFR, jedina ciljana terapija odobrena za liječenje HNSCC-a [197–199]. Točnije, kombinacija cetuksimaba i vismodegiba s cisplatinom i docetakselom značajno je reducirala proliferaciju i sposobnost stvaranja kolonija stanica HNSCC-a [198]. Isto tako, inhibicija signalnog puta mTOR dodatno pojačava djelovanje inhibitora HH-GLI u HNSCC-u [158]. Kleszcz i sur. ispitali su kombiniranu inhibiciju više signalnih puteva u HNSCC-u, uključujući HH-GLI (vismodegib), WNT/ β -katenin (PRI-724), PI3K (HS-173) i EGFR (erlotinib) te su pokazali da inhibitori primijenjeni zajedno imaju jači učinak nego kao monoterapije [200]. Najizraženiji sinergistički efekt postignut je dvostrukom inhibicijom signalnih puteva WNT i HH-GLI, što je rezultiralo smanjenjem migracijske sposobnosti i jačim antiproliferativnim učinkom, dok su kombinacije PRI-724 s erlotinibom ili HS-173 imale proapoptotski učinak [200]. Učinkovitije smanjenje proliferacije i migracije dodatno podupire koncept multiterapijskog pristupa, koji se u drugim tumorima već ispituje u vidu kombinacije inhibitora HH-GLI sa standardnom kemoterapijom ili ciljanim lijekovima [201]. Do danas su provedena samo dva klinička ispitivanja inhibitora SMO-a u HNSCC-u, pri čemu je jedno od njih (NCT04007744), koje procjenjuje kombiniranu primjenu sonidegiba i pembrolizumaba u različitim tumorima, uključujući metastatski HNSCC, još uvijek u tijeku te se nalazi u fazi I. S druge strane, kliničko ispitivanje NCT01255800 pokazalo je da kombinacija cetuksimaba i saridegiba (IPI-926) ima podnošljivu toksičnost. Također, klinički odgovor bio je povezan sa smanjenom ekspresijom *EGFR* i gena članova signalnog puta HH-GLI, no u samo 12,5 % bolesnika postignut je djelomičan klinički odgovor [202]. Upotreba saridegiba može modulirati signalizaciju putem EGFR-a i pojačati odgovor na cetuksimab, no nije dovoljna za prevladavanje prethodno stečene rezistencije, pa je predloženo da se isti uvede kao terapija prije uvođenja cetuksimaba. Zaključno, ova je studija imala nekoliko metodoloških ograničenja, uključujući ograničeni i heterogeni uzorak ($n = 9$), što upućuje na to da je dobivene rezultate potrebno potvrditi na većoj i homogenijoj kohorti [202]. Otpornost na inhibiciju SMO-a i općenita neusklađenost između rezultata *in vitro* i *in vivo* vjerojatno je rezultat genetskih i epigenetskih promjena koje rezultiraju trajnom aktivacijom faktora GLI. Poznato je da brojni signalni putevi, uključujući WNT, MAPK, NF- κ B, PI3K i TGF β mogu aktivirati transkripciju faktora GLI putem nekanonskih mehanizama, što znači da inhibicija SMO-a sama po sebi često nije dovoljna za dokidanje signalnog puta HH-GLI u tumoru [201].

Inhibitori transkripcijskih faktora GLI najprivlačnija su terapijska meta, budući da

predstavljaju posljednju efektorsku komponentu signalnog puta HH-GLI i izravno reguliraju ekspresiju njegovih ciljnih gena. Iako je razvijeno više inhibitora faktora GLI, samo je nekolicina ispitana u istraživanjima *in vitro* kod HNSCC-a. Najistraženiji antagonist GLI-jeva je arsenov trioksid (ATO), odobren za liječenje akutne mijeloične leukemije, no pokazao je i antitumorsku aktivnost u solidnim tumorima, uključujući HNSCC [203]. Pokazano je da u staničnim linijama OSCC-a ATO smanjuje ekspresiju GLI1, inducira morfološke promjene, fragmentaciju jezgre i apoptozu [204]. Isto tako, nekoliko studija *in vitro* pokazalo je da ATO povećava osjetljivost tumorskih stanica na cisplatinu te potencira njihov sinergistički antitumorski učinak [205–207], a dodatno može i značajno povećati radiosenzitivnost stanica HNSCC-a [208]. U skladu s dosadašnjim rezultatima, najnovija istraživanja usmjerena su na kombinirane terapijske strategije koje uključuju ATO s drugim citotoksičnim agensima. Nadalje, slične učinke pokazuje i GANT 61, drugi poznati inhibitor faktora GLI, koji u staničnim modelima OSCC-a smanjuje ekspresiju GLI1 i GLI2 te potiče apoptozu [209,210]. Zubčić i sur. također su pokazali da GANT 61 i litijev klorid, inhibitor GSK3 β , dovode do supresije proliferacije i rasta staničnih linija HNSCC-a [211]. Zaključno, unatoč ohrabrujućim rezultatima *in vitro*, većina inhibitora signalnog puta HH-GLI još nije uvrštena u klinička ispitivanja kod HNSCC-a, što upućuje na nužnost daljnjeg razvoja kombiniranih terapijskih pristupa usmjerenih na više signalnih puteva, s ciljem prevladavanja rezistencije i unaprjeđenja terapijske učinkovitosti u HNSCC-u.

2.4. Interakcija između signalnih puteva ER i HH-GLI

Posljednjih desetljeća postalo je jasno da tumorigeneza nije rezultat djelovanja pojedinačnih signalnih puteva, već međusobne interakcije i dinamične komunikacije signalnih mreža. Izražene spolne razlike u incidenciji i mortalitetu HNSCC-a, uz činjenicu da su temeljni mehanizmi tih razlika nedovoljno istraženi, jasno ukazuju na potrebu istraživanja međudjelovanja spolnih hormona i njihovih receptora te signalnih puteva uključenih u tumorigenezu HNSCC-a, poput puta HH-GLI. Takav pristup mogao bi pružiti bolji uvid u biološku osnovu spolnih razlika i otvoriti nove mogućnosti za preciznije terapijske pristupe. Iako su signalni putevi receptora estrogena i HH-GLI dugo proučavani zasebno, ER kao transkripcijski faktori ovisni o hormonima, a HH-GLI kao ključni regulator embriogeneze i onkogeni signalni put, suvremeni dokazi potvrđuju njihovu međusobnu funkcionalnu, transkripcijsku i potencijalno fizičku interakciju, osobito zbog zajedničke ovisnosti o

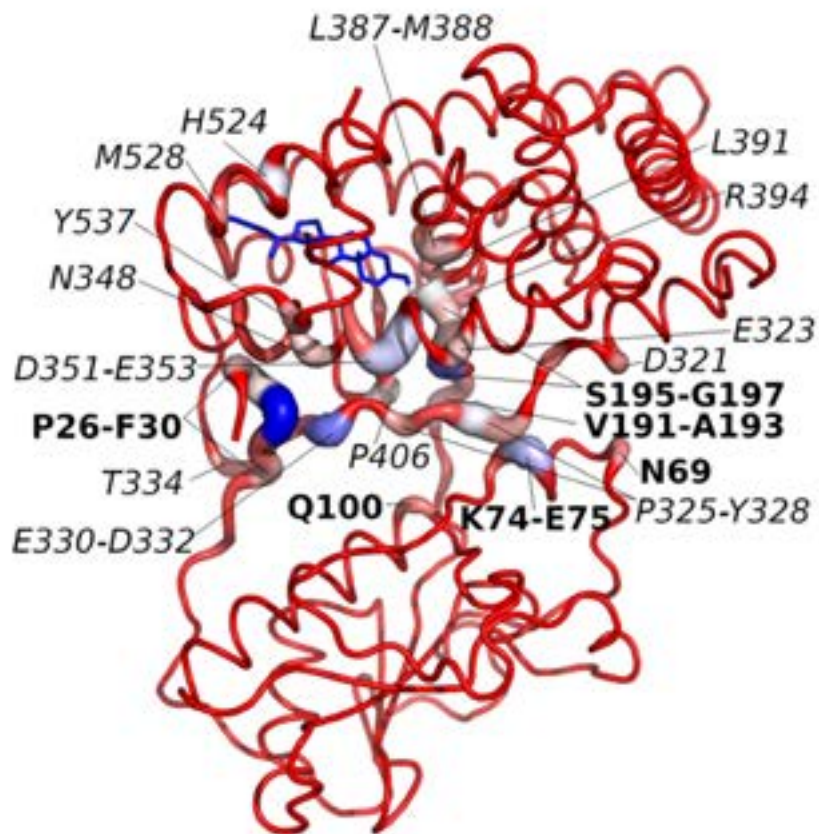
kolesterolu, koji je istodobno prekursor u sintezi svih steroidnih hormona i ključna posttranslacijska modifikacija liganda HH.

Kolesterol je polazni supstrat biosinteze steroidnih hormona, uključujući estrogene, u procesu steroidogeneze. Pretvorba kolesterola u pregnenolon predstavlja prvi korak steroidogeneze i rezultira nastankom progesterona, androgena i konačno estrogena [212]. Povećana dostupnost kolesterola u tumorskim stanicama, što je tipično za metabolički reprogramirane tumore, može dovesti do pojačane sinteze estrogena i posljedično pojačanje signalizacije putem ER [213]. Istodobno, ligand SHH zahtijeva posttranslacijsku kolesterolsku modifikaciju kako bi nastala aktivna forma proteina. Nakon autokatalitičkog cijepanja liganda SHH nastaje aktivni N-terminalni fragment (SHH-N), na čiji se C-terminalni kraj kovalentno veže kolesterol [214]. Također, proteini SHH prolaze dodatnu lipidnu modifikaciju vezanja palmitinske kiseline na N-terminalni kraj proteina, što dodatno pojačava njihovu aktivnost [215]. Dvostruka lipidna modifikacija predstavlja ključni dio sinteze i procesiranja proteina SHH i ima važnu ulogu u lokalizaciji i kontroliranoj sekreciji proteina s membrane, što je preduvjet za normalnu međustaničnu signalizaciju [216]. Stoga je ključno naglasiti da oba signalna puta dijele zajedničku metaboličku osnovu ovisnu o kolesterolu, što snažno podupire hipotezu o njihovom izravnom međudjelovanju te ukazuje na to da poremećaji u lipidnom metabolizmu mogu paralelno modulirati aktivnost oba signalna puta.

Dosadašnja istraživanja međudodosa signalnih puteva ER i HH-GLI gotovo isključivo su provedena samo na tumorima ovisnim o hormonima. Jedna od prvih studija pokazala je da ER α može regulirati signalni put HH-GLI u ER α ⁺ staničnim linijama dojke putem indukcije ekspresije SHH te da je navedena regulacija potencijalno važna za razvoj raka dojke [7]. Isto je pokazano i kod ER α ⁺ raka želudca, gdje aktivacija ER α potiče proliferaciju stanica preko indukcije SHH i posljedične aktivacije signalnog puta HH-GLI [217]. S druge strane, istraživanje Kameda i sur. pokazalo je da primjena ciklopamina, kao i smanjenje ekspresije GLI1 kod ER α negativnih staničnih linija raka dojke, značajno smanjuje proliferaciju i invaziju stanica [218]. Slično, u stanicama raka dojke otpornima na TAM pokazana je pojačana ekspresija proteina GLI1, a njegova inhibicija smanjila je proliferaciju i transkripcijsku aktivnost ER α neovisno o estradiolu te je primjena kombinacije terapij TAM-a i GANT 61 efikasnije inhibirala rast tumorskih stanica u usporedbi sa samim TAM-om. Osim toga, pojačana ekspresija GLI1 povezana je s lošijim preživljenjem bez udaljenih metastaza kod ER α ⁺ raka dojke [219]. Dodatno, Sun i sur. pokazali su da tretman estradiolom aktivira GLI1, čime se potiče obnavljanje CSC-ova i EMT u istom tumorskom modelu, što je rezultiralo povećanom invazivnošću tumora [220]. Također, istraživanje Massaha i sur. ukazuje na to da

ER α stupa u interakciju i s GLI3 te da tretman estradiolom rezultira stabilizacijom GLI3 i pojačanom ekspresijom ciljnih gena GLI-jeva, kao i da su stanice tumora dojke ovisne o GLI3 za održavanje svoje proliferacije i rasta [221]. Međutim, istraživanje provedeno u našem laboratoriju ispitalo je učinke simultane primjene ciklopamina i TAM-a kod ER α + stanica raka dojke i pokazalo da, usprkos individualnoj citotoksičnosti oba lijeka, njihova kombinirana primjena uzrokuje kratkotrajan porast stope preživljenja stanica i značajno povećanu migratornu sposobnost. Također, studija je pokazala da SHH može aktivirati ER α neovisno o faktoru GLI1, ukazujući na nekanonsku regulaciju signalnih puteva i postojanje složenog mehanizma regulacije istih koji potencijalno doprinosi rezistenciji na terapiju i povećanoj invazivnosti tumora [8]. Ovaj fenomen mogao bi biti izrazito važan i kod HNSCC-a, gdje su oba puta istodobno aktivna u brojnim podtipovima tumora. U takvim okolnostima tumor može preferencijalno aktivirati alternativni signalni put kojim će održavati proliferaciju i migraciju, čime se potiče terapijska rezistencija i smanjuje učinkovitost primjene monoterapija. Navedeni primjeri interakcije signalnih puteva ER i HH-GLI dokazuju da postoji dvosmjerna interakcija između istih te se vjerojatno stvara pozitivna povratna petlja u kojoj ova puta međusobno djeluju s ciljem preživljenja i daljnjeg razvoja i širenja tumora.

Naše istraživanje *in silico*, temeljeno na molekulskom uklapanju, po prvi put je potvrdilo da interakcija između signalnih puteva ER i HH-GLI nije samo teorijski predviđena, već da je molekularno izvediva i stabilna prema računalnim simulacijama [9]. U navedenom radu pokazali smo da aktivna forma proteina SHH (SHH-N) ima izuzetno visok afinitet vezanja za ER α , jači nego prema drugim steroidnim receptorima (Slika 7.). Dobiveni rezultati potvrđuju potencijalnu biološku i kliničku relevantnost ove nekanonske interakcije, s obzirom na to da inhibicija ove interakcije može predstavljati novu strategiju liječenja tumora otpornih na endokrinu terapiju. Također, studija provedena u našem laboratoriju pokazala je da ligand SHH može stupati u fizičku interakciju s receptorom ER α u tumorskim stanicama raka dojke, čime se dodatno potvrđuje biološka relevantnost izravnog međudjelovanja ovih signalnih puteva [8]. Zajedno, ovi nalazi upućuju na postojanje složene, dvosmjerne regulacijske mreže između signalnih puteva ER i HH-GLI, čije razumijevanje predstavlja ključ za tumačenje biološke heterogenosti HNSCC-a. Istraživanjem interakcije navedenih signalnih puteva, ovaj rad usmjeren je na razjašnjavanje jedne od ključnih, do sada nedovoljno razjašnjenih osi koje oblikuju biološko ponašanje HNSCC-a.



Slika 7. Kompleks ERα-SHH-N-kolesterol. Prikaz stabilnog kompleksa ERα i aktivne forme proteina SHH (SHH-N) u prisutnosti kolesterola, dobiven analizom *in silico*, s istaknutim aminokiselinskim ostacima koji doprinose ostvarenju fizičkog kontakta između proteina i stabilnosti kompleksa. Kolesterol je prikazan kao štapićasti model (plavo) vezan uz SHH-N. Preuzeto iz [9].

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

3.1.1. Kemikalije i puferi

Tablica 1. Popis korištenih kemikalija i njihovih proizvođača

Kemikalija	Proizvođač
Agar	Merck & Co., SAD
Agaroza	Sigma Aldrich, SAD
Akrlamid/bis-akrlamid	Sigma Aldrich, SAD
Ampicilin	Sigma Aldrich, SAD
APS (amonijev persulfat)	Sigma Aldrich, SAD
Apsolutni etanol	Gram-Mol, Hrvatska
Arsenov trioksid	Sigma Aldrich, SAD
Bromfenol plavo	Sigma Aldrich, SAD
BSA (albumin iz goveđeg seruma)	Thermo Fisher Scientific, SAD
DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol)	Thermo Fisher Scientific, SAD
DMSO (dimetil sulfoksid)	Gram-Mol, Hrvatska
DTT (ditiotreitol)	Sigma Aldrich, SAD
EDTA (etilendiamintetraoctena kiselina)	Kemika, Hrvatska
Ekstrakt kvasca	Sigma Aldrich, SAD
FBS (fetalni goveđi serum)	Sigma Aldrich, SAD
Fenol	Sigma Aldrich, SAD
Formaldehid, otopina min. 36 %	Kemika, Hrvatska
Formamid Hi-Di	Thermo Fisher Scientific, SAD
GANT 61	Selleck Chemicals, Njemačka
Glicerol	Kemika, Hrvatska
Glicin	Kemika, Hrvatska
Izoamilni alkohol	Kemika, Hrvatska
Izopropanol	Gram-Mol, Hrvatska
KH_2PO_4 / Na_2HPO_4 / KCl / NaCl / CaCl_2 / $\text{MgCl}_2/\text{NaOH}$	Kemika, Hrvatska
Kloroform	Kemika, Hrvatska
Klorovodična kiselina	Gram-Mol, Hrvatska
Kristal ljubičasto	Sigma Aldrich, SAD
LB (Luria-Bertani broth)	Sigma Aldrich, SAD
L-glutamin	Sigma Aldrich, SAD

Tablica 1. - nastavak

Matrigel Growth Factor Reduced Basement Membrane Matrix	Corning Inc., SAD
Metanol	Kemika, Hrvatska
MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijev bromid)	Sigma Aldrich, SAD
Naftol plavo	Kemika, Hrvatska
Natrijev acetat	Kemika, Hrvatska
Natrijev deoksikolat	Kemika, Hrvatska
Natrijev piruvat	Thermo Fisher Scientific, SAD
Nonidet P-40	Calbiochem, SAD
Obrano mlijeko u prahu	Dukat, Hrvatska
Octena kiselina	Kemika, Hrvatska
Propidijev jodid (PI)	Sigma Aldrich, SAD
Puromicin	Sigma Aldrich, SAD
SDS (natrijev dodecil sulfat)	Sigma Aldrich, SAD
Sonidegib	Selleck Chemicals, Njemačka
Penicilin-Streptomycin	Thermo Fisher Scientific, SAD
RNaza A	Sigma Aldrich, SAD
Tamoksifen	Toronto Research Chemicals, Kanada
TEMED (tetrametiletilendiamin)	Sigma Aldrich, SAD
Tripansko modriilo	Sigma Aldrich, SAD
Tripsin	Sigma Aldrich, SAD
Tris baza	Sigma Aldrich, SAD
Tween20	Sigma Aldrich, SAD
Ultračista voda Milli-Q	Institut Ruđer Bošković, Zagreb
Vismodegib	Selleck Chemicals, Njemačka

Tablica 2. Popis korištenih pufera i otopina te njihov sastav

Pufer/otopina	Sastav
10 % APS	10 % (w/v) amonijev persulfat
10 % SDS	10 % (w/v) natrijev dodecil sulfat
2x LB: pufer za nanošenje proteina	50 % (v/v) 4x LB razrijeđen u qH ₂ O
3,6 % Formaldehid	3,6 % (v/v) formaldehid u PBS-u
30 % AAS	29,2 % (w/v) akrilamid, 0,8 % (w/v) bis-akrilamid

Tablica 2. - nastavak

4x LB: pufer za nanošenje proteina	0,2 M Tris-HCl pH = 6,8, 0,4 M DTT, 8 % (w/v) SDS, 40 % (v/v) glicerol, 0,001 % (w/v) bromfenol plavo
Fosfatni pufer (PBS)	137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 1,4 mM KH ₂ PO ₄ , 4,3 mM Na ₂ HPO ₄ × 7 H ₂ O, pH = 7,4
Otopina boje naftol plavo	10 % (v/v) metanol, 2 % (v/v) octena kiselina, 0,1% (w/v) naftol plavo
Otopina mlijeka za blokiranje membrane	5 % (w/v) mlijeko u prahu u puferu TBST
Otopina za blokiranje (IF)	2 % (w/v) BSA u PBS-u
Otopina za eluciju	10 mM Tris-HCl, pH = 8,0
Otopina za odbojavanje	50 % (v/v) metanol, 7 % (v/v) octena kiselina
Pufer PBS-Tween20	0,02 % (v/v) Tween20 u PBS-u
Pufer RIPA	25 mM Tris-HCl, 1 % (w/v) Na-deoksikolat, 1 % (v/v) Nonidet P-40, 150 mM NaCl, 0,1 % (w/v) SDS
Pufer TAE	40 mM Tris, 20 mM octena kiselina, 1 mM EDTA
Pufer TBST	50 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,05 % (v/v) Tween20, pH = 7,5
Pufer TE	10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH = 8,0
Pufer TENN	50 mM Tris pH = 7,4, 5 mM EDTA, 150 mM NaCl, 0,5% (v/v) Nonidet P-40
Pufer za elektroforezu (RB)	1 M glicin, 50 mM Tris, 1 % (w/v) SDS
Pufer za izolaciju DNA	10 mM Tris-HCl, 0,4 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1 % (w/v) SDS, pH = 8,0
Pufer za oblaganje (<i>coating buffer</i>)	0,7 % (w/v) NaCl, 0,01 M Tris, pH = 8,0
Pufer za prijenos proteina (TB)	200 mM Tris, 1,5 mM glicin, 10 % (v/v) metanol
Tris za gel za razdvajanje	1,5 M Tris pH = 8,8
Tris za gel za sabijanje	1,0 M Tris pH = 6,8

3.1.2. Komercijalne otopine, enzimi, standardi i kompleti

Tablica 3. Popis komercijalnih otopina, enzima, standarda i kompleta te njihovih proizvođača

Proizvod	Proizvođač
1 Kb plus DNA marker	Thermo Fischer Scientific, SAD
AAVS1 Transgene knockin vector kit	Origene, SAD
BigDye Terminator v3.1 Ready Reaction Cycle Sequencing	Thermo Fischer Scientific, SAD
BSA standardi	Thermo Fischer Scientific, SAD
dNTP-ovi	Thermo Fisher Scientific, SAD

Tablica 3. - nastavak

Dynabeads Protein G	Thermo Fischer Scientific, SAD
FastStart Taq DNA Polymerase	Roche, Švicarska
GoTaq Flexi Buffer	Promega, SAD
GoTaq Hot Start DNA Polymerase	Promega, SAD
High-Capacity cDNA Reverse Transcription	Thermo Fischer Scientific, SAD
Inhibitori proteaza Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail Tablets	Roche, Švicarska
Medij za uklapanje Biomount New	Biognost, Hrvatska
Midori Green Advance	NIPPON Genetics EUROPE, Njemačka
Muse Caspase-3/7 Kit	Cytek Biosciences, SAD
NucleoSpin Plasmid EasyPure kit	Macherey-Nagel, Njemačka
NucleoZOL	Macherey-Nagel, Njemačka
Pierce BCA Protein Assay Kit	Thermo Fischer Scientific, SAD
PrimeSTAR GXL Buffer	Takara Bio, Japan
PrimeSTAR GXL DNA Polymerase	Takara Bio, Japan
Proteinaza K (MC5008)	Promega, SAD
Proteinski marker CozyHi Prestained Protein Ladder	highQu GmbH, Njemačka
Pufer s Mg^{2+}	Roche, Švicarska
QIAEX II Gel Extraction Kit	Qiagen, Njemačka
rCutSmart Buffer	New England Biolabs, SAD
Restriksijski enzim MluI-HF	New England Biolabs, SAD
Restriksijski enzim SalI-HF	New England Biolabs, SAD
RNAlater	Thermo Fischer Scientific, SAD
SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix	Bio-Rad Laboratories, SAD
SuperSignal West Femto	Thermo Fischer Scientific, SAD
SuperSignal West Pico	Thermo Fischer Scientific, SAD
T4 DNA Ligase	New England Biolabs, SAD
T4 DNA Ligase Reaction Buffer	New England Biolabs, SAD
Xfect RNA Transfection Reagent	Takara Bio, Japan
Zymo Quick-RNA Miniprep Kit	Zymo Research, SAD

Tablica 4. Popis korištenih primarnih antitijela i njihovih proizvođača

Primarno antitijelo	Domaćin	Referentni broj	Proizvođač	Razrjeđenje	Metoda
ER α	miš	(F-10): sc-8002	Santa Cruz Biotechnology, SAD	1:50	WB, IF, Co-IP

Tablica 4. - nastavak

ER β	miš	(B-1): sc-390243	Santa Cruz Biotechnology, SAD	1:50	WB, IF, Co-IP
GLI1	zec	NB600-600	Novus Biologicals, SAD	1:500	WB
PTCH1	zec	A0826	ABclonal Technology, SAD	1:500	WB
SHH	miš	(E-1): sc-365112	Santa Cruz Biotechnology, SAD	1:50	WB, Co-IP
β -aktin	miš	8H10D10	Cell Signaling Technology, SAD	1:4000	WB

Tablica 5. Popis korištenih sekundarnih antitijela i njihovih proizvođača

Sekundarno antitijelo	Domaćin	Referentni broj	Proizvođač	Razrjeđenje	Metoda
HRP anti-zečji IgG	koza	554021	BD Pharmingen, SAD	1:6000	WB
HRP anti-mišji IgG	koza	554002	BD Pharmingen, SAD	1:8000	WB
Alexa Fluor 594 Conjugate	miš	8890	Cell Signaling Technology, SAD	1:100	IF
Peroxidase AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG, Fc γ fragment specific	koza	AB_2338506	Jackson Immuno Research, SAD	1:5000	Co-IP
Peroxidase AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG, light chain specific	koza	AB_2338512	Jackson Immuno Research, SAD	1:5000	Co-IP

3.1.3. Instrumenti i materijali

Tablica 6. Popis korištenih instrumenata i njihovih proizvođača

Instrument	Proizvođač
Analitička vaga Mettler PM4000	Mettler-Toledo, Švicarska
Centrifuga 5415R	Eppendorf, Njemačka
Centrifuga 5804R	Eppendorf, Njemačka
CFX Opus 96 Real-Time PCR System	Bio-Rad Laboratories, SAD
EVOS Fluid Imaging System	Thermo Fisher Scientific, SAD
Fluorescentni svjetlosni mikroskop Olympus BX51	Olympus Corporation, Japan
Hladnjak	Gorenje, Slovenija
Inkubator Memmert 100-800	Memmert, Njemačka
Inkubator tresilica Heidolph1000	Heidolph, Njemačka
Inkubator za rast stanica Memmert ICO150	Memmert, Njemačka
Kabinet s laminarnim protokom zraka	Iskra, Slovenija
Kamera za mikroskop Dino-Eye AM7023 (R4)	AnMo Electronics, Tajvan
Modul za prijenos proteina Mini Trans-Blot	Bio-Rad Laboratories, SAD
Protočni citometar Guava Muse Cell Analyzer	Luminex, SAD
SeqStudio Genetic Analyzer	Thermo Fisher Scientific, SAD
Sonifikator Labsonic M	Sartorius, Njemačka
Spektrofotometar Multiskan MS	Labsystems Diagnostics, Finska
Spektrofotometar NanoPhotometer N60/N50	Implen, Njemačka
Spremnik s tekućim dušikom	Haier Biomedical, Kina
Sustav za agaroznu gel elektroforezu Sub-Cell GT	Bio-Rad Laboratories, SAD
Sustav za SDS-PAGE elektroforezu Mini-PROTEAN III	Bio-Rad Laboratories, SAD
Svjetlosni mikroskop Boeco Germany BIB-100	Boeco, Njemačka
Termo tresilica za mikropruvete TS-100	Biosan, Latvija
Thermo Savant DNA 120 SpeedVac	Thermo Fisher Scientific, SAD
Uređaj za PCR GeneAmp PCR System 2700	Applied Biosystems, SAD
Uređaj za sekvenciranje NovaSeq 6000	Illumina, SAD
UV-transiluminator Vilber TFX-20 MC	Vilber Lourmat, Njemačka
UVITEC Alliance Q9 Mini	UVItec Cambridge, Ujedinjeno Kraljevstvo
UVItec Cambridge Alliance 4.7	UVItec Cambridge, Ujedinjeno Kraljevstvo
Veriti™ 96-Well Fast Thermal Cycler	Applied Biosystems, SAD
Vorteks miješalica LLG-uniTEXER	Lab Logistics Group, Njemačka
Zamrzivač ultra niske temperature ULF50086	Infrico Medcare, Španjolska

Tablica 7. Popis korištenih materijala i njihovih proizvođača

Materijal	Proizvođač
Epruveta za zamrzavanje stanica	Greiner Bio-One, Austrija
Filter s veličinom pora 0,2 µm	Macherey-Nagel, Njemačka
Komorice za invaziju Falcon Permeable Support for 24-well Plate with 8.0 µm Transparent PET Membrane	Corning Inc., SAD
Magnetni stalak DynaMag	Invitrogen, SAD
Mikroepruvete (0,2 mL, 0,5 mL, 1,5 mL, 2 mL i 5 mL)	Thermo Fischer Scientific, SAD
Nitrocelulozna membrana veličine pora 0,2 µm	Amersham Biosciences, Ujedinjeno Kraljevstvo
Parafilm M	Bemis Manufacturing Company, SAD
Plastične epruvete Falcon (15 i 50 mL)	Corning Life Sciences, SAD
Pločice za rast stanica (6/24/96 bunarčića)	Sarstedt, Njemačka
Pokrovna stakalca	Biognost, Hrvatska
Predmetna stakalca	Biognost, Hrvatska
Bočice za rast stanica T25/T75	Sarstedt, Njemačka
µ-Slide 18 Well	ibidi GmbH, Njemačka

3.1.4. Plazmidi i početnice

Tablica 8. Popis korištenih plazmida i njihovih proizvođača

Ime plazmida	Proizvođač
pCMV-hERalpha	Addgene, SAD
pCMV3-ER beta	Sino Biological, Kina
pCas-Guide-AAVS1	Origene, SAD
pAAVS1-Puro-DNR	Origene, SAD
pAAVS1-Puro- <i>ESR1</i>	dizajniran u sklopu ovog doktorskog rada
pAAVS1-Puro- <i>ESR2</i>	dizajniran u sklopu ovog doktorskog rada

Tablica 9. Popis i sekvence korištenih početnica za izrezivanje fragmenata gena *ESR1* i *ESR2* iz plazmida donora

Ciljni gen	Naziv početnice	Sekvenca	Originalna sekvenca u plazmidu
<i>ESR1</i>	<i>ESR1</i> cloning F	5'- TGCAGAGTCGACGAATTC CGGCCACGGACCAT-3'	5'- TGCAGATTTCGACGAATTCCG GCCACGGACCAT-3'

Tablica 9. - nastavak

<i>ESR1</i>	<i>ESR1</i> cloning R	5'- ATTCG <u>ACGCGT</u> TCCGCCA GGGAGCTCTCAGACTG-3'	5'- ATTCG <u>ACGAAT</u> TCCGCCAGG GAGCTCTCAGACTG-3'
<i>ESR2</i>	<i>ESR2</i> cloning F	5'- CTCCACAGGT <u>GTCGACTC</u> CCAGGTCCAA-3'	5'- CTCCACAGGT <u>GTCCACTCCC</u> AGGTCCAA-3'
	<i>ESR2</i> cloning R	5'- TTCGGCGG <u>ACGCGT</u> TAGA TTTACTGAGA-3'	5'- TTCGGCGG <u>CCGCTC</u> TAGATT TACTGAGA-3'

Tablica 10. Popis i sekvence korištenih početnica za detekciju HPV-a lančanom reakcijom polimerazom

Ciljni gen/regija	Naziv početnice	Sekvenca	Referenca
β-globin	PC04	5'-GAAGAGCCAAGGACAGGTAC-3'	[222]
	GH20	5'-CAACTTCATCCACGTTTACC-3'	
PGMY (L1)	PGMY11-A	5'-GCACAGGGACATAACAATGG-3'	[223]
	PGMY11-B	5'-GCGCAGGGCCACAATAATGG-3'	
	PGMY11-C	5'-GCACAGGGACATAATAATGG-3'	
	PGMY11-D	5'-GCCCAGGGCCACAACAATGG-3'	
	PGMY11-E	5'-GCTCAGGGTTTAAACAATGG-3'	
	PGMY09-F	5'-CGTCCCAAAGGAAACTGATC-3'	
	PGMY09-G	5'-CGACCTAAAGGAAACTGATC-3'	
	PGMY09-H	5'-CGTCCAAAAGGAAACTGATC-3'	
	PGMY09-Ia	5'-GCCAAGGGGAAACTGATC-3'	
	PGMY09-J	5'-CGTCCCAAAGGATACTGATC-3'	
	PGMY09-K	5'-CGTCCAAGGGGATACTGATC-3'	
	PGMY09-L	5'-CGACCTAAAGGGAATTGATC-3'	
	PGMY09-M	5'-CGACCTAGTGGAAATTGATC-3'	
	PGMY09-N	5'-CGACCAAGGGGATATTGATC-3'	
	PGMY09-Pa	5'-GCCCAACGGAAACTGATC-3'	
	PGMY09-Q	5'-CGACCCAAGGGGAACTGGTC-3'	
	PGMY09-R	5'-CGTCCTAAAGGAACTGGTC-3'	
	HMB01b	5'-GCGACCCAATGCAAATTGGT-3'	
HPV-16 (L1/LCR)	F HPV-16	5'-CCCAGCTGTAATCATGCATGGAGA-3'	[224]
	R HPV-16	5'-GTGTGCCCATTAACAGGTCTTCCA-3'	
HPV-18 (E6/E7)	F HPV-18	5'-CGACAGGAACGACTCCAACGA-3'	[224]
	R HPV-18	5'-GCTGGTAAATGTTGATGATTAAC-3'	

Tablica 10. - nastavak

HPV-33 (E1/E2)	F HPV-33	5'-ATGATAGATGATGTAACGCC-3'	[225]
	R HPV-33	5'-GCACACTCCATGCGTATCAG-3'	

Tablica 11. Popis i sekvence korištenih početnica za određivanje ekspresije gena kvantitativnom lančanom reakcijom polimerazom

Ciljni gen	Smjer	Sekvenca	Referenca
<i>RPLP0</i>	F	5'-GGCACCATTGAAATCCTGAGTGATGTG-3'	[226]
	R	5'-TTGCGGACACCCTCCAGGAAGC-3'	
<i>ESR1</i>	F	5'-CAGATGGTCAGTGCCTTGTTGG-3'	[227]
	R	5'-CCAAGAGCAAGTTAGGAGCAAACAG-3'	
<i>ESR2</i>	F	5'-ATGGAGTCTGGTCGTGTGAAGG-3'	OriGene HP225829
	R	5'-TAACACTTCCGAAGTCGGCAGG-3'	
<i>GPER1</i>	F	5'-TTCCGCGAGAAGATGACCATCC-3'	OriGene HP234520
	R	5'-TAGTACCGCTCGTGCAGGTTGA-3'	
<i>SCN2A</i>	F	5'-GCTTCCGCTTCTTTACCAGG-3'	[228]
	R	5'-GCGTTCCTGTTTGGGTCTCT-3'	
<i>SHH</i>	F	5'-GAAAGCAGAGAACTCGGTGG-3'	[229]
	R	5'-GGTAAGTGAGGAAGTCGCTG-3'	
<i>PTCH1</i>	F	5'-TCCTCGTGTGCGCTGTCTTCCTTC-3'	[230]
	R	5'-CGTCAGAAAGGCCAAAGCAACGTGA-3'	
<i>GLII</i>	F	5'-CTTGTGGTCCCCATGACTCT-3'	[231]
	R	5'-GTTGGGGCTGGACATATCAC-3'	

Tablica 12. Popis i sekvence korištenih početnica za Sangerovu metodu kapilarne elektroforeze

Naziv početnice	Smjer	Sekvenca	Referenca
VP1.5	F	5'-GGACTTTCCAAAATGTCG-3'	OriGene (PRIMER)
XL39	R	5'-ATTAGGACAAGGCTGGTGGG-3'	OriGene (PRIMER)

3.1.5. Stanična kultura

Tablica 13. Popis korištenih medija i otopina te njihov sastav

Medij	Sastav
Medij za zamrzavanje	90 % (v/v) FBS, 10 % (v/v) DMSO
DMEM + 10 % FBS	Gibco, Thermo Fisher Scientific, SAD, kompletiran s 10 % (v/v) FBS, 100 µg/mL penicilin, 100 µg/mL streptomycin, 1 mM L-glutamin, 1 mM natrijev piruvat
Tekući LB + ampicilin	20 g/L LB, 100 mg/L ampicilin
Čvrsti LB + ampicilin	20 g/L LB, 13 g/L agar, 100 mg/L ampicilin
Otopina tripsina	0,05 % (w/v) tripsin, 1 mM EDTA

Tablica 14. Popis korištenih staničnih linija, medija za uzgoj i njihovog porijekla

Stanična linija	Medij	Porijeklo
CAL-27	DMEM + 10 % FBS	Donacija dr. sc. Maje Herak Bosnar (Institut Ruđer Bošković, Zagreb)
SCC-25	DMEM + 10 % FBS	ATCC CRL-1628 TM
CAL-27 <i>ESR1</i> ^{KI}	DMEM + 10 % FBS	uspostavljena u sklopu ovog doktorskog rada
CAL-27 <i>ESR2</i> ^{KI}	DMEM + 10 % FBS	uspostavljena u sklopu ovog doktorskog rada
SCC-25 <i>ESR1</i> ^{KI}	DMEM + 10 % FBS	uspostavljena u sklopu ovog doktorskog rada
SCC-25 <i>ESR2</i> ^{KI}	DMEM + 10 % FBS	uspostavljena u sklopu ovog doktorskog rada

3.1.6. Bakterijske stanice

Tablica 15. Popis korištenih bakterijskih stanica i njihovog porijekla

Naziv	Porijeklo
<i>Escherichia coli</i> , soj DH5α	New England Biolabs, SAD

3.1.7. Uzorci tkiva

Tablica 16. Pregled i porijeklo uzoraka tkiva korištenih u istraživanju

Vrsta tkiva	n	Porijeklo	Etičko povjerenstvo
Primarni tumori pločastih stanica sluznice glave i vrata	95	Zavod za otorinolaringologiju i maksilofacijalnu kirurgiju, KBC Zagreb	Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu (Ur. Broj: 251-59-10106-24-111/178; Klasa: 641-01/24-02/04)
Metastatski limfni čvorovi	25		
Zdravo tkivo sluznice usne šupljine	40		

3.1.8. Softveri

Tablica 17. Popis korištenih softvera i njihovih proizvođača

Softver	Proizvođač
Bio-Rad CFX Manager 3.1	Bio-Rad Laboratories, SAD
BioRender	Science Suite Inc., Kanada
DinoCapture 2.0 (Windows)	AnMo Electronics, Tajvan
GPower 3.1	Heinrich Heine Universität Düsseldorf, Njemačka
IC ₅₀ Calculator	AAT Bioquest, SAD
ImageJ 1.54g	National Institutes of Health, SAD
MedCalc Statistical Software (v 23.4.2.)	MedCalc Software Ltd., Belgija
Muse 1.8 Analysis	Luminex, SAD
NEB Ligation Calculator	New England Biolabs, SAD
Olympus Stream Essentials	Olympus Corporation, Japan
Prism 8.0.2	GraphPad, SAD
SeqStudio Genetic Analyzer	Thermo Fischer Scientific, SAD
Sequencing Analysis Software 7	Thermo Fischer Scientific, SAD
SnapGene	GSL Biotech LLC, SAD

3.2. Metode

3.2.1. Prikupljanje uzoraka tkiva

U suradnji sa Zavodom za otorinolaringologiju i maksilofacijalnu kirurgiju Kliničkog bolničkog centra Zagreb prikupljani su uzorci primarnih tumora pločastih stanica sluznice glave i vrata te metastatskih limfnih čvorova ($N = 120$), kao i zdravog tkiva sluznice usne šupljine ($N=40$), a sve u skladu Mišljenja Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta u Zagrebu od 28. studenog 2024. (Ur. Broj: 251-59-10106-24-111/178; Klasa: 641-01/24-02/04). S obzirom na to da ovakvo istraživanje još nije provedeno, za izračun veličine uzorka korišten je program GPower 3.1 i podatci iz rada Ozretić i sur. [232], a analiza je pokazala, uz snagu studije od 0,8 i odabranu razinu značajnosti $P < 0,05$, da su potrebna minimalno 62 uzorka, odnosno 31 po svakoj skupini. Osim informiranog pristanka, o pacijentima su prikupljeni svi dostupni klinički podatci u svrhu povezivanja relativne ekspresije gena od interesa s kliničko-patološkim karakteristikama. Prikupljeni su sljedeći klinički podatci: datum rođenja, datum operacije, spol, patološki (p) status TNM, stadij i gradus tumora, podatci o primanju adjuvantne terapije, ekstrakapsularno širenje tumora (eng. *extracapsular spread*, ECS), perineuralna invazija (eng. *perineural invasion*, PNI), limfovaskularna invazija (eng. *lymphovascular invasion*, LVI), kao i podatci o recidivu i ishodu pacijenata. Svi osobni podaci ispitanika u istraživanju bili su pohranjeni i obrađivani u elektroničkom obliku, uz poštivanje propisanih postupaka za zaštitu osobnih podataka i Uredbe (EU) 2016/679 Europskog parlamenta i Vijeća od 27. travnja 2016. o zaštiti pojedinaca u vezi s obradom osobnih podataka i o slobodnom kretanju takvih podataka te o stavljanju izvan snage Direktive 95/46/EZ. U našu bazu podataka ispitanici su bili uneseni pomoću posebnih kodova te imena ispitanika nikada nisu bila otkrivena trećim osobama.

Svježe tumorsko ili zdravo tkivo dostavljeno je u Laboratorij za nasljedni rak Instituta Ruđer Bošković odmah po operaciji ili nekoliko dana nakon operacije. Ukoliko je tkivo bilo dostavljeno naknadno, u međuvremenu je bilo čuvano u otopini za stabilizaciju RNA, RNAlater. Svježe tkivo pohranjeno je u epruveti za zamrzavanje stanica u zamrzivač na -80°C . Tako pohranjeni uzorci tkiva kasnije su korišteni za izolaciju RNA i DNA, što je opisano u potpoglavljima 3.2.2.1. i 3.2.3.1.

3.2.2. Analiza ekspresije gena u uzorcima tkiva

3.2.2.1. Izolacija ukupne RNA iz uzoraka tkiva

Za izolaciju ukupne RNA odvojen je komadić tkiva (~ 50 mg) koji je pomoću sterilnih škarića najprije nasjeckan na što sitnije komadiće. Na tako usitnjeni uzorak dodano je 500 µL NucleoZOL-a, komercijalnog reagensa koji je po kemijskom sastavu otopina fenola (30-60 %) i gvanidinijevog tiocijanata (30-60 %), i 200 µL ultračiste vode Milli-Q te je uzorak potom dobro resuspendiran trešnjom mikroeprovete i potom inkubiran 15 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon toga, uzorak je centrifugiran 15 minuta pri 12 000 x g, na 8 °C i 525 µL supernatanta (75 % početnog volumena uzorka) potom je prebačeno u čistu mikroeprovetu. Na izdvojeni supernatant dodano je 525 µL izopropanola, uzorci su ponovno dobro promućkani i potom inkubirani 10 minuta na sobnoj temperaturi. Po završetku inkubacije, uzorci su centrifugirani 10 minuta pri 12 000 x g, na 8 °C. Dobiveni talog RNA dva puta je ispran s 500 µL 75 %-tnog etanola i centrifugiran 3 minute pri 8000 x g na 8 °C. Nakon drugog ispiranja, talog je otopljen u 50 µL ultračiste vode Milli-Q i vorteksiran 3 minute. Potom je izmjerena koncentracija i čistoća izolirane RNA na spektrofotometru NanoPhotometer N60/N50, koji mjeri apsorbanciju pri valnim duljinama od 230 nm, 260 nm i 280 nm te su uzorci potom spremljeni u zamrzivač na -80 °C do daljnje upotrebe.

3.2.2.2. Reverzna transkripcija

Kako bi izolirana ukupna RNA bila korištena za određivanje ekspresije gena od interesa, najprije je prevedena u stabilniju cDNA pomoću metode reverzne transkripcije, koristeći komercijalni komplet High-Capacity cDNA Reverse Transcription. Za reakciju je korišteno ukupno 500 ng RNA otopljene u vodi bez RNaza. Reakcijska smjesa pripremljena je prema uputama proizvođača u ukupnom volumenu od 25 µL i sastojala se od: 2,5 µL pufera RT, 1 µL smjese dNTP-ova (c = 4 mM), 2,5 µL nasumičnih početnica RT i 1,25 µL enzima reverzne transkriptaze MultiScribe (62,5 U), dok preostali volumen smjese čini RNA i voda. Reakcija je provedena u uređaju za PCR prema sljedećem programu: sparivanje početnica na 25 °C tijekom 10 minuta, sinteza DNA na 37 °C tijekom 120 minuta i deaktivacija enzima na 85 °C tijekom 5 minuta. Dobivena cDNA potom je pohranjena u hladnjaku na -20 °C do korištenja.

3.2.2.3. Kvantitativna lančana reakcija polimerazom (qPCR)

U svrhu analize ekspresije gena od interesa u uzorcima tkiva tumora, kao i zdravih

kontrolnih uzoraka korištena je metoda kvantitativne lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu (qPCR). Cilj je bio odrediti ekspresijski profil gena jezgrinih (*ESR1* i *ESR2*) i membranskih receptora estrogena (*GPER1* i *SCN2A*), kao i gena pokazatelja aktivnosti signalnog puta HH-GLI (*SHH*, *PTCH1* i *GLII*) na setu svježih uzoraka tkiva HNSCC-a i zdrave sluznice. Za normalizaciju dobivenih rezultata korišten je referentni gen *RPLP0*. Reakcijska smjesa sastojala se od: 5 μ L fluorescentne boje SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix, 3,4 μ L ultračiste vode, 0,3 μ L uzvodne (eng. *forward*, F) i 0,3 μ L nizvodne početnice (eng. *reverse*, R) te 1 μ L uzorka cDNA ($c = 20$ ng/ μ L). Popis i nukleotidni sljedovi korištenih početnica nalazi se u Tablici 11. Reakcija qPCR-a provedena je na uređaju CFX Opus 96 Real-Time PCR System pri sljedećim uvjetima: početna denaturacija na 95 °C tijekom 30 s, 40 ciklusa denaturacije DNA na 95 °C tijekom 10 s i sparivanja početnica na 60 °C (*ESR1*, *ESR2*, *GPER1* i *SCN2A*) ili 61 °C (*RPLP0*, *SHH*, *PTCH1* i *GLII*) tijekom 30 s te analiza krivulje mekšanja u rasponu od 60/61-95 °C (po 2 s, porast temperature za 0,5 °C), uz korištenje programa Bio-Rad CFX Manager 3.1 za prikupljanje podataka. Relativna promjena ekspresije gena izračunata je metodom $2^{-\Delta Ct}$, pri čemu Ct označava broj ciklusa potreban da fluorescentni signal dosegne zadani prag (eng. *cycle threshold*). Za svaki je uzorak najprije izračunata vrijednost ΔCt oduzimanjem Ct vrijednost referentnog gena od Ct vrijednosti gena od interesa, a zatim je izračunata vrijednost $2^{-\Delta Ct}$. Na taj je način relativna ekspresija gena od interesa normalizirana i izražena u odnosu na referentni gen.

3.2.3. Analiza prisutnosti HPV-a u uzorcima tkiva tumora

3.2.3.1. Izolacija genomske DNA iz uzoraka tkiva

Genomska DNA izolirana je iz svježe smrznutih uzoraka tumorskog tkiva pomoću organskih otapala metodom fenol-kloroform na način da je na komadić smrznutog tkiva (~ 50 mg) najprije dodano 1 mL pufera za izolaciju DNA iz tkiva i 20 μ L proteinaze K te je mikroeproveta s uzorkom potom stavljena na termo tresilicu na 37 °C pri 330 rpm preko noći. Sutradan je u svaku mikroeprovetu s uzorkom dodano 1 mL fenola, nakon čega je sadržaj istih dobro promućkan i centrifugiran 10 minuta pri 13 000 x g na 4 °C. Gornja vodena faza u kojoj se nalazila DNA premještena je u čiste mikroeprove i dodano joj je 1 mL otopine kloroforma i izoamilnog alkohola u omjeru 24:1, nakon čega su uzorci dobro protreseni. Ponovljen je korak centrifugiranja pri istim uvjetima i 600 μ L gornje faze preneseno je u čiste mikroeprove. Potom je dodano 1200 μ L ledeno hladnog apsolutnog etanola i mikroeprove su ponovno

dobro protresene. Kako bi došlo do taloženja DNA, smjesa je centrifugirana 30 minuta pri 13 000 x g, na 4 °C, nakon čega je etanol uklonjen, a suhi talog DNA otopljen u 200 µL pufera TE. Koncentracija i čistoća izolirane DNA izmjerena je na spektrofotometru te su uzorci potom spremljeni u frižider na 4 °C do daljnje upotrebe.

3.2.3.2. Detekcija HPV-a lančanom reakcijom polimerazom (PCR)

Genomska DNA izolirana iz uzoraka tkiva tumora, prema protokolu opisanom u potpoglavlju 3.2.3.1., korištena je za detekciju prisutnosti HPV-a u uzorcima tumorskog tkiva koristeći metodu lančane reakcije polimerazom (eng. *polymerase chain reaction*, PCR). Sam protokol detekcije HPV-a proveden je u suradnji s Laboratorijem za molekularnu virologiju i bakteriologiju Zavoda za molekularnu medicinu Instituta Ruđer Bošković. PCR za detekciju HPV-a proveden je s konsenzus početnicama PGMY usmjerenih na regiju L1 genoma HPV-a. U višestrukoj PCR reakciji (eng. *multiplex PCR*) korištene su početnice specifične za tip HPV-16, HPV-18 i HPV-33 za genotipizaciju HPV-a. PCR amplifikacija gena beta-globina s početnicama PC04/GH20 korištena je kao unutarnja kontrola kvalitete izolirane DNA i odsutnosti inhibitora PCR-a. Popis i sekvence svih korištenih početnica navedeni su u Tablici 10. Svaka reakcija amplifikacije provedena je u ukupnom volumenu od 20 µL. Reakcijske smjese sadržavale su ultračistu vodu, 1X Green GoTaq Flexi Buffer i 100 ng DNA svakog od uzoraka. Kao pozitivna kontrola korištena je DNA stanične linije CaSki. U prvoj reakciji DNA je amplificirana setom početnica PGMY i početnicama PC04 i GH20 specifičnima za beta-globin. PCR smjesa je sadržavala 3 mM MgCl₂, 0,1 mM svakog dNTP-a, 0,2 U DNA polimeraze GoTaq Hot Start, 1,8 µM svake od početnica PGMY i 50 mM početnica PC04 i GH20. Amplifikacija DNA provedena je prema sljedećem protokolu: denaturacija na 95 °C tijekom 9 minuta i 40 ciklusa koji su uključivali denaturaciju na 95 °C tijekom 1 minute, sparivanje početnica na 55 °C tijekom 1 minute, elongaciju na 72 °C tijekom 1 minute, s konačnom elongacijom na 72 °C tijekom 5 minuta. Smjesa za višestruku PCR reakciju sa specifičnim početnicama za HPV-16, HPV-18 i HPV-33 sadržavala je 1,625 mM MgCl₂, 0,15 mM svakog dNTP-a, 0,2 U DNA polimeraze GoTaq Hot Start i 0,15 svake početnice za HPV-16, HPV-18 i HPV-33. Uvjeti amplifikacije DNA bili su: denaturacija na 95 °C tijekom 5 minuta i 35 ciklusa koji su uključivali denaturaciju na 95 °C tijekom 1 minute, sparivanje početnica na 58 °C tijekom 45 s, elongaciju na 72 °C tijekom 1 minute, s konačnom elongacijom na 72 °C tijekom 7 minuta. Nakon provedenih PCR reakcija, po 10 µL svakog produkta bilo je razdvojeno metodom elektroforeze na 2 %-tnom agaroznom gelu obojenom

bojom Midori Green Advance. Prisutnost produkata specifične veličine provjerena je vizualiziranjem gelova koristeći UV zračenje pomoću UVItec Cambridge Alliance 4.7 sustava za snimanje.

3.2.4. Primjena sustava CRISPR/Cas9 za ugradnju gena *ESR1* i *ESR2* u genom stanica

3.2.4.1. Umnažanje gena *ESR1* i *ESR2* metodom PCR

Na temelju rezultata određivanja genske ekspresije ER na uzorcima tkiva HNSCC-a u usporedbi sa zdravim tkivom odabrani su geni *ESR1* i *ESR2* sa svrhom izrade staničnih linija „*knock-in*“ za daljnje eksperimente *in vitro*, pošto su isti pokazali diferencijalnu ekspresiju. Prvi korak u pripremi plazmida za ciljanu i stabilnu ugradnju *ESR1* i *ESR2* u genom stanica bio je izrezivanje i umnažanje istih iz komercijalno dostupnih plazmida pCMV-hERalpha i pCMV3-ER beta metodom PCR. Za izrezivanje svakog od gena iz navedenih plazmida donora dizajniran je poseban par početnica koje se vežu za nukleotidnu sekvencu u neposrednoj blizini početka, odnosno kraja sekvence koja kodira za gen *ESR1* ili *ESR2*. Navedene početnice dizajnirane su na način da je uz minimalne promjene, odnosno uvođenje jedne do tri izmjene u nukleotidnoj sekvenci, uvedena palindromska sekvenca koju prepoznaju restrikcijski enzimi Sall (G[^]TCGAC) i MluI (A[^]CGCGT). Popis korištenih početnica, kao i uvedene promjene u istima u odnosu na originalnu sekvencu nalaze se u Tablici 9., dok su mjesta vezanja početnica prikazana na Slici 8. Pojedina reakcijska smjesa za PCR sastojala se od: 10 µL pufera 5X PrimeSTAR GXL Buffer, 4 µL smjese dNTP-ova (0,2 mM svaki), 2 µL svake od početnica (*ESR1* cloning F i R za *ESR1*, odnosno *ESR2* cloning F i R za *ESR2*), 10 ng plazmidne DNA i 1 µL enzima PrimeSTAR GXL DNA Polymerase (1,25 U), dok je preostali volumen do 50 µL sačinjavala ultračista voda. Reakcija PCR-a provedena je na uređaju Veriti™ 96-Well Fast Thermal Cycler pri sljedećim uvjetima: denaturacija na 98 °C tijekom 4 minute i 40 ciklusa koji su uključivali denaturaciju na 98 °C tijekom 10 s, sparivanje početnica na 60 °C tijekom 15 s i elongaciju na 68 °C tijekom 2 minute, s konačnom elongacijom na 68 °C tijekom 7 minuta. Nakon PCR-a, po 5 µL svakog od uzorka analizirano je elektroforezom na 1 %-tnom agarozom gelu obojenom bojom Midori Green Advance, a prisutnost produkata odgovarajuće veličine provjerena je vizualizacijom pomoću UV-a.



Slika 8. Položaj PCR početnica korištenih za umnažanje *ESR1* i *ESR2*. Prikaz mjesta vezanja početnica korištenih za izrezivanje i umnažanje (A) *ESR1* i (B) *ESR2* iz plazmida donora pCMV-hERalpha i pCMV3-ER beta. Sekvence korištenih početnica označene su ljubičastim strelicama, dok su plavom bojom istaknuta palindromski sljedovi koje prepoznaju enzimi SalI i MluI.

3.2.4.2. Izrezivanje i pročišćavanje fragmenata gena *ESR1* i *ESR2* iz gela

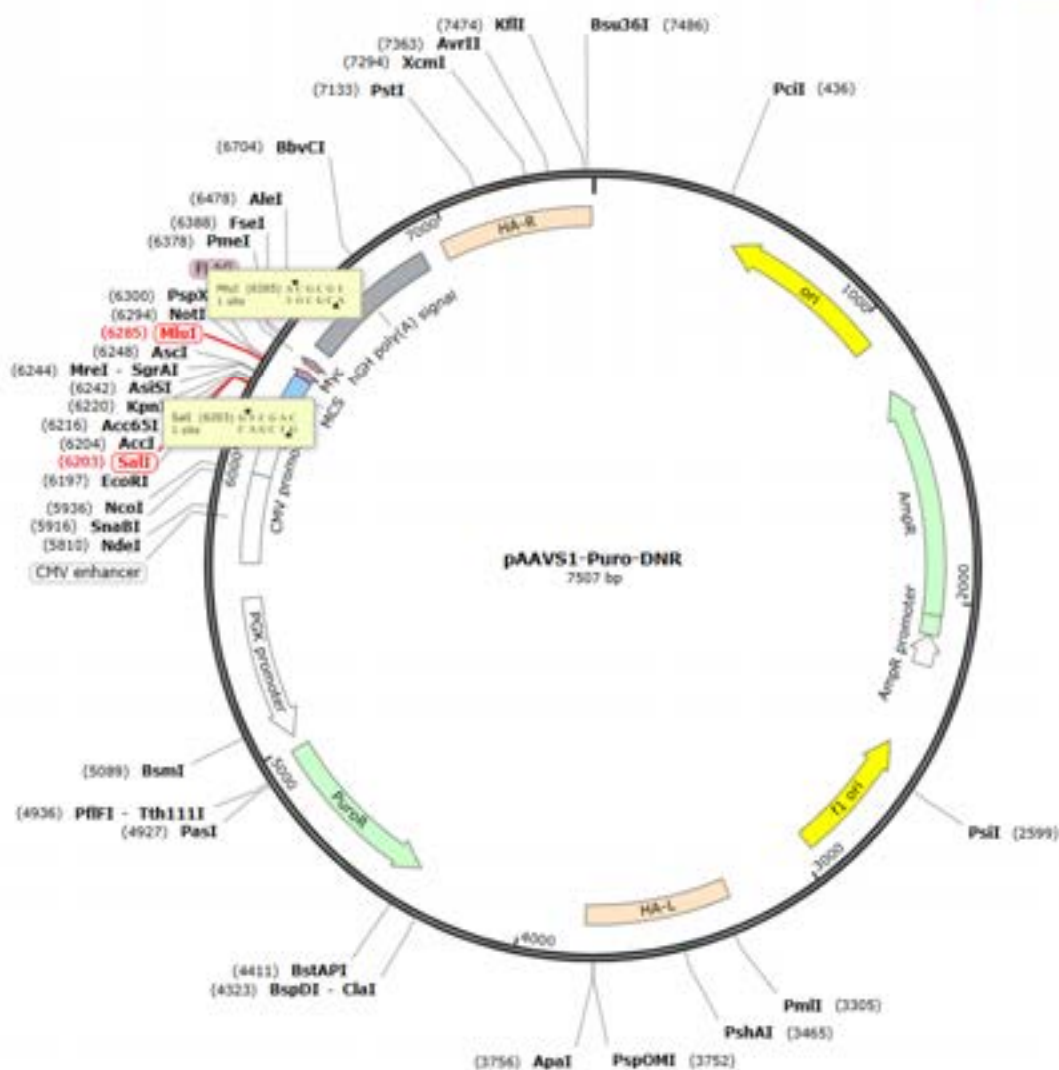
Nakon provjere uspješnosti umnažanja fragmenata gena *ESR1* i *ESR2* pomoću gel elektroforeze, preostalih 45 µL smjese PCR reakcije nanoseno je na svježe pripremljeni 0,7 %-tni agarozni gel te je nakon razdvajanja pomoću elektroforeze vizualizirano u mračnoj prostoriji pomoću UV-transiluminatora, koji emitira ultraljubičasto zračenje valne duljine 312 nm kroz gel. Potom su pomoću skalpela izrezani komadići gela u kojima su se nalazili fragmenti DNA približne veličine 1844 i 1708 pb, što odgovara umnoženim fragmentima *ESR1*, odnosno *ESR2*. Izrezani komadići gela prebačeni su u unaprijed izvagane i označene mikroepruvete od 1,5 mL, nakon čega su iste ponovno izvagane. Za pročišćavanje fragmenata iz gela korišten je komercijalni komplet QIAEX II Gel Extraction Kit. Prema protokolu proizvođača, u mikroepruvete je dodan trostruki volumen pufera QX1 iz navedenog kompleta u odnosu na izračunatu masu gela koja ne smije iznositi više od 250 mg. Potom su kuglice QIAEX II resuspendirane pomoću vorteks miješalice 30 s i dodano je po 30 µL istih u svaki uzorak, nakon čega je uslijedila inkubacija 10 minuta na 50 °C, kako bi se otopila agarozna i DNA vezala na kuglice. Tijekom inkubacije, suspenzije su svake 2 minute resuspendirane vorteksiranjem i

potom centrifugirane 30 s pri 13 200 rpm na sobnoj temperaturi. Dobiveni talozi isprani su s 500 μ L pufera QX1, resuspendirani vorteksiranjem i ponovno centrifugirani pri istim uvjetima. Po uklanjanju supernatanta, talozi su dva puta isprani pomoću pufera PE, ponavljajući korake vorteksiranja i centrifugiranja. Konačno, isti su sušeni na zraku otprilike 30 minuta, dok nisu poprimili bijelu boju. Za eluciju DNA s kuglica korišteno je 20 μ L otopine 10 mM Tris-HCl, pH = 8,0. Po dodatku elucijske otopine talozi su resuspendirani pomoću vorteks miješalice i inkubirani 5 minuta na 50 °C, nakon čega su centrifugirani 30 s pri 13 200 rpm. Supernatanti s pročišćenom DNA prebačeni su u čiste mikroepruvete te im je potom izmjerena koncentracija i čistoća pomoću spektrofotometra, nakon čega su pohranjeni u zamrzivač na -20 °C.

3.2.4.3. Priprema vektora CRISPR/Cas9

Ciljana ugradnja *ESR1* i *ESR2* u lokus *AAVS1* u genomu stanica bila je provedena koristeći komercijalni komplet AAVS1 Transgene knockin vector kit koji sadrži dva vektora. Prvi je pCas-Guide-AAVS1 koji eksprimira sgRNA koja cilja lokus *AAVS1*, te nukleazu Cas9. Drugi je pAAVS1-Puro-DNR koji sadrži homologne regije koje odgovaraju lokusu *AAVS1*. Između tih regija nalazi se mjesto za kloniranje željenog inserta, u ovom slučaju gena *ESR1* ili *ESR2*, i gen za rezistenciju na puromicin.

Prvi korak u izradi vektora CRISPR/Cas9 bila je priprema reakcijskih smjesa za digestiju pročišćenih fragmenata *ESR1* i *ESR2*, kao i vektora pAAVS1-Puro-DNR, pomoću restrikcijskih enzima Sall i MluI. Reakcijske smjese za digestiju sastojale su se od: 1 μ g inserta ili vektora, po 1 μ L svakog od restrikcijskih enzima Sall i MluI, 2 μ L pufera rCut Smart, dok je preostali volumen do 20 μ L sačinjavala ultračista voda. Tako pripremljene reakcijske smjese inkubirane su sat vremena na 37 °C, a potom 20 minuta na 65 °C, kako bi došlo do inaktivacije enzima. Enzim Sall prepoznaje palindromsku sekvencu nukleotida GTCGAC, a enzim MluI sekvencu ACGCGT te su navedena restrikcijska mjesta na plazmidu pAAVS1-Puro-DNR prikazana na Slici 9. Sljedeći korak u kloniranju bila je ligacija digestiranog vektora s pojedinim od digestiranih inserata *ESR1* i *ESR2*, u omjeru 1:7. Za izračun potrebnih volumena inserata i vektora u odabranom molarnom udjelu korišten je NEB Ligation Calculator, dostupan na web adresi: <https://nebiocalculator.neb.com/#!/ligation>. Sastavi reakcijskih smjesa za ligaciju vektora pAAVS1-Puro-DNR i inserta *ESR1* ili *ESR2* nalaze se u Tablici 18.



Slika 9. Mapa plazmida pAAVS1-Puro-DNR s prikazanim restrikcijskim mjestima SalI i MluI.

Kako bi se povećala učinkovitost ligacije, ligacijske smjese pripremljene su bez ligaze DNA T4 i zagrijane 5 minuta na 45 °C. Nakon toga dodana je ligaza T4 i smjese su inkubirane preko noći na sobnoj temperaturi, kako bi se potaknulo stvaranje fosfodiesterских veza između inserta i plazmida. Idućeg dana, aktivnost enzima ligaze T4 inaktivirana je zagrijavanjem ligacijskih smjesa 10 minuta na 65 °C i potom je uslijedila transformacija kompetentnih bakterija.

Tablica 18. Sastavi reakcijskih smjesa za ligaciju vektora pAAVS1-Puro-DNR i inserta *ESR1* i *ESR2* u molarnom udjelu 1:7.

KOMPONENTA	<i>ESR1</i> (1:7)	<i>ESR2</i> (1:7)
insert	1,76 μ L (85,94 ng)	1,58 μ L (78,81 ng)
vektor pAAVS1-Puro-DNR (50 ng)	1 μ L	1 μ L
pufer ligaze DNA T4	2 μ L	2 μ L
ligaza DNA T4	1 μ L	1 μ L
ultračista voda	14,24 μ L	14,42 μ L
UKUPNI VOLUMEN	20 μL	20 μL

3.2.4.4. Transformacija kompetentnih bakterija

Za transformaciju su korištene kemijski kompetentne bakterije vrste *Escherichia coli*, soj DH5 α . Nakon što su se dva alikvota istih otopila na ledu dodano im je po 10 μ L ligacijskih smjesa pripremljenih na gore opisani način. Dodane ligacijske smjese promiješane su u mikroepuветama s bakterijama nastavkom za mikropipetu i inkubirane 10 minuta na ledu. Nakon toga, smjese su zagrijane 1 minutu na 42 °C koristeći termo tresilicu i potom opet ohlađene na ledu 2 minute. Zatim je u svaku od mikroepuveta dodano 250 μ L tekućeg medija LB bez antibiotika i iste su inkubirane sat vremena na termo tresilici, pri uvjetima od 37 °C i s frekvencijom miješanja od 330 rpm. U međuvremenu su pripremljene čvrste selektivne hranjive podloge koristeći agar, medij LB i antibiotik ampicilin. Po završetku inkubacije, na hranjive podloge je razmazano po 200 μ L bakterijske suspenzije i iste su spremljene u inkubator za uzgoj bakterija na 37 °C preko noći.

3.2.4.5. Analiza bakterijskih kolonija metodom colony PCR

Otpriblike 18 sati nakon transformacije pregledane su hranjive podloge te su odabrane bakterijske kolonije za daljnju analizu metodom *colony PCR*. Navedenom metodom umnaža se specifičan odsječak DNA koji obuhvaća dio plazmida pAAVS1-Puro-DNR, koristeći početnicu VP1.5, i dio potencijalno ugrađenog inserta, koristeći početnice za qPCR (*ESR1* R ili *ESR2* R). Na taj način, u slučaju uspješne ugradnje inserta, očekivana veličina produkata iznosi 1401 pb za *ESR1*, odnosno 844 pb za *ESR2*. Reakcijske smjese za *colony PCR* sastojale su se od: 7,72 μ L ultračiste vode, 1 μ L pufera s Mg²⁺, po 0,5 μ L svake od početnica (VP1.5 i *ESR1* R ili VP1.5 i *ESR2* R), 0,2 μ L smjese dNTP-ova i 0,08 μ L enzima polimeraze DNA FastStart Taq. Po 10 μ L pripremljene reakcijske smjese dodano je u unaprijed označene mikroepuvete od 0,2 mL.

Na isti način označen je i set mikroepruveta od 2 mL u koje je dodano 1 mL medija LB s ampicilinom, za pripremu bakterijskih starter kultura. Potom su nastavkom za mikropipetu nježno pokupljene odabrane bakterijske kolonije te je svaka prvo resuspendirana u reakcijskoj smjesi za *colony PCR*, a potom i u mikroepruveti za pripremu starter kulture. Kao negativna kontrola korištena je reakcijska smjesa bez DNA. Reakcija *colony PCR*-a provedena je pri sljedećim uvjetima: denaturacija na 94 °C tijekom 4 minute i 35 ciklusa koji su uključivali denaturaciju na 94 °C tijekom 30 s, sparivanje početnica na 53 °C za *ESR1*, odnosno 59 °C za *ESR2*, tijekom 45 s i elongaciju na 72 °C tijekom 2 minute, s konačnom elongacijom na 72 °C tijekom 7 minuta. Po završetku *colony PCR*-a, dobiveni produkti analizirani su metodom elektroforeze na agaroznom gelu i prisutnost produkata odgovarajuće veličine provjerena je vizualizacijom na uređaju UVItec Alliance 4.7. Bakterijske starter kulture inkubirane su na termo miješalici dva sata na 37 °C, s frekvencijom miješanja od 330 rpm, te su potom spremljene u frižider na 4 °C.

3.2.4.6. Izolacija plazmidne DNA iz bakterija

Iz bakterijskih kolonija, u kojima je metodom *colony PCR* i analizom umnoženih produkata gel elektroforezom bila dokazana prisutnost inserata *ESR1* ili *ESR2* ugrađenih u vektor pAAVS1-Puro-DNR, izolirana je plazmidna DNA radi potvrde rezultata PCR reakcije Sangerovom tehnologijom kapilarne elektroforeze. Starter kulture tih kolonija nasadene su u staklene epruvete za rast bakterija s tekućom hranjivom podlogom koja se sastojala od 2 mL tekućeg medija LB i antibiotika ampicilina te su iste inkubirane preko noći u inkubatoru tresilici na 37 °C, s frekvencijom miješanja 180 rpm.

Za izolaciju plazmidne DNA iz bakterija korišten je komercijalni komplet NucleoSpin Plasmid EasyPure kit. Ukupni volumen bakterijskih kultura inkubiranih preko noći prebačen je u mikroepruvete od 2 mL i centrifugiran 30 s pri 13 000 x g. Nakon uklanjanja supernatanta na svaki uzorak je dodano 150 µL pufera A1 i talog je dobro resuspendiran pomoću vorteks miješalice. Potom je u svaku mikroepruvetu dodano 250 µL pufera A2 i sadržaj istih je pomiješan nježnim okretanjem mikroepruveta pet puta te je inkubiran na sobnoj temperaturi 2 minute. Zatim je dodano po 350 µL pufera A3 i mikroepruvete su okretane sve dok sadržaj istih nije postao bezbojan, bez ikakvih tragova plavog obojenja. Nakon centrifugiranja 3 minute pri 13 000 x g, supernatant je prebačen u kolonice NucleoSpin Plasmid EasyPure koje su prije toga stavljene u epruvete za sakupljanje od 2 mL. Sadržaj je ponovno centrifugiran 30 s pri 2 000 x g, sadržaj iz epruvete za sakupljanje je bačen i na kolonicu je dodano 450 µL pufera AQ. Nakon

posljednjeg centrifugiranja 1 minutu pri 13 000 x g, epruveta za sakupljanje je bačena, a kolonika je stavljena u čistu mikroepruvetu od 1,5 mL i na kolonicu je dodano 50 µL pufera za eluciju AE prethodno zagrijanog na 50 °C. Po završetku inkubacije od 1 minute na sobnoj temperaturi, plazmidna DNA je eluirana s kolonice centrifugiranjem 1 minutu pri 13 000 x g te joj je potom izmjerena koncentracija i čistoća pomoću spektrofotometra. Tako izolirana DNA spremljena je u frižider na -20 °C do daljnje upotrebe.

3.2.4.7. Provjera ispravnosti ugrađenih sekvenci gena *ESR1* i *ESR2* primjenom Sangerove tehnologije kapilarne elektroforeze

Konačna provjera ispravnosti sekvenci ugrađenih inserata *ESR1* i *ESR2* u plazmidni vektor pAAVS1-Puro-DNR izvršena je primjenom Sangerove tehnologije sekvenciranja, u suradnji s Laboratorijem za molekularnu genetiku Zavoda za molekularnu biologiju Instituta Ruđer Bošković.

Sekvenciranje je provedeno uz primjenu komercijalnog kompleta BigDye Terminator v3.1 Ready Reaction Cycle Sequencing i kapilarne elektroforeze. Reakcijske smjese pripremljene su u ukupnom volumenu od 20 µL te su sadržavale 15 µL DNA uzorka s pripadajućom početnicom (koncentracija DNA: 33,3 ng/µL, koncentracija početnice 0,33 pmol/µL), 3 µL pufera za sekvenciranje 5X BigDye Terminator v3.1 i 2 µL otopine BigDye Terminator v3.1 Ready Reaction Mix. Kontrolne reakcije, uz navedene dvije komponente, dodatno su sadržavale i 3 µL kontrolne DNA pGEM -3Zf(+) u dvolančanom obliku (200 ng/µL), 1 µL početnice M13 (0,8 pmol/µL) i 11 µL ultračiste vode. Za svaki uzorak provedene su dvije reakcije sekvenciranja, u uzvodnom i nizvodnom smjeru, koristeći početnice VP1.5 i XL39. Nakon kratkog miješanja i centrifugiranja, reakcijske smjese su podvrgnute PCR programu koji je uključivao početnu denaturaciju 1 minutu na 96 °C, zatim 25 ciklusa denaturacije 10 s na 96 °C, sparivanja početnica 5 s pri 50 °C i elongacije 4 s na 60 °C, uz završno hlađenje 7 minuta na 4 °C. Nakon završetka reakcije, produkti su pročišćeni dodatkom 2 µL 3 M natrijevog acetata, 2 µL 125 mM EDTA i 50 µL apsolutnog etanola. Dodane komponente promiješane su okretanjem mikroepruvete četiri puta i potom inkubirane 15 minuta na sobnoj temperaturi. Potom je uslijedilo centrifugiranje pri najvećoj brzini tijekom 15 minuta pri 4 °C, nakon čega je supernatant pažljivo uklonjen. Dobiveni talozi isprani su sa 70 µL svježe pripremljenog 70 %-tnog etanola i ponovno centrifugirani 5 minuta pri sobnoj temperaturi. Po uklanjanju supernatanta talozi su osušeni u vakuumskom centrifugalnom koncentratoru Thermo Savant DNA 120 SpeedVac 5 minuta pri sobnoj temperaturi i potom su

resuspendirani u 13 μ L formamida Hi-Di, pomiješani laganim lupkanjem po mikroepruveti i potom kratko centrifugirani. Uzorci su potom denaturirani na 95 °C tijekom 3 minute te ohlađeni na -20 °C najmanje 3 minute radi sprječavanja renaturacije DNA, nakon čega je po 10 μ L svakog uzorka preneseno u pločicu s 96 bunarčića. Kapilarna elektroforeza provedena je na uređaju SeqStudio Genetic Analyzer uz postavke metoda: sekvenciranje, boja BigDye 3.1 i tip modula *medium seq*, a dizajn ploča je proveden u programu Plate Manager. Prikupljanje podataka izvršeno je pomoću softvera SeqStudio Genetic Analyzer, dok je obrada rezultata nakon završetka elektroforeze provedena pomoću programa Sequencing Analysis Software 7.

3.2.5. Rad sa staničnim kulturama

3.2.5.1. Uzgoj i rukovanje staničnim linijama u kulturi

Rad sa staničnim kulturama proveden je u kontroliranim, sterilnim uvjetima, koristeći sterilne otopine, medije, pufere i posuđe. Sav pribor namijenjen radu sa staničnim kulturama korišten je unutar kabineta s laminarnim protokom zraka, uz prethodnu dezinfekciju materijala prije rukovanja u sterilnom okruženju. Stanične linije su uzgajane u mediju za rast stanica DMEM + 10 % FBS, u inkubatoru za rast stanica pri 37 °C i 5 % CO₂.

Stanične linije CAL-27 i SCC-25 bile su pohranjene u mediju za zamrzavanje u zamrzivaču na -80 °C. S druge strane, stanične linije CAL-27 *ESR1*^{KI}, CAL-27 *ESR2*^{KI}, SCC-25 *ESR1*^{KI} i SCC-25 *ESR2*^{KI} uspostavljene su tijekom izrade ovog doktorskog rada, kao što je opisano u poglavljima 3.2.5.2. i 3.2.5.3., a nakon njihove uspostave s njima se rukovalo na jednak način kao i s ishodišnim staničnim linijama CAL-27 i SCC-25. Odmrzavanje stanica provedeno je prebacivanjem smrznute suspenzije stanica u prethodno pripremljenu epruvetu s 5 mL medija za rast stanica. Odmah potom epruvete sa suspenzijama centrifugirane su 5 minuta pri 300 x g i temperaturi 4 °C. Dobiveni talog stanica resuspendiran je u 10 mL medija i prebačen u bočicu za rast stanica T75 i spremljen u inkubator za rast stanica. Nakon odmrzavanja, stanicama u kulturi je svaka dva do tri dana uklonjen medij, isprane su s 5 mL fosfatnog pufera (PBS) i dodano im je 10 mL svježeg medija. Kada su stanice dosegle otprilike 90 % konfluentnosti, nakon uklanjanja medija i ispiranja PBS-om, u svaku bočicu T75 dodano je 1 mL otopine tripsina. Nakon otprilike 5 minuta, kada su se sve stanice odvojile od podloge, tripsin je bio inaktiviran s 9 mL medija i dio stanične suspenzije je ili održavan u kulturi ili je prikupljen. Za održavanje stanica u kulturi, 1 mL stanične suspenzije ostavljeno je u bočici za rast uz dodatak 9 mL svježeg medija za rast te je bočica bila vraćena u inkubator za rast. S druge

strane, stanice su nakon prikupljanja bile korištene za daljnje eksperimente ili za ponovno zamrzavanje. Za prikupljanje, stanice su nakon inaktivacije tripsina kompletiranim medijem bile privremeno pohranjene u plastičnu epruvetu od 15 mL. Prilikom nasađivanja stanica za eksperimente, 20 μ L stanične suspenzije resuspendirano je u 80 μ L tripsanskog modrila i potom je 10 μ L tako pripremljene suspenzije nanoseno na Neubauerovu komoricu za brojanje stanica. Ukupan broj stanica po mililitru suspenzije izračunat je koristeći formulu: $(\text{broj stanica} / 0,4) \times 5 \times 10^3$. Za zamrzavanje stanica, prikupljene stanice su najprije ohlađene pola sata na ledu u plastičnim epruvetama, a potom su centrifugirane 5 minuta pri 300 x g na 4 °C. Nakon centrifugiranja, supernatant je bačen, a talog stanica je resuspendiran u 1 mL medija za zamrzavanje stanica i prebačen u epruvetu za zamrzavanje stanica, koja se najprije pohranjuje u zamrzivač na -80 °C, a za potrebe daljnjeg skladištenja u spremnik s tekućim dušikom.

3.2.5.2. Stabilna transfekcija stanica vektorima CRISPR/Cas9

Za ciljanu i stabilnu ugradnju gena *ESR1* i *ESR2* u lokus *AAVS1* genoma staničnih linija tumora jezika, CAL-27 i SCC-25, korišten je komercijalni komplet AAVS1 Transgene knockin vector kit, koji se temelji na tehnologiji CRISPR/Cas9 posredovanoj stvaranjem dvostrukog loma DNA i homologne rekombinacije s donorskim vektorom koji sadrži odgovarajući insert i gen za rezistenciju na puromicin kao selekcijski marker. Priprema donorskog vektora pAAVS1-Puro-*ESR1* i pAAVS1-Puro-*ESR2* opisana je u poglavlju 3.2.4.3.

Transfekcija staničnih linija provedena je koristeći komercijalni komplet Xfect RNA Transfection Reagent. Stanične linije su 24 sata prije transfekcije izbrojane i nasađene u pločice za rast sa šest bunarčića, kao što je opisano u poglavlju 3.2.5.1., pri gustoći od 3×10^5 stanica po bunarčiću. Na dan transfekcije, u sterilnim mikroepruvetama pomiješano je 100 μ L pufera Xfect i 5 μ g plazmidne DNA, odnosno 2,5 μ g DNA plazmida pCas-Guide-AAVS1 i 2,5 μ g DNA plazmida donora pAAVS1-Puro-*ESR1* ili pAAVS1-Puro-*ESR2*. Tako pripremljena smjesa pomiješana je pomoću vorteks miješalice tijekom 5 s te je u reakcijske smjese potom dodano 1,5 μ L polimera Xfect (0,3 μ L/ μ g DNA) i sadržaj mikroepruveta je ponovno pomiješan 10 s i potom inkubiran 10 minuta na sobnoj temperaturi. Potom je 100 μ L transfekcijske smjese nakapano u odgovarajuće bunarčiće, u koje je prethodno dodan 1 mL svježeg medija DMEM bez dodatka seruma, i pločice za rast stanica su vraćene u inkubator, pri standardnim uvjetima. Nakon inkubacije od četiri sata uklonjen je medij iz bunarčića i zamijenjen s 2 mL kompletiranog medija DMEM + 10 % FBS. Dan nakon transfekcije stanica započeta je selekcija puromicinom u svrhu uspostave klonalnih staničnih linija, kao što je opisano u

3.2.5.3. Uspostava klonalnih staničnih linija s ciljanom ugradnjom gena *ESR1* ili *ESR2*

Za provedbu selekcije staničnih linija koje imaju ugrađen gen *ESR1* ili *ESR2*, stanicama je dodan antibiotik puromicin u koncentraciji od 1 µg/mL te je isti postupak ponavlján svaka dva do tri dana, uz dodatak svježeg medija s antibiotikom. Nakon nekoliko dana, u bunarčićima je uočeno da većina stanica nije preživjela selekcijski postupak, dok su preživjele stanice započele formiranje kolonija. Završetkom razdoblja selekcije u trajanju od otprilike dva tjedna, odnosno kada su stanice postigle približno 70 % konfluentnosti, iste su tripsinizirane, izbrojane i primjenom tzv. metode graničnog razrjeđenja (eng. *limiting dilution*) razrijeđene do konačne koncentracije od 5 stanica/mL. U svrhu dobivanja monoklonalnih populacija stanica, stanična suspenzija je nasadena u pločice s 96 bunarčića, s ciljem izolacije pojedinačnih klonova po bunarčiću. Bunarčići bez stanica, kao i oni u kojima je bilo prisutno više stanica, isključeni su iz daljnje analize zbog rizika od razvoja poliklonalnih populacija s heterogenim genetskim obilježjima. Bunarčići s pojedinačnim klonovima odabrani su za daljnje praćenje te su redovito promatrani pod svjetlosnim mikroskopom. Kada bi isti dosegli približno 70-80 % konfluentnosti, klonovi su postupno prebacivani u veće formate za rast, najprije pločice s 24 ili 6 bunarčića, a potom i bočice za rast stanica T25/T75. Nakon što je pojedina kolonija popunila bunarčić pločice za rast sa šest bunarčića, dio stanične suspenzije je raspodijeljen u više bunarčića, kako bi se omogućila analiza iste klonalne populacije na razini genske, a kasnije i proteinske ekspresije, dok je preostali dio stanica pohranjen zamrzavanjem na -80 °C. Za analizu genske ekspresije provedena je izolacija RNA iz taloga stanica klonova, reverzna transkripcija i konačno qPCR analiza ekspresije *ESR1* ili *ESR2*, kao što je opisano u poglavljima 3.2.2.1. – 3.2.2.3. Za daljnje eksperimente odabrani su klonovi sa stabilno pojačanom genskom ekspresijom, potvrđenom trima neovisnim izolacijama RNA. U odabranim klonovima potom je provedena i analiza proteinske ekspresije ciljanog gena, kao što je opisano u poglavljima 3.2.7.1. – 3.2.7.3.

3.2.5.4. Analiza vijabilnosti stanica

Za procjenu vijabilnosti stanica, odnosno njihovog preživljenja nakon tretmana inhibitorom receptora estrogena (tamoksifen) i inhibitorima signalnog puta HH-GLI

(vismodegib, sonidegib, GANT 61 i arsenov trioksid), kao i kombinacijom navedenih inhibitora, korišten je test MTT. Stanice su nasađene u četriplicatima u pločice za rast s 96 bunarčića, pri gustoći od 2×10^3 stanica po bunarčiću i ukupnom volumenu od 100 μL medija. Nakon 24 sata, stanice su tretirane dodavanjem 100 μL ispitivanih spojeva u različitim koncentracijama, prethodno pripremljenih kao što je prikazano u Tablici 19. Za ispitivanje kombiniranog učinka, stanice su tretirane istodobnom primjenom TAM-a i ATO-a u različitim koncentracijama oba spoja (Tablica 20.). U kombiniranim tretmanima korištene su niže koncentracije inhibitora u odnosu na pojedinačne tretmane, odabrane na temelju rezultata pojedinačnih tretmana, pri čemu su ispitane sve relevantne kombinacije primijenjenih koncentracija. Na dan očitavanja, stanicama je dodano 40 μL otopine MTT-a u mediju bez seruma konačne koncentracije 1 mg/mL. Pločice su inkubirane četiri sata u inkubatoru pri 37 °C i 5 % CO_2 , zaštićene od svjetla. Nakon inkubacije, u svaki bunarčić je dodano 160 μL otopine dimetil sulfoksida (DMSO). Apsorbancija pri valnoj duljini od 570 nm izmjerena je fluorimetrijski pomoću spektrofotometra. Na temelju dobivenih rezultata izračunate su vrijednosti IC_{50} za pojedine inhibitore pomoću web alata AAT Bioquest IC_{50} Calculator.

Tablica 19. Priprema tretmana kemijskih spojeva tamoksifena, vismodegiba, sonidegiba, GANT 61 i arsenovog trioksida za test MTT

TAMOKSIFEN/ EtOH	Početna konc. spoja	V spoja/ μL	V medija/ μL	Radna konc. spoja/ μL	V nanesen u bunarčić/ μL	Konačna konc. spoja/ μL
	10 mM	0,3	1499,7	2	100	1
	10 mM	2,25	1497,75	15	100	7,5
	10 mM	3	1497	20	100	10
	10 mM	5,25	1494,75	35	100	17,5
	10 mM	10,5	1489,5	70	100	35
VISMODEGIB/ DMSO	Početna konc. spoja	V spoja/ μL	V medija/ μL	Radna konc. spoja/ μL	V nanesen u bunarčić/ μL	Konačna konc. spoja/ μL
	5 mM	1,5	1498,5	5	100	2,5
	5 mM	9	1491	30	100	15
	5 mM	18	1482	60	100	30
	5 mM	30	1470	100	100	50
	5 mM	45	1455	150	100	75
SONIDEGIB/ DMSO	Početna konc. spoja	V spoja/ μL	V medija/ μL	Radna konc. spoja/ μL	V nanesen u bunarčić/ μL	Konačna konc. spoja/ μL
	5 mM	1,5	1498,5	5	100	2,5
	5 mM	4,5	1495,5	15	100	7,5
	5 mM	9	1491	30	100	15
	5 mM	15	1485	50	100	25
	5 mM	21	1479	70	100	35

Tablica 19. - nastavak

GANT 61/ EtOH	Početna konc. spoja	V spoja/μL	V medija/μL	Radna konc. spoja/μL	V nanesen u bunarčić/μL	Konačna konc. spoja/μL
	5 mM	1,5	1498,5	5	100	2,5
	5 mM	3	1497	10	100	5
	5 mM	4,5	1495,5	15	100	7,5
	5 mM	6	1494	20	100	10
	5 mM	9	1491	30	100	15
ATO/ NaOH	Početna konc. spoja	V spoja/μL	V medija/μL	Radna konc. spoja/μL	V nanesen u bunarčić/μL	Konačna konc. spoja/μL
	50 mM (A)	1,5	3000	25	100	12,5
	B	1500 A u B	1500	12,5	100	6,25
	C	1500 B u C	1500	6,25	100	3,125
	D	1500 C u D	1500	3,13	100	1,56
	E	1500 D u E	1500	1,56	100	0,78

Tablica 20. Priprema kombiniranih tretmana tamoksifenom i arsenovim trioksidom za test MTT

ATO/TAM (μM)	Početna konc. ATO/μM	V ATO/μL	Početna konc. TAM/μM	V TAM/μL	V medija/μL	V nanesen u bunarčić/μL
0 / 0	200	0	200	0	1000	100
0 / 0,5	200	0	200	5	995	100
0 / 5	200	0	200	50	950	100
0 / 10	200	0	200	100	900	100
0 / 20	200	0	200	200	800	100
0,5 / 0	200	5	200	0	995	100
0,5 / 0,5	200	5	200	5	990	100
0,5 / 5	200	5	200	50	945	100
0,5 / 10	200	5	200	100	895	100
0,5 / 20	200	5	200	200	795	100
2,5 / 0	200	25	200	0	975	100
2,5 / 0,5	200	25	200	5	970	100
2,5 / 5	200	25	200	50	925	100
2,5 / 10	200	25	200	100	875	100
2,5 / 20	200	25	200	200	775	100
5 / 0	200	50	200	0	950	100
5 / 0,5	200	50	200	5	945	100
5 / 5	200	50	200	50	900	100
5 / 10	200	50	200	100	850	100
5 / 20	200	50	200	200	750	100

Tablica 20. - nastavak

7,5 / 0	200	75	200	0	925	100
7,5 / 0,5	200	75	200	5	920	100
7,5 / 5	200	75	200	50	875	100
7,5 / 10	200	75	200	100	825	100
7,5 / 20	200	75	200	200	725	100

3.2.5.5. Analiza migracijske sposobnosti stanica

Ova analiza, zajedno s nizom dodatnih funkcionalnih testova opisanih u sljedećim poglavljima, provedena je radi karakterizacije modela *knock-in* u usporedbi s ishodišnim staničnim linijama te ispitivanja učinka inhibicije ER i signalnog puta HH-GLI na biološka svojstva stanica HNSCC-a. U tu svrhu primijenjen je test zacjeljivanja rane (eng. *wound healing assay*), koji se temelji na praćenju mehanički induciranog ureza na monosloju stanica uzgojenih do visoke konfluencije. Stanice su nasađene u pločice za rast s 24 bunarčića pri gustoći od 2×10^5 stanica po bunarčiću te su inkubirane 24 sata kako bi se postigla visoka konfluencija (80-90 %). Nakon uklanjanja kompletiranog medija, u bunarčiće je dodan medij bez seruma, kako bi se u analizi migracijske sposobnosti eliminirao proliferativni potencijal stanica. Sljedećeg dana, u svakom od bunarčića izrađena su dva linearna ureza korištenjem najmanjeg plastičnog nastavka mikropipete, nakon čega su bunarčići isprani PBS-om. Stanice su potom tretirane kemijskim spojevima tamoksifenom (5 μ M) i arsenovim trioksidom (2 μ M), kao i kombinacijom navedenih spojeva, pripremljenima u mediju bez seruma. Kao kontrola korištene su stanice tretirane odgovarajućim otapalima ispitivanih spojeva, odnosno apsolutnim etanolom za TAM i 1 M NaOH za ATO. Svaki bunarčić je fotografiran pomoću kamere za mikroskop na četiri unaprijed definirana položaja na dan primjene tretmana te 24 i 48 sati nakon tretiranja. Analiza zatvaranja ureza provedena je korištenjem programa ImageJ uz dodatak *Wound Healing Tool*, koji omogućava identifikaciju rubova ureza i kvantifikaciju površine rane.

3.2.5.6. Analiza invazivnosti stanica

Sposobnost usmjerene invazije stanica prema kemoatraktantu (FBS) ispitana je pomoću komorica za invaziju stanica (eng. *Transwell invasion assay*) uz dodatak matrigela, koji oponaša bazalnu laminu. Najprije je pripremljen pufer za oblaganje (eng. *coating buffer*) koji je potom profiltriran kroz filter s veličinom pora 0,2 μ m i ohlađen na ledu kroz najmanje dva

sata. U isto vrijeme na ledu je otopljen i alikvot matrigela, koji je potom resuspendiran nježnim okretanjem mikroeprevete. Sav pribor koji je dolazio u kontakt s matrigelom također je prethodno ohlađen. Potom je pripremljena otopina za oblaganje komorica miješanjem pufera za oblaganje i matrigela u finalnoj koncentraciji od 250 $\mu\text{g/mL}$. Tako pripremljena otopina je lagano promiješana rotiranjem mikroeprevete i inkubirana na ledu do upotrebe. Komorice za invaziju su postavljene u pločice za rast s 24 bunarčića te je u svaku dodano 100 μL otopine za oblaganje, nakon čega su iste inkubirane dva sata u inkubatoru za rast stanica. Neposredno prije nasađivanja stanica, višak pufera za oblaganje uklonjen je pomoću mikropipete, pazeći pritom da se ne ošteti sloj matrigela, kao i da se isti ne osuši prije dodatka suspenzije stanica. U bunarčiće pločice za rast dodano je 750 μL medija s FBS-om kao kemoatraktantom, uz izbjegavanje stvaranja mjehurića ispod umetaka. Stanice su nasađene u komorice za rast pri gustoći od $2,5 \times 10^4$ stanica po bunarčiću, u ukupnom volumenu od 500 μL medija za rast bez FBS-a. U komorice su odmah dodani i tretmani, tamoksifen (5 μM) i arsenov trioksid (2 μM), pojedinačno i u kombinaciji, kao i odgovarajuće kontrole, identično kao u prethodno opisanom testu migracijske sposobnosti. Stanice su ostavljene da invadiraju u komoricama tijekom 48 sati u inkubatoru, nakon čega je membrana komorice isprana dva puta po 5 minuta uranjanjem u 1 mL pufera PBS u bunarčiću pločice s 24 bunarčića. Sloj matrigela, kao i stanice koje se nalaze s gornje strane membrane, odnosno one koje nisu invadirale, uklonjeni su kružnim pokretima pomoću pamučnog štapića za uši prethodno navlaženog u PBS-u. Stanice koje su preostale na donjoj strani membrane komorice potom su fiksirane uranjanjem u 3,6 %-tni formaldehid tijekom 10 minuta, zatim ponovno isprane dva puta u trajanju od 5 minuta uranjanjem u PBS i konačno obojane 1 %-tnom otopinom boje kristal ljubičasto tijekom 30 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon bojanja, komorice su isprane u vodovodnoj vodi, membrane su zatim pažljivo izrezane pomoću skalpela i uklopljene u medij za uklapanje na predmetno stakalce, na način da je membrana sa stanicama bila okrenuta prema gore. Stanice su vizualizirane pomoću svjetlosnog mikroskopa Olympus BX51 i programa *Olympus Stream Essentials*, pri čemu je svaka membrana fotografirana na najmanje pet nasumično odabranih mjesta, uz izbjegavanje rubnih područja. Kvantifikacija boja stanica provedena je pomoću programa ImageJ, a rezultati su izraženi kao prosječan broj invadiranih stanica u odnosu na kontrolu.

3.2.5.7. Analiza sposobnosti formiranja kolonija

Za ispitivanje sposobnosti formiranja kolonija (eng. *colony forming assay*) stanice su nasađene u pločice za rast s 24 bunarčića pri gustoći od 1×10^3 stanica po bunarčiću. Idućeg

dana provedeni su tretmani stanica s po dvije različite koncentracije spojeva TAM-a (1 i 5 μM) i ATO-a (1 i 2 μM), kao i njihovih kombinacija. Kao kontrola služile su stanice tretirane otapalima navedenih spojeva. Formiranje i rast kolonija praćeni su tijekom razdoblja od dva tjedna, pri čemu je svaka tri dana stanicama dodan svježi medij s odgovarajućim tretmanom. Nakon dva tjedna, uklonjen je medij sa stanica, a bunarčići su isprani tri puta po 5 minuta PBS-om. Fiksacija stanica provedena je inkubacijom stanica u 3,6 %-tnom formaldehidu tijekom 10 minuta na sobnoj temperaturi, nakon čega su stanice ponovno isprane tri puta PBS-om. Vizualizacija kolonija provedena je bojanjem u 1 %-tnoj otopini kristal ljubičastog tijekom 5 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon uklanjanja boje, bunarčići su ispirani vodovodnom vodom sve dok višak boje nije u potpunosti uklonjen, a kolonije ostale jasno vidljive i intenzivno obojane. Kvantitativna analiza kolonija provedena je fotografiranjem bunarčića pomoću mobilnog uređaja i obradom dobivenih fotografija u programu ImageJ.

3.2.6. Protočna citometrija

3.2.6.1. Analiza staničnog ciklusa

Analiza staničnog ciklusa provedena je primjenom interkalirajuće boje propidijev jodid (eng. *propidium iodide*, PI) i RNaze A na stolnom protočnom citometru Guava Muse Cell Analyzer. Stanice su nasadene u pločice za rast sa šest bunarčića pri gustoći od 2×10^5 stanica po bunarčiću. Dvadeset i četiri sata nakon nasađivanja stanice su tretirane pojedinačno i u kombinaciji sa spojevima tamoksifenom (5 μM) i arsenovim trioksidom (2 μM), dok su kao kontrole korišteni tretmani otapalima istih spojeva. Stanice su sakupljene tripsinizacijom nakon 24 i 48 sati od tretmana, nakon čega su centrifugirane 5 minuta pri 300 x g na 4 °C. Dobiveni stanični talog resuspendiran je u 1 mL PBS-a i ponovno centrifugiran. Nakon toga talog je resuspendiran u 50 μL PBS-a te je tako pripremljena stanična suspenzija dodavana kap po kap u sterilne epruvete s ledeno hladnim 70 %-tnim etanolom radi fiksacije stanica, uz istodobno miješanje na vorteks miješalici, kako bi se spriječilo stvaranje staničnih agregata. Uzorci su potom pohranjeni preko noći u zamrzivač na -20 °C. Na dan analize, fiksirane stanice prebačene su u mikroepruvete od 1,5 mL i centrifugirane 5 minuta pri 300 x g na 4 °C. Talog je resuspendiran u 500 μL PBS-a i ponovno ispran, nakon čega je resuspendiran u 200 μL otopine RNaze A (0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) i inkubiran 15 minuta u inkubatoru na 37 °C i 5 % CO_2 . Nakon završetka inkubacije, uzorci su prebačeni na led i svakom uzorku je dodano 200 μL otopine PI (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) te je ponovno slijedila inkubacija od 30 minuta na sobnoj temperaturi u mraku. Konačno, prije

očitanja na uređaju, uzorci su dobro resuspendirani i analizirani u tri neovisna očitavanja na unaprijed kalibriranom protočnom citometru. Dobiveni podatci analizirani su pomoću programa Muse 1.8 Analysis.

3.2.6.2. Analiza apoptoze stanica

Analiza ulaska stanica u apoptozu provedena je primjenom komercijalnog kompleta Muse Caspase-3/7 Kit, kojim se istodobno procjenjuje aktivacija kaspaza 3 i 7 te permeabilizacija stanične membrane. Postupak nasađivanja i tretiranja stanica bio je jednak onome opisanom za analizu staničnog ciklusa (poglavlje 3.2.6.1.). Nakon 24 i 48 sati od provedenih tretmana, sakupljen je medij u kojem su stanice rasle, nakon čega su stanice odvojene tripsinizacijom i zajedno s prikupljenim medijem korištene za daljnju analizu. Uzorci su centrifugirani 5 minuta pri 300 x g na 4 °C, a dobiveni talog resuspendiran je u 50 µL pufera BA, na način da finalna koncentracija pripremljenih stanica bude u rasponu $1 \times 10^5 - 5 \times 10^6$ st./mL. Nakon toga, u svaki uzorak dodano je 5 µL reagensa Muse Caspase-3/7, prethodno razrijeđenog u PBS-u u omjeru 1:8. Uzorci su potom inkubirani 30 minuta na 37 °C u inkubatoru s 5 % CO₂. U svaku epruvetu dodano je 150 µL radne otopine Muse Caspase 7-AAD, pripremljene miješanjem 2 µL Muse Caspase 7-AAD i 148 µL pufera BA, nakon čega je provedena inkubacija u trajanju od 5 minuta u mraku na sobnoj temperaturi. Analiza je provedena na protočnom citometru, pri čemu svaki uzorak očitao u tri neovisna mjerenja. Dobiveni podatci analizirani su pomoću softvera proizvođača Muse 1.8 Analysis.

3.2.7. Analiza ekspresije proteina

3.2.7.1. Izdvajanje i određivanje koncentracije proteina

Proteini su izolirani iz stanica primjenom pufera za lizu uz sonifikaciju. Za izolaciju proteina namijenjenih za detekciju westernskom metodom otiska korišten je pufer RIPA uz dodatak inhibitora proteaza (jedna tableta na 10 mL pufera). Stanice su sakupljenje struganjem na ledu nakon uklanjanja medija i ispiranja PBS-om, centrifugirane 5 minuta pri 300 x g na 4 °C, a dobiveni talog je resuspendiran u 50 µL pufera za lizu. Uzorci su sonicirani dva puta po 15 s na ledu pomoću sonifikatora i sonde debljine 1 mm, nakon čega su centrifugirani 30 minuta pri 16 000 x g na 4 °C. Supernatant s izdvojenim proteinima prebačen je u čiste mikroepruvete i pohranjen na -80 °C. Za koimunoprecipitaciju (co-IP) proteini su

izolirani iz stanica sakupljenih iz nekoliko bočica za rast stanica T75, primjenom blagog pufera TENN, koji omogućuje očuvanje proteinskih interakcija, uz dodatak inhibitora proteaza. Stanice su sakupljene na jednak način kao što je opisano gore, a talog je resuspendiran u 150 µL pufera TENN i soniciran dva puta po 10 s. Daljnji postupak obrade uzoraka bio je jednak kao i za westernsku metodu otiska.

Koncentracija proteina određena je kolorimetrijskom metodom BCA, primjenom komercijalnog kompleta Pierce BCA Protein Assay, u pločicama s 96 bunarčića. Radna otopina reagensa BCA pripremljena je miješanjem otopina A i B u omjeru 50:1. Za izradu baždarnog pravca korištena su serijska razrjeđenja albumina iz goveđeg seruma (eng. *bovine serum albumin*, BSA) početne koncentracije 1 mg/mL, čime su dobivene finalne koncentracije od 1500, 1000, 750, 500, 375, 250, 125, 62,5 i 0 µg/mL. U svaki bunarčić prethodno je dodano 200 µL radne otopine reagensa BCA, nakon čega je dodano 25 µL uzoraka proteina razrijeđenih 10 puta u ultračistoj vodi ili odgovarajućih standarda, u duplikatima. Pločica je inkubirana 30 minuta na 37 °C, zaštićena od svjetla. Apsorbancija uzoraka izmjerena je pri valnoj duljini od 562 nm pomoću spektrofotometra.

3.2.7.2. Detekcija proteina westernskom metodom otiska

U svrhu karakterizacije odabranih klonova u odnosu na ishodišne stanične linije, analizirana je ekspresija proteina ERα i ERβ, kao i proteina pokazatelja aktivnosti signalnog puta HH-GLI (GLI1, PTCH1 i SHH) westernskom metodom otiska. Proteini su najprije razdvojeni elektroforezom na SDS-poliakrilamidnom gelu, pri čemu je za razdvajanje korišten 10 %-tni gel, a za sabijanje 5 %-tni poliakrilamidni gel, čiji sastavi su prikazani u Tablici 21. Za svaku analizu pripremljeno je 40 µg proteina, koji su pomiješani s četvrtinom konačnog volumena 4x pufera za nanošenje (pufer LB) i potom denaturirani 10 minuta pri 95 °C. Prije nanošenja na gel, uzorci su centrifugirani 1 minutu pri 13 200 rpm. Elektroforeza je provedena u sustavu za elektroforezu SDS-PAGE elektroforezu Mini-PROTEAN III napunjenom puferom za elektroforezu (RB), prvih 10 minuta pri konstantnom naponu od 90 V, a zatim tijekom 90 minuta pri 110 V. Kao proteinski marker korišten je CozyHi Prestained Protein Ladder. Po završetku elektroforeze, proteini su preneseni na nitroceluloznu membranu veličine pora 0,2 µm pomoću modula za prijenos proteina Mini Trans-Blot sustava Mini-PROTEAN III, koristeći pufer za prijenos (TB). Prijenos proteina proveden je pri konstantnom naponu od 13 V preko noći na sobnoj temperaturi. Uspješnost prijenosa proteina provjerena je bojanjem membrane pomoću boje naftol plavo, a potom i uklanjanjem boje pomoću otopine za

odbojavanje. Radi sprječavanja nespecifičnog vezanja antitijela membrane su blokirane u 5 %-tnoj otopini mlijeka u prahu u puferu TBST tijekom sat vremena na sobnoj temperaturi uz laganu trešnju. Nakon blokiranja membrane su inkubirane s primarnim antitijelima razrijeđenima u 5 %-tnoj otopini mlijeka u TBST-u preko noći na 4 °C. Popis korištenih primarnih antitijela i njihova razrjeđenja prikazan je u Tablici 4. Kao kontrola količine nanesenih proteina korišten je β -aktin. Sljedećeg dana membrane su isprane tri puta po 5 minuta u puferu TBST, nakon čega su inkubirane sa sekundarnim antitijelima odgovarajućih razrjeđenja u 5 %-tnoj otopini mlijeka u TBST-u tijekom sat vremena pri sobnoj temperaturi (Tablica 5.). Detekcija signala proteina provedena je primjenom kemiluminiscentnih reagensa SuperSignal West Pico i SuperSignal West Femto, pripremljenih u omjeru 3:1. Membrane su vizualizirane pomoću uređaja UVITEC Alliance Q9 Mini.

Tablica 21. Sastav i omjeri komponenti poliakrilamidnih gelova za razdvajanje i sabijanje

KOMPONENTA	VOLUMEN / mL
GEL ZA RAZDVAJANJE (10 %)	
voda	4
30 % AAS	3,3
1,5 M TRIS-HCl pufer, pH = 8,8	2,5
10 % SDS	0,1
10 % amonijev persulfat	0,1
TEMED	0,004
GEL ZA SABIJANJE (5 %)	
voda	2,1
30 % AAS	0,5
1 M TRIS-HCl pufer, pH = 6,8	0,38
10 % SDS	0,03
10 % amonijev persulfat	0,03
TEMED	0,003

3.2.7.3. Detekcija proteina imunofluorescentnim bojanjem

Osim kvantitativne razine ekspresije proteina ER α i ER β koja je određena westernskom metodom otiska, radi vizualizacije lokalizacije ekspresije proteina provedeno je imunofluorescentno bojanje stanica. Stanice su nasadene u mikroskopsko stakalce s 18 bunarčića (μ -Slide 18 Well), pri gustoći od 5×10^4 stanica po bunarčiću, u ukupnom volumenu od 100 μ L medija. Dva dana nakon nasađivanja stanice su isprane tri puta po 5 minuta u PBS-

u, nakon čega su fiksirane u 3,6 %-tnom formaldehidu tijekom 15 minuta na sobnoj temperaturi i ponovno isprane tri puta. Nakon toga uslijedila je permeabilizacija inkubacijom u metanolu, također tijekom 15 minuta na sobnoj temperaturi, uz ponovljen korak ispiranja nakon inkubacije. Nespecifično vezanje antitijela reducirano je inkubacijom u otopini za blokiranje tijekom 30 minuta na sobnoj temperaturi. Primarna i sekundarna antitijela pripremljena su u razrijeđenju 1:100 u 2 %-tnoj otopini BSA u PBS-u. Popis korištenih antitijela nalazi se u Tablici 4. Po završetku inkubacije u Protein Block-u, u svaki bunarčić je nakapano po 50 μ L otopine primarnog antitijela od interesa te je uslijedila inkubacija preko noći na 4 °C. Sljedećeg dana uklonjena je otopina primarnog antitijela, a bunarčići su isprani tri puta po 5 minuta PBS-om, nakon čega je provedena inkubacija sa sekundarnim antitijelima (Tablica 5.) tijekom sat vremena na sobnoj temperaturi u mraku. Konačno, nakon uklanjanja sekundarnih antitijela i ispiranja bunarčića, na uzorke je dodano po 100 μ L 0,02 %-tne otopine boje DAPI i inkubirano je tijekom 5 minuta na sobnoj temperaturi u mraku. Nakon posljednjeg ispiranja u PBS-u, stanice su vizualizirane na mikroskopu EVOS Fluid Imaging System, a dobivene fotografije obrađene su pomoću programa ImageJ.

3.2.7.4. Određivanje interakcije između proteina metodom koimunoprecipitacije

Koimunoprecipitacija je provedena sa svrhom ispitivanja proteinske interakcije između proteina ER α i SHH, primjenom magnetnih zrnaca Dynabeads Protein G. Izolacija ukupnih proteina i određivanje njihove koncentracije provedeni su prema protokolu opisanom u poglavlju 3.2.7.1. Magnetna zrnca Dynabeads resuspendirana su laganim okretanjem bočice, nakon čega je 50 μ L suspenzije zrnaca (1,5 mg) po uzorku alikvotirano u mikroeprovete volumena 2 mL. Nakon izdvajanja zrnaca pomoću magnetnog stalka i uklanjanja supernatanta, zrnca su dva puta isprana s 500 μ L pufera TENN uz resuspendiranje i ponovno izdvajanje na magnetnom stalku. Na isprana zrnca dodano je 4 μ g primarnog anti-ER α antitijela razrijeđenog u 200 μ L PBS-a s 0,02 % Tween20, nakon čega su uzorci inkubirani uz rotaciju tijekom sat vremena na sobnoj temperaturi, kako bi se omogućilo vezanje antitijela na G-protein. Kao negativna kontrola korištena su primarna zrnca inkubirana u puferu bez primarnog antitijela. Nakon inkubacije, zrnca su izdvojena pomoću magneta, supernatant je uklonjen te je kompleks zrnca-antitijelo resuspendiran u 200 μ L pufera PBS-Tween20. Kompleksu magnetnih zrnaca i antitijela potom je dodan lizat proteina u količini od 1 mg ukupnih proteina po uzorku. Uzorci su inkubirani preko noći na 4 °C uz kontinuiranu rotaciju, kako bi se omogućilo vezanje ciljnih proteina i njihovih interakcijskih partnera na antitijela vezana za G-protein. Nakon prekonoćne

inkubacije, zrnca su izdvojena, a supernatant pohranjen za eventualne daljnje analize. Kompleks zrnca-antitijelo-antigen ispran je tri puta s 200 μ L PBS-a uz magnetno izdvajanje nakon svakog ispiranja. Kako bi se smanjila ko-elucija nespecifično vezanih proteina sa stijenki mikroeproveta, zrnca su resuspendirana u 100 μ L PBS-a i prebačena u čiste, prethodno označene mikroeprovete. Elucija vezanih proteina provedena je dodatkom 2x pufera za nanošenje (LB), nakon čega su uzorci inkubirani 10 minuta na 70 °C. Zrnca su potom magnetski izdvojena, a supernatant koji sadrži eluate korišten je za daljnju analizu westernskom metodom otiska. Uz eluate, za analizu je korišteno 40 μ g ukupnih proteina po uzorku kao input. Popis antitijela korištenih za detekciju proteina od interesa nalazi se u Tablicama 4. i 5.

3.2.8. Sekvenciranje RNA

3.2.8.1. Izolacija RNA i priprema uzoraka za sekvenciranje RNA

Sekvenciranje RNA provedeno je kao završni eksperimentalni korak s ciljem analize učinka pojačane ekspresije *ESR1* i *ESR2*, ostvarene pristupom *knock-in*, kao i njegove inhibicije primjenom inhibitora ER (tamoksifen) te inhibitora signalnog puta HH-GLI (arsenov trioksid), pojedinačno i u kombinaciji, na ekspresiju gena, regulaciju bioloških procesa i signalnih puteva u staničnim modelima HNSCC-a, s ciljem dobivanja informacija koje bi mogle doprinijeti razvoju novih terapijskih pristupa. Za sekvenciranje RNA korištene su stanične linije CAL-27, CAL-27 *ESR1*^{KI} i CAL-27 *ESR2*^{KI}. Stanice su nasađene u pločice za rast sa šest bunarčića pri gustoći od 3×10^5 stanica po bunarčiću. Idućeg dana stanice su tretirane tamoksifenom (5 μ M) i arsenovim trioksidom (2 μ M), pojedinačno i u kombinaciji u istim koncentracijama, dok su kontrolne stanice tretirane odgovarajućim otapalima. Svi eksperimenti provedeni su u biološkim triplikatima.

Nakon 24 sata od tretmana, stanice su isprane PBS-om, tripsinizirane te je prikupljen stanični talog za izolaciju ukupne RNA korištenjem komercijalnog kompleta Zymo Quick-RNA Miniprep Kit. Talog stanica resuspendiran je dodatkom 450 μ L RNA Lysis Buffera, nakon čega su uzorci centrifugirani 2 minute pri 16 000 x g na sobnoj temperaturi. Dobiveni lizat prenesen je na kolonicu Spin-Away, postavljenu u epruvetu za sakupljanje, i centrifugiran 30 s pri 16 000 x g. Nakon centrifugiranja, kolonice su bačene, a filtrat je sačuvan. Filtratu je dodano 450 μ L apsolutnog etanola, smjesa je resuspendirana i prenesena na kolonicu Zymo-Spin IIIICG, postavljenu u novoj mikroeproveti za sakupljanje. Nakon centrifugiranja 30 s pri 16 000 x g, tekućina iz epruvete za sakupljanje je bačena, a kolonica je zadržana. Kolonica je

potom isprana dodatkom 400 μ L RNA Wash Buffera i ponovno centrifugirana. Nakon odvajanja sakupljene tekućine, na membranu kolonice nanese se 80 μ L pripremljene smjese DNaze (5 μ L DNase I i 75 μ L DNA Digestion Buffer po uzorku), nakon čega je provedena inkubacija u trajanju od 15 minuta na sobnoj temperaturi. Po završetku inkubacije, na kolonicu je dodano 400 μ L RNA Prep Buffera te su uzorci centrifugirani 30 s pri 16 000 x g. Kolonica je zatim isprana dodatkom 700 μ L RNA Wash Buffera, a potom i dodatnih 400 μ L istog pufera uz centrifugiranje nakon svakog ispiranja. Nakon završnog ispiranja, kolonica je prenesena u čistu mikroeprevetu od 1,5 mL, a RNA je eluirana dodatkom 50 μ L DNase/Rnase-Free vode uz centrifugiranje 30 s pri 16 000 x g. Koncentracija i čistoća izolirane RNA određene je spektrofotometrijski. Nakon izolacije, uzorci su pripremljeni za slanje na sekvenciranje u tvrtku Novogene (München, Njemačka). Uzorci su alikvotirani u sterilne mikroeprevete od 1,5 mL u volumenu od 10 μ L po uzorku. Sve mikroeprevete su dodatno zabrtvljene parafilmom. Uzorci su transportirani na suhom ledu, kako bi se očuvao integritet RNA.

3.2.8.2. Priprema biblioteka cDNA i sekvenciranje RNA

Priprema biblioteka cDNA i sekvenciranje transkriptoma metodom mRNA sekvenciranja uparenih krajeva (eng. *paired-end sequencing*, PE) provedeni su u tvrtki Novogene, u skladu s njihovim standardnim protokolima. mRNA je izdvojena iz ukupne RNA korištenjem oligo dT početnica koje su imobilizirane na magnetskim zrnima. Nakon fragmentacije mRNA, sinteza prvog lanca cDNA provedena je pomoću nasumičnih heksamera i enzima reverzne transkriptaze, nakon čega je uslijedila sinteza drugog lanca cDNA uz uporabu deoksiuridin-trifosfata (dUTP-a) umjesto deoksitimidin-trifosfata (dTTP-a). Ugradnja dUTP-a u drugi lanac omogućava određivanje orijentacije pojedinog transkripta, odnosno zadržava informaciju s kojeg lanca DNA isti potječe (eng. *strand-specific library*). Sintetizirane molekule cDNA potom su podvrgnute postupcima popravljivanja krajeva (eng. *end repair*), dodavanja jednog adenzina na 3' kraj svakog fragmenta (eng. *A-tailing*), ligaciji specifičnih adapterskih sekvenci, selekciji veličine fragmenata, enzimatskoj razgradnji pomoću enzima USER (eng. *uracil-specific excision reagent*), amplifikaciji i pročišćavanju. Kvaliteta i koncentracija tako pripremljenih biblioteka provjerene su pomoću fluorometra Qubit i qPCR-a za kvantifikaciju te Bioanalyzera radi određivanja distribucije veličine fragmenata. Nakon kontrole kvalitete, biblioteke su pomiješane na temelju efektivne koncentracije i ciljane količine podataka te podvrgnute sekvenciranju na uređaju Illumina NovaSeq 6000 po principu sekvenciranja sintezom (eng. *sequencing by synthesis*). Tijekom sekvenciranja fluorescentno

obilježeni dNTP-ovi ugrađivani su u novonastajuće lance, pri čemu je emitirana fluorescencija bilježena i pretvarana u zapise pomoću računalnog softvera.

3.2.8.3. Bioinformatička obrada i analiza podataka dobivenih sekvenciranjem

Podatci dobiveni sekvenciranjem obrađeni su i analizirani tijekom jednomjesečnog boravka na Institutu za bioinformatiku Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Innsbrucku, pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Huberta Hackla, s obzirom na to da navedeni Institut posjeduje naprednu računalnu infrastrukturu kroz koju je omogućen pristup specijaliziranim bioinformatičkim alatima potrebnima za obradu velikih skupova podataka.

Prije daljnje obrade, kvaliteta izlaznih podataka procijenjena je pomoću alata *FastQC* (v 0.12.1) [233]. Analizirani su sljedeći parametri: Phred-vrijednost 30 (Q30), zastupljenost pojedinih nukleotida i udio sekvenci GC, udio očitavanja N, udio dupliciranih sekvenci te prekomjerno zastupljene sekvence. Budući da su svi parametri bili unutar očekivanih granica, proveden je sljedeći korak, a to je uklanjanje adapterskih sekvenci pomoću alata *Trimmomatic PE* (v 0.39) [234]. Tijekom ovog postupka, osim uklanjanja adapterskih sekvenci, uklonjene su i niskokvalitetne baze na početku i na kraju očitavanja. Na taj način dobiveni su visokokvalitetni, filtrirani podatci (eng. *clean reads*), koji su korišteni u svim sljedećim koracima bioinformatičke analize. Neobrađene sekvence poravnate su na referentni humani genom verzije GRCh38.p14 pomoću programskog alata *STAR* (v 2.7.11b) [235]. Nakon poravnanja, kvantifikacija genske ekspresije provedena je određivanjem broja očitavanja mapiranih na pojedine anotirane gene humanog genoma pomoću alata *featureCounts* [236], koji je dio softverskog paketa *Subread* (v 2.0.6) [236]. Dobiveni brojevi očitavanja normalizirani su izračunom RPK (eng. *reads per kilobase*), čime je broj očitavanja korigiran u odnosu na duljinu gena. Na temelju vrijednosti RPK izračunate su vrijednosti TPM (eng. *transcripts per million*) skaliranjem unutar svakog uzorka, čime je omogućena usporedba razina genske ekspresije između različitih uzoraka. Analiza diferencijalne genske ekspresije provedena je u programskom okruženju R (v 4.5.1.) primjenom paketa DESeq2 (v 1.48.1.) [237], pri čemu su kao ulazni podatci korišteni ne-normalizirani brojevi očitavanja dobiveni alatom *featureCounts* [237]. Promjene u ekspresiji gena izražene na logaritamskoj skali po bazi 2 (eng. *logarithmic fold change*, log₂FC) procijenjene su primjenom generaliziranog linearnog modela (eng. *generalized linear model*, GLM), kojim se uspoređuju razine ekspresije pojedinog gena između analiziranih skupina uzoraka. Statistička značajnost promjena u ekspresiji gena određena je Waldovim testom, dok su *p*-vrijednosti korigirane za višestruko testiranje Benjamin-

Hochbergovim postupkom, čime su dobivene vrijednosti prilagođene statističke značajnost (eng. *adjusted p-value*, padj) koje opisuju stopu lažno pozitivnih otkrića (eng. *false discovery rate*, FDR) za izračunatu promjenu ekspresije. Konačni cilj analize bio je dobivanje liste diferencijalno eksprimiranih gena s pripadajućim vrijednostima $\log_2FC$, rangiranih prema prilagođenoj statističkoj značajnosti (padj), pri čemu su značajnima smatrani geni s $\log_2FC \geq 1$, $\text{padj} \leq 0,1$ te srednjom razinom ekspresije, izraženom kao *baseMean*, većom od 10.

Na temelju rezultata analize diferencijalne ekspresije provedena je analiza obogaćivanja skupa gena (eng. *Gene Set Enrichment Analysis*, GSEA) u programskom okruženju R. Za potrebe GSEA korištena je rangirana lista svih analiziranih gena prema vrijednostima $\log_2FC$ dobivenima analizom DESeq2. Analiza je provedena primjenom unaprijed definiranih skupova gena, pri čemu je obogaćenje procjenjivano izračunom normalizirane vrijednosti obogaćivanja (eng. *normalized enrichment score*, NES), a statistička značajnost rezultata određena je permutacijskim testiranjem, temeljenom na fenotipu, i prilagodbom na FDR za svaku NES-vrijednost. Kao značajno obogaćeni smatrani su skupovi gena s $FDR < 0,1$, a rezultati su interpretirani u kontekstu bioloških procesa i signalnih puteva povezanih s ispitivanim fenotipom. Analiza obogaćivanja skupova gena provedena je korištenjem funkcije *GSEA* iz računalnog paketa *clusterProfiler* (v 4.16.0) [238] te funkcije *gsePathway* iz paketa *ReactomePA* (v 1.52.0) [239], pri čemu su korišteni skupovi gena *Hallmark* i *GO Biological Process* preuzeti iz baze podataka MSigDB (eng. *Molecular Signature Database*), kao i signalni putevi *Reactome* preuzeti iz baze podataka Reactome [240]. Rezultati su vizualizirani pomoću paketa *ggplot2* (v 3.5.2) u obliku točkastih grafova [241]. Skupovi gena i signalni putevi smatrani su značajno obogaćenima ako im je vrijednost padj bila manja od 0,1.

3.2.9. Statistička obrada rezultata

Normalnost distribucije kontinuiranih varijabli ispitana je pomoću D'Agostino-Pearsonovog testa. Za sve varijable koje su pokazale normalnost distribucije korišten je Studentov t-test za nezavisne uzorke za usporedbu razlika između dvije skupine, odnosno jednosmjerna ili dvosmjerna analiza varijance (ANOVA) s Tukey-Kramerovim *post hoc* testom za usporedbu više od dvije skupine. Za uzorke koji nisu pokazivali normalnost distribucije korišteni su neparametrijski testovi, Mann-Whitneyev test za usporedbu dvije skupine i Kruskal-Wallisov test s Conoverovim *post hoc* testom, kao zamjena za ANOVA-u, pri usporedbi više skupina. Korelacija između ekspresije gena procijenjena je izračunom Spearmanovog koeficijenta korelacije (ρ). Granične vrijednosti korištene za kategorizaciju

razina genske ekspresije na „nisku“ i „visoku“ određene su izračunom površine ispod krivulje ROC (eng. *receiver operating characteristic*). Krivulje preživljenja konstruirane su Kaplan-Meierovom metodom, a za njihovu usporedbu primijenjen je log-rang test. Za univarijatnu i multivarijatnu analizu korištena je Coxova regresija proporcionalnih rizika s postupnom (eng. *stepwise*) selekcijom varijabli. Dodatno, obrada i analiza podataka dobivenih sekvenciranjem RNA opisana je u poglavlju 3.2.8.3. Statistička analiza provedena je pomoću programa MedCalc (v 23.4.2.), dok je za vizualizaciju rezultata, osim navedenog programa, korišten i Prism (v 8.0.2). Dvostrane *P*-vrijednosti manje od 0,05 smatrane su statistički značajnima.

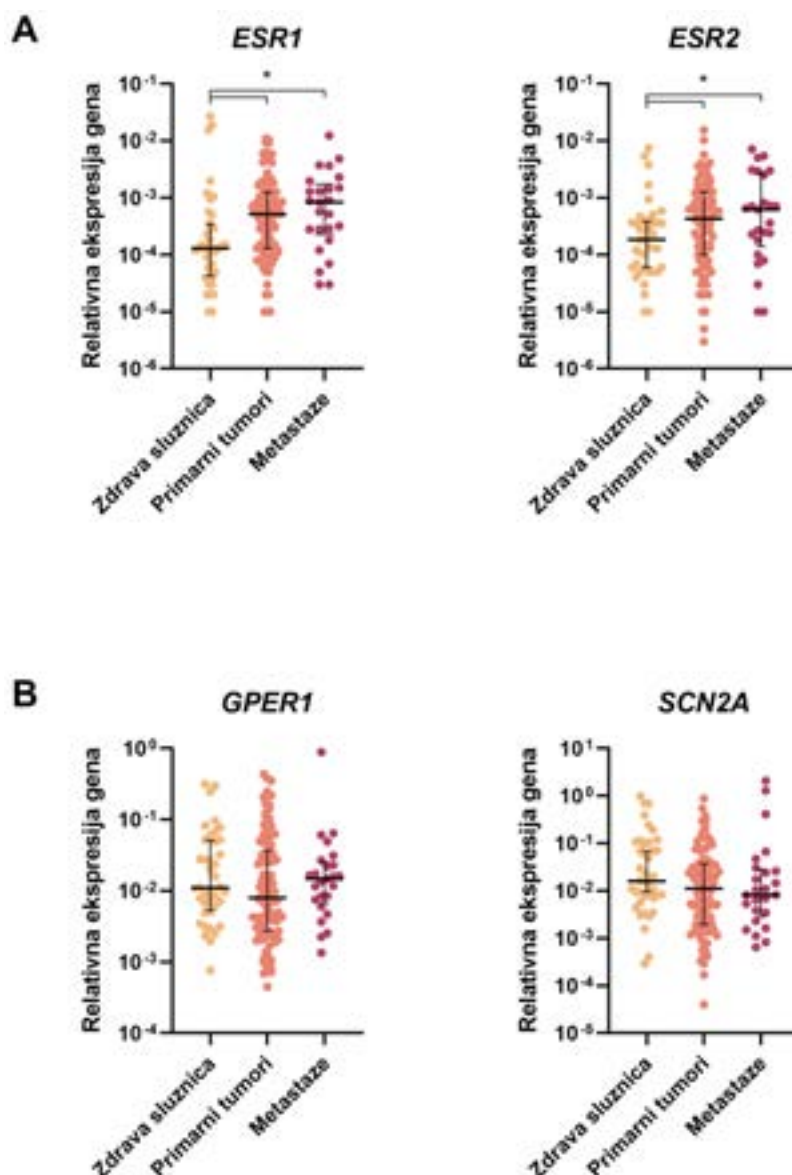
4. REZULTATI

4.1. Ekspresija receptora estrogena i komponenti signalnog puta HH-GLI u uzorcima tkiva tumora HNSCC-a i zdravom tkivu sluznice glave i vrata

U svježim uzorcima tkiva primarnih tumora HNSCC-a, metastatskih limfnih čvorova i zdrave sluznice analizirana je ekspresija gena jezgrinih (*ESR1* i *ESR2*) i membranskih receptora estrogena (*GPER1* i *SCN2A*), kao i komponenti signalnog puta HH-GLI (*SHH*, *PTCH1* i *GLI1*). Analiza je provedena metodom kvantitativne lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu (qPCR), a dobivene vrijednosti normalizirane su u odnosu na referentni gen *RPLP0* i izražene kao $2^{-\Delta C_t}$. Ekspresijski profili uspoređeni su između skupina te dodatno analizirani u odnosu na HPV status i kliničko-patološke karakteristike pacijenata.

4.1.1. Ekspresija receptora estrogena u tumorskom i zdravom tkivu sluznice glave i vrata

Ekspresija jezgrinih (*ESR1* i *ESR2*) i membranskih receptora estrogena (*GPER1* i *SCN2A*) bila je uspješno detektirana u zdravom tkivu sluznice usne šupljine, primarnim tumorima i metastatskim limfnim čvorovima metodom qPCR (Slika 10.). Relativna ekspresija *ESR1* bila je statistički značajno pojačana u uzorcima primarnih tumora i metastatskih limfnih čvorova u usporedbi sa zdravom sluznicom ($P = 0,001$), dok između primarnih tumora i metastaza nije uočena statistički značajna razlika. Sličan obrazac zabilježen je i za *ESR2*, čija je relativna ekspresija također bila statistički značajno pojačana u obje tumorske skupine u odnosu na zdrave kontrolne uzorke ($P = 0,040$). S druge strane, iako je ekspresija membranskih receptora estrogena detektirana u svim ispitivanim skupinama, nisu uočene statistički značajne razlike u relativnoj ekspresiji između analiziranih skupina. Dobiveni rezultati ukazuju na diferencijalnu ekspresiju jezgrinih receptora estrogena između tumorskog i zdravog tkiva, dok membranski receptori pokazuju ujednačen ekspresijski obrazac među analiziranim skupinama.

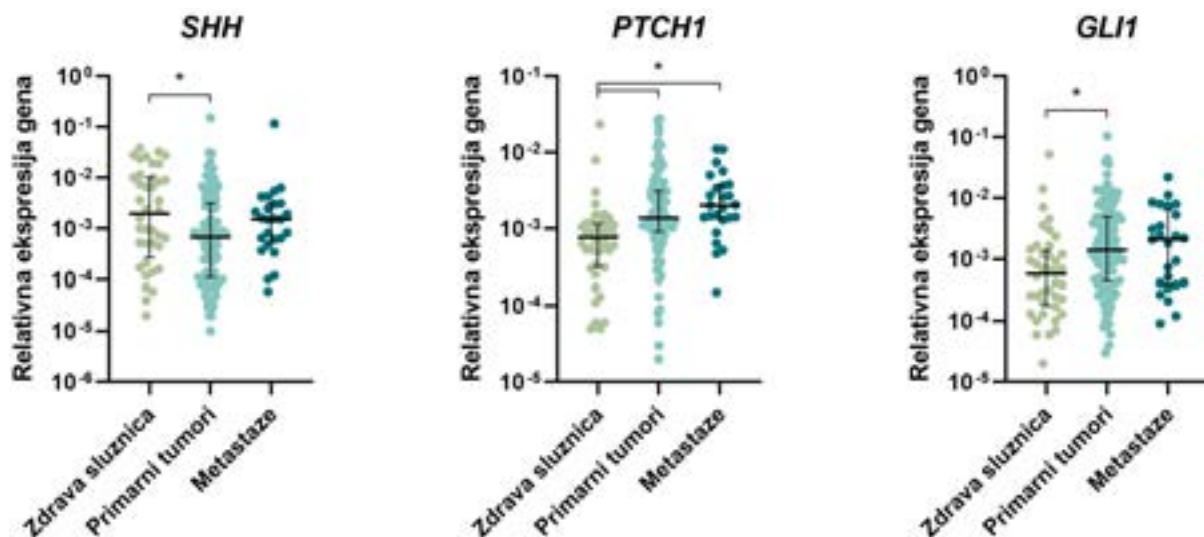


Slika 10. Ekspresija receptora estrogena u zdravom tkivu sluznice, primarnim tumorima i metastatskim limfnim čvorovima. (A) Relativna ekspresija jezgrinih receptora estrogena *ESR1* i *ESR2*. (B) Relativna ekspresija membranskih receptora estrogena *GPER1* i *SCN2A*. Vrijednosti su prikazane kao medijan s interkvartilnim rasponom. * $P < 0,05$.

4.1.2. Ekspresija komponenti signalnog puta HH-GLI u tumorskom i zdravom tkivu sluznice glave i vrata

Ekspresija komponenti signalnog puta HH-GLI (*SHH*, *PTCH1* i *GLI1*) također je uspješno detektirana u zdravom tkivu sluznice usne šupljine, primarnim tumorima i metastatskim limfnim čvorovima metodom qPCR (Slika 11.). Relativna ekspresija *SHH* bila je statistički značajno smanjena u uzorcima primarnih tumora u usporedbi sa zdravom sluznicom

($P = 0,034$), dok između metastatskih limfnih čvorova i zdravog tkiva, kao ni između primarnih tumora i metastaza, nije uočena statistički značajna razlika. S druge strane, ekspresija *PTCH1* bila je statistički značajno pojačana u uzorcima primarnih tumora i metastatskih limfnih čvorova u usporedbi sa zdravom sluznicom ($P < 0,0001$), dok između primarnih tumora i metastaza također nije bilo statistički značajne razlike. Relativna ekspresija transkripcijskog čimbenika *GLI1* bila je statistički značajno pojačana u uzorcima primarnih tumora u odnosu na zdravo tkivo sluznice ($P = 0,004$), dok u metastatskim limfnim čvorovima nije zabilježena značajna razlika u usporedbi sa zdravim kontrolnim uzorcima, kao niti u odnosu na primarne tumore.



Slika 11. Ekspresija komponenti signalnog puta HH-GLI (*SHH*, *PTCH1*, *GLI1*) u zdravom tkivu sluznice, primarnim tumorima i metastatskim limfnim čvorovima. Vrijednosti su prikazane kao medijan s interkvartilnim rasponom. * $P < 0,05$.

4.1.3. Povezanost ekspresije gena s kliničko-patološkim karakteristikama pacijenata

Ovo istraživanje je uključivalo ukupno 160 uzoraka, od čega je 95 uzoraka primarnih tumora sluznice glave i vrata, 25 uzoraka metastatskih limfnih čvorova te 40 uzoraka kontrolnog, zdravog tkiva sluznice usne šupljine. Kliničko-patološke karakteristike ispitivane kohorte prikazane su u Tablici 22. Analiza demografskih podataka pokazala je da su pacijenti s primarnim tumorima bili statistički značajno stariji u usporedbi s ispitanicima kontrolne skupine. Medijan dobi pacijenata iznosio je 63 godine (raspon 39-90), dok je u kontrolnoj

skupini medijan dobi bio 56,5 godina (raspon 35-89) ($P < 0,0001$). U obje skupine zabilježena je izražena predominacija muškog spola, no nije utvrđena statistički značajna razlika u spolnoj distribuciji između skupina. Analiza životnih navika pokazala je da je pušenje bilo značajno češće među pacijentima oboljelima od HNSCC-a u odnosu na kontrolnu skupinu. Pušenje je bilo prisutno u 71,0 % pacijenata, dok je u kontrolnoj skupini zabilježeno u 25,0 % ispitanika ($P < 0,0001$). S obzirom na anatomske mjesta tumora, najveći udio primarnih tumora činili su tumori usne šupljine (55,8 %). Slijedili su tumori grkljana (21,2 %), orofarinksa (8,4 %), hipofarinksa (7,4 %) te nosne šupljine i paranazalnih sinusa (7,4 %). U trenutku postavljanja dijagnoze, većina tumora bila je u uznapredovalom stadiju bolesti. Tumori kategorizirani kao pT3-pT4 činili su 70,6 % svih analiziranih uzoraka. Patohistološki potvrđene metastaze u regionalnim limfnim čvorovima utvrđene su u 47,6 % pacijenata, dok je prema klasifikaciji TNM ukupno 58,8 % pacijenata svrstano u stadij IV bolesti. Analiza histološkog gradusa pokazala je da su umjereno diferencirani tumori (G3) bili najzastupljeniji, čineći 59,3 % slučajeva. Pozitivnost na HPV utvrđena je u manjem udjelu tumora (14,7 %), dok je ekstrakapsularno širenje tumora bilo prisutno u 23,5 % slučajeva. Dodatno, limfovaskularna invazija zabilježena je u 26,2 % tumora, a perineuralna invazija u 38,8 % analiziranih uzoraka. Na kraju razdoblja praćenja, 58,1 % pacijenata bilo je živo, dok je 41,9 % pacijenata preminulo.

Tablica 22. Kliničko-patološke karakteristike ispitivane kohorte pacijenata i kontrolne skupine

Karakteristika	Pacijenti (n (%))	Kontrole (n (%))	P-vrijednost
Dob (godine)*	63 (39–90)	56,5 (35–89)	< 0,0001
Spol			
Žene	24 (25,3)	8 (20,0)	0,5130
Muškarci	71 (74,7)	32 (80,0)	
Pušenje			
Ne	27 (29,0)	30 (75,0)	< 0,0001
Da	66 (71,0)	10 (25,0)	
ND	2		
Sijelo			
Nosna šupljina i paranazalni sinusi	7 (7,4)		
Usna šupljina	53 (55,8)		
Orofarinks	8 (8,4)		
Grkljan	20 (21,1)		
Hipofarinks	7 (7,4)		

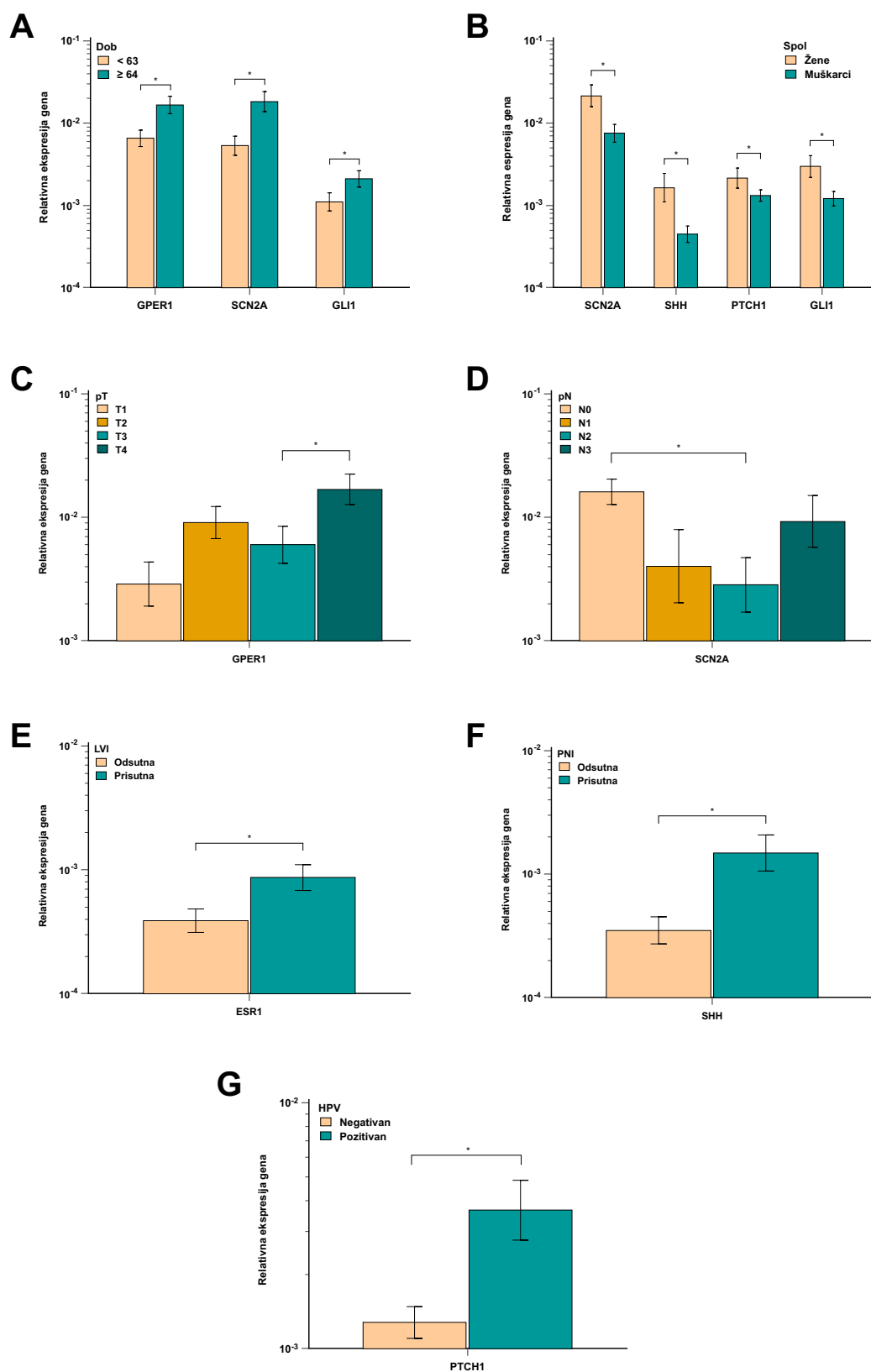
Tablica 22. - nastavak

Veličina primarnog tumora (pT) T1 (≤ 2 cm) T2 (> 2 to ≤ 4 cm) T3 (> 4 cm) T4 (invazija susjednih/kritičnih struktura) ND	3 (3,5) 22 (25,9) 26 (30,6) 34 (40,0) 10		
Zahvaćenost limfnih čvorova (pN) N0 N1 N2 N3 ND	44 (52,4) 7 (8,3) 14 (16,7) 19 (22,6) 11		
Stadij tumora (pS) 1 2 3 4 ND	1 (1,2) 16 (18,8) 18 (21,2) 50 (58,8) 10		
Gradus tumora G1 G2 G3 G4 ND	3 (3,5) 11 (12,8) 51 (59,3) 21 (24,4) 9		
HPV Negativan Pozitivan	81 (85,3) 14 (14,7)		
Ekstrakapsularno širenje Odsutno Pristutno ND	65 (76,5) 20 (23,5) 10		
Limfovaskularna invazija Odsutna Pristutna ND	62 (73,8) 22 (26,2) 11		
Perineuralna invazija Odsutna Pristutna ND	52 (61,2) 33 (38,8) 10		
Preživljenje Živ Preminuo ND	50 (58,1) 36 (41,9) 9		

* Podaci su prikazani kao medijan i raspon. ND – podaci nisu dostupni; p – patološki

Ekspresija jezgrinih i membranskih receptora estrogena, kao i članova signalnog puta HH-GLI analizirana je u primarnim uzorcima tumora u odnosu na kliničko-patološke karakteristike pacijenata. Ispitanici su, na temelju medijana dobi od 63 godine, podijeljeni u dvije skupine: mlađe i starije od medijana. Analiza povezanosti ekspresije receptora estrogena s dobi pacijenata pokazala je statistički značajno pojačanu ekspresiju *GPER1* ($P = 0,006$) i *SCN2A* ($P = 0,003$) kod pacijenata starijih od medijana u usporedbi s mlađim pacijentima ($P = 0,006$), dok za *ESR1* i *ESR2* nije utvrđena statistički značajna razlika u ekspresiji u odnosu na dob pacijenata (Slika 12. A). Nadalje, u odnosu na spol, samo je ekspresija *SCN2A* bila značajno smanjena kod muškaraca u usporedbi sa ženama (Slika 12. B), kao i kod pacijenata s pN2 u usporedbi s pN0 (Slika 12. D). U odnosu na veličinu primarnog tumora, utvrđena je pojačana ekspresija *GPER1* u tumorima kategorije pT4 u usporedbi s pT3 ($P = 0,042$) (Slika 12. C). Konačno, ekspresija *ESR1* bila je pojačana u tumorima s prisutnom LVI u usporedbi s tumorima bez LVI ($P = 0,045$) (Slika 12. E). Za ostale analizirane kliničko-patološke karakteristike nisu utvrđene statistički značajne razlike u ekspresiji receptora estrogena.

S druge strane, što se tiče analize povezanosti ekspresije gena signalnog puta HH-GLI s kliničko-patološkim karakteristikama pacijenata, utvrđena je pojačana ekspresija *GLII* u skupini pacijenata starijih od medijana ($P = 0,042$) (Slika 12. A). Također, u odnosu na spol, ekspresija svih analiziranih komponenti signalnog puta HH-GLI (*SHH*, *PTCH1* i *GLII*) bila je značajno smanjena kod muškaraca u odnosu na žene ($P = 0,008$, $0,090$ i $0,016$) (Slika 12. B). Zanimljivo, analiza HPV-statusa pokazala je pojačanu ekspresiju *PTCH1* u HPV-pozitivnim tumorima u usporedbi s HPV-negativnim tumorima ($P = 0,004$) (Slika 12. G). Dodatno, ekspresija *SHH* bila je statistički značajno pojačana u tumorima s prisutnom perineuralnom invazijom u usporedbi s PNI-negativnim tumorima ($P = 0,001$) (Slika 12. F), dok preostale kliničko-patološke karakteristike nisu pokazale značajnu razliku u ekspresiji komponenti signalnog puta HH-GLI.



Slika 12. Relativna ekspresija jezgrinih i membranskih receptora estrogena te članova signalnog puta HH-GLI u uzorcima primarnih tumora uspoređena prema kliničko-patološkim karakteristikama bolesnika. (A) Relativna ekspresija *GPER1*, *SCN2A* i *GLI1* prema dobi

Slika 12. - nastavak

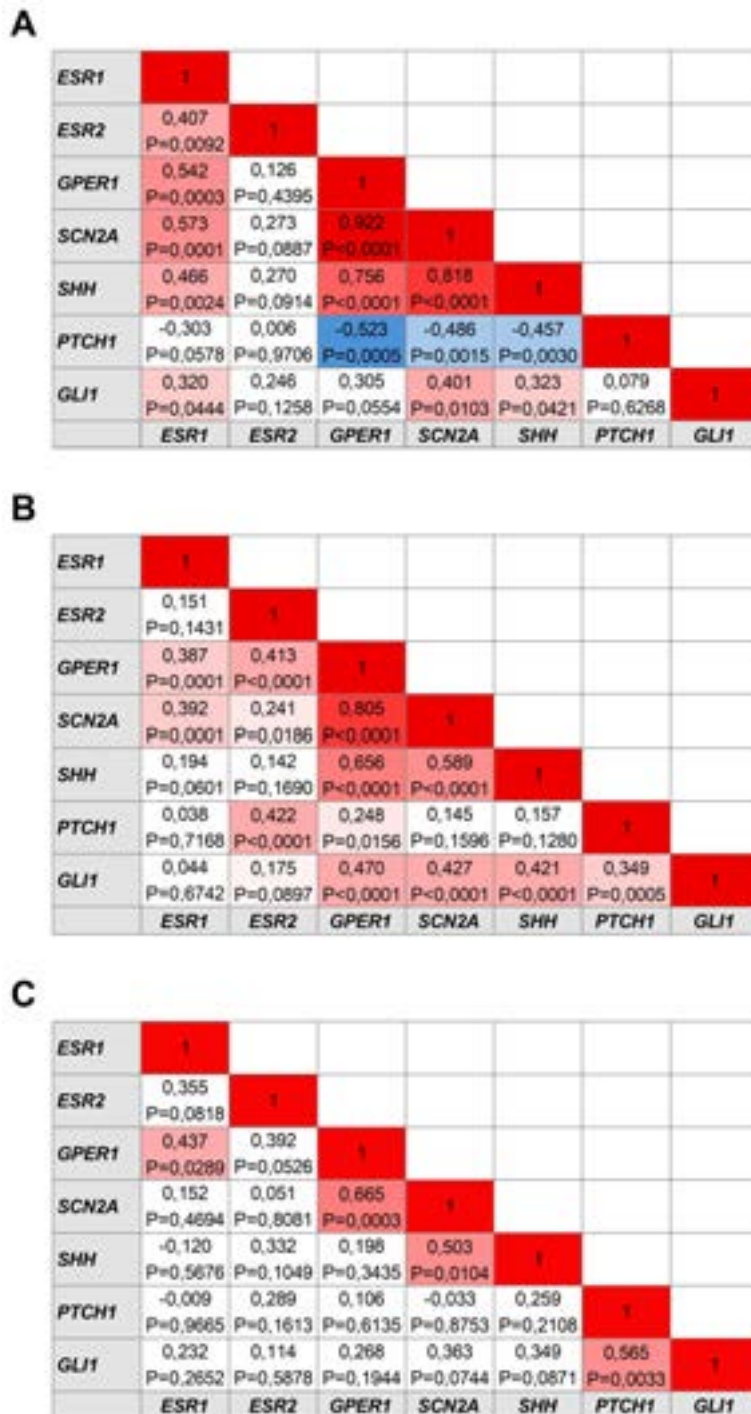
bolesnika, s pojačanom ekspresijom u skupini ≥ 64 godine. (B) Pojačana ekspresija *SCN2A*, *SHH*, *PTCH1* i *GLII* u tumorima žena. (C) Pojačana ekspresija *GPER1* u pT4 tumorima u odnosu na pT3. (D) Relativna ekspresija *SCN2A* prema pN stadiju, s pojačanom ekspresijom u pN0 u usporedbi s pN2. (E) Usporedba relativne ekspresije *ESR1* prema statusu LVI, s pojačanom ekspresijom u LVI-pozitivnim tumorima. (F) Pojačana ekspresija *SHH* u PNI-pozitivnim tumorima u odnosu na PNI-negativne. (G) Relativna ekspresija *PTCH1* prema HPV statusu, s pojačanom ekspresijom u HPV+ tumorima. Podatci su prikazani kao srednja vrijednost $\pm$ SEM na logaritamskoj skali; * $P < 0,05$.

Izračun koeficijenta korelacije u skupini zdravog kontrolnog tkiva pokazao je pretežito umjerene do vrlo visoke korelacije između ekspresije jezgrinih i membranskih receptora estrogena te pojedinih članova signalnog puta HH-GLI (Slika 13. A). Između *ESR1* i *ESR2* zabilježena je niska pozitivna korelacija ($\rho = 0,407$), kao i u slučaju usporedbe *ESR1* s *SHH* ($\rho = 0,466$) i *GLII* ($\rho = 0,320$). S druge strane, ekspresija *ESR1* pokazala je umjerenu pozitivnu korelaciju s membranskim receptorima *GPER1* ($\rho = 0,542$) i *SCN2A* ($\rho = 0,573$). Nadalje, zabilježena je vrlo visoka pozitivna korelacija između *GPER1* i *SCN2A* ($\rho = 0,922$). Također, oba membranska receptora pokazala su visoku pozitivnu korelaciju sa *SHH* (*GPER1*-*SHH* $\rho = 0,756$ i *SCN2A*-*SHH* $\rho = 0,818$). Suprotno tome, *PTCH1* je u zdravom tkivu pokazao umjerenu negativnu korelaciju s *GPER1* ($\rho = -0,523$), odnosno nisku negativnu korelaciju sa *SCN2A* ($\rho = -0,486$) i *SHH* ($\rho = -0,457$). Konačno, niska pozitivna korelacija zabilježena je između *GLII* i *SCN2A* ($\rho = 0,401$) te *SHH* ($\rho = 0,323$).

U primarnim tumorima nije utvrđena statistički značajna korelacija između *ESR1* i *ESR2*, međutim oba receptora zadržala su niske pozitivne korelacije s membranskim receptorima estrogena (*ESR1*-*GPER1* $\rho = 0,387$, *ESR1*-*SCN2A* $\rho = 0,392$, *ESR2*-*GPER1* $\rho = 0,413$ i *ESR2*-*SCN2A* $\rho = 0,241$). Kao i u zdravom tkivu, u primarnim tumorima također je zabilježena visoka pozitivna korelacija između *GPER1* i *SCN2A* ($\rho = 0,805$) te umjerena pozitivna korelacija membranskih receptora estrogena sa *SHH* (*GPER1*-*SHH* $\rho = 0,656$, *SCN2A*-*SHH* $\rho = 0,589$). U ovoj skupini *GLII* je pokazao niske pozitivne korelacije s *GPER1* ($\rho = 0,470$), *SCN2A* ($\rho = 0,427$), *SHH* ($\rho = 0,421$) i *PTCH1* ($\rho = 0,349$). Niska pozitivna korelacija zabilježena je i između *PTCH1* i *ESR2* ($\rho = 0,422$), dok negativne korelacije nisu zabilježene u tumorskom tkivu (Slika 13. B).

U metastazama je uočen daljnji gubitak statistički značajnih korelacija između analiziranih gena (Slika 13. C). *ESR1* je pokazao nisku pozitivnu korelaciju s *GPER1* ($\rho = 0,437$), dok ostale korelacije jezgrinih receptora s membranskim receptorima estrogena nisu bile statistički značajne. Zanimljivo, između *GPER1* i *SCN2A* i u ovoj je skupini zabilježena

umjerena pozitivna korelacija ($\rho = 0,665$), kao i između *SHH* i *SCN2A* ($\rho = 0,503$). Unutar signalnog puta HH-GLI istaknula se umjerena pozitivna korelacija između *PTCH1* i *GLI1* ($\rho = 0,565$), dok ostale korelacije u metastatskom tkivu nisu dosegnule statističku značajnost.



Slika 13. Korelacijske matrice ekspresije jezgrinih (*ESR1*, *ESR2*) i membranskih receptora estrogena (*GPER1*, *SCN2A*) te članova signalnog puta HH-GLI (*SHH*, *PTCH1*, *GLI1*) u (A) zdravom tkivu, (B) primarnim tumorima i (C) metastazama. Prikazane su vrijednosti Spearmanovog koeficijenta korelacije (ρ) i pripadajuće *P*-vrijednosti za svaki par gena. Pozitivne korelacije označene su crvenom bojom, negativne plavom bojom, pri čemu intenzitet boje odražava jačinu korelacije. Jačina korelacija interpretirana je kao zanemariva ($\rho < 0,30$), niska ($0,30 \leq \rho < 0,50$), umjerena ($0,50 \leq \rho < 0,70$), visoka ($0,70 \leq \rho < 0,90$) ili vrlo visoka ($\rho \geq 0,90$).

Nadalje, analizirano je preživljenje bolesnika s HNSCC-om, pri čemu su podatci o preživljenju bili dostupni za 86 bolesnika (90,5 %) s primarnim tumorima, od kojih je 36 (41,9 %) umrlo tijekom razdoblja praćenja. Medijan vremena praćenja iznosio je 24 mjeseca, s rasponom od 1 do 48 mjeseci. Ukupno preživljenje (eng. *overall survival*, OS) definirano je kao vrijeme od postavljanja dijagnoze do smrti od bilo kojeg uzroka ili do posljednjeg pregleda, pri čemu je dvogodišnja stopa OS-a iznosila 58,4 %. Analiza utjecaja kliničko-patoloških karakteristika i razina ekspresije analiziranih gena na preživljenje pokazala je da nekoliko karakteristika ima značajan utjecaj na OS (Tablica 23.).

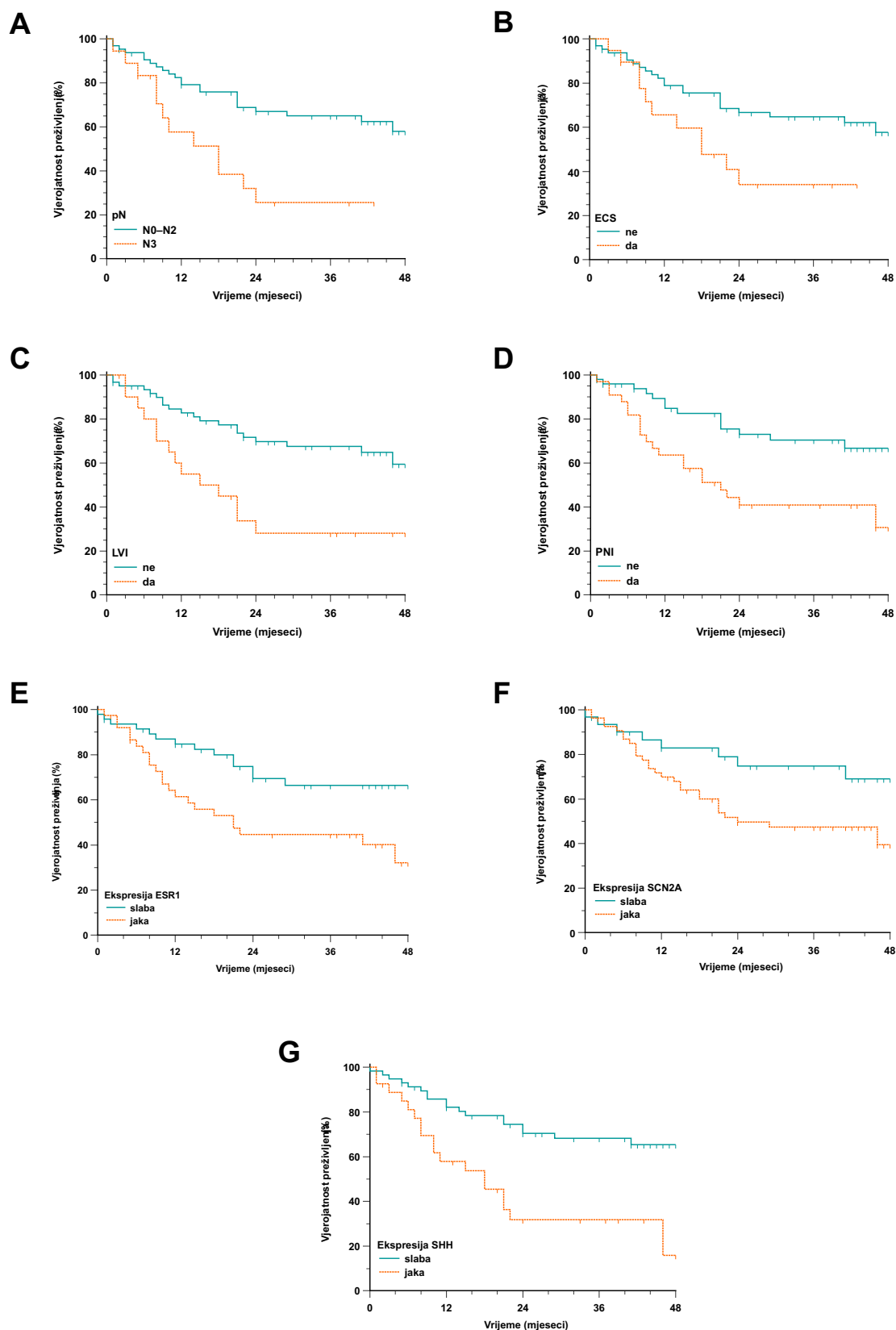
Tablica 23. Utjecaj kliničko-patoloških karakteristika i razina ekspresije receptora estrogena i gena signalnog puta HH-GLI na ukupno preživljenje pacijenata s HNSCC-om. Prikazane su *P*-vrijednosti log-rang testa (statistički značajne vrijednosti su masno otisnute), kao i omjeri rizika (HR) s pripadajućim 95 % intervalima pouzdanosti (CI) za varijable koje su pokazale statistički značajan rezultat log-rang testa.

Karakteristika	Kategorije	<i>P</i> -vrijednost	HR (95 % CI)
dob	≥ 64 vs. < 63 godina	0,0697	
spol	žensko vs. muško	0,6678	
pušenje	da vs. ne	0,9348	
HPV	pozitivni vs. negativni	0,6570	
pT	T1–T3 vs. T4	0,0579	
pN	N0–N2 vs. N3	0,0024	4,2 (1,66–10,55)
pStage	1–3 vs. 4	0,0545	
gradus	G1 vs. G2–G4	0,3538	
ECS	da vs. ne	0,0265	2,7 (1,12–6,68)
LVI	da vs. ne	0,0018	3,9 (1,66–9,14)
PNI	da vs. ne	0,0034	2,9 (1,42–5,92)
<i>ESR1</i>	‘jaka’ vs. ‘slaba’	0,0092	2,45 (1,25–4,81)
<i>ESR2</i>	‘jaka’ vs. ‘slaba’	0,3544	
<i>GPER1</i>	‘jaka’ vs. ‘slaba’	0,1014	
<i>SCN2A</i>	‘jaka’ vs. ‘slaba’	0,0357	2,07 (1,05–4,08)
<i>SHH</i>	‘jaka’ vs. ‘slaba’	0,0004	4,01 (1,86–8,66)
<i>PTCH1</i>	‘jaka’ vs. ‘slaba’	0,0897	
<i>GLII</i>	‘jaka’ vs. ‘slaba’	0,0859	

Bolesnici s pN3 imaju približno četverostruko veći rizik od smrtnog ishoda u usporedbi s ostalim bolesnicima (omjer rizika (eng. *hazard ratio*, HR): 4,2; 95 %-tni interval pouzdanosti (eng. *confidence interval*, CI): 1,66–10,55; *P* = 0,0024) (Slika 14. A). Također, sva tri markera invazije tumora, ECS, LVI i PNI, povezana su s kraćim preživljenjem bolesnika s HNSCC-om

(Slika 14. B-D). Što se tiče analize ekspresije gena od interesa, pojačana ekspresija *ESR1* bila je statistički značajno povezana s kraćim OS ($P = 0,0092$), pri čemu su bolesnici s pojačanom ekspresijom *ESR1* imali oko 2,5 puta veći rizik od smrtnog ishoda u usporedbi s bolesnicima sa slabom ekspresijom (HR: 2,45; 95 % CI: 1,25-4,81) (Slika 14. E). Pojačana ekspresija *SCN2A* također je bila povezana s kraćim OS-om ($P = 0,0357$; HR: 2,07; 95 % CI: 1,05-4,08) (Slika 14. F). Najizraženiji negativan utjecaj na preživljenje uočen je za pojačanu ekspresiju *SHH*, koja je bila povezana s četiri puta većim rizikom od smrtnog ishoda ($P = 0,0004$; HR: 4,01; 95 % CI: 1,86-8,66) (Slika 14. G). Ekspresija preostalih gena nije pokazala statistički značajnu povezanost s OS-om, iako su za smanjene ekspresije *PTCH1* i *GLII* zabilježeni trendovi prema kraćem preživljenju.

Konačno, kako bi se identificirali čimbenici povezani s ukupnim preživljenjem bolesnika s HNSCC-om, provedena je univarijatna i multivarijatna Coxova regresijska analiza proporcionalnih rizika (Tablica 24.). U univarijatnoj analizi su pN-status, prisutnost ECS, LVI i PNI bili statistički značajno povezani s kraćim OS-om, pri čemu su bolesnici kategorizirani kao pN3 imali povećan rizik od smrtnog ishoda u usporedbi s bolesnicima pN0-N2 ($P = 0,0040$; HR: 2,8; 95 % CI: 1,40-5,79). Što se tiče ekspresije analiziranih gena, u univarijatnoj analizi viša ekspresija *ESR1* ($P = 0,0122$; HR: 2,36; 95 % CI: 1,21-4,62), *SCN2A* ($P = 0,0428$; HR: 2,26; 95 % CI: 1,03-4,97) i *SHH* ($P = 0,0008$; HR: 3,09; 95 % CI: 1,59-5,99) bila je statistički značajno povezana s kraćim OS-om. U multivarijatnoj Coxovoj regresijskoj analizi, u koju su uključeni svi kovarijati sa statistički značajnim ili graničnim rezultatima u univarijatnoj analizi, pN-status, LVI i ekspresija *SHH* zadržali su statistički značajan utjecaj na ukupno preživljenje. Sva tri čimbenika povezana su s više nego dvostruko povećanim rizikom od smrtnog ishoda, pri čemu su bolesnici s pN3 imali HR = 2,17 (95 % CI 1,00-4,70), bolesnici s prisutnom LVI HR = 2,52 (95 % CI 1,24-5,14), dok su bolesnici s pojačanom ekspresijom *SHH* imali 2,34 puta veći rizik od smrtnog ishoda u usporedbi s bolesnicima s niskom ekspresijom *SHH* (HR = 2,34; 95 % CI 1,13-4,86).



Slika 14. Kaplan-Meierove krivulje preživljenja za kliničko-patološke karakteristike i razine ekspresija ER-ova i gena signalnog puta HH-GLI sa statistički značajno kraćim ukupnim preživljenjem kod bolesnika s primarnim HNSCC-om. Prikazani su: (A) kategorija pN, (B) prisutnost ECS, (C) prisutnost LVI, (D) prisutnost PNI, (E) ekspresija *ESR1*, (F) ekspresija *SCN2A*, (G) ekspresija *SHH*. Oznake na krivuljama predstavljaju cenzurirane slučajeve.

Tablica 24. Univarijatna i multivarijatna Coxova regresijska analiza proporcionalnih rizika ukupnog preživljenja kod bolesnika s primarnim HNSCC-om. Statistički značajne vrijednosti su masno otisnute.

Kovarijat	Kategorije	Univarijatna analiza		Multivarijatna analiza	
		HR (95 % CI)	<i>P</i> -vrijednost	HR (95 % CI)	<i>P</i> -vrijednost
dob	≥ 64 vs. < 63 godina	1,8 (0,94–3,58)	0,0769	-(-)	-
spol	žensko vs. muško	0,8 (0,38–1,85)	0,6712	-(-)	-
pušenje	da vs. ne	1,0 (0,48–2,20)	0,9357	-(-)	-
HPV	pozitivni vs. negativni	0,8 (0,31–2,08)	0,6608	-(-)	-
pT	T1–T3 vs. T4	1,9 (0,96–3,64)	0,0646	-(-)	-
pN	N0–N2 vs. N3	2,8 (1,40–5,79)	0,0040	2,17 (1,00–4,70)	0,0487
pStage	1–3 vs. 4	2,0 (0,97–4,05)	0,0617	-(-)	-
gradus	G1 vs. G2–G4	1,9 (0,46–8,06)	0,3676	-(-)	-
ECS	da vs. ne	2,2 (1,07–4,61)	0,0322	-(-)	-
LVI	da vs. ne	2,8 (1,42–5,67)	0,0030	2,52 (1,24–5,14)	0,0110
PNI	da vs. ne	2,7 (1,34–5,27)	0,0053	-(-)	-
<i>ESR1</i>	‘jaka’ vs. ‘slaba’	2,36 (1,21–4,62)	0,0122	-(-)	-
<i>ESR2</i>	‘jaka’ vs. ‘slaba’	1,36 (0,70–2,62)	0,3607	-(-)	-
<i>GPER1</i>	‘jaka’ vs. ‘slaba’	1,90 (0,86–4,17)	0,1105	-(-)	-
<i>SCN2A</i>	‘jaka’ vs. ‘slaba’	2,26 (1,03–4,97)	0,0428	-(-)	-
<i>SHH</i>	‘jaka’ vs. ‘slaba’	3,09 (1,59–5,99)	0,0008	2,34 (1,13–4,86)	0,0220
<i>PTCH1</i>	‘jaka’ vs. ‘slaba’	0,45 (0,18–1,17)	0,1011	-(-)	-
<i>GLII</i>	‘jaka’ vs. ‘slaba’	0,56 (0,29–1,10)	0,0932	-(-)	-

CI – interval pouzdanosti; HR – omjer rizika

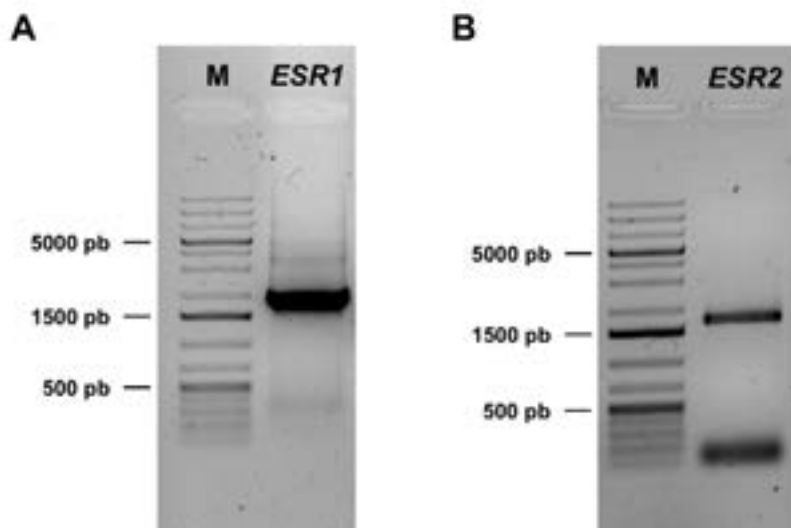
4.2. Uspostava i molekularna validacija *ESR1*^{KI} i *ESR2*^{KI} staničnih linija HNSCC-a

Na temelju rezultata analize genske ekspresije receptora estrogena u uzorcima tkiva HNSCC-a u usporedbi sa zdravim kontrolnim uzorcima, utvrđena je diferencijalna ekspresija *ESR1* i *ESR2*. Dodatnom analizom korelacije ekspresije gena s kliničko-patološkim karakteristikama pacijenata te s obzirom na potencijalnu ulogu signalnih puteva receptora estrogena u patogenezi i progresiji HNSCC-a, geni *ESR1* i *ESR2* odabrani su kao ciljevi za uspostavu stabilnih *knock-in* staničnih linija u svrhu daljnjih funkcionalnih istraživanja *in vitro*, kako bi se razjasnila razlika između jezgrinih receptora u biološkoj podlozi ove bolesti. S obzirom na nisku endogenu ekspresiju *ESR1* i *ESR2* u staničnim linijama HNSCC-a, kao i želju

da se izbjegne pristup prolazne transfekcije zbog moguće varijabilnosti i nedosljednosti rezultata, primijenjen je pristup stabilne transfekcije korištenjem sustava CRISPR/Cas9. U ovom poglavlju prikazan je cjelokupni postupak konstrukcije i molekularne validacije staničnih linija s ciljano ugrađenim genima *ESR1* i *ESR2*, uključujući dizajn i izradu vektora za CRISPR/Cas9, potvrdu ugradnje Sangerovim sekvenciranjem, uspostavu stabilnih klonalnih linija te analizu genske i proteinske ekspresije. Prikazani rezultati omogućuju procjenu uspješnosti genomske integracije, stabilnosti ekspresije i funkcionalne relevantnosti ugrađenih gena, čime se postavlja temelj za daljnje funkcionalne analize uloge ER u HNSCC-u.

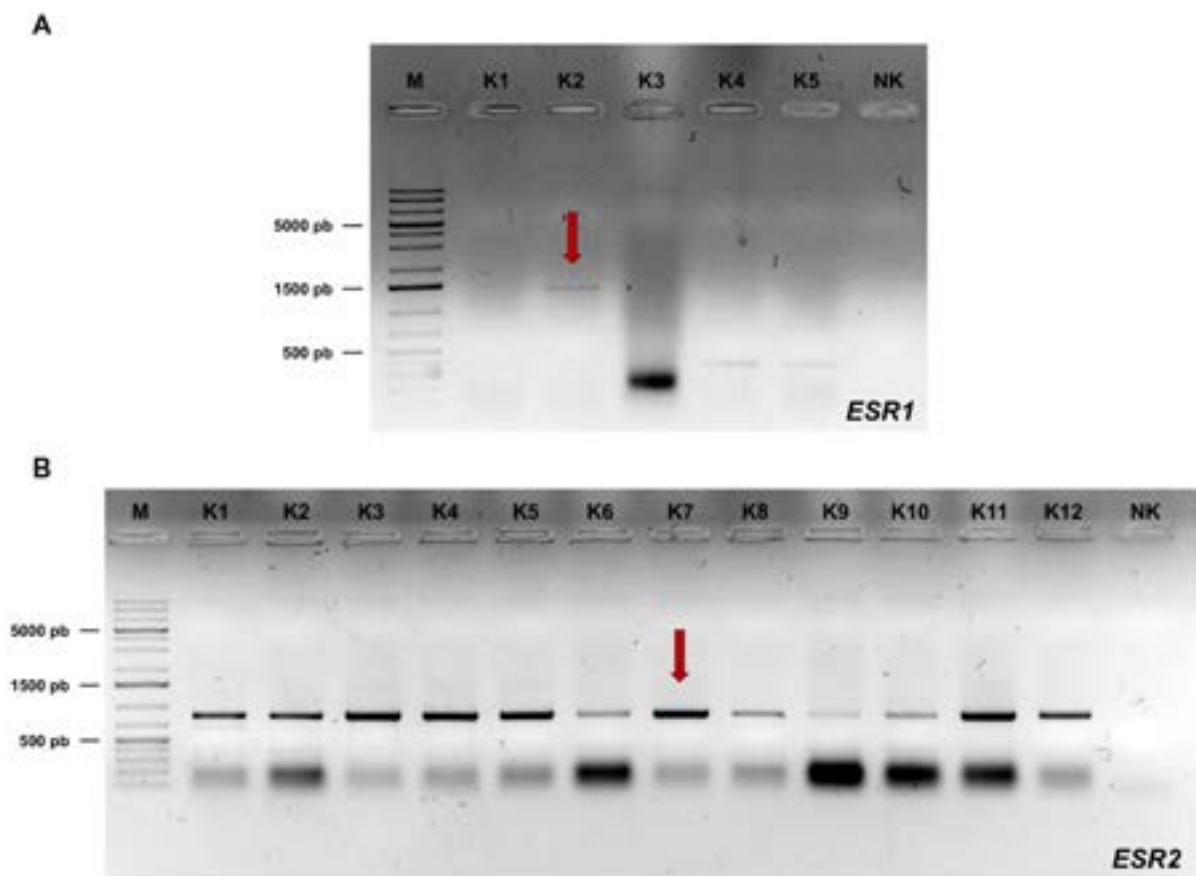
4.2.1. Konstrukcija CRISPR/Cas9 vektora za ugradnju *ESR1* i *ESR2*

U svrhu izrade vektora za ciljanu ugradnju *ESR1* i *ESR2* u lokus *AAVS1* primjenom tehnologije CRISPR/Cas9, najprije su umnoženi odgovarajući fragmenti navedenih gena metodom PCR iz komercijalnih plazmida pCMV-hERalpha i pCMV3-ER beta. Analizom PCR produkata elektroforezom na agaroznom gelu potvrđena je prisutnost fragmenta očekivane veličine, pri čemu je za gen *ESR1* detektiran fragment veličine približno 1844 pb, dok je za gen *ESR2* detektiran fragment veličine približno 1708 pb (Slika 15.). Dobiveni rezultati ukazuju na uspješno i specifično umnažanje ciljanih sekvenci.



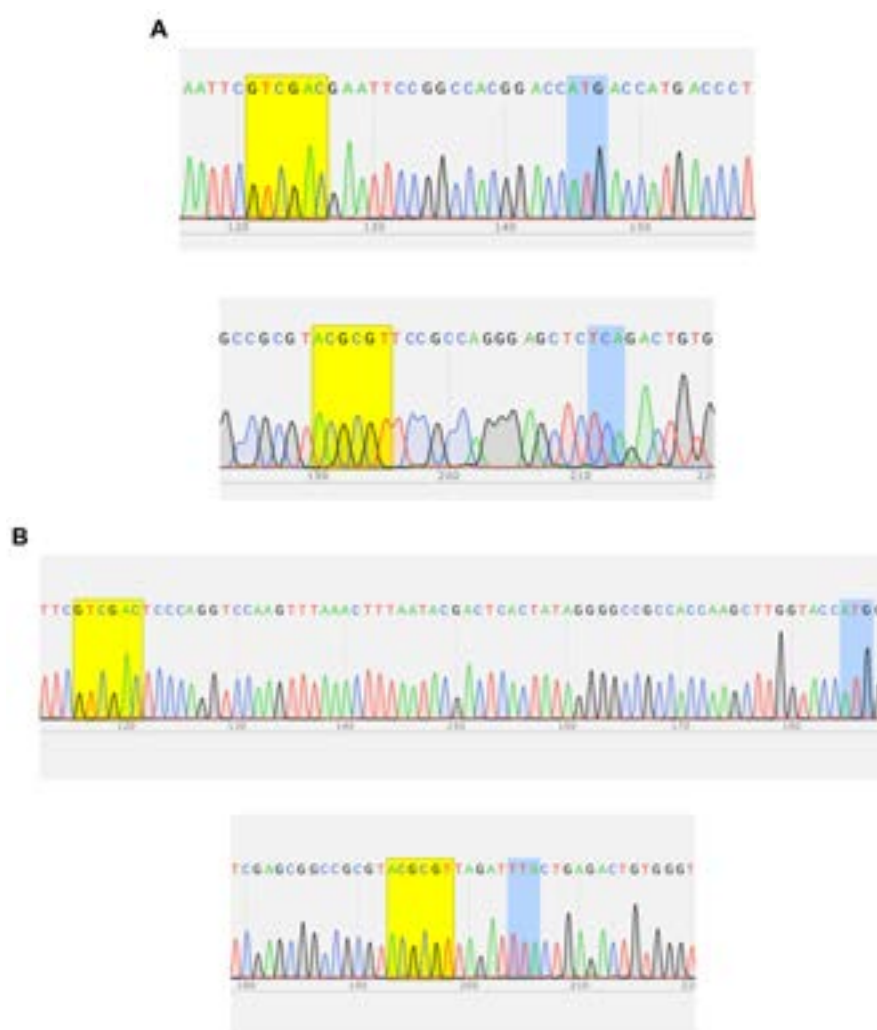
Slika 15. Gel elektroforeza produkata gena *ESR1* i *ESR2* nakon umnažanja PCR-om. (A) Agarozni gel s PCR produktom gena *ESR1* (~1844 pb). **(B)** Agarozni gel s PCR produktom gena *ESR2* (~1708 pb). U oba slučaja uočeni su fragmenti očekivane veličine, čime je potvrđeno uspješno i specifično umnažanje ciljanih sekvenci. M – marker.

Nakon toga su produkti PCR-a pročišćeni iz agaroznog gela i podvrgnuti restrikcijskoj digestiji, zajedno s vektorom pAAVS1-Puro-DNR, pomoću enzima *SalI* i *MluI*. Uspješna digestija i linearizacija vektora, kao i odgovarajuće cijepanje inserata, omogućilo je daljnju ligaciju, a potom i transformaciju koristeći kompetentne bakterije *E. coli* soja DH5 α . Na selektivnim podlogama s ampicilinom dobiven je veći broj bakterijskih kolonija, što upućuje na uspješnu transformaciju. Odabrane kolonije analizirane su metodom colony PCR-a, pri čemu su u uzorcima s ugrađenim insertima detektirani produkti očekivanih veličina, odnosno približno 1401 pb za *ESR1* i 844 pb za *ESR2* (Slika 16.). Navedeni rezultati potvrđuju uspješnu ugradnju fragmenata *ESR1* i *ESR2* u vektor pAAVS1-Puro-DNR. Na temelju rezultata colony PCR-a odabrane su pozitivne kolonije iz kojih je izolirana plazmidna DNA za konačnu potvrdu uspješnosti ugradnje Sangerovom metodom kapilarne elektroforeze.



4.2.2. Potvrda ugradnje sekvenci *ESR1* i *ESR2* Sangerovom metodom kapilarne elektroforeze

Kako bi se potvrdila ispravnost sekvenci ugrađenih inserata *ESR1* i *ESR2* u plazmidni vektor pAVVS1-Puro-DNR, provedeno je Sangerovo sekvenciranje odabranih pozitivnih klonova. Analiza je izvršena u oba smjera, koristeći uzvodnu (VP1.5) i nizvodnu (XL39) početnicu, čime je osigurana potpuna pokrivenost ugrađenih sekvenci. Dobiveni kromatogrami pokazali su jasno čitljive sekvence visoke kvalitete bez prisutnosti preklapanja signala ili pozadinskog šuma. Usporedbom dobivenih sekvenci s referentnim kodirajućim sekvencama *ESR1* (M12674.1) i *ESR2* (AF051427.1) potvrđena je potpuna podudarnost nukleotidne sekvence (Slika 17.). Dobiveni rezultati potvrđuju uspješnu konstrukciju vektora pAAVS1-Puro-*ESR1* i pAAVS1-Puro-*ESR2*, koji sadrže točne sekvence gena *ESR1* i *ESR2*, čime su stvoreni preduvjeti za daljnju transfekciju stanica i uspostavu stabilnih *knock-in* staničnih linija.



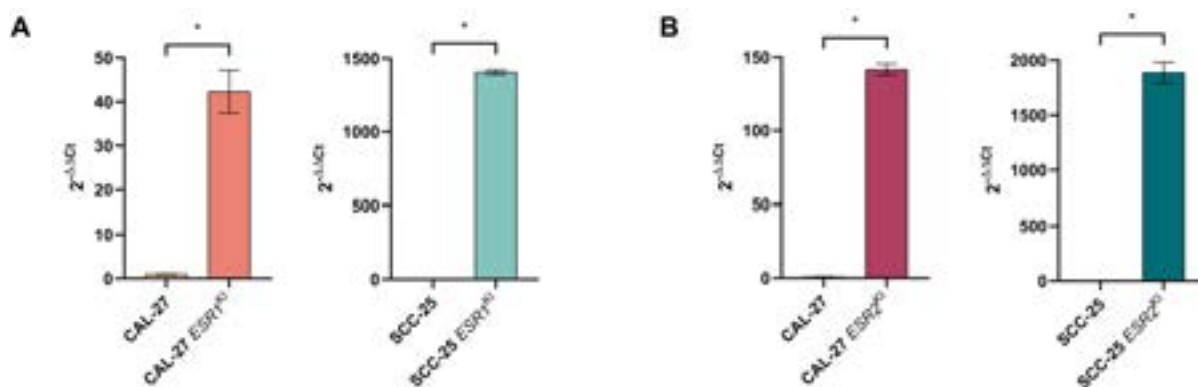
Slika 17. Analiza rezultata Sangerovog sekvenciranja inserata *ESR1* i *ESR2* ugrađenih u

Slika 17. - nastavak

vektor pAAVS1-Puro-DNR. (A) Kromatogrami sekvenciranja inserta *ESR1* u uzvodnom (F, gornji dio slike) i nizvodnom (R, donji dio slike) smjeru. (B) Kromatogrami sekvenciranja inserta *ESR2* u uzvodnom (F, gornji dio slike) i nizvodnom (R, donji dio slike) smjeru. Žutom bojom označena su restrikcijska mjesta Sall (GTCGAC) i MluI (ACGCGT), dok su plavom bojom označeni početni (start) i završni (stop) kodoni gena. Dobiveni kromatogrami potvrđuju ispravnost sekvence i orijentaciju inserata *ESR1* i *ESR2*.

4.2.3. Analiza profila genske ekspresije u uspostavljenim klonalnim linijama

Nakon uspostave stabilnih staničnih linija *ESR1*^{KI} i *ESR2*^{KI}, provedena je karakterizacija njihove genske ekspresije s ciljem potvrde funkcionalnosti dobivenih klonalnih modela. Analiza genske ekspresije pokazala je pojačane razine ekspresije *ESR1*, odnosno *ESR2*, u većem broju neovisno uspostavljenih klonova u usporedbi s pripadajućim roditeljskim staničnim linijama (podatci nisu prikazani). Za daljnju karakterizaciju i prikaz u ovom radu odabrani su reprezentativni klonovi s najvišom stabilnom razinom ekspresije ciljnih gena *ESR1* (Slika 18. A) i *ESR2* (Slika 18. B) ($P < 0,001$), potvrđenom trima neovisnim izolacijama RNA. Samim time je potvrđena uspješna uspostava stabilnih klonalnih modela.

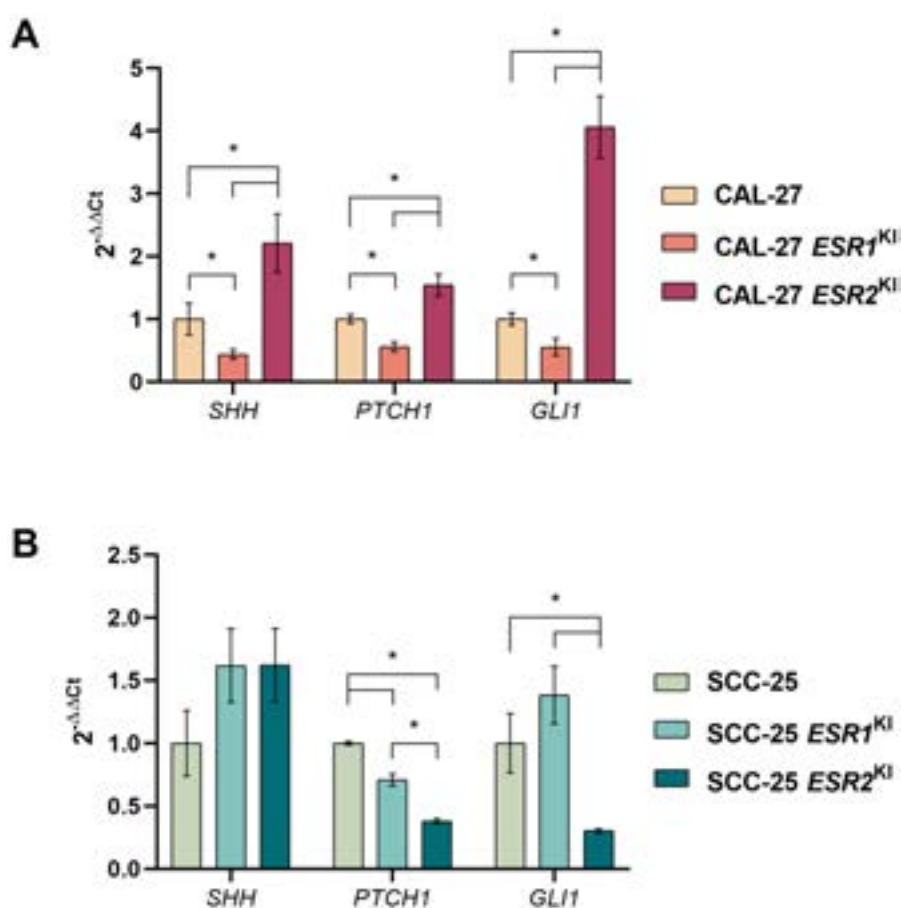


Slika 18. Ekspresija gena *ESR1* i *ESR2* u odabranim *knock-in* klonalnim linijama.

Relativna ekspresija *ESR1* i *ESR2* u roditeljskim staničnim linijama CAL-27 i SCC-25 te u odabranim *ESR1*^{KI} (A) i *ESR2*^{KI} (B) klonalnim linijama određena je analizom qPCR. Prikazani su reprezentativni klonovi s najvišom i stabilnom razinom ekspresije ciljanog gena, odabrani iz većeg broja neovisno uspostavljenih staničnih linija. Podatci su prikazani kao srednja vrijednost $\pm$ standardna devijacija (SD), a relativna ekspresija izračunata je metodom $2^{-\Delta\Delta Ct}$ u odnosu na roditeljsku staničnu liniju. Analiza je provedena Studentovim t-testom za nezavisne uzorke. Statistički značajne razlike označene su zvjezdicom ($P < 0,001$).

S obzirom na potencijalnu ulogu ER u regulaciji signalnih puteva uključenih u tumorsku biologiju, u istim klonalnim linijama analizirana je i ekspresija ključnih komponenti signalnog

puta HH-GLI, uključujući *SHH*, *PTCH1* i *GLI1* (Slika 19.). U staničnoj liniji CAL-27 *ESR1*^{KI} zabilježena je smanjena ekspresija *SHH*, *PTCH1* i *GLI1* u odnosu na roditeljsku staničnu liniju ($P < 0,001$), dok je u liniji CAL-27 *ESR2*^{KI} uočena pojačana ekspresija svih analiziranih komponenti signalnog puta HH-GLI, s najizraženijim porastom ekspresije *GLI1* ($P < 0,001$). S druge strane, kod stanične linije SCC-25 uočen je različit obrazac regulacije ovisno o tipu receptora estrogena, pa je tako kod stanične linije SCC-25 *ESR1*^{KI} zabilježena pojačana ekspresija *GLI1* ($P = 0,002$) u odnosu na kontrolne stanice, a isti trend je zabilježen i za *SHH*. Za razliku od toga, u liniji SCC-25 *ESR2*^{KI} došlo do smanjenja ekspresije *PTCH1* ($P < 0,001$) i *GLI1* ($P = 0,002$) te je ponovno vidljiv trend pojačane ekspresije *SHH* u odnosu na roditeljsku liniju. Dobiveni rezultati ukazuju na to da pojačana ekspresija *ESR1* i *ESR2* dovodi do suprotnih, stanično-specifičnih promjena u ekspresiji komponenti signalnog puta HH-GLI u staničnim linijama CAL-27 i SCC-25.

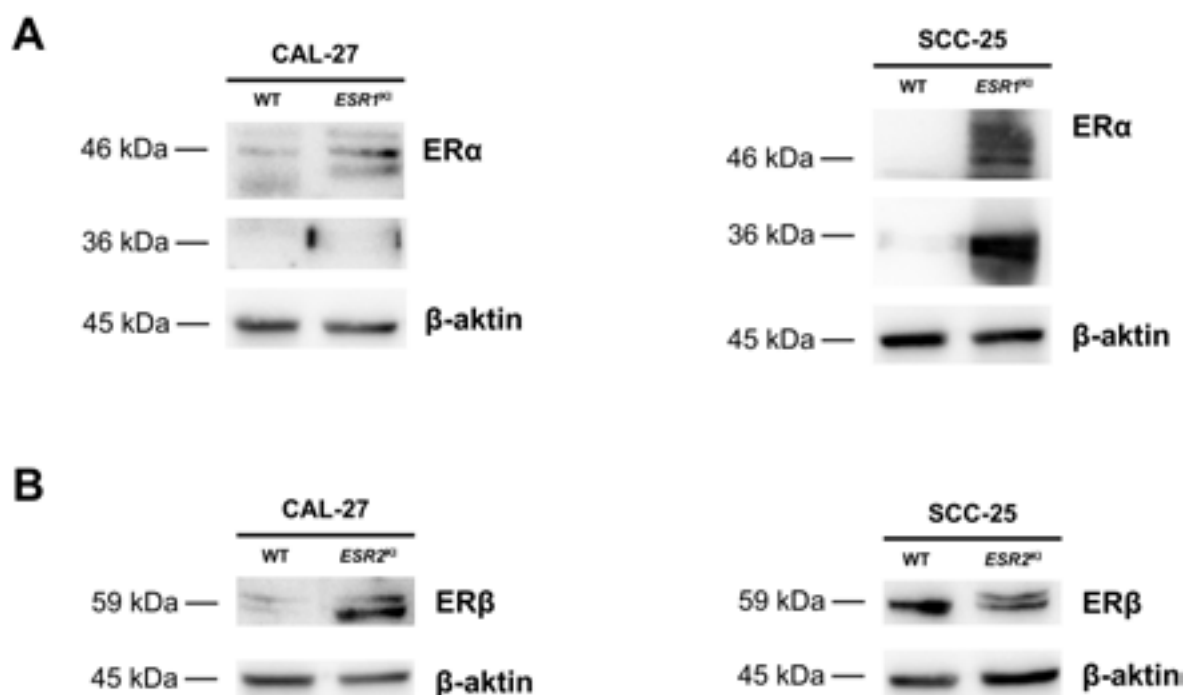


Slika 19. Ekspresija komponenti signalnog puta HH-GLI u klonalnim linijama. Relativna genska ekspresija komponenti signalnog puta HH-GLI (*SHH*, *PTCH1* i *GLI1*) u klonalnim linijama *ESR1*^{KI} i *ESR2*^{KI} staničnih modela (A) CAL-27 i (B) SCC-25 određena je qPCR-om. Podatci su prikazani kao srednja vrijednost $\pm$ SD. Statistička naliza je provedena jednosmjernom analizom varijance (eng. *one-way ANOVA*), uz Tukey-Kramerov *post hoc* test. Statistički značajne razlike označene su zvjezdicom ($P < 0,05$).

4.2.4. Analiza profila ekspresije proteina westernskom metodom otiska i imunofluorescentnim bojanjem u uspostavljenim klonalnim linijama

Kako bi se utvrdilo odražavaju li se promjene u genskoj ekspresiji i na razini proteina, provedena je analiza ekspresije odgovarajućih proteina. Kvantitativna razina ekspresije receptora estrogena ER α i ER β , kao i odabranih proteinskih komponenti signalnog puta HH-GLI (SHH, PTCH1 i GLI1), analizirana je westernskom metodom otiska, pri čemu je β -aktin korišten kao unutarnja kontrola količine nanesenih proteina, dok je imunofluorescentno bojanje primijenjeno u svrhu vizualizacije stanične lokalizacije receptora estrogena u klonalnim u usporedbi s roditeljskim staničnim linijama. Na taj način omogućena je sveobuhvatna karakterizacija proteinskog profila uspostavljenih klonalnih modela te usporedba kvantitativnih i lokalizacijskih aspekata ekspresije proteina od interesa.

Analiza proteinske ekspresije receptora estrogena westernskom metodom otiska pokazala je da izoforma ER α pune duljine (~ 66 kDa) nije detektirana niti u roditeljskim staničnim linijama, ni u klonovima *ESR1*^{KI}, neovisno o staničnom modelu. U analiziranim uzorcima detektirani su isključivo kraći proteinski oblici ER α . U staničnoj liniji CAL-27 *ESR1*^{KI} dominantan signal zabilježen je pri molekulskoj masi od približno 46 kDa, pri čemu je isti bio izraženiji u odnosu na roditeljsku liniju (Slika 20. A).



Slika 20. Analiza ekspresije receptora estrogena ER α i ER β westernskom metodom

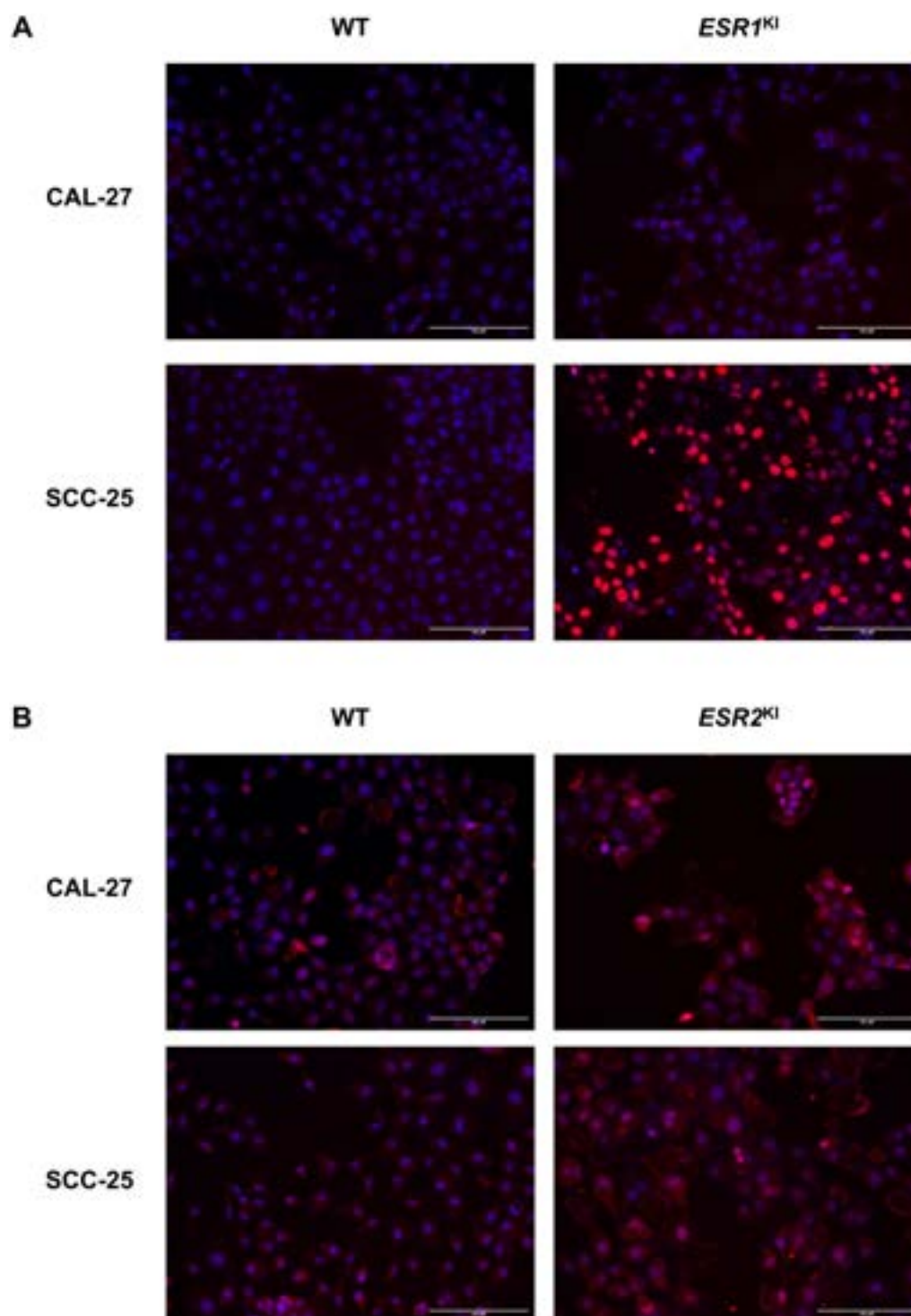
Slika 20. - nastavak

otiska. Ekspresija proteina (A) ER α i (B) ER β analizirana je westernskom metodom otiska u roditeljskim (WT) i odgovarajućim klonalnim linijama *ESR1*^{KI} i *ESR2*^{KI} staničnih modela CAL-27 i SCC-25. U staničnoj liniji CAL-27 *ESR1*^{KI} dominantni signal ER α zabilježen je pri 46 kDa, dok je u staničnoj liniji SCC-25 *ESR1*^{KI} najizraženiji signal bio pri 36 kDa. Ekspresija ER β detektirana je kao izoforma pune duljine (~ 59 kDa), uz pojačani signal isključivo kod linije CAL-27 *ESR2*^{KI}, u odnosu na roditeljsku staničnu liniju. Kao kontrola količine nanesenih proteina korišten je β -aktin.

S druge strane, u staničnoj liniji SCC-25 *ESR1*^{KI} vidljiv je vrlo snažan signal pri približno 36 kDa, uz jasno detektabilne trake viših molekulskih masa (~ 46 i 53 kDa), dok je u roditeljskoj staničnoj liniji signal ER α bio slab i ograničen uglavnom na područje oko 36 kDa. Što se tiče analize ekspresije ER β , u staničnoj liniji CAL-27 *ESR2*^{KI} zabilježen je pojačani signal u odnosu na roditeljsku liniju, pri čemu je detektirana izoforma ER β pune duljine (~ 59 kDa) (Slika 20. B). S druge strane, u staničnoj liniji SCC-25 *ESR2*^{KI} nije uočeno pojačanje signala u odnosu na ishodišnu staničnu liniju. Važno je naglasiti da iako su uočene razlike u proteinskoj ekspresiji, genska ekspresija *ESR1* i *ESR2* u odabranim klonovima ostala je stabilno pojačana tijekom višemjesečnog uzgoja stanica, potvrđujući stabilnost uspostavljenih klonalnih modela.

Imunofluorescentno bojanje stanica provedeno je kao dopuna westernskoj metodi otiska, s ciljem ispitivanja substanične lokalizacije ER α i ER β u klonalnim linijama u odnosu na roditeljske stanične linije (Slika 21.). U roditeljskim staničnim linijama signal ER α bio je izuzetno slab, s ograničenom detekcijom u manjem broju stanica te bez izražene akumulacije u jezgri. Takav obrazac upućuje na nisku bazalnu razinu proteinske ekspresije ER α u oba stanična modela, što je u skladu s rezultatima dobivenima westernskom metodom otiska. Nasuprot tome, u klonalnim linijama *ESR1*^{KI} uočeno je pojačanje intenziteta signala ER α u odnosu na roditeljske linije. U staničnoj liniji CAL-27 *ESR1*^{KI} signal je bio umjereno pojačan te pretežno lokaliziran u citoplazmi, dok je u staničnoj liniji SCC-25 *ESR1*^{KI} zabilježen najizraženiji signal u velikom broju stanica, s dominantnom nuklearnom lokalizacijom, što je također u skladu s izraženim proteinskim signalom zabilježenim westernskom metodom otiska. Analiza ekspresije ER β pokazala je sličan obrazac, pri čemu je u roditeljskim linijama CAL-27 i SCC-25 signal ER β bio slab do umjeren te difuzno raspoređen unutar stanice, bez jasno izražene primarne lokalizacije. S druge strane, u klonalnim staničnim linijama *ESR2*^{KI} uočen je značajan porast intenziteta signala ER β , pri čemu je isti bio dominantno prisutan u jezgri, uz vidljivo citoplazmatsko bojanje. U staničnoj liniji CAL-27 *ESR2*^{KI} ovaj nalaz je u skladu s rezultatima westernske metode otiska, u kojoj je zabilježena pojačana ekspresija proteina ER β . Za razliku

od toga, u staničnoj liniji SCC-25 *ESR2*^{KI} imunofluorescentno bojanje pokazalo je intenzivniji signal ER β u odnosu na roditeljsku liniju, što upućuje na veću prisutnost proteina u stanici, iako navedena razlika nije bila jasno uočljiva kod westernske metode otiska.



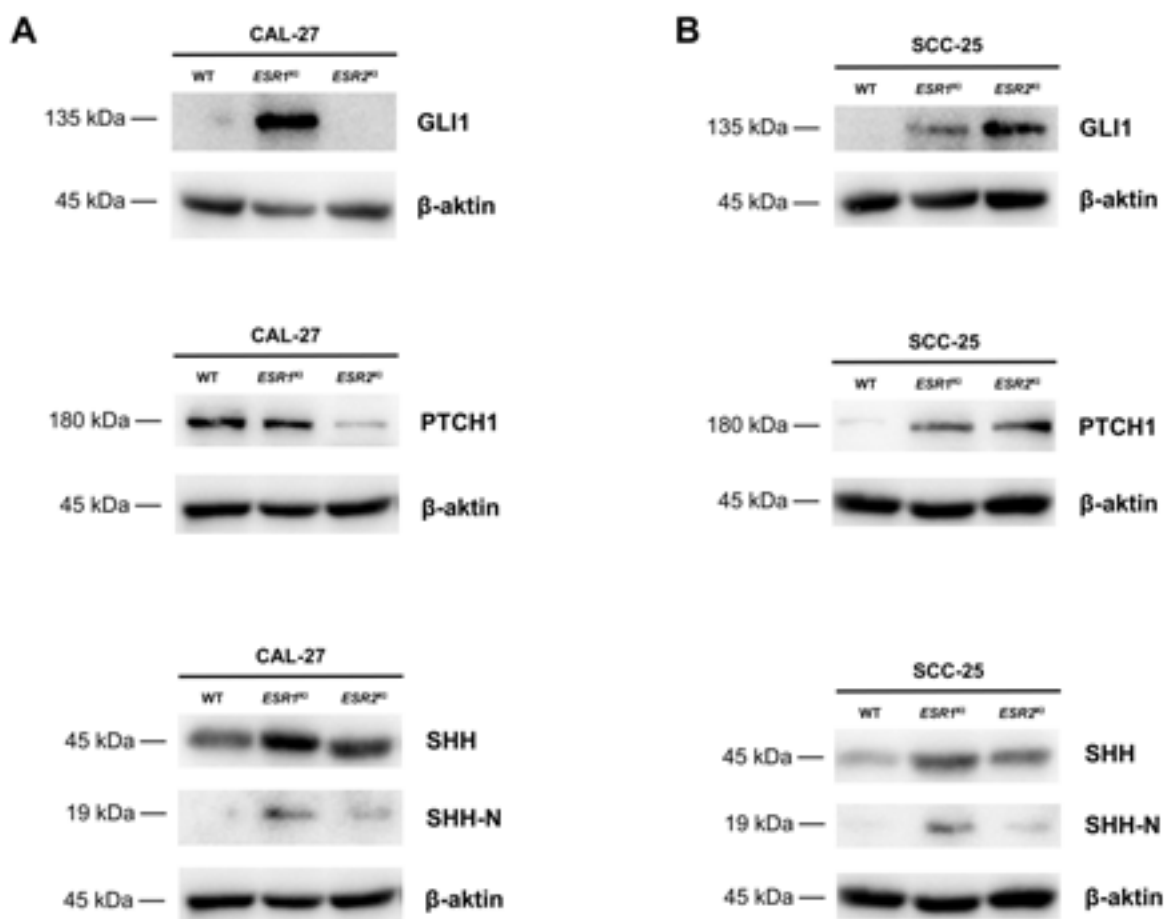
Slika 21. Analiza ekspresije i stanične lokalizacije receptora estrogena ER α i ER β metodom imunofluorescentnog bojanja stanica. Imunofluorescentne slike prikazuju ekspresiju

Slika 21. - nastavak

proteina (A) ER α i (B) ER β u roditeljskim (WT) i klonalnim staničnim linijama *ESR1*^{KI} i *ESR2*^{KI} staničnih modela CAL-27 i SCC-25. ER α i ER β signal prikazan je crvenom bojom, a jezgre stanica obojene su plavo (DAPI). Skala: 100 μ m.

Ukupno gledano, imunofluorescentna analiza potvrđuje da se promjene u proteinskoj ekspresiji receptora estrogena, utvrđene westernskom metodom otiska, odražavaju i na njihovu staničnu distribuciju. Ovi rezultati potvrđuju funkcionalnu relevantnost uspostavljenih klonalnih linija i pružaju osnovu za daljnju analizu potencijalnih nizvodnih signalnih učinaka receptora estrogena.

U svrhu dodatne karakterizacije uspostavljenih klonalnih linija te usporedbe s prethodno dobivenim rezultatima genske ekspresije, analizirana je razina ekspresije proteina uključenih u signalni put HH-GLI (SHH, PTCH1 i GLI1) westernskom metodom otiska. U staničnoj liniji CAL-27 *ESR1*^{KI} zabilježeno je izraženo pojačanje ekspresije proteina GLI1, dok je kod linije CAL-27 *ESR2*^{KI} signal u potpunosti izostao. Slično tome, ekspresija proteina PTCH1 također je bila smanjena u liniji CAL-27 *ESR2*^{KI} u odnosu na CAL-27 *ESR1*^{KI} i roditeljsku staničnu liniju CAL-27. Suprotno tome, u staničnim linijama SCC-25 zabilježen je drugačiji obrazac proteinske ekspresije, pri čemu je ekspresija proteina GLI1 i PTCH1 bila pojačana u obje klonalne linije u odnosu na divlji tip, s izraženijim signalom u liniji SCC-25 *ESR2*^{KI}. Unatoč razlikama u ekspresiji proteina GLI1 i PTCH1 između dva stanična modela, ekspresija proteina SHH, a osobito njegovog procesiranog oblika SHH-N (19 kDa) bila je dosljedno pojačana u oba modela u klonalnim staničnim linijama, prvenstveno u klonovima *ESR1*^{KI}, a u nešto manjoj mjeri i u *ESR2*^{KI} u odnosu na ishodišne stanične linije (Slika 22.) Usporedbom s rezultatima genske ekspresije uočava se da se proteinska ekspresija komponenti signalnog puta HH-GLI ne podudara u potpunosti s transkripcijskim obrascima, pri čemu je dosljedno pojačanje ekspresije proteina SHH i SHH-N u klonovima *ESR1*^{KI} zajedničko objema staničnim linijama. Ovi rezultati upućuju na mogućnost interakcije receptora estrogena i SHH, što će se u nastavku ispitati metodom koimunoprecipitacije (Co-IP).



Slika 22. Analiza ekspresije komponenti signalnog puta HH-Gli westernskom metodom otiska. Ekspresija proteina GLI1, PTCH1 i SHH analizirana je westernskom metodom otiska u roditeljskim (WT) i odgovarajućim klonalnim linijama *ESR1*^{KI} i *ESR2*^{KI} staničnih modela (**A**) CAL-27 i (**B**) SCC-25. Uz protein SHH pune duljine (45 kDa) detektiran je i njegov procesirani oblik SHH-N (19 kDa). Kao kontrola količine nanesenih proteina korišten je β-aktin.

4.3. Funkcionalna karakterizacija uspostavljenih staničnih linija *ESR1*^{KI} i *ESR2*^{KI}

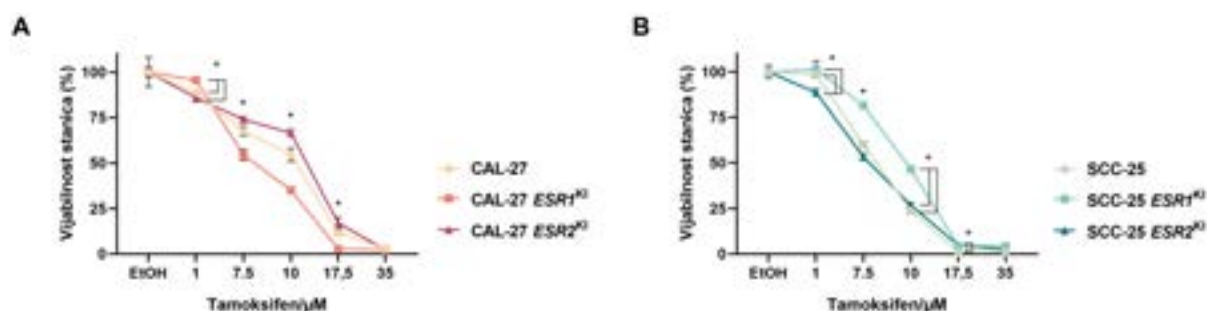
Nakon molekularne i proteinske karakterizacije uspostavljenih klonalnih staničnih linija *ESR1*^{KI} i *ESR2*^{KI}, u sljedećem koraku provedena je njihova funkcionalna analiza. S obzirom na ulogu receptora estrogena u regulaciji brojnih staničnih procesa, kao i na uočene promjene u ekspresiji komponenti signalnog puta HH-Gli, ispitano je kako inhibicija ovih signalnih puteva utječe na osobna obilježja tumora. Funkcionalna karakterizacija obuhvatila je analizu vijabilnosti stanica, migracijskog i invazivnog potencijala, sposobnosti formiranja kolonija, kao i promjena u regulaciji staničnog ciklusa i apoptoze. Ispitivanja su provedena u roditeljskim i

klonalnim staničnim linijama, uz farmakološku inhibiciju receptora estrogena i signalnog puta HH-GLI, s ciljem utvrđivanja njihove potencijalne uloge u regulaciji ključnih bioloških karakteristika HNSCC-a.

4.3.1. Utjecaj inhibicije receptora estrogena i signalnog puta HH-GLI na vijabilnost stanica

Učinak inhibicije receptora estrogena i signalnog puta HH-GLI na vijabilnost stanica ispitan je u roditeljskim i klonalnim staničnim linijama CAL-27 i SCC-25 primjenom testa MTT. Stanice su tretirane inhibitorom receptora estrogena (tamoksifen) i odabranim inhibitorima signalnog puta HH-GLI (vismodegib, sonidegib, GANT 61 i arsenov trioksid) tijekom 72 sata, nakon čega je procijenjena vijabilnost stanica. Dobiveni rezultati prikazuju razlike u odgovoru roditeljskih i klonalnih staničnih linija na pojedinačne inhibitore.

Tretman TAM-om doveo je do smanjenja vijabilnosti stanica ovisnog o dozi u oba stanična modela ($P < 0,05$). U staničnoj liniji CAL-27 *ESR1*^{KI} zabilježen je izraženiji pad vijabilnosti u usporedbi s roditeljskom linijom, dok je u klonu CAL-27 *ESR2*^{KI} odgovor na TAM bio slabiji, osobito pri srednjim koncentracijama inhibitora (Slika 23. A). Sličan obrazac uočen je i kod staničnog modela SCC-25, gdje je TAM također uzrokovao smanjenje vijabilnosti u svim analiziranim linijama, ali uz razlike u intenzitetu odgovora između roditeljske i klonalnih linija. Naime, u klonu SCC-25 *ESR1*^{KI} uočen je blaži pad vijabilnosti u odnosu na roditeljsku staničnu liniju i klon SCC-25 *ESR2*^{KI} (Slika 23. B). Na temelju nelinearne regresijske analize izračunate su vrijednosti IC₅₀ TAM-a, koje su iznosile 10,5 μ M za CAL-27, 8,1 μ M za CAL-27 *ESR1*^{KI} i 12,3 μ M za CAL-27 *ESR2*^{KI}, dok su u staničnom modelu SCC-25 iznosile 8,1 μ M za roditeljsku liniju, 9,6 μ M za SCC-25 *ESR1*^{KI} i 7,9 μ M za SCC-25 *ESR2*^{KI}.

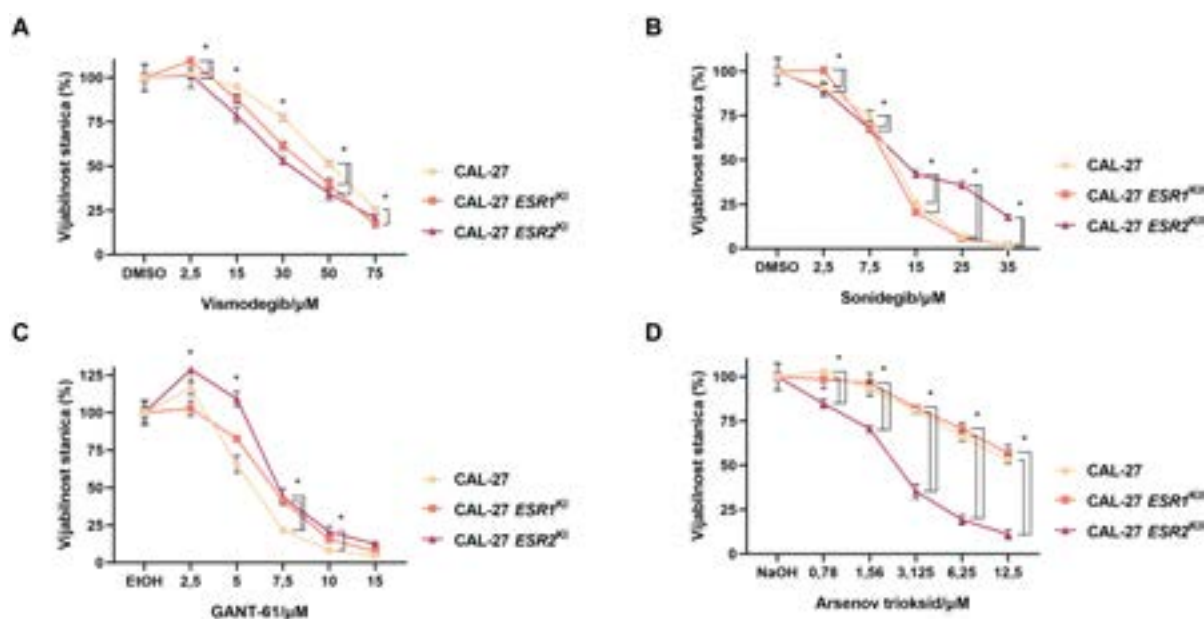


Slika 23. Učinak tamoksifena na vijabilnost roditeljskih i klonalnih staničnih linija CAL-

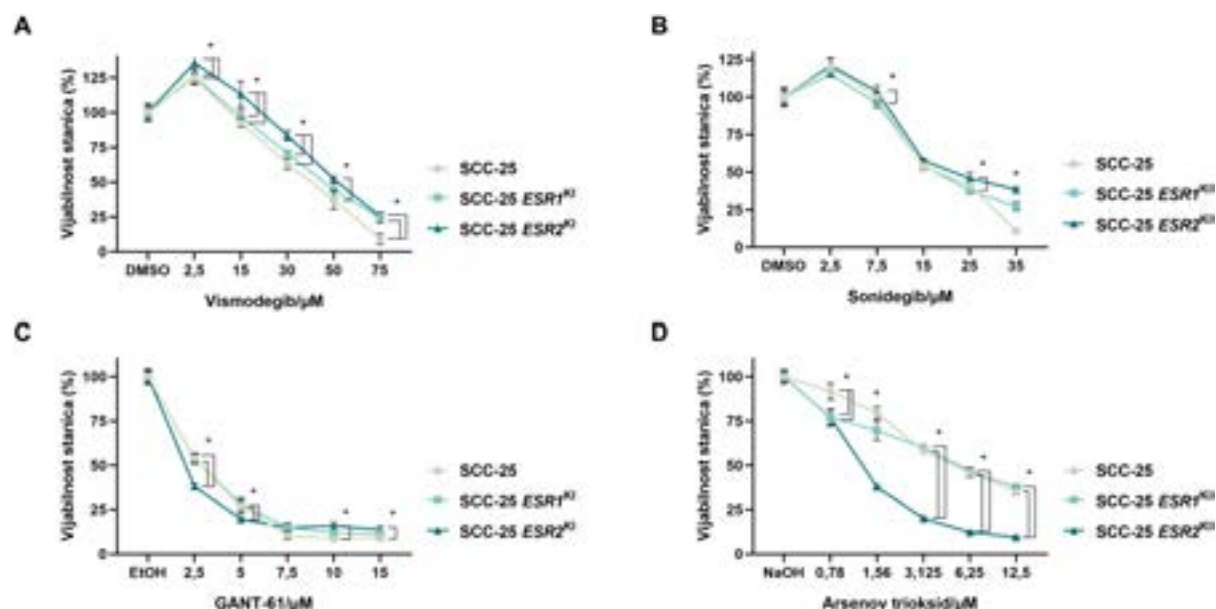
Slika 23. - nastavak

27 i SCC-25. Vijabilnost stanica (%) određena je testom MTT nakon 72 sata tretmana tamoksifenom u različitim koncentracijama. (A) Stanični model CAL-27 (divlji tip, *ESR1^{KI}* i *ESR2^{KI}*). (B) Stanični model SCC-25 (WT, *ESR1^{KI}* i *ESR2^{KI}*). Vrijednosti su izražene kao postotak u odnosu na kontrolu tretiranu otapalom (EtOH). Podatci su prikazani kao srednja vrijednost $\pm$ SD. Statistička analiza provedena je dvosmjernom analizom varijance (eng. *two-way ANOVA*), uz Tukey-Kramerov *post hoc* test. * $P < 0,05$.

Ispitan je i učinak inhibicije signalnog puta HH-GLI na vijabilnost roditeljskih i klonalnih staničnih linija, pri čemu je utvrđeno da inhibicija ovog signalnog puta dovodi do smanjenja vijabilnosti u svim analiziranim staničnim linijama, uz razlike u intenzitetu učinka ovisno o korištenom inhibitoru (Slika 24. i 25.). U oba stanična modela inhibitori SMO-a, vismodegib i sonidegib, uzrokovali su postupno smanjenje vijabilnosti ovisno o dozi, pri čemu je učinak sonidegiba bio izraženiji u usporedbi s vismodegibom. Razlike između roditeljskih i klonalnih linija bile su slabije izražene, osobito pri nižim koncentracijama ovih inhibitora. Suprotno tome, inhibitor transkripcijskih faktora GLI, GANT 61, doveo je do izraženijeg smanjenja vijabilnosti stanica u oba stanična modela, pri čemu je pad vijabilnosti bilo vidljiv već pri nižim koncentracijama. Najizraženija razlika u učinku primijenjenih inhibitora između roditeljskih i klonalnih staničnih linija zabilježena je nakon tretmana arsenovim trioksidom. U oba stanična modela, klonovi *ESR2^{KI}* pokazali su izražen pad vijabilnosti u usporedbi s roditeljskom staničnom linijom i klonom *ESR1^{KI}*, osobito pri višim koncentracijama inhibitora ($P < 0,0001$) (Slika 24. D i 25. D). Usporedbom dvaju staničnih modela uočen je sličan obrazac odgovora na pojedine inhibitore, uz iznimku inhibitora GANT 61, kod kojeg je zabilježen izraženiji pad vijabilnosti u staničnom modelu SCC-25 u odnosu na CAL-27. U nastavku su navedene vrijednosti IC_{50} za pojedine inhibitore, prikazane sljedećim redoslijedom staničnih linija: CAL-27, CAL-27 *ESR1^{KI}*, CAL-27 *ESR2^{KI}*, SCC-25, SCC-25 *ESR1^{KI}* i SCC-25 *ESR2^{KI}*. IC_{50} vrijednosti vismodegiba iznosile su 59,5, 45,5, 31,1, 46,1, 39,0 i 43,3 μ M, IC_{50} vrijednosti sonidegiba 11,1, 9,5, 14,6, 16,2, 12,5 i 11,9 μ M, IC_{50} vrijednosti GANT 61 5,4, 6,7, 6,8, 2,6, 2,5 i 1,7 μ M, dok su IC_{50} vrijednosti arsenova trioksida iznosile 4,0, 4,5, 2,1, 5,4, 6,1 i 1,6 μ M.



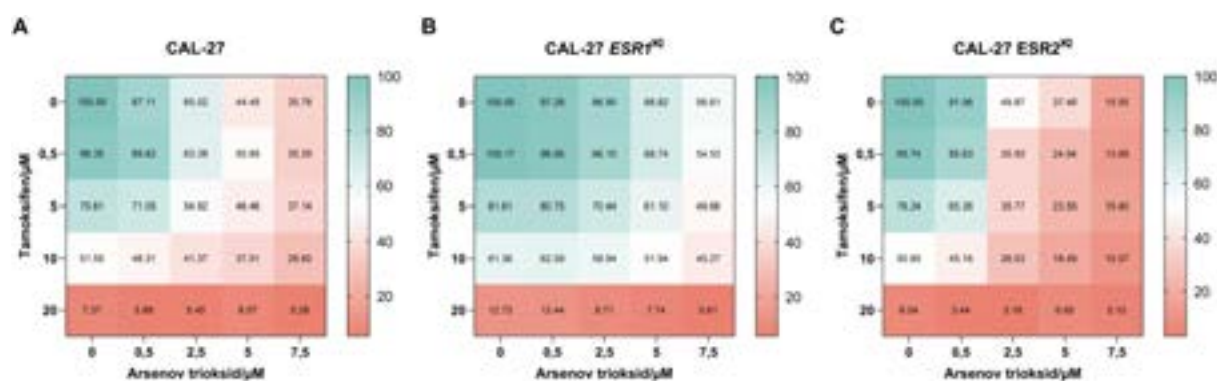
Slika 24. Učinak inhibitora signalnog puta HH-GLI na vijabilnost staničnog modela CAL-27. Vijabilnost stanica (%) određena je testom MTT nakon 72 sata tretmana inhibitorima signalnog puta HH-GLI u različitim koncentracijama. (A) Vismodegib, (B) sonidegib, (C) GANT 61 i (D) arsenov trioksid. Vrijednosti su izražene kao postotak u odnosu na kontrolu tretiranu odgovarajućim otapalom (DMSO, EtOH i NaOH). Podatci su prikazani kao srednja vrijednost $\pm$ SD. Statistička analiza provedena je dvosmjernom analizom varijance (eng. *two-way* ANOVA), uz Tukey-Kramerov *post hoc* test. * $P < 0,05$.



Slika 25. Učinak inhibitora signalnog puta HH-GLI na vijabilnost staničnog modela SCC-25. Vijabilnost stanica (%) određena je testom MTT nakon 72 sata tretmana inhibitorima signalnog puta HH-GLI u različitim koncentracijama. (A) Vismodegib, (B) sonidegib, (C) GANT 61 i (D) arsenov trioksid. Vrijednosti su izražene kao postotak u odnosu na kontrolu tretiranu odgovarajućim otapalom (DMSO, EtOH i NaOH). Podatci su prikazani kao srednja vrijednost $\pm$ SD. Statistička analiza provedena je dvosmjernom analizom varijance (eng. *two-way* ANOVA), uz Tukey-Kramerov *post hoc* test. * $P < 0,05$.

Na temelju dobivenih vrijednosti IC_{50} odabrane su koncentracije inhibitora za daljnje funkcionalne analize. U početnim eksperimentima korištene su koncentracije približne vrijednostima IC_{50} , međutim, za TAM se pokazalo da su takve koncentracije za većinu staničnih linija imale izrazito citotoksičan učinak, pri čemu je dolazilo do odvajanja stanica od podloge, osobito kod analize migracije stanica. Stoga je za daljnje funkcionalne analize odabrana niža koncentracija TAM-a ($5 \mu M$), dok je za ATO odabrana koncentracija od $2 \mu M$, koja je omogućila pouzdanu procjenu učinka tretmana bez izraženog gubitka adhezije i vijabilnosti stanica.

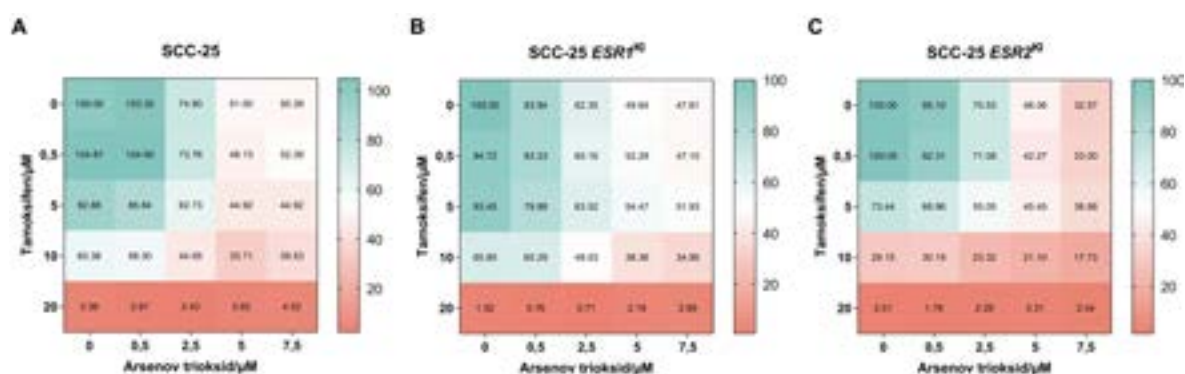
S obzirom na to da su pojedinačni tretmani pokazali izražene, ali diferencirane učinke na vijabilnost roditeljskih i klonalnih staničnih linija, daljnja analiza usmjerena je na ispitivanje kombiniranog učinka inhibicije receptora estrogena i signalnog puta HH-GLI. Na temelju izraženog učinka ATO-a na smanjenje vijabilnosti klonova $ESR2^{KI}$ u oba stanična modela, ispitan je učinak kombiniranog tretmana ATO-om i TAM-om primjenom različitih koncentracija oba inhibitora, pri čemu su korištene nešto niže koncentracije u usporedbi s pojedinačnim tretmanima. Kombinirani tretmani provedeni su u roditeljskim i klonalnim staničnim linijama, a vijabilnost stanica određena je testom MTT nakon 72 sata od primjene tretmana (Slike 26. i 27.).



Slika 26. Učinak kombiniranog tretmana tamoksifenom i arsenovim trioksidom na vijabilnost staničnog modela CAL-27. Vijabilnost stanica (%) određena je testom MTT nakon 72 sata tretmana kombinacijama tamoksifena i arsenovog trioksida u različitim koncentracijama. Prikazani su rezultati za (A) roditeljsku i klonalne stanične linije (B) $ESR1^{KI}$ i (C) $ESR2^{KI}$. Vrijednosti su izražene kao postotak u odnosu na kontrolu. Boja polja odgovara relativnoj vijabilnosti stanica.

U oba stanična modela kombinirani tretman doveo je do izraženog i konzistentnog smanjenja vijabilnosti stanica u svim analiziranim linijama, koje je bilo vidljivo kroz širi spektar primijenjenih koncentracija. Usporedbom dvaju staničnih modela vidljiv je izraženiji pad vijabilnosti u staničnom modelu CAL-27 u odnosu na SCC-25 pri istim koncentracijama

inhibitora, što upućuje na veću osjetljivost ovog modela na kombiniranu inhibiciju signalnog puta HH-GLI i ER. Unutar klonalnih linija uočen je jasno diferenciran odgovor na kombinirani tretman. Klonovi *ESR1^{KI}* pokazuju slabiji pad vijabilnosti u usporedbi s roditeljskim staničnim linijama i klonovima *ESR2^{KI}*, dok je upravo u klonovima *ESR2^{KI}* zabilježen najsnažniji pad vijabilnosti u oba stanična modela nakon primjene kombinacije tretmana ATO-a i TAM-a. Zajedno, ovi rezultati ukazuju da kombinirana inhibicija receptora estrogena i signalnog puta HH-GLI dovodi do izraženijeg smanjenja vijabilnosti stanica u usporedbi s pojedinačnim tretmanima, uz jasno diferenciran odgovor između roditeljskih i klonalnih staničnih linija.



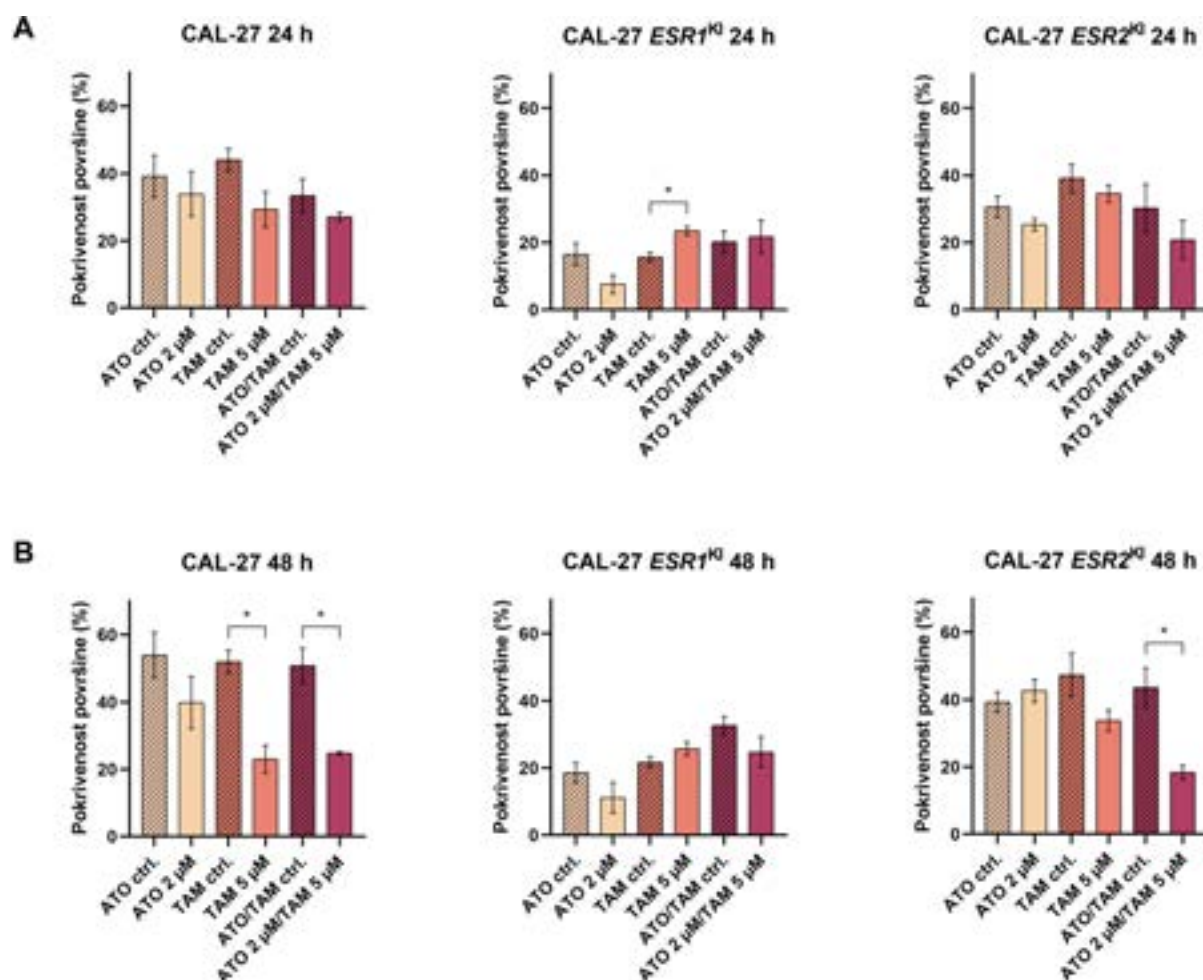
Slika 27. Učinak kombiniranog tretmana tamoksifenom i arsenovim triksidom na vijabilnost staničnog modela SCC-25. Vijabilnost stanica (%) određena je testom MTT nakon 72 sata tretmana kombinacijama tamoksifena i arsenovog triksida u različitim koncentracijama. Prikazani su rezultati za (A) roditeljsku i klonalne stanične linije (B) *ESR1^{KI}* i (C) *ESR2^{KI}*. Vrijednosti su izražene kao postotak u odnosu na kontrolu. Boja polja odgovara relativnoj vijabilnosti stanica.

4.3.2. Utjecaj inhibicije receptora estrogena i signalnog puta HH-GLI na migracijsku sposobnost stanica

Migracijska sposobnost stanica predstavlja jedno od ključnih obilježja tumorske progresije i invazivnog potencijala tumora glave i vrata. S obzirom na uočene promjene u vijabilnosti stanica nakon inhibicije receptora estrogena i signalnog puta HH-GLI, u sljedećem je koraku analiziran je učinak istih inhibitora na migraciju roditeljskih i klonalnih staničnih linija CAL-27 i SCC-25. Migracijska sposobnost analizirana je testom zacjeljivanja rane primjenom medija bez seruma, koji omogućuje procjenu migracijskog potencijala stanica neovisno o proliferaciji, 24 sata i 48 sati nakon stvaranja rane, uz tretman ATO-om (2 μM), TAM-om (5 μM) i njihovom kombinacijom.

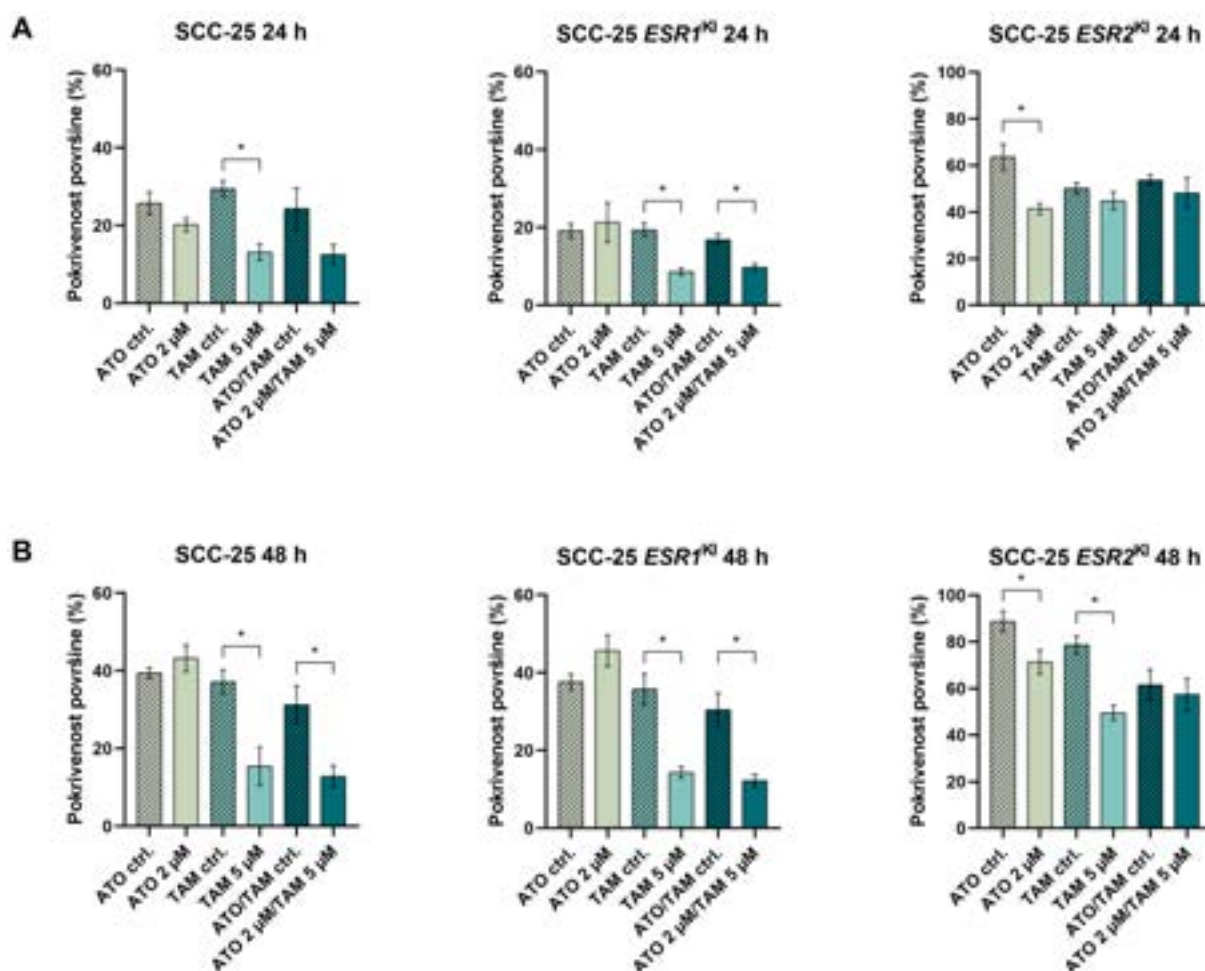
U roditeljskoj liniji CAL-27, nakon 24 sata nisu uočene statistički značajne razlike u

zatvorenosti površine rane između kontrolnih uvjeta i tretmana (Slika 28. A). Međutim, nakon 48 sati, tretman TAM-om ($P = 0,0017$), kao i kombinirani tretman ATO-om i TAM-om, doveli su do značajnog smanjenja migracije u usporedbi s kontrolom ($P = 0,0304$), dok ATO samostalno nije imao značajan učinak (Slika 28. B). U liniji CAL-27 *ESR1*^{KI}, migracijska sposobnost stanica bila je povećana nakon 24 sata tretmana TAM-om ($P = 0,0029$), dok nakon 48 sati taj učinak više nije bio prisutan (Slika 28. A i B). Konačno, u liniji CAL-27 *ESR2*^{KI}, nakon 24 sata nije zabilježen učinak ATO-a, TAM-a, niti njihove kombinacije na migraciju (Slika 28. A), no nakon 48 sati zabilježeno je značajno smanjenje zatvorenosti površine rane isključivo pri kombiniranom tretmanu u odnosu na kontrolu ($P = 0,0066$), dok pojedinačni tretmani nisu pokazali statistički značajan učinak (Slika 28. B).



Slika 28. Migracijska sposobnost roditeljske i klonalnih staničnih linija CAL-27 analizirana testom zacjeljivanja. Pokrivnost rane određena je (A) 24 sata i (B) 48 sati nakon stvaranja rane u kontrolnim uvjetima te nakon tretmana arsenovim trioksidom (ATO 2 μM) i tamoksifenom (TAM 5 μM) pojedinačno i u kombinaciji (ATO 2 μM/TAM 5 μM). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± SD. Statistička analiza provedena je Studentovim t-testom. * $P < 0,05$. ctrl. – kontrola tretirana otapalom.

S druge strane, u roditeljskoj staničnoj liniji SCC-25, tretman TAM-om rezultirao je smanjenom migracijom već nakon 24 sata ($P = 0,0014$), a taj se učinak zadržao i nakon 48 sati ($P = 0,0102$). Sličan obrazac zabilježen je i pri kombiniranom tretmanu ATO-om i TAM-om, pri čemu je nakon 24 sata uočen trend promjene, dok je nakon 48 sati učinak bio statistički značajan ($P = 0,0163$). ATO primijenjen samostalno nije značajno utjecao na migracijsku sposobnost (Slika 29. A i B). U liniji SCC-25 *ESR1*^{KI}, smanjena pokrivenost površine rane uočena je u uvjetima tretmana TAM-om, pri čemu je učinak pristan i nakon 24 ($P = 0,0015$) i nakon 48 sati ($P = 0,0023$). Kombinirani tretman dodatno je smanjio migraciju u obje vremenske točke ($P = 0,0064$ i $0,0077$), dok ATO samostalno nije pokazao značajan učinak (Slika 29. A i B).



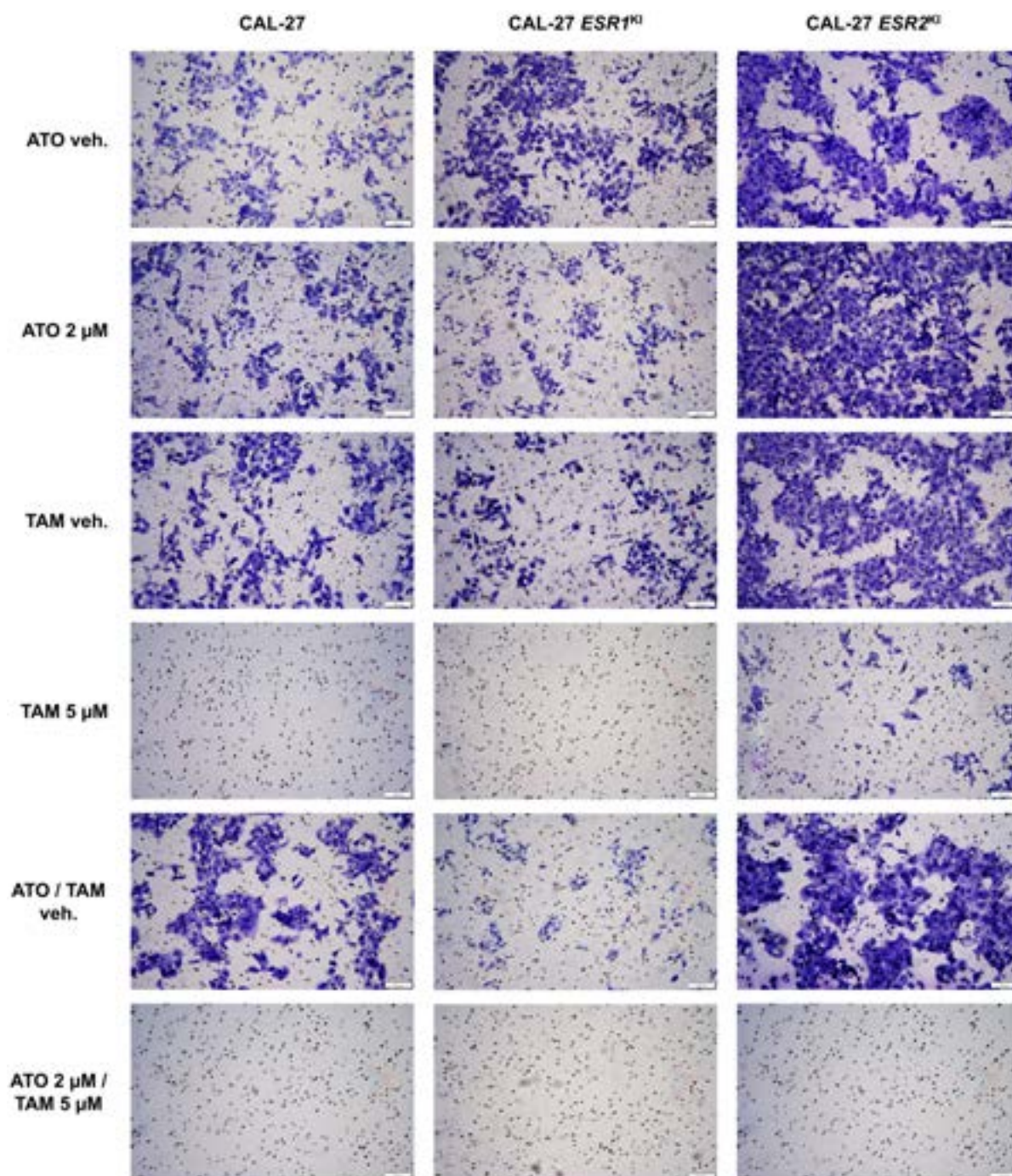
Slika 29. Migracijska sposobnost roditeljske i klonalnih staničnih linija SCC-25 analizirana testom zacjeljivanja. Pokrivenost rane određena je (A) 24 sata i (B) 48 sati nakon stvaranja rane u kontrolnim uvjetima te nakon tretmana arsenovim trioksidom (ATO 2 μ M) i tamoksifenom (TAM 5 μ M) pojedinačno i u kombinaciji (ATO 2 μ M/TAM 5 μ M). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost $\pm$ SD. Statistička analiza provedena je Studentovim t-testom. * $P < 0,05$. ctrl. – kontrola tretirana otapalom.

Nasuprot tome, u klonalnoj liniji SCC-25 *ESR2*^{KI}, tretman ATO-om doveo je do statistički značajnog smanjenja migracijske sposobnosti u obje vremenske točke ($P = 0,0110$ i $0,0413$), pri čemu je ova linija jedina u kojoj je zabilježen značajan učinak pojedinačnog učinka ATO-a (Slika 29. A i B). Tamoksifen je u ovoj liniji značajno smanjio migraciju tek nakon 48 sati ($P = 0,0011$), dok isti nije bio prisutan nakon 24 sata. Kombinirani tretman nije značajno utjecao na migraciju ove klonalne linije (Slika 29.). U cjelini, dobiveni rezultati ukazuju na to da je učinak inhibicije estrogenskih receptora i signalnog puta HH-GLI na migracijsku sposobnost stanica primarno ovisan o statusu receptora estrogena i vremenu izlaganja.

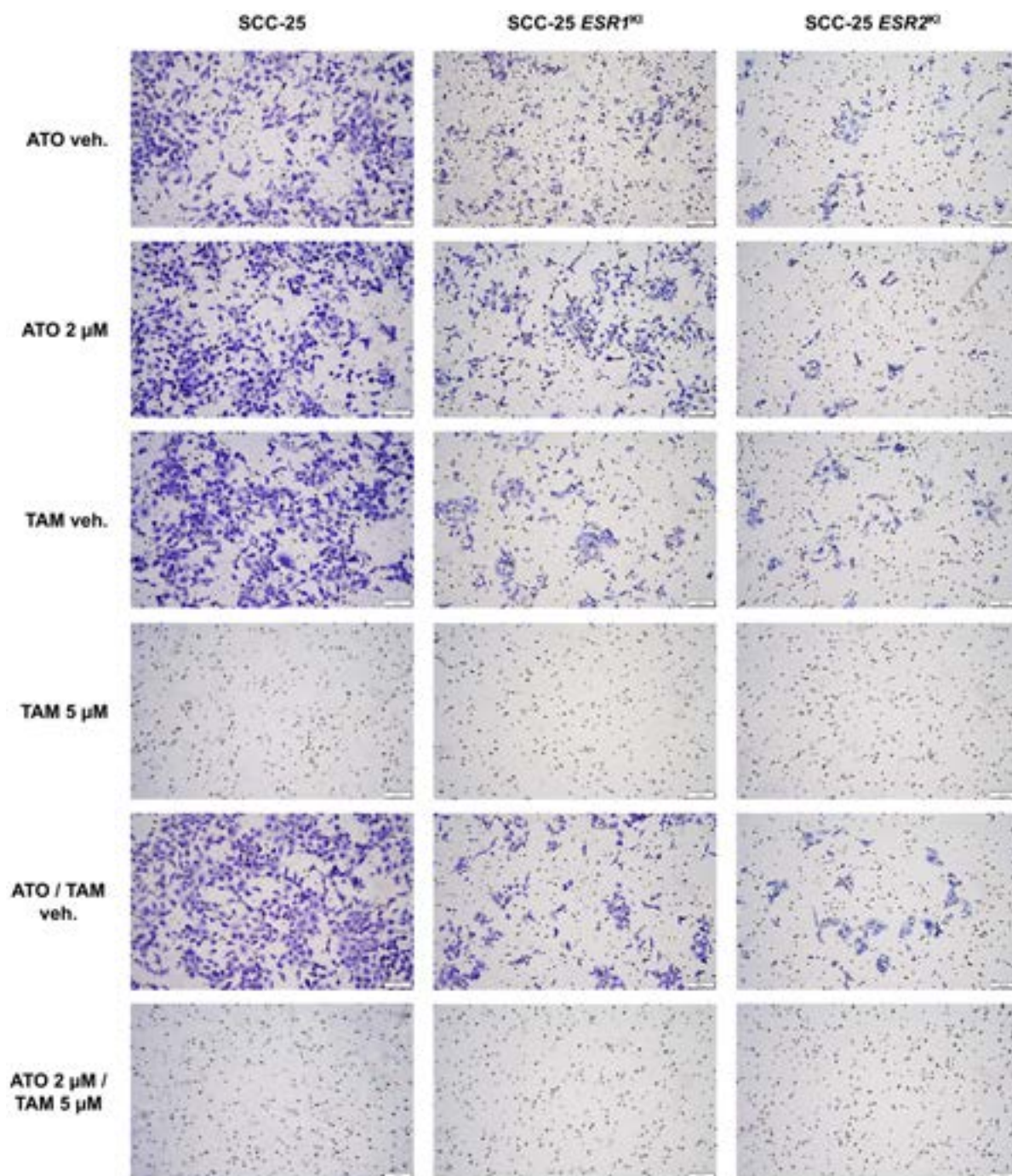
4.3.3. Utjecaj inhibicije receptora estrogena i signalnog puta HH-GLI na invazivnost stanica

Invazivna sposobnost tumorskih stanica predstavlja sljedeći, složeniji korak u procesu tumorske progresije, koji uz migraciju uključuje i razgradnju bazalne lamine te prolazak stanica kroz izvanstanični matriks. Učinak inhibicije receptora estrogena i signalnog puta HH-GLI na invazivnu sposobnost roditeljskih i klonalnih staničnih linija CAL-27 i SCC-25 ispitan je primjenom testa *Transwell invasion* uz dodatak matrigela, koji oponaša bazalnu laminu. Usmjerena invazija stanica inducirana je dodatkom FBS-a kao kemoatraktanta. Stanice su tretirane TAM-om i ATO-om, pojedinačno i u kombinaciji, tijekom 48 sati, a kvantifikacija invazije provedena je analizom postotka obojene površine na donjoj strani membrane, pri čemu su rezultati izraženi u odnosu na kontrolu (Slika 32.).

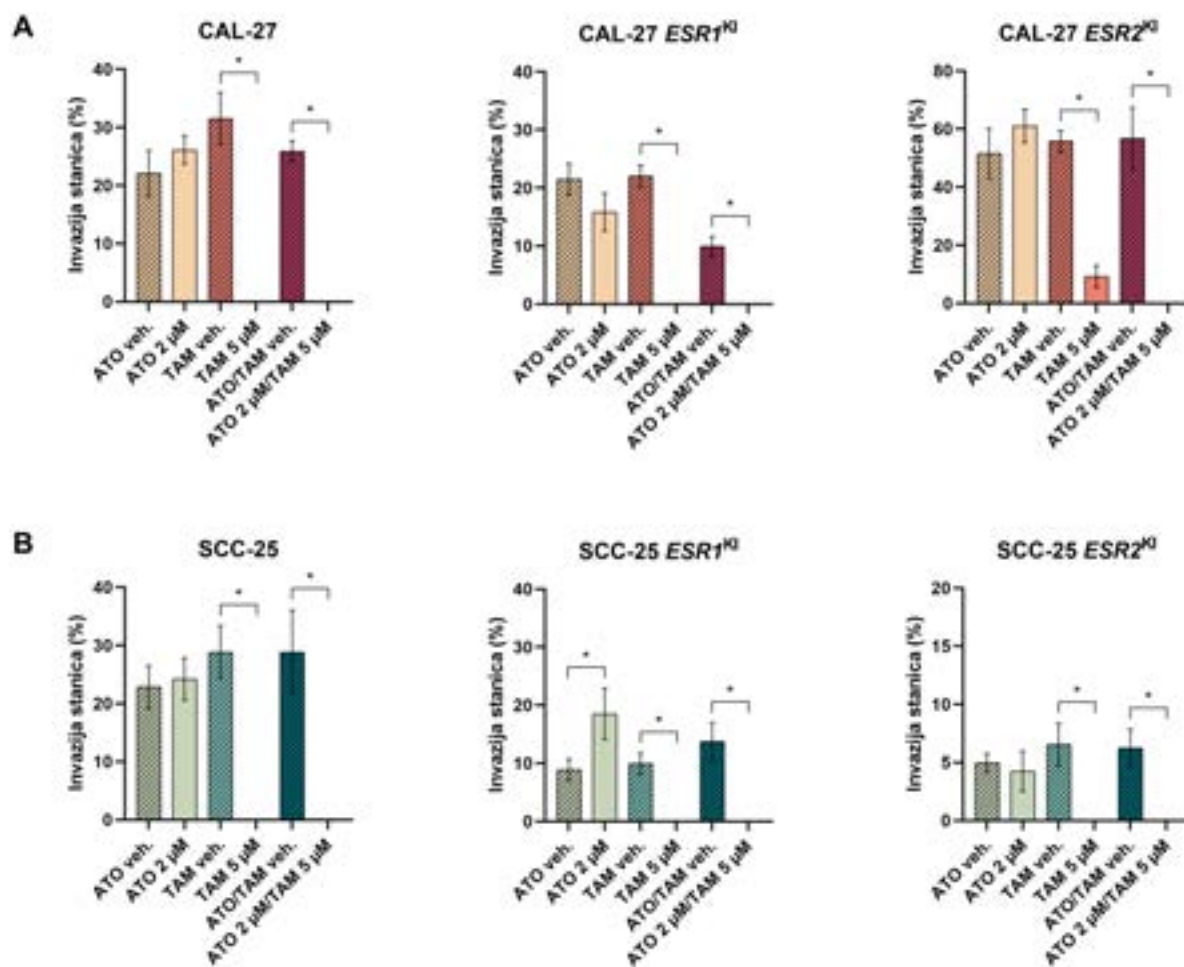
Roditeljska linija CAL-27 i klon CAL-27 *ESR1*^{KI} pokazuju usporedivu bazalnu invazivnost, što je potvrđeno kvantitativnom analizom (Slika 32. A) i reprezentativnim mikrofotografijama (Slika 30.). U navedenim linijama tretman ATO-om ($2\ \mu\text{M}$) ne dovodi do značajne promjene invazije. Tretman TAM-om ($5\ \mu\text{M}$), kao i kombinirani tretman s ATO-om i TAM-om, u obje linije dovode do potpune inhibicije invazije u usporedbi s kontrolama ($P = 0,0053$), uz izostanak ljubičasto obojenih stanica s donje strane membrane. S druge strane, linija CAL-27 *ESR2*^{KI} pokazuje znatno višu razinu bazalne invazivnosti u odnosu na roditeljsku liniju i klon *ESR1*^{KI}. Tretman ATO-om ni u ovoj liniji ne dovodi do značajnih promjena u intenzitetu invazivnosti, dok TAM dovodi do statistički značajnog smanjenja invazivne sposobnosti, međutim unatoč izraženom smanjenju invazije, ona nije potpuna nakon primjene ovog tretmana, kao u preostale dvije linije ($P = 0,0079$). Potpuna inhibicija invazije u ovoj liniji postignuta je isključivo primjenom kombiniranog tretmana ATO-om i TAM-om ($P = 0,0053$).



Slika 30. Reprezentativne mikrofotografije testa *Transwell invasion* roditeljske linije CAL-27 te klonova CAL-27 *ESR1*^{KI} i CAL-27 *ESR2*^{KI}. Invazivnost stanica (%) određena je nakon 48 sati inkubacije s arsenovim trioksidom (ATO 2 μ M) i tamoksifenom (TAM 5 μ M) pojedinačno i u kombinaciji (ATO 2 μ M/TAM 5 μ M), uz odgovarajuće kontrole tretirane otapalima spojeva. Invadirane stanice obojane su kristal ljubičastim. Skala: 100 μ m. veh. – kontrola tretirana otapalom.



Slika 31. Reprezentativne mikrofotografije testa *Transwell invasion* roditeljske linije SCC-25 te klonova SCC-25 ESR1^{KI} i SCC-25 ESR2^{KI}. Invazivnost stanica (%) određena je nakon 48 sati inkubacije s arsenovim trioksidom (ATO 2 μ M) i tamoksifenom (TAM 5 μ M) i pojedinačno i u kombinaciji (ATO 2 μ M/TAM 5 μ M), uz odgovarajuće kontrole tretirane otapalima spojeva. Invadirane stanice obojane su kristal ljubičastim. Skala: 100 μ m. veh. – kontrola tretirana otapalom.



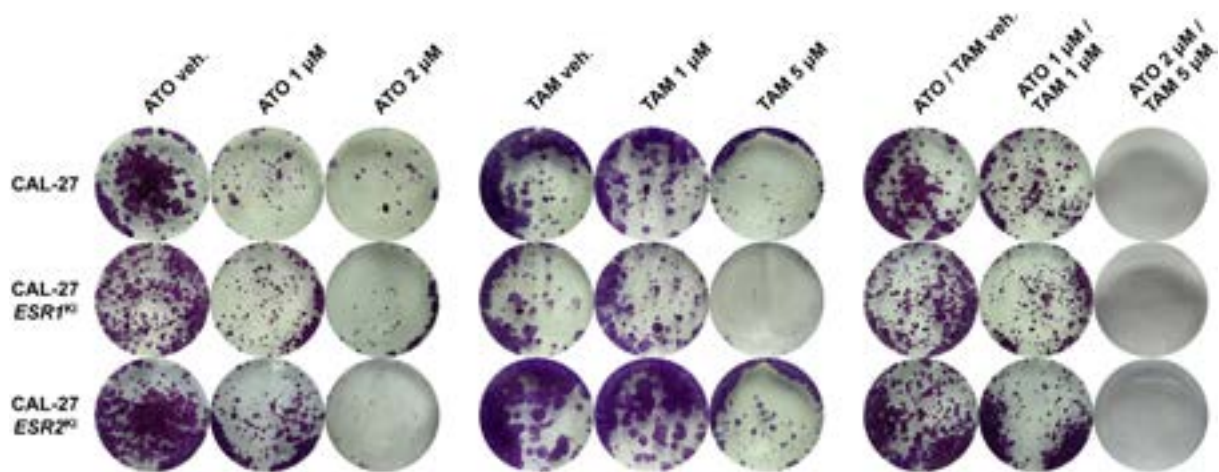
Slika 32. Kvantitativna analiza invazije roditeljskih i klonalnih staničnih linija (A) CAL-27 i (B) SCC-25 nakon 48 sati tretmana arsenovim trioksidom (ATO 2 µM) i tamoksifenom (TAM 5 µM) pojedinačno i u kombinaciji (ATO 2 µM/TAM 5 µM). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± SD. Statistička analiza provedena je Mann-Whitneyevim testom za nezavisne uzorke. * $P < 0,05$. veh. (eng. *vehicle*) – kontrola tretirana otapalom.

S druge strane, kod modela SCC-25, roditeljska linija pokazuje najvišu bazalnu invazivnost u odnosu na klonove, pri čemu je bazalna razina invazije osobito niska kod linije SCC-25 *ESR2*^{KI}. Za razliku od uočenog smanjenja invazivne sposobnosti u klonu CAL-27 *ESR1*^{KI} nakon tretmana ATO-om, u liniji SCC-25 *ESR1*^{KI} primjena ATO-a dovodi do statistički značajnog povećanja invazije ($P = 0,0079$), dok u roditeljskoj liniji SCC-25 i klonu SCC-25 *ESR2*^{KI} ne uzrokuje značajne promjene. Tretman TAM-om i kombinirani tretman ATO-om i TAM-om u ovom modelu dovode do potpune inhibicije invazivne sposobnosti, bez detektabilnih invadiranih stanica ($P = 0,0053$) (Slike 31. i 32. B).

4.3.4. Utjecaj inhibicije receptora estrogena i signalnog puta HH-GLI na sposobnost formiranja kolonija

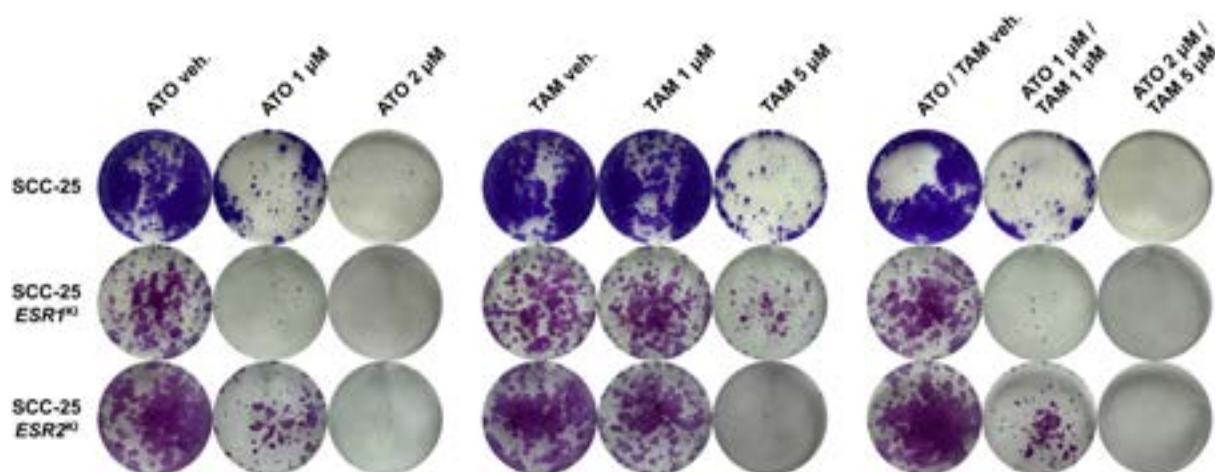
Sposobnost formiranja kolonija odražava dugoročni proliferativni potencijal tumorskih stanica i predstavlja važno obilježje tumorske agresivnosti i terapijske rezistencije. Dugoročni učinak inhibicije receptora estrogena i signalnog puta HH-GLI ispitan je analizom sposobnosti formiranja kolonija kod roditeljskih i klonalnih linija modela CAL-27 i SCC-25, primjenom testa *colony forming*. U tu svrhu stanice su tretirane različitim koncentracijama ATO-a i TAM-a, pojedinačno i u kombinaciji, uz odgovarajuće kontrole tretirane otapalima. Važno je istaknuti da su, osim uobičajenih koncentracija od 2 μM za ATO i 5 μM za TAM, korišteni i pojedinačni te kombinirani tretmani pri dozi od 1 μM , budući da je kod pojedinih tretmana pri višim koncentracijama uočen potpuni inhibitorski učinak na sposobnost formiranja kolonija. Formiranje kolonija praćeno je tijekom razdoblja od dva tjedna, nakon čega je provedena njihova vizualizacija i kvantitativna analiza.

Analiza sposobnosti formiranja kolonija kod roditeljske stanične linije CAL-27 i klonalnih linija CAL-27 *ESR1*^{KI} i CAL-27 *ESR2*^{KI} prikazana je reprezentativnim fotografijama na Slici 33. U roditeljskoj liniji već pri koncentraciji od 1 μM vidljivo je umjereno smanjenje broja i gustoće kolonija u odnosu na kontrolu, dok je pri koncentraciji od 2 μM zabilježen dodatni pad, uz mali broj preostalih kolonija. Nasuprot tome, u klonalnim linijama zabilježen je nešto slabiji učinak doze od 1 μM na formiranje kolonija u usporedbi s roditeljskom linijom, no pri koncentraciji od 2 μM ATO-a, vidljiva je gotovo popuna inhibicija formiranja kolonija u liniji CAL-27 *ESR2*^{KI}, dok stanična linija CAL-27 *ESR1*^{KI} pokazuje sličan odgovor kao i roditeljska linija. Što se tiče tretmana TAM-om, kod sve tri linije je zabilježen blagi porast broja kolonija pri dozi od 1 μM , no pri koncentraciji od 5 μM TAM-a došlo je do smanjenja broja kolonija, uz vidljive razlike u osjetljivosti između klonalnih linija. Naime, inhibitorski učinak TAM-a bio je posebno izražen u klonalnoj liniji *ESR1*^{KI}, dok je linija *ESR2*^{KI} i pri toj koncentraciji zadržala veći broj kolonija u usporedbi s roditeljskom linijom. Kod kombiniranog tretmana ATO-om i TAM-om također su uočene promjene u sposobnosti formiranja kolonija u ovisnosti o dozi primijenjenih tretmana. Pri nižoj kombiniranoj dozi (1 μM ATO i 1 μM TAM) zabilježen je umjereni pad broja kolonija u usporedbi s kontrolnim uvjetima, dok je pri višim kombiniranim dozama uočena potpuna inhibicija sposobnosti formiranja kolonija u sve tri linije.



Slika 33. Učinak tretmana arsenovim trioksidom (ATO) i tamoksifenom (TAM) pojedinačno i u kombinaciji (ATO/TAM) na formiranje kolonija u roditeljskoj liniji CAL-27 i klonalnim linijama CAL-27 *ESR1*^{KI} i CAL-27 *ESR2*^{KI}. Stanice su tretirane ATO-om u koncentracijama od 1 i 2 µM te TAM-om u koncentracijama od 1 i 5 µM, kao i njihovim kombinacijama pri nižoj i višoj dozi. veh. – kontrola tretirana otapalom.

Tretman ATO-om u modelu SCC-25 pokazao je sličan obrazac odgovora kao i u modelu CAL-27 (Slika 34.). Već pri koncentraciji od 1 µM vidljiva je inhibicija sposobnosti formiranja kolonija u sve tri ispitivane linije, pri čemu je učinak posebno izražen u klonalnoj liniji SCC-25 *ESR1*^{KI}. Pri koncentraciji od 2 µM uočeno je izraženije smanjenje broja kolonija, s potpunim izostankom kolonija u liniji SCC-25 *ESR1*^{KI}, odnosno gotovo potpunom inhibicijom formiranja kolonija u roditeljskoj liniji SCC-25 i klonu SCC-25 *ESR2*^{KI}. Što se tiče tretmana TAM-om, pri koncentraciji od 1 µM nije zabilježen značajan učinak na formiranje kolonija u usporedbi s kontrolom. Nasuprot tome, pri koncentraciji od 5 µM zabilježen je značajan inhibitorski učinak u sve tri linije. Za razliku od modela CAL-27 gdje je najizraženije smanjenje broja kolonija bilo kod klona *ESR1*^{KI}, u modelu SCC-25 isto je zabilježeno kod klona *ESR2*^{KI}, dok su roditeljska i klonalna linija *ESR1*^{KI} pokazale nešto slabiji, ali i dalje jasno vidljiv inhibitorski učinak. Konačno, kod kombiniranog tretmana ATO-om i TAM-om uočen je snažan inhibitorski učinak na sposobnost formiranja kolonija već pri nižim kombiniranim dozama, sličan učinku zabilježenom kod pojedinačnog tretmana ATO-om. Pri višim kombiniranim dozama zabilježena je potpuna inhibicija formiranja kolonija u sve tri linije, što upućuje na snažan inhibitorski učinak primijenjenog tretmana u oba modela.



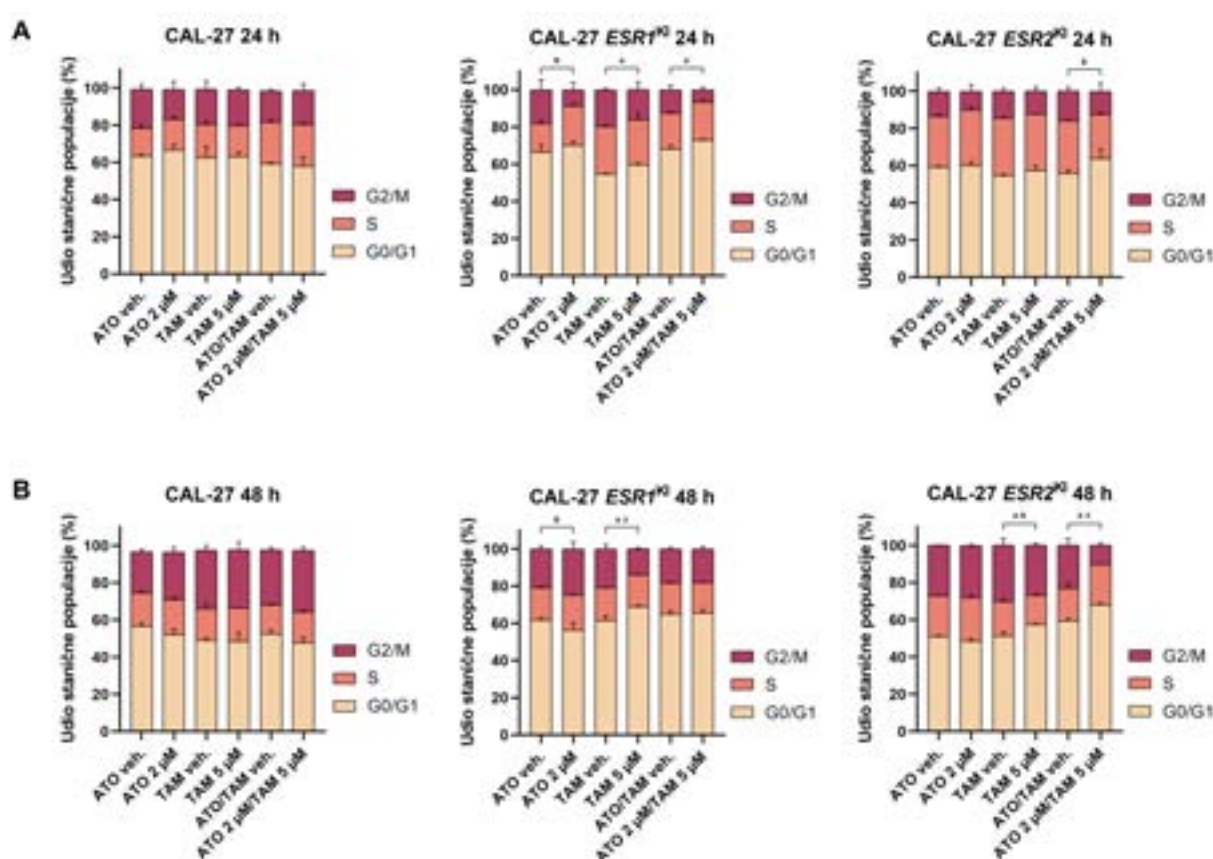
Slika 34. Učinak tretmana arsenovim trioksidom (ATO) i tamoksifenom (TAM) pojedinačno i u kombinaciji (ATO/TAM) na formiranje kolonija u roditeljskoj liniji SCC-25 i klonalnim linijama SCC-25 *ESR1*^{KI} i SCC-25 *ESR2*^{KI}. Stanice su tretirane ATO-om u koncentracijama od 1 i 2 μ M te TAM-om u koncentracijama od 1 i 5 μ M, kao i njihovim kombinacijama pri nižoj i višoj dozi. veh. – kontrola tretirana otapalom.

4.3.5. Analiza staničnog ciklusa u uspostavljenim klonalnim staničnim linijama

Kako bi se ispitaio učinak tamoksifena (5 μ M) i arsenovog trioksida (2 μ M), primijenjenih pojedinačno i u kombinaciji, na raspodjelu stanica u pojedinim fazama staničnog ciklusa, provedena je analiza staničnog ciklusa protočnom citometrijom. Udio stanica u fazama G0/G1, S i G2/M određen je nakon 24 i 48 sati tretmana te uspoređen s odgovarajućim kontrolnim tretmanima. Dobiveni rezultati omogućuju uvid u promjene dinamike staničnog ciklusa izazvane ispitivanim spojevima, kao i u moguće učinke njihove kombinirane primjene.

U staničnoj liniji CAL-27 nije zabilježena statistički značajna promjena u udjelu stanica u fazama G0/G1, S ili G2/M nakon 24, kao ni 48 sati nakon tretmana ATO-om, TAM-om ili njihovom kombinacijom u usporedbi s kontrolama. Nasuprot tome, u liniji CAL-27 *ESR1*^{KI} uočene su promjene u raspodjeli staničnog ciklusa već nakon 24 sata, pri čemu je tretman ATO-om rezultirao statistički značajnim povećanjem udjela stanica u fazi S ($P = 0,013$), dok je tretman TAM-om primijenjen pojedinačno ($P = 0,003$) i u kombinaciji s ATO-om ($P = 0,042$) doveo do povećanja udjela stanica u fazi G0/G1 (Slika 35. A). Nakon 48 sati od tretmana, i dalje je bio vidljiv učinak ATO-a u vidu povećanja udjela stanica u fazi S ($P = 0,014$). Osim porasta udjela stanica u fazi G0/G1 ($P = 0,011$), tretman TAM-om rezultirao je istodobnim smanjenjem udjela stanica u fazi G2/M ($P = 0,010$). S druge strane, nakon 48 sati više nije zabilježena statistički značajna razlika u raspodjeli staničnog ciklusa nakon primjene kombiniranog tretmana u istoj liniji (Slika 35. B). Za razliku od klona *ESR1*^{KI}, u liniji CAL-27

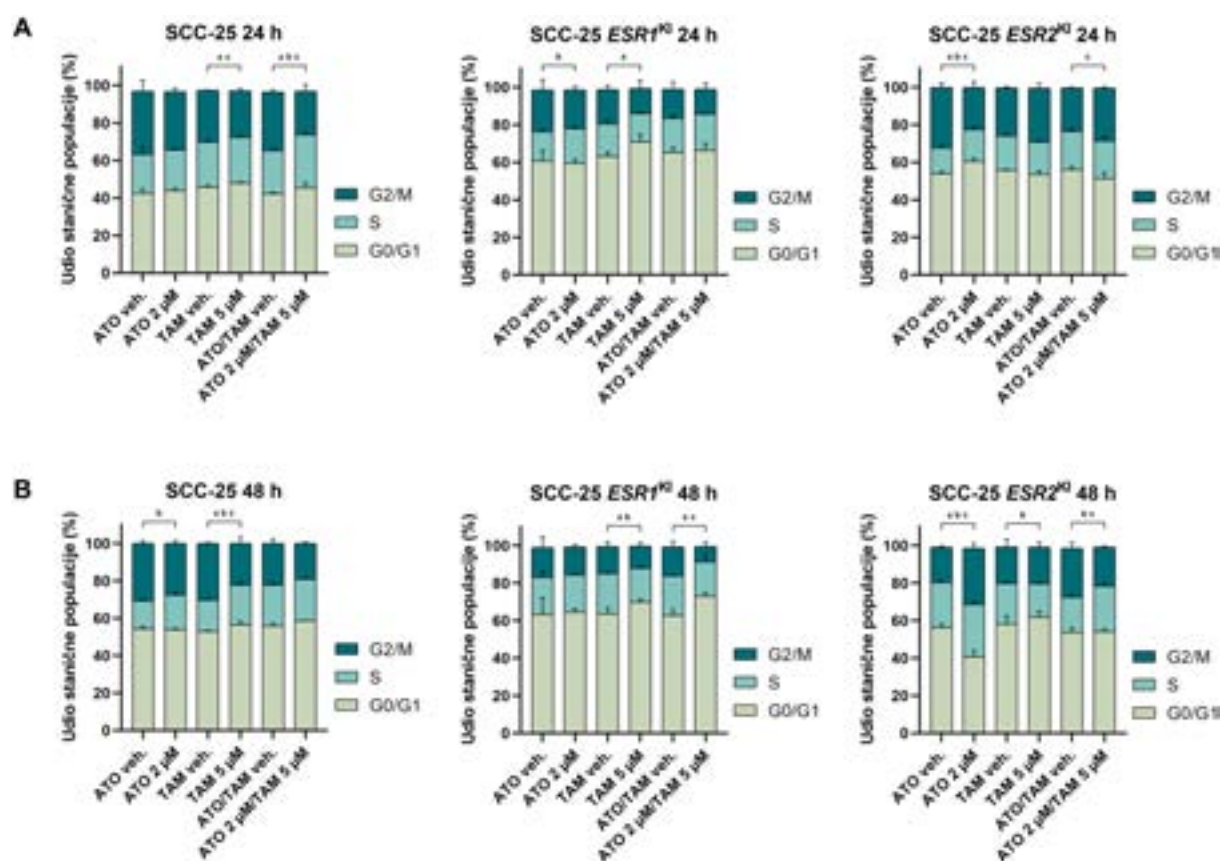
ESR2^{KI} nakon 24 sata zabilježeno je isključivo smanjenje udjela stanica u fazi S nakon primjene kombiniranog tretmana ATO-om i TAM-om ($P = 0,028$), dok u fazama G0/G1 i G2/M, kao ni nakon pojedinačnih tretmana, nije uočena statistički značajna promjena u raspodjeli staničnog ciklusa (Slika 35. A). Nakon 48 sati uočen je drugačiji odgovor linije CAL-27 *ESR2*^{KI} na primijenjene tretmane, pri čemu tretman TAM-om dovodi do značajnog povećanja udjela stanica u fazi G0/G1 ($P = 0,012$) i istodobnog smanjenja udjela stanica u fazi S ($P = 0,046$). Slično tome, primjena kombiniranog tretmana također rezultira porastom udjela stanica u fazi G0/G1 ($P = 0,001$), uz izraženo smanjenje udjela stanica u fazi G2/M ($P = 0,002$). Pojedinačni tretman ATO-om ni nakon 48 sati ne dovodi do značajnih promjena (Slika 35. B).



Slika 35. Raspodjela stanica po fazama staničnog ciklusa (G0/G1, S i G2/M) u staničnoj liniji CAL-27 i klonovima CAL-27 *ESR1*^{KI} i CAL-27 *ESR2*^{KI} nakon primjene tretmana arsenovim trioksidom (ATO 2 μM) i tamoksifenom (TAM 5 μM) pojedinačno i u kombinaciji (ATO 2 μM/TAM 5 μM). Raspodjela stanične populacije nakon (A) 24 sata i (B) 48 sati od tretmana. Podaci su prikazani kao udio stanica (%) + SD. Statistička analiza provedena je jednosmjernom analizom varijance uz Tukey-Kramerov *post hoc* test. Značajne razlike označene su slovom 'a' za fazu G0/G1, slovom 'b' za fazu S i slovom 'c' za fazu G2/M (* $P < 0,05$). veh. – kontrola tretirana otapalom.

U usporedbi s roditeljskom staničnom linijom CAL-27, u kojoj nije uočena promjena u

raspodjeli staničnog ciklusa nakon primijenjenih tretmana, u liniji SCC-25 promjene su zabilježene već nakon 24 sata od tretmana TAM-om kako pojedinačno, tako i u kombinaciji s ATO-om. Oba tretmana rezultirala su povećanjem udjela stanica u fazi G0/G1 ($P = 0,020$ i $0,008$) i smanjenjem udjela stanica u fazi G2/M ($P = 0,018$ i $0,028$), uz dodatno povećanje broja stanica u fazi S nakon primjene kombiniranog tretmana ($P = 0,017$) (Slika 36. A). Nakon 48 sati uočena je promjena obrasca staničnog ciklusa u odnosu na 24 sata, pri čemu razlike nakon primjene kombiniranog tretmana više nisu bile statistički značajne, dok suprotno tome pojedinačni tretman ATO-om, za razliku od 24 sata, dovodi do povećanja udjela stanica u fazi S ($P = 0,016$). Najsličniji obrazac onom uočenom nakon 24 sata pokazuje TAM, uključujući povećanje udjela stanica u fazi G0/G1 ($P = 0,023$), smanjenje u fazi G2/M ($P = 0,015$) i dodatno povećanje udjela stanica u fazi S ($P = 0,015$) (Slika 36. B). S obzirom na to da su razlike u profilu staničnog ciklusa uočene već između roditeljskih linija, klonalne linije dodatno potvrđuju da odgovor na pojedini tretman ovisi o genetskoj podlozi i vremenu izlaganja tretmanu. U liniji SCC-25 *ESR1*^{KI} već nakon 24 sata tretman ATO-om doveo je do povećanja udjela stanica u fazi S ($P = 0,010$), dok je tretman TAM-om rezultirao povećanjem udjela stanica u fazi G0/G1 staničnog ciklusa ($P = 0,041$) u odnosu na kontrolu (Slika 36. A). Nakon 48 sati u istoj liniji zadržan je učinak TAM-a, pri čemu je i dalje vidljivo povećanje udjela stanica u fazi G0/G1 ($P = 0,036$), uz dodatno smanjenje broja stanica u fazi S ($P = 0,007$). Slično tome, i nakon primjene kombiniranog tretmana ATO-om i TAM-om uočeno je povećanje broja stanica u fazi G0/G1 ($P = 0,008$), uz istodobno smanjenje broja stanica u fazi G2/M ($P = 0,030$) (Slika 36. B). Pojedinačni tretman ATO-om u ovoj vremenskoj točki više ne rezultira statistički značajnim promjenama. Konačno, u klonu SCC-25 *ESR2*^{KI} vidljiva je najveća razlika u odgovoru na tretman ATO-om u usporedbi s roditeljskom linijom SCC-25 i klonom SCC-25 *ESR1*^{KI}, koja uključuje povećanje udjela stanica u fazama G0/G1 ($P = 0,005$) i S ($P = 0,048$), odnosno smanjenje broja stanica u fazi G2/M ($P = 0,012$) nakon 24 sata (Slika 36. A). Nakon 48 sati uočen je drugačiji profil stanične populacije s vidljivim smanjenjem postotka stanica u fazi G0/G1 ($P = 0,010$) i povećanjem udjela stanica u fazama S ($P = 0,035$) i G2/M ($P = 0,011$). Tretman TAM-om nije pokazao statistički značajnu razliku nakon 24 sata, dok je nakon 48 sati uočeno smanjenje broja stanica u fazi S staničnog ciklusa ($P = 0,003$) (Slika 36. B). Kao i kod pojedinačnog tretmana ATO-om, njegov kombinirani tretman s TAM-om također rezultira različitim profilom staničnog ciklusa ovisno o vremenskoj točki. Nakon 24 sata od primjene kombiniranog tretmana uočeno je značajno povećanje broja stanica u fazi G2/M ciklusa ($P = 0,006$), dok se nakon 48 sati uočava smanjenje iste faze ($P = 0,045$) uz istodobno povećanje udjela faze S ($P = 0,015$).



Slika 36. Raspodjela stanica po fazama staničnog ciklusa (G0/G1, S i G2/M) u staničnoj liniji SCC-25 i klonovima SCC-25 *ESR1*^{KI} i SCC-25 *ESR2*^{KI} nakon primjene tretmana arsenovim trioksidom (ATO 2 μ M) i tamoksifenom (TAM 5 μ M) pojedinačno i u kombinaciji (ATO 2 μ M/TAM 5 μ M). Raspodjela stanične populacije nakon (A) 24 sata i (B) 48 sati od tretmana. Podaci su prikazani kao udio stanica (%) + SD. Statistička analiza provedena je jednosmjernom analizom varijance uz Tukey-Kramerov *post hoc* test. Značajne razlike označene su slovom 'a' za fazu G0/G1, slovom 'b' za fazu S i slovom 'c' za fazu G2/M ($P < 0,05$). veh. – kontrola tretirana otapalom.

4.3.6. Analiza apoptoze u uspostavljnim klonalnim staničnim linijama

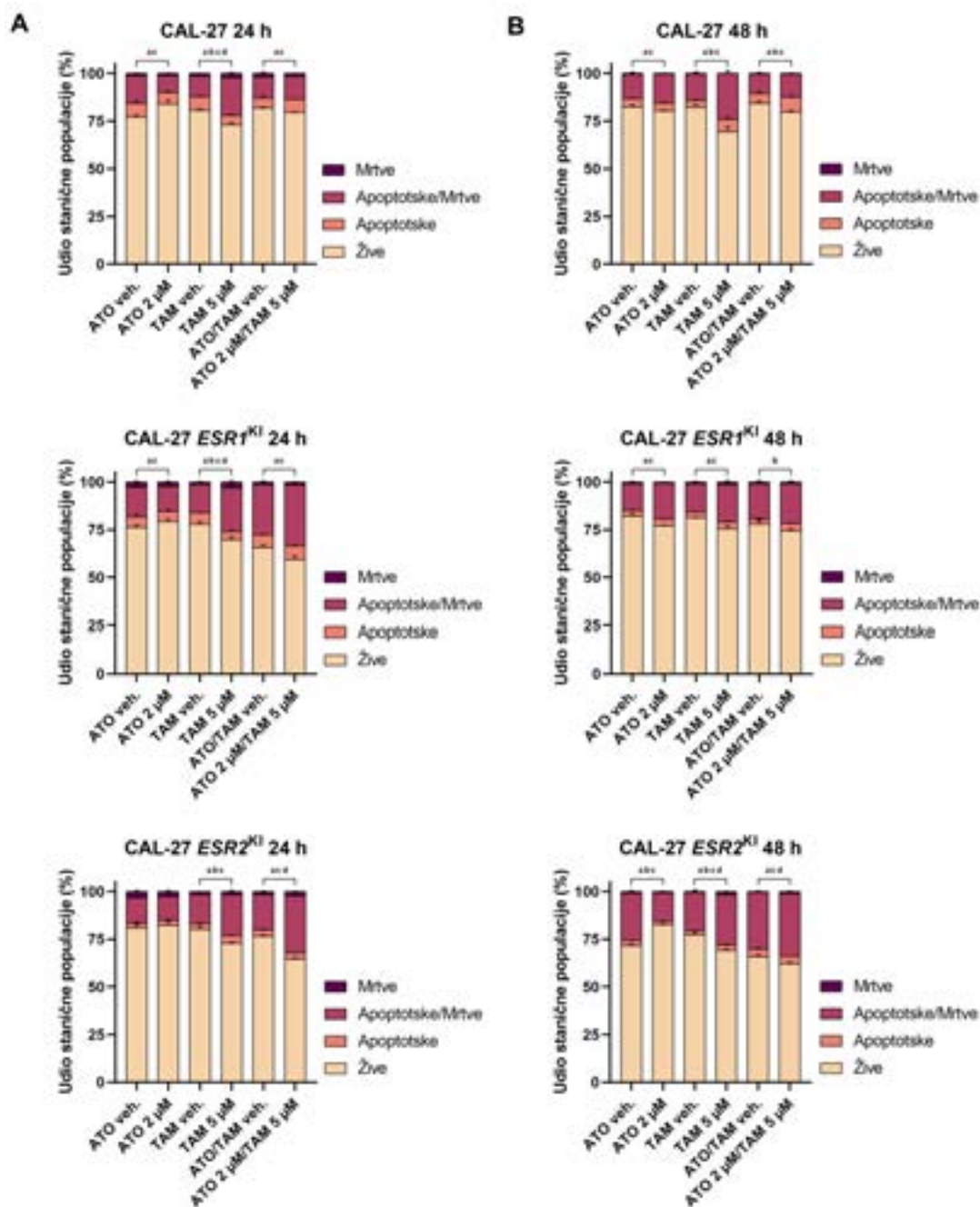
Ulazak stanica u apoptozu nakon tretmana tamoksifenom (5 μ M) i arsenovim trioksidom (2 μ M), primijenjenih pojedinačno i u kombinaciji, analiziran je praćenjem aktivnosti izvršiteljskih kaspaza 3 i 7, koje predstavljaju ključni biljeg apoptotske stanične smrti. Analiza je provedena primjenom protočne citometrije i komercijalnog kompleta Muse Caspase-3/7, koji omogućuje istodobno kvantitativno mjerenje apoptoze posredovane aktivacijom kaspaza 3 i 7 te procjenu permeabilizacije plazmatske membrane. Detekcija apoptotskih stanica temelji se na fluorescenciji boje vezane s peptidnim supstratom DEVD, pri čemu cijepanje supstrata od strane aktiviranih kaspaza omogućuje vezanje boje za DNA i porast fluorescentnog signala. Istodobno, marker 7-AAD koristi se za procjenu permeabilizacije

stanične membrane. Na temelju kombinacije ova dva signala određeni su relativni udjeli živih stanica, stanica u ranoj i kasnoj fazi apoptoze te mrtvih stanica.

Nakon 24 sata tretmana ATO-om u staničnim linijama CAL-27 i CAL-27 *ESR1*^{KI} zabilježen je porast udjela živih stanica ($P = 0,006$ i $0,040$) uz istodobno smanjenje udjela stanica u kasnoj fazi apoptoze ($P = 0,006$ i $0,022$), dok u klonalnoj liniji CAL-27 *ESR2*^{KI} nije bilo statistički značajne promjene u udjelu apoptotskih i mrtvih stanica u odnosu na kontrolu. Tretman TAM-om u sve tri linije (CAL-27, CAL-27 *ESR1*^{KI} i CAL-27 *ESR2*^{KI}) doveo je do smanjenja udjela živih stanica ($P = 0,001$, $0,002$ i $0,001$) i povećanja udjela stanica u kasnoj fazi apoptoze ($P = 0,001$). Istodobno je u linijama CAL-27 i CAL-27 *ESR1*^{KI} zabilježeno smanjenje udjela stanica u ranoj apoptozi ($P = 0,002$ i $0,015$) i povećanje broja mrtvih stanica ($P = 0,009$ i $0,015$), dok je u klonu CAL-27 *ESR2*^{KI} uočen porast udjela stanica u ranoj apoptozi ($P = 0,013$). Kombinirani tretman ATO-om i TAM-om u sve tri linije također je rezultirao smanjenjem udjela živih stanica ($P = 0,002$, $0,009$ i $< 0,001$) i povećanjem broja stanica u kasnoj apoptozi ($P = 0,039$, $0,005$ i $< 0,001$), pri čemu je najizraženiji učinak zabilježen u klonu CAL-27 *ESR2*^{KI}, u kojem je zabilježen i značajan porast udjela mrtvih stanica nakon primjene kombiniranog tretmana ($P = 0,020$) (Slika 37. A).

Za razliku od rezultata dobivenih nakon 24 sata, tretman ATO-om nakon 48 sati doveo je do obrnutog odgovora u staničnim linijama CAL-27 i CAL-27 *ESR1*^{KI}, u kojima je zabilježen smanjen udio živih stanica ($P = 0,041$ i $0,002$) uz istodobno povećanje udjela stanica u kasnoj fazi apoptoze ($P = 0,018$ i $0,002$). Suprotno tome, u klonalnoj liniji CAL-27 *ESR2*^{KI}, u kojoj nakon 24 sata nisu uočene značajne promjene u raspodjeli staničnih populacija, nakon 48 sati zabilježen je porast udjela živih stanica ($P < 0,001$), uz smanjenje udjela onih u ranoj ($P = 0,006$) i kasnoj apoptozi ($P < 0,001$). Učinak TAM-a nakon 48 sati u velikoj je mjeri bio usporediv s onim zabilježenim nakon 24 sata, pri čemu je ponovno u sve tri analizirane linije uočen pad udjela živih stanica ($P = 0,002$, $0,003$ i $0,001$) i porast udjela stanica u kasnoj fazi apoptoze ($P = 0,001$, $0,007$ i $0,003$). Dodatno, za razliku od linije CAL-27 *ESR1*^{KI}, u linijama CAL-27 i CAL-27 *ESR2*^{KI} nakon 48 sati zabilježen je i porast udjela stanica u ranoj fazi apoptoze ($P = 0,007$ i $0,008$), odnosno i udjela mrtvih stanica isključivo kod linije CAL-27 *ESR2*^{KI} ($P < 0,001$). Kombinirani tretman nakon 48 sati također je pokazao vremenski ovisne razlike u usporedbi s 24 sata u pojedinim linijama. U staničnoj liniji CAL-27 zabilježen je pad udjela živih stanica ($P = 0,008$) uz porast udjela stanica u ranoj ($P = 0,010$) i kasnoj fazi apoptoze ($P = 0,030$). U klonalnoj liniji CAL-27 *ESR2*^{KI} ponovno je uočen najizraženiji učinak kombiniranog tretmana, koji se očitovao smanjenjem udjela živih stanica ($P = 0,011$) te porastom udjela mrtvih stanica ($P = 0,007$) i onih u kasnoj apoptozi ($P = 0,013$). Suprotno

tome, u klonu CAL-27 *ESR1*^{KI} nakon 48 sati nije vidljivo izraženo smanjenje broja živih stanica ili povećanje udjela onih u kasnoj apoptozi, već samo blagi porast udjela stanica u ranoj fazi apoptoze ($P = 0,011$) (Slika 37. B).



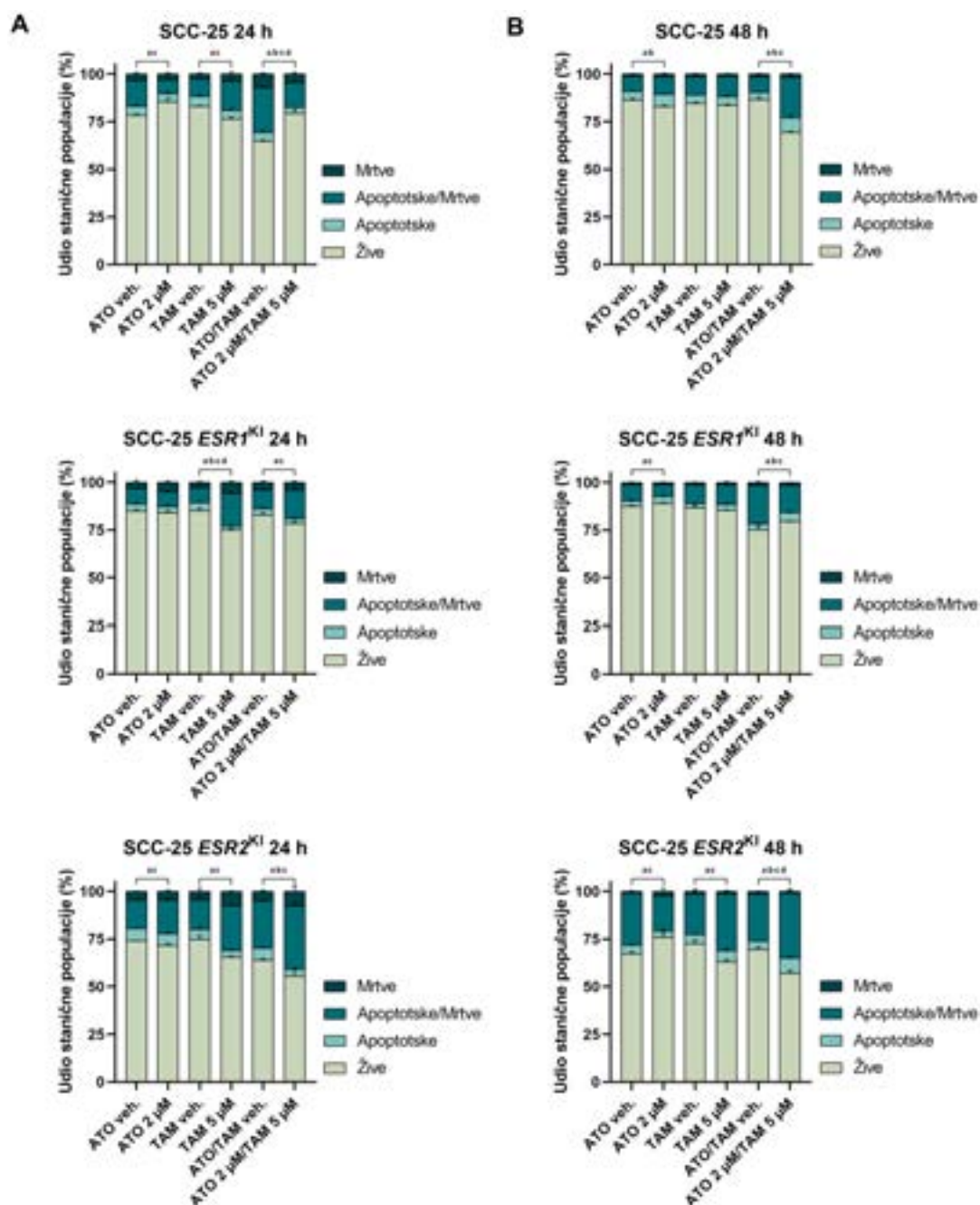
Slika 37. Analiza apoptoze u staničnim linijama CAL-27, CAL-27 *ESR1*^{KI} i CAL-27 *ESR2*^{KI} nakon (A) 24 i (B) 48 sati tretmana arsenovim trioksidom (ATO 2 μ M) i tamoksifenom (TAM 5 μ M) pojedinačno i u kombinaciji (ATO 2 μ M/TAM 5 μ M). Vrijednosti su izražene kao udio stanica (%) + SD. Statistička analiza provedena je jednosmjernom analizom varijance uz Tukey-Kramerov *post hoc* test. Značajne razlike u usporedbi s kontrolom označene su odgovarajućim slovima: žive stanice (a), stanice u ranoj apoptozi (b), stanice u kasnoj apoptozi (c) i mrtve stanice (d) (* $P < 0,05$). veh. – kontrola tretirana otapalom

U modelu SCC-25 tretman ATO-om nakon 24 sata doveo je do istog odgovora u

roditeljskoj liniji kao i u modelu CAL-27, odnosno do povećanja udjela živih stanica ($P = 0,004$) uz smanjenje udjela u kasnoj fazi apoptoze ($P = 0,002$). Suprotno tome, u klonalnoj liniji SCC-25 *ESR2*^{KI} zabilježen je suprotan učinak, koji se očitovao smanjenjem udjela živih stanica ($P = 0,009$) i povećanjem udjela kasne apoptoze ($P = 0,004$), dok u liniji SCC-25 *ESR1*^{KI} nisu uočene značajne promjene u odnosu na kontrolu. Tretman TAM-om nakon 24 sata je u sve tri linije (SCC-25, SCC-25 *ESR1*^{KI} i SCC-25 *ESR2*^{KI}) rezultirao smanjenjem udjela živih stanica ($P = 0,001$, $< 0,001$ i $0,001$) i povećanjem udjela stanica u kasnoj fazi apoptoze ($P < 0,001$, $< 0,001$ i $0,010$). Najizraženiji učinak tretmana TAM-om vidljiv je u liniji SCC-25 *ESR1*^{KI}, u kojoj je dodatno uočen pad udjela stanica u ranoj apoptozi ($P = 0,002$) i porast udjela mrtvih stanica u odnosu na kontrolu ($P = 0,001$). Kombinirani tretman nakon 24 sata pokazao je najveće razlike između roditeljske i klonalnih linija, ali i visok stupanj podudarnosti s odgovorom na isti u modelu CAL-27. Naime, u roditeljskoj liniji SCC-25 vidljiv je porast udjela živih stanica ($P < 0,001$), uz smanjenje udjela preostale tri populacije ($P = 0,022$ za ranu apoptozu, $< 0,001$ za kasnu apoptozu i $0,013$ za mrtve stanice), dok je u klonalnim linijama SCC-25 *ESR1*^{KI} i SCC-25 *ESR2*^{KI} uočen pad udjela živih stanica ($P = 0,008$ i $0,018$) i porast udjela stanica u kasnoj fazi apoptoze ($P = 0,003$ i $0,001$). Dodatno, u liniji SCC-25 *ESR2*^{KI} zabilježeno je i smanjenje udjela stanica u ranoj apoptozi ($P = 0,002$) (Slika 38. A).

Nakon 48 sati tretmana ATO-om u modelu SCC-25 zabilježen je izražen vremenski ovisan pomak u odgovoru na navedeni tretman u odnosu na 24 sata, pri čemu se obrazac odgovora razlikovao između roditeljske i klonalnih linija. Naime, u roditeljskoj liniji SCC-25 zabilježen je pad udjela živih stanica ($P = 0,004$) uz povećanje udjela rane apoptoze ($P = 0,002$), dok je u klonovima SCC-25 *ESR1*^{KI} i SCC-25 *ESR2*^{KI} uočen porast udjela živih stanica ($P = 0,017$ i $0,004$) uz smanjenje udjela stanica u kasnoj apoptozi ($P = 0,003$ i $0,001$). Učinak TAM-a nakon 48 sati bio je usporediv s onim zabilježenim nakon 24 sata samo u klonalnoj liniji SCC-25 *ESR2*^{KI}, u kojoj je i dalje bio prisutan pad udjela živih stanica ($P = 0,001$) uz povećanje broja stanica u kasnoj fazi apoptoze ($P = 0,005$). Suprotno tome, u roditeljskoj liniji SCC-25 i SCC-25 *ESR1*^{KI} učinak TAM-a na apoptozu stanica nakon 48 sati nije bio statistički značajan u odnosu na kontrolu. Konačno, kombinirani tretman nakon 48 sati također je rezultirao drugačijim odgovorom u odnosu na 24 sata. U roditeljskoj liniji SCC-25 zabilježena je pojačana osjetljivost na kombinirani tretman, koja se očitovala smanjenjem udjela živih stanica ($P < 0,001$) uz porast udjela stanica u ranoj ($P = 0,002$) i kasnoj fazi apoptoze ($P < 0,001$). Sličan odgovor zabilježen je i u klonalnoj liniji SCC-25 *ESR2*^{KI} ($P < 0,001$, $< 0,001$ i $0,002$), uz dodatno smanjenje udjela mrtvih stanica ($P = 0,032$). Za razliku od preostale dvije linije, klonalna linija SCC-25 *ESR1*^{KI} pokazala je specifičan obrazac odgovora koji se očitovao

porastom udjela živih stanica ($P = 0,023$) i rane apoptoze ($P = 0,011$) te smanjenjem udjela stanica u kasnoj apoptozi ($P = 0,005$).



Slika 38. Analiza apoptoze u staničnim linijama SCC-25, SCC-25 *ESR1*^{KI} i SCC-25 *ESR2*^{KI} nakon (A) 24 i (B) 48 sati tretmana arsenovim trioksidom (ATO 2 μM) i tamoksifenom (TAM 5 μM) pojedinačno i u kombinaciji (ATO 2 μM/TAM 5 μM). Vrijednosti su izražene kao udio stanica (%) + SD. Statistička analiza provedena je jednosmjernom analizom varijance uz Tukey-Kramerov *post hoc* test. Značajne razlike u usporedbi s kontrolom označene su odgovarajućim slovima: žive stanice (a), stanice u ranoj apoptozi (b), stanice u kasnoj apoptozi (c) i mrtve stanice (d) (* $P < 0,05$). veh. – kontrola tretirana otapalom.

4.4. Analiza interakcije receptora estrogena i proteina SHH

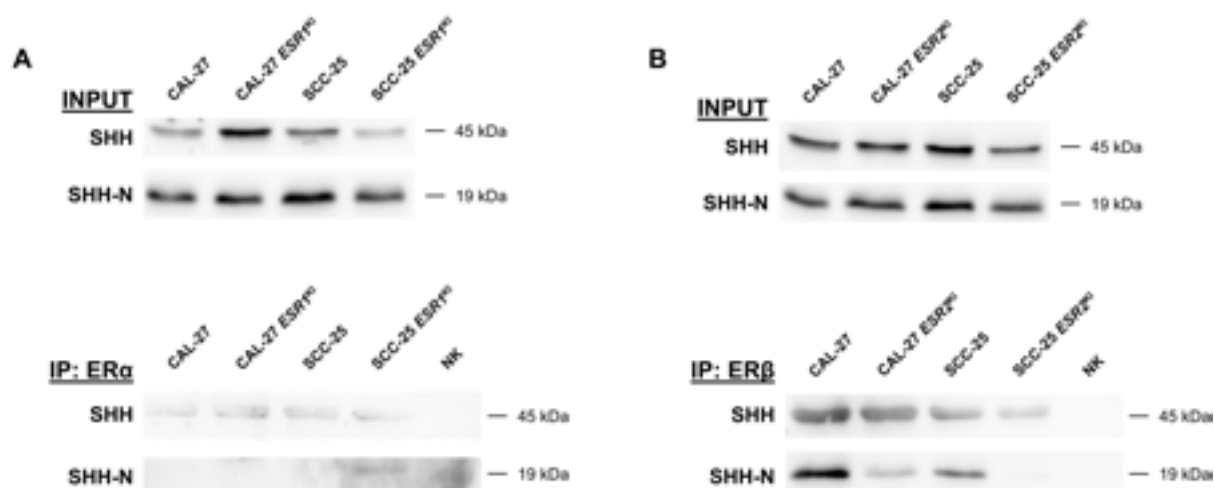
Jedan od ciljeva ovog rada bio je ispitati postoji li fizička interakcija između liganda signalnog puta HH-GLI (SHH) i receptora estrogena (ER α i ER β) u HNSCC-u. S obzirom na to da su prethodni rezultati ovog rada ukazali na funkcionalnu povezanost signalnih puteva estrogena i HH-GLI na razini regulacije ekspresije i biološkog odgovora stanica, u ovom je poglavlju provedena analiza njihove moguće međusobne povezanosti na razini proteinskih kompleksa. Ispitivanje fizičke interakcije SHH s jezgrinim receptorima estrogena omogućuje dublji uvid u molekularne mehanizme međudjelovanja ova dva signalna puta te predstavlja važan korak u razumijevanju njihovog međuodnosa u HNSCC-u. Ujedno, ovakav pristup otvara mogućnost razmatranja kombiniranih terapijskih strategija usmjerenih na navedene komponente i signalne puteve u HNSCC-u.

4.4.1. Koimunoprecipitacija ER α i ER β sa SHH

U svrhu ispitivanja moguće proteinske interakcije između receptora estrogena ER α i ER β te proteina SHH u HNSCC-u, provedena je koimunoprecipitacija iz ukupnih staničnih lizata linija CAL-27 i SCC-25, kao i njihovih klonalnih linija (*ESR1*^{KI} i *ESR2*^{KI}). Imunoprecipitacija je izvedena primjenom specifičnih antitijela usmjerenih protiv ER α , odnosno ER β , dok su uzorci bez dodatka primarnih antitijela korišteni kao negativna kontrola. Nakon elucije imunoprecipitiranih proteinskih kompleksa, prisutnost proteina SHH analizirana je westernskom metodom otiska. Analiza je obuhvatila detekciju pune, prekursorske forme SHH, kao i njegove biološki aktivne N-terminalne forme (SHH-N). S obzirom na to da molekulske mase SHH (45 kDa) i SHH-N (19 kDa) odgovaraju približnim masama teškog i lakog lanca imunoglobulina, u svrhu pouzdane interpretacije rezultata korištena su specifična sekundarna antitijela usmjerena protiv teškog (eng. *heavy chain*) i lakog (eng. *light chain*) lanca imunoglobulina. Na taj je način omogućeno razlikovanje specifičnih signala proteina od interesa od signala koji potječu od imunoglobulinskih lanaca antitijela korištenih u postupku koimunoprecipitacije te je osigurana pouzdanost interpretacije dobivenih rezultata.

U kontrolnim ulaznim uzorcima (eng. *input*) potvrđena je ekspresija obje forme proteina SHH u svim analiziranim staničnim linijama. Time je potvrđena prisutnost ciljnog proteina u proteinskim lizatima korištenima u daljnjoj analizi proteinskih interakcija (Slika 39.). Analizom intenziteta signala uočena je pojačana ekspresija obje forme proteina SHH u staničnim linijama

CAL-27 *ESR1*^{KI} i CAL-27 *ESR2*^{KI} u usporedbi s roditeljskom linijom. Suprotno tome, u oba klonalno stanične linije SCC-25 zabilježena je slabija ekspresija SHH i SHH-N u odnosu na roditeljsku staničnu liniju. Nakon endogene koimunoprecipitacije ER α , u svim analiziranim uzorcima detektirana je puna forma proteina SHH. U obje klonalne linije (CAL-27 *ESR1*^{KI} i SCC-25 *ESR1*^{KI}) uočen je izraženiji signal SHH u odnosu na odgovarajuće roditeljske linije. Aktivni oblik SHH-N detektiran je isključivo u liniji SCC-25 *ESR1*^{KI}. U negativnoj kontroli bez primarnog antitijela (NK) nisu detektirani signali za SHH i SHH-N (Slika 39. A). S druge strane, nakon koimunoprecipitacije ER β , u svim analiziranim uzorcima detektirana je puna forma proteina SHH, pri čemu signal bio izraženiji u roditeljskim staničnim linijama, u usporedbi s klonovima *ESR2*^{KI}. Razlike u intenzitetu signala bile su još izraženije pri detekciji SHH-N, koji je također detektiran u svim uzorcima. Sličan obrazac uočen je i pri detekciji SHH-N, koji je detektiran u svim uzorcima, ali je signal bio slabije izražen u klonalnim linijama *ESR2*^{KI}, a osobito u staničnoj liniji SCC-25 *ESR2*^{KI}, u kojoj signal za SHH-N gotovo u potpunosti izostaje. U NK nisu detektirani specifični signali (Slika 39. B).



Slika 39. Analiza koimunoprecipitacije receptora estrogena (A) ER α i (B) ER β s proteinom SHH u staničnim linijama CAL-27 i SCC-25 te klonovima *ESR1*^{KI} i *ESR2*^{KI}. Prikazana je detekcija pune forme proteina SHH (~ 45 kDa) i njegovog aktivnog N-terminalnog oblika SHH-N (~ 19 kDa) u kontrolnim uzorcima (INPUT) te nakon koimunoprecipitacije ER α (IP: ER α) i ER β (IP: ER β). Uzorci bez dodatka primarnog antitijela korišteni su kao negativna kontrola (NK).

4.5. Transkriptomaska analiza učinaka genetske i farmakološke modulacije signalnog puta estrogena i HH-GLI u stanicama HNSCC-a

Kako bi se prethodno uočeni fenotipski i molekularni učinci modulacije receptora

estrogena i signalnog puta HH-GLI sagledali na razini globalne regulacije genske ekspresije, provedena je transkriptomaska analiza temeljena na sekvenciranju RNA. Ovaj pristup omogućio je integraciju rezultata dobivenih funkcionalnim eksperimentima te pružio uvid u rane transkripcijske programe aktivirane pojačanom ekspresijom *ESR1* i *ESR2*, kao i farmakološkom modulacijom navedenih signalnih puteva. Analiza je bila usmjerena na identifikaciju promjena u ekspresiji gena, bioloških procesa i signalnih mreža koje odražavaju neposredni odgovor stanica HNSCC-a na pojedinačnu i kombiniranu modulaciju ovih signalnih osi, s ciljem razjašnjavanja molekularnih mehanizama njihove međusobne funkcionalne povezanosti u kontekstu tumorske biologije tumora glave i vrata.

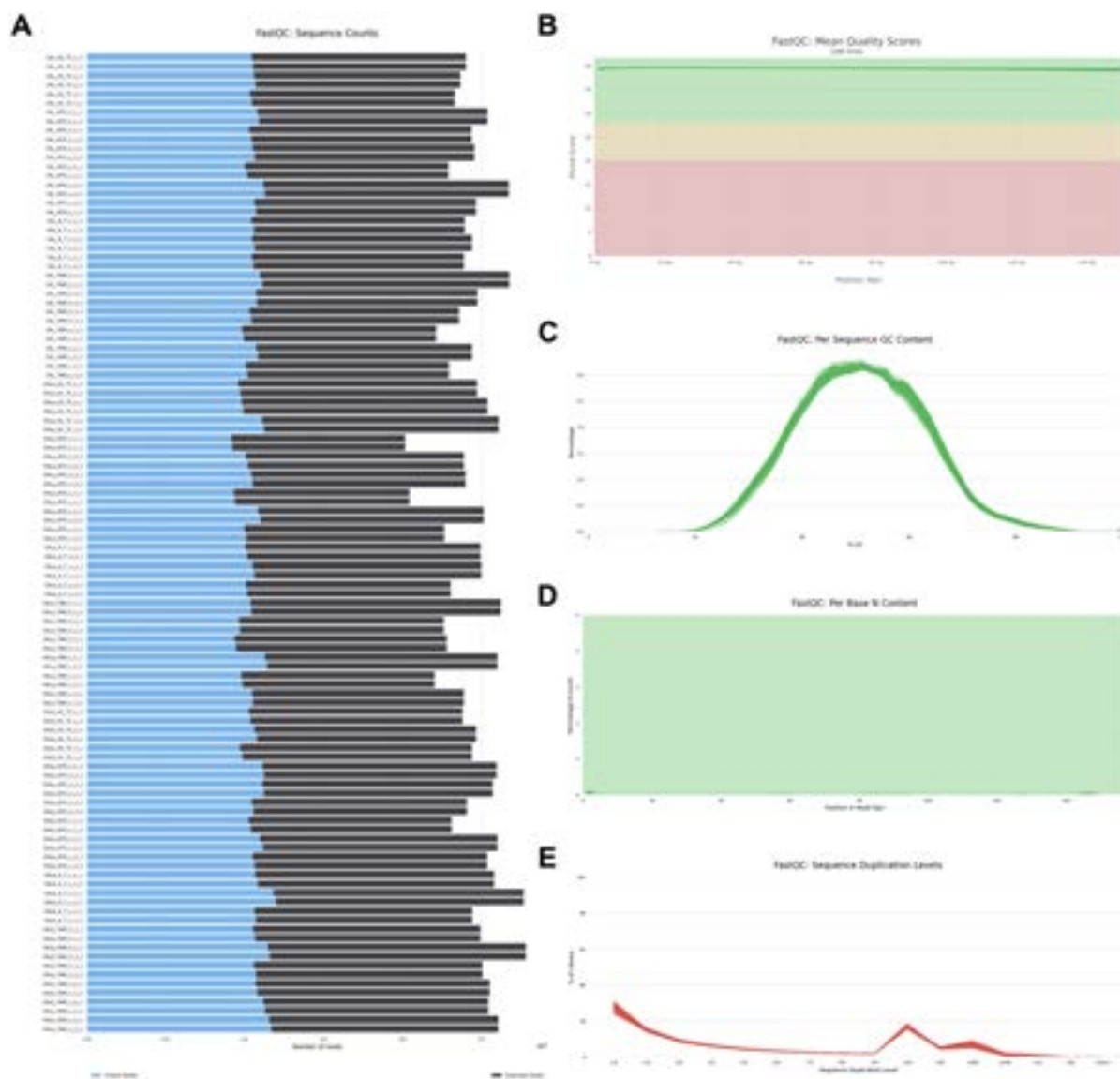
4.5.1. Kvaliteta i osnovna statistika podataka dobivenih sekvenciranjem RNA

Prije provedbe daljnjih analiza, procijenjene su kvaliteta i pouzdanost podataka dobivenih sekvenciranjem RNA, kako bi se osiguralo da uzorci zadovoljavaju kriterije potrebne za vjerodostojnu analizu genske ekspresije. Ukupno su analizirana 54 uzorka dobivena sekvenciranjem RNA, koji obuhvaćaju tri stanične linije (CAL-27, CAL-27 *ESR1*^{KI} i CAL-27 *ESR2*^{KI}). Za svaku liniju analizirano je šest eksperimentalnih skupina: tretman ATO-om (2 μ M), TAM-om (5 μ M) i kombinirani tretman navedenim spojevima te kontrole tretirane otapalima svakog od spojeva, pri čemu su svi uvjeti provedeni u biološkim triplicatima, što u konačnici rezultira s ukupno 108 uzoraka zbog sekvenciranja uparenih krajeva. Tako definirani eksperimentalni dizajn omogućio je usporedbu učinaka pojedinačnih tretmana, kao i njihove kombinacije te same genetske modulacije receptora estrogena na razini globalne genske ekspresije.

Analiza osnovnih parametara kvalitete pomoću alata *FastQC* omogućila je uvid u tehničku uspješnost sekvenciranja, homogenost uzoraka te usporedivost bioloških replikata unutar i između eksperimentalnih skupina. Sirovi podatci pokazali su visoku ukupnu kvalitetu očitavanja, pri čemu je ukupni broj očitavanja po uzorku iznosio približno $2,5 \cdot 10^7$, uz ujednačen udio jedinstvenih (eng. *unique reads*) i dupliciranih očitavanja (eng. *duplicate reads*) te bez značajnih odstupanja između pojedinih uzoraka ili eksperimentalnih skupina (Slika 40. A). Distribucija srednjih vrijednosti kvalitete očitavanja pokazala je da se sve sekvence nalaze u području vrlo visoke kvalitete, pri čemu je Phred vrijednost za sve uzorke iznosila oko 39, što potvrđuje tehničku uspješnost provedenog sekvenciranja i izuzetnu kvalitetu uzoraka i bibiloteka (Slika 40. B). Nadalje, analiza udjela sekvenci GC pokazala je ujednačenu i normalnu

distribuciju za sve uzorke, bez izraženih pomaka u distribuciji (Slika 40. C). Također, udio neidentificiranih baza (N) bio je zanemariv duž očitavanja u svim uzorcima, bez uočenih porasta na pojedinim pozicijama (Slika 40. D). Konačno, analiza udjela dupliciranih sekvenci pokazala je očekivanu raspodjelu, s niskim udjelom visoko dupliciranih sekvenci, a manji porast udjela višestruko ponovljenih sekvenci pri višim razinama dupliciranosti je u skladu s velikom dubinom sekvenciranja (eng. *sequencing depth*) koja se ostvaruje sekvenciranjem na Illumininoj platformi i očekivano je za RNA-seq podatke (Slika 40. E). Dodatno, udio prekomjerno zastupljenih sekvenci bio je manji od 1 % u svim analiziranim uzorcima (rezultati nisu prikazani).

Dobivena sirova očitavanja su poravnata na referentni humani genom pomoću programskog alata *STAR*. Analiza svih uzoraka pokazala je visoku i ujednačenu učinkovitost mapiranja, pri čemu se u svim uzorcima više od 92 % očitavanja jedinstveno mapiralo na genom, s prosječnim udjelom jedinstveno mapiranih očitavanja od približno 94 %. Udio višestruko mapiranih očitavanja bio je nizak (~ 2 %), dok je udio nemapiranih očitavanja bio minimalan. Kao primjer, Slika 41. prikazuje izlazni rezultat *STAR*-a za jedan reprezentativni uzorak, iz kojeg je vidljiv visoki broj jedinstveno mapiranih očitavanja (94,59 %), uz nizak udio višestruko mapiranih (2,16 %) i nemapiranih očitavanja (3,21 %). Provedene analize kvalitete i mapiranja potvrđuju visoku tehničku kvalitetu podataka dobivenih sekvenciranjem RNA, dobru usporedivost uzoraka i pouzdanu osnovu za daljnje analize diferencijalne ekspresije gena.



Slika 40. Procjena kvalitete podataka sekvenciranja RNA pomoću alata *FastQC*. (A) Broj jedinstvenih i dupliciranih očitavanja po uzorku. (B) Distribucija kvalitete očitavanja sa srednjom Phred-vrijednošću oko 39. (C) Analiza udjela sekvenci GC. (D) Udio neidentificiranih baza (označenih slovom N) duž očitavanja. (E) Razina dupliciranih sekvenci.

```

                Started job on | Jan 09 20:18:53
                Started mapping on | Jan 09 20:19:43
                Finished on | Jan 09 20:26:44
Mapping speed, Million of reads per hour | 203.08

                Number of input reads | 23748767
                Average input read length | 298
                UNIQUE READS:
                Uniquely mapped reads number | 22463070
                Uniquely mapped reads % | 94.59%
                Average mapped length | 297.38
                Number of splices: Total | 26719398
                Number of splices: Annotated (sjdb) | 26511552
                Number of splices: GT/AG | 26442842
                Number of splices: GC/AG | 220689
                Number of splices: AT/AC | 27963
                Number of splices: Non-canonical | 27904
                Mismatch rate per base, % | 0.13%
                Deletion rate per base | 0.01%
                Deletion average length | 1.81
                Insertion rate per base | 0.01%
                Insertion average length | 1.48
                MULTI-MAPPING READS:
                Number of reads mapped to multiple loci | 512702
                % of reads mapped to multiple loci | 2.16%
                Number of reads mapped to too many loci | 5296
                % of reads mapped to too many loci | 0.02%
                UNGAPPED READS:
                Number of reads unmapped: too many mismatches | 0
                % of reads unmapped: too many mismatches | 0.00%
                Number of reads unmapped: too short | 761904
                % of reads unmapped: too short | 3.21%
                Number of reads unmapped: other | 5795
                % of reads unmapped: other | 0.02%
                CHIMERIC READS:
                Number of chimeric reads | 0
                % of chimeric reads | 0.00%

```

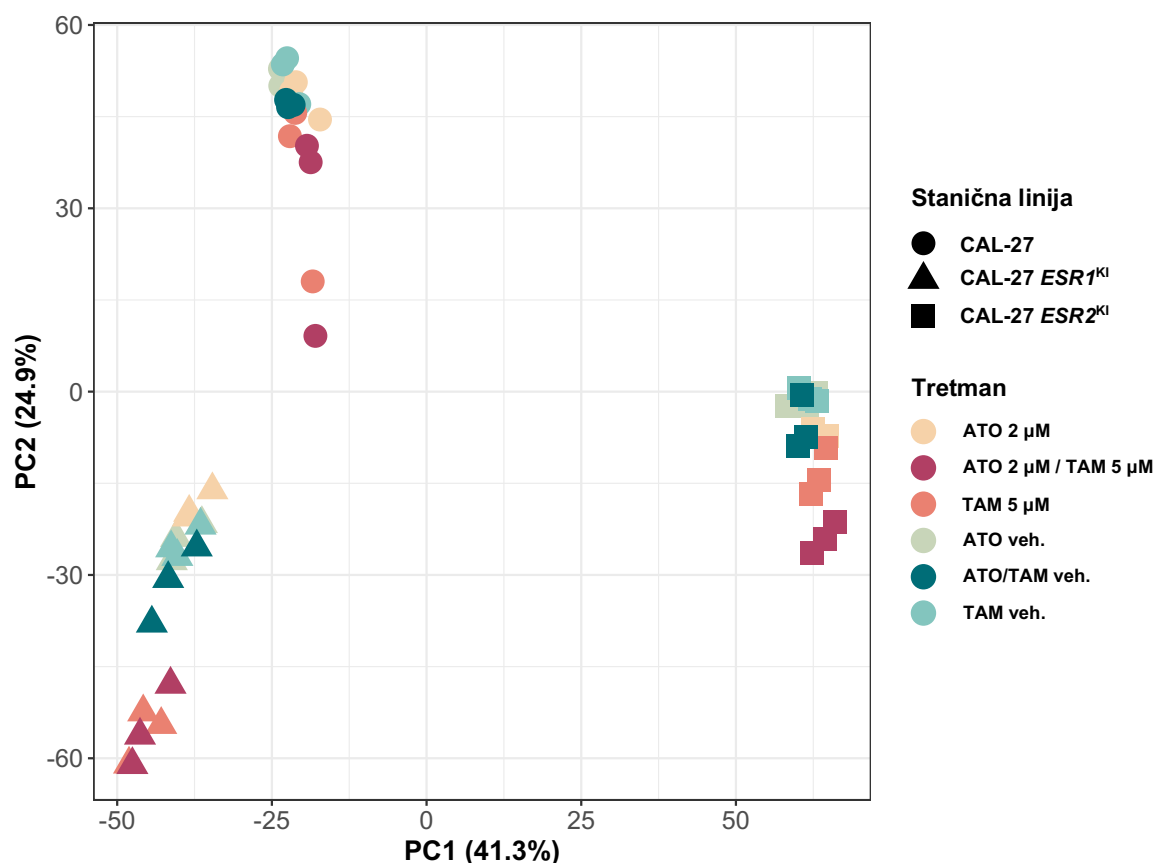
Slika 41. Izlazni rezultat poravnanja očitavanja dobivenih metodom RNA-seq na referentni humani genom pomoću alata STAR za jedan reprezentativni uzorak. Prikazani su osnovni parametri mapiranja, uključujući udio jedinstvenih, višestruko mapiranih i nemapiranih očitavanja, koji potvrđuju visoku i ujednačenu učinkovitost mapiranja.

4.5.2. Analiza diferencijalno eksprimiranih gena

Kako bi se identificirali geni čija je ekspresija značajno promijenjena uslijed modulacije signalnog puta estrogena i HH-GLI, provedena je analiza diferencijalne genske ekspresije između kontrolnih i tretiranih skupina stanica, kao i između različitih staničnih linija tretiranih istim spojem ili njihovom kombinacijom. Ovakav pristup omogućio je razlučivanje transkriptomskih obrazaca povezanih s pojačanom ekspresijom *ESR1* i *ESR2* te s inhibicijom receptora estrogena i signalnog puta HH-GLI, kao i procjenu sličnosti i razlika u globalnom odgovoru između analiziranih uzoraka. Diferencijalno eksprimiranima smatrani su geni s promjenom ekspresije izraženom kao $\log_2FC \geq 1$, vrijednošću $padj \leq 0,1$ i srednjom razinom ekspresije ($baseMean$) > 10 .

Kao prvi korak u analizi diferencijalne genske ekspresije provedena je analiza glavnih komponenti (eng. *principal component analysis*, PCA) na 5000 gena s najvećom varijabilnošću ekspresije, s ciljem procjene globalne varijabilnosti uzoraka, identifikacije glavnih izvora varijacije u podacima te provjere grupiranja uzoraka u odnosu na staničnu liniju i primijenjene

tretmane. Prve dvije komponente analize PCA objašnjavaju značajan udio ukupne varijance u podacima (66,2 %), pri čemu PC1 objašnjava 41,3 %, a PC2 dodatnih 24,9 % varijance (Slika 42.). Uzorci se dominantno razdvajaju duž osi PC1 prema staničnoj liniji, pri čemu su roditeljska linija CAL-27 i klonovi CAL-27 *ESR1*^{Kl} i CAL-27 *ESR2*^{Kl} jasno odvojeni u zasebne klastere, što upućuje na genetsku modulaciju receptora estrogena kao glavni izvor transkriptomске varijabilnosti. Dodatno razdvajanje uzoraka unutar pojedinih klastera duž osi PC2 odražava učinak primijenjenih tretmana, pri čemu se uzorci tretirani TAM-om, ATO-om i njihovom kombinacijom razlikuju od kontrola tretiranih otapalima, što je posebno naglašeno u klonalnim linijama. Biološki replikati unutar istih eksperimentalnih uvjeta su blisko grupirani, što potvrđuje dobru reproducibilnost podataka i pouzdanost provedene analize.



Slika 42. Analiza glavnih komponenti (PCA) temeljena na 5000 gena s najvećom varijabilnošću ekspresije. Prikazano je razdvajanje uzoraka prema prve dvije glavne komponente (PC1 i PC2), pri čemu su uzorci označeni prema staničnoj liniji i primijenjenom tretmanu. Udio varijance objašnjen pojedinom komponentom naveden je uz odgovarajuću os.

Analiza diferencijalno eksprimiranih gena (eng. *differentially expressed genes*, DEGs) provedena je za sve relevantne usporedbe između tretmana, odgovarajućih kontrola tretiranih

otapalom te između različitih staničnih linija. Ukupan broj pojačano i smanjeno eksprimiranih gena za svaku pojedinu usporedbu, kao i njihov zbroj, prikazan je u Tablici 25. Na temelju dobivenih podataka potom je analiziran stupanj preklapanja DEG-ova između staničnih linija i tretmana.

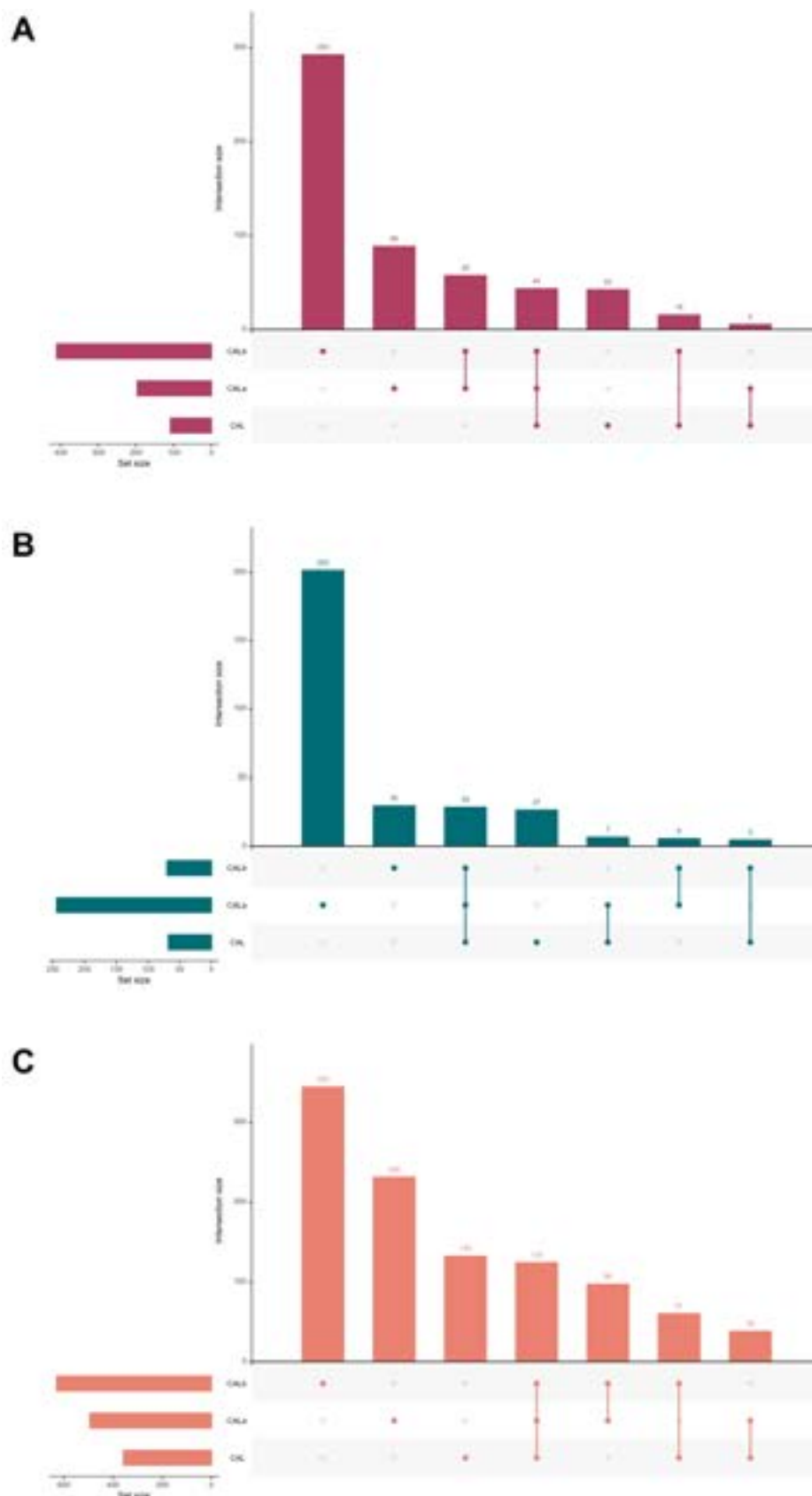
Tablica 25. Broj pojačano i smanjeno eksprimiranih gena te ukupan broj DEG-ova u svim analiziranim skupinama. Analiza obuhvaća staničnu liniju CAL-27 i klonalne linije CAL-27 *ESR1*^{KI} i CAL-27 *ESR2*^{KI} nakon tretmana arsenovim trioksidom (ATO) (2 µM), tamoksifenom (TAM) (5 µM) i njihovom kombinacijom (ATO/TAM) (2 i 5 µM), u usporedbi s kontrolama tretiranim otapalom (veh.).

Usporedba	Pojačano eksprimirani DEG	Smanjeno eksprimirani DEG	Ukupni broj DEG
CAL-27 ATO/TAM vs. CAL-27 ATO/TAM veh.	145	160	305
CAL-27 ATO vs. CAL-27 ATO veh.	31	77	108
CAL-27 TAM vs. CAL-27 TAM veh.	63	5	68
CAL-27 <i>ESR1</i> ^{KI} vs. CAL-27 ATO/TAM	467	609	1076
CAL-27 <i>ESR1</i> ^{KI} ATO/TAM vs. CAL-27 <i>ESR1</i> ^{KI} ATO/TAM veh.	150	286	436
CAL-27 <i>ESR1</i> ^{KI} vs. CAL-27 ATO	329	491	820
CAL-27 <i>ESR1</i> ^{KI} ATO vs. CAL-27 <i>ESR1</i> ^{KI} ATO veh.	48	147	195
CAL-27 <i>ESR1</i> ^{KI} vs. CAL-27 TAM	516	638	1154
CAL-27 <i>ESR1</i> ^{KI} TAM vs. CAL-27 <i>ESR1</i> ^{KI} TAM veh.	122	84	206
CAL-27 <i>ESR2</i> ^{KI} vs. CAL-27 ATO/TAM	679	768	1447
CAL-27 <i>ESR2</i> ^{KI} vs. CAL-27 <i>ESR1</i> ^{KI} ATO/TAM	810	859	1669
CAL-27 <i>ESR2</i> ^{KI} ATO/TAM vs. CAL-27 <i>ESR2</i> ^{KI} ATO/TAM veh.	238	319	557
CAL-27 <i>ESR2</i> ^{KI} vs. CAL-27 ATO	687	815	1502
CAL-27 <i>ESR2</i> ^{KI} vs. CAL-27 <i>ESR1</i> ^{KI} ATO	715	763	1478
CAL-27 <i>ESR2</i> ^{KI} ATO vs. CAL-27 <i>ESR2</i> ^{KI} ATO veh.	129	255	384
CAL-27 <i>ESR2</i> ^{KI} vs. CAL-27 TAM	611	764	1375
CAL-27 <i>ESR2</i> ^{KI} vs. CAL-27 <i>ESR1</i> ^{KI} TAM	822	934	1756
CAL-27 <i>ESR2</i> ^{KI} TAM vs. CAL-27 <i>ESR2</i> ^{KI} TAM veh.	57	13	70

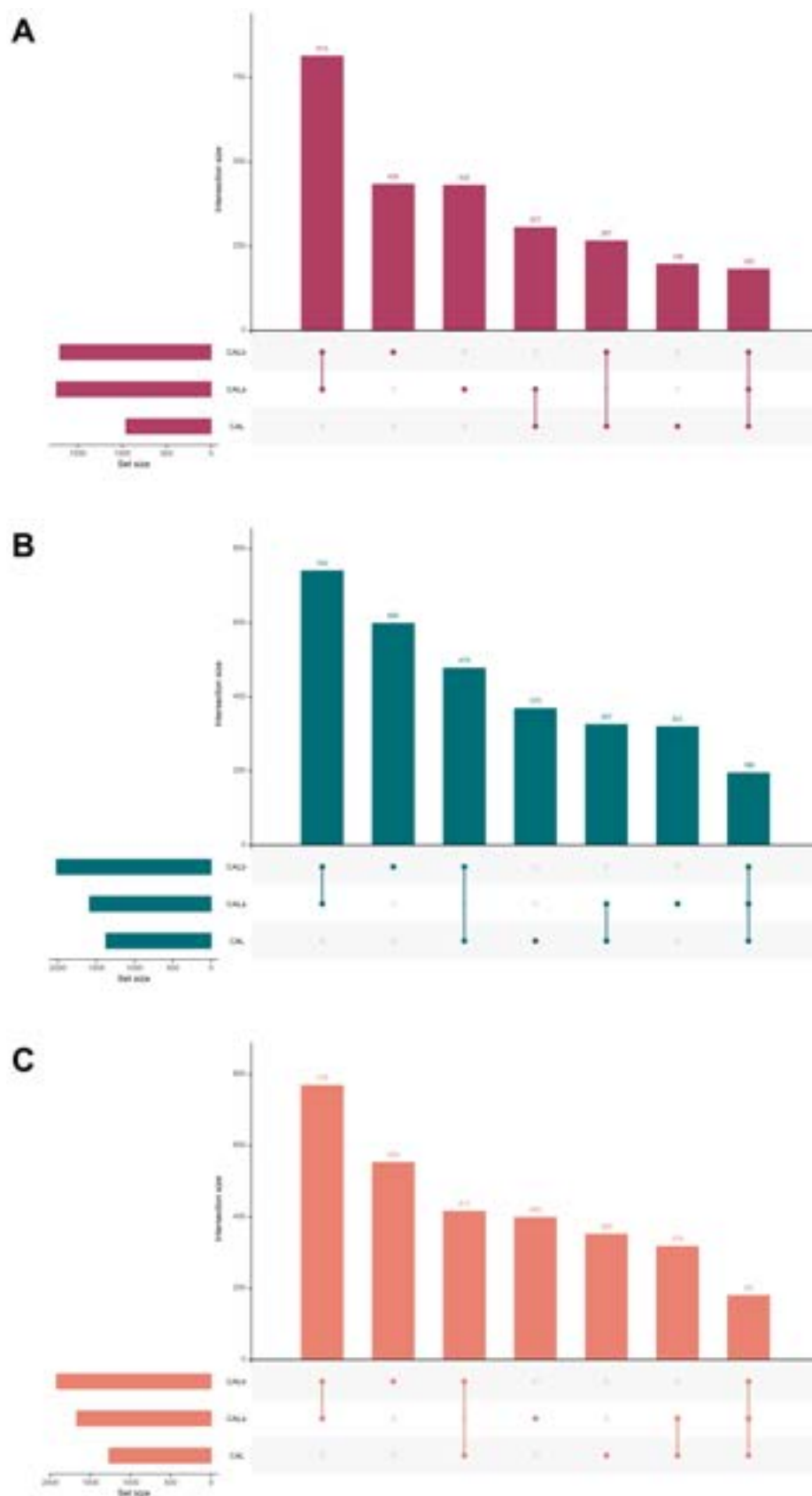
Usporedba s odgovarajućim kontrolama tretiranim otapalom pokazala je da se transkriptomski odgovor na primijenjene tretmane značajno razlikuje između analiziranih staničnih linija te da se stupanj preklapanja promjena u genskoj ekspresiji razlikuje ovisno o vrsti tretmana (Slika 43.). Nakon tretmana ATO-om najveći broj DEG-ova bio je jedinstven za klon CAL-27 *ESR2*^{KI} (293 gena), dok je u klonu CAL-27 *ESR1*^{KI} identificirano 89, a u roditeljskoj liniji CAL-27 43 gena jedinstvenih za staničnu liniju. Zajednički odgovor klonova na tretman ATO-om obuhvaćao je 58 gena, dok je presjek sva tri analizirana modela uključivao

44 gena, uz dodatne manje presjeke između pojedinih parova, što upućuje na odgovor specifičan za pojedinu liniju na ATO (Slika 43. A). U slučaju tretmana TAM-om, najupečatljiviji transkriptomski odgovor zabilježen je u klonu CAL-27 *ESR1*^{KI}, s 202 jedinstvena DEG-a, dok je u klonu *ESR2*^{KI} identificirano 30, a u liniji CAL-27 ukupno 27 takvih gena. Broj preklapajućih gena u sve tri linije bio je relativno nizak (29 gena), kao i broj gena u parnim preklapanjima između linija, što upućuje na izraženu ovisnost transkriptomskog odgovora na TAM o pojačanoj ekspresiji *ESR1* (Slika 43. B). S druge strane, kombinirani tretman ATO-om i TAM-om rezultirao je najizraženijim obrascem promjena u genskoj ekspresiji. U sve tri linije zabilježen je veliki broj jedinstvenih DEG-ova, osobito u klonovima *ESR2*^{KI} (345 gena) i *ESR1*^{KI} (232 gena), ali i u roditeljskoj liniji CAL-27 (133 gena). Istodobno je uočen i povećan broj preklapajućih DEG-ova, pri čemu je presjek sva tri stanična modela obuhvaćao 125 gena (Slika 43. C). Ovi rezultati upućuju na to da kombinirana inhibicija signalnog puta estrogena i HH-GLI istodobno aktivira jedinstvene i preklapajuće transkripcijske programe te rezultira širim transkripcijskim odgovorom u odnosu na pojedinačne tretmane.

Nadalje, kako bi se dodatno razjasnio stupanj sličnosti transkriptomskog odgovora između pojedinih staničnih linija za svaki od primijenjenih tretmana, analizirani su presjeci skupova gena unutar istog tretmana među linijama (Slika 44.). Za sva tri analizirana tretmana uočen je dosljedan rezultat prema kojem je najveći broj preklapajućih gena prisutan u presjeku klonova CAL-27 *ESR1*^{KI} i CAL-27 *ESR2*^{KI}, pri čemu je taj presjek obuhvaćao 815 gena nakon tretmana ATO-om (Slika 44. A), 742 gena nakon tretmana TAM-om (Slika 44. B) i 770 gena nakon kombiniranog tretmana (Slika 44. C). S druge strane, preklapanje između klonalnih linija i roditeljske linije CAL-27 bilo je slabije izraženo. Istodobno, skup zajedničkih gena za sve tri linije bio je najmanji u sva tri tretmana, što upućuje na to da pojačana ekspresija *ESR1* i *ESR2* snažno oblikuje transkriptomski odgovor na primjenu navedenih tretmana i da je navedeni odgovor jedinstven na temelju genetske podloge stanične linije.



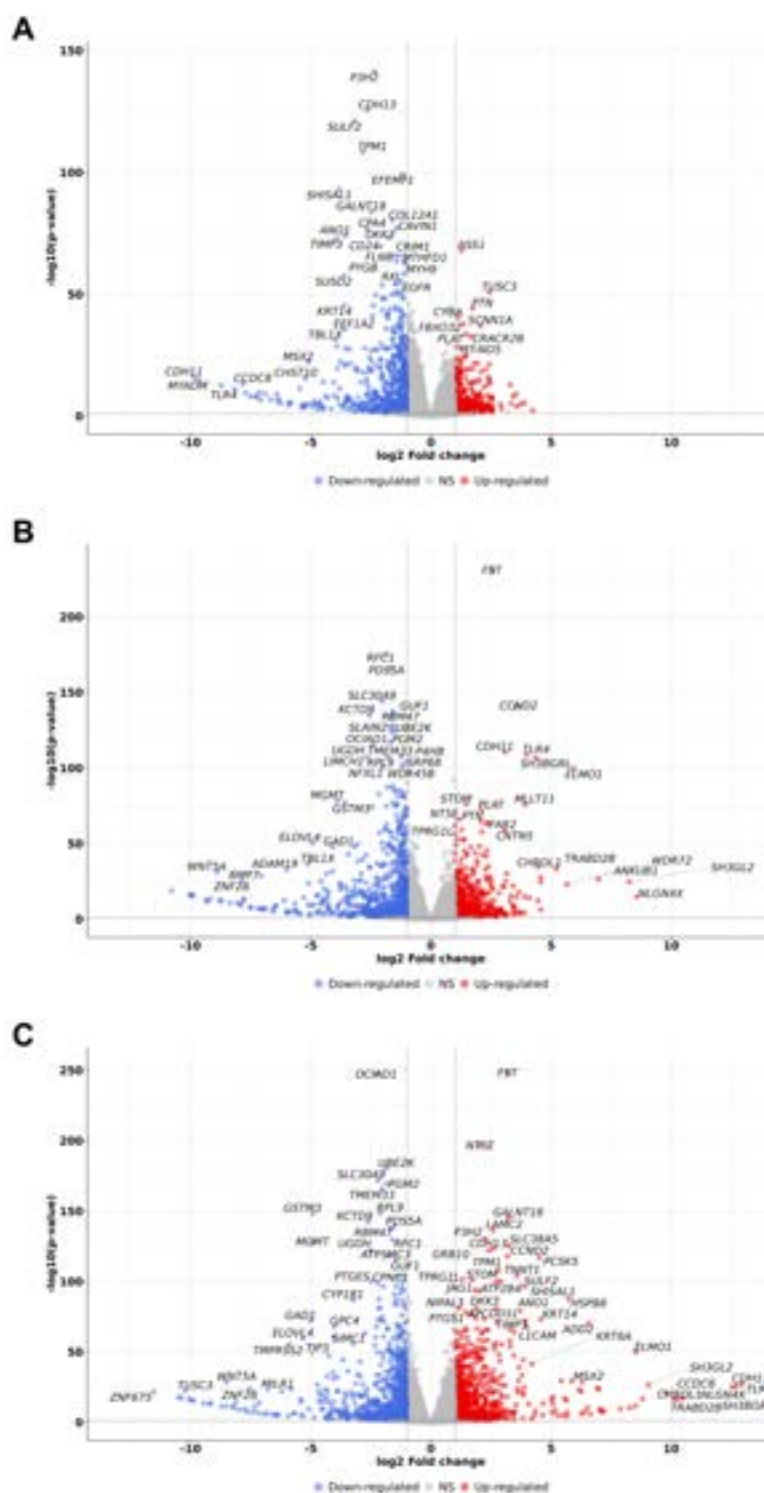
Slika 43. Dijagrami prikaza preklapanja diferencijalno eksprimiranih gena u usporedbi s kontrolama tretiranim otapalom nakon tretmana (A) arsenovim trioksidom, (B) tamoksifenom i (C) kombinacijom navedenih spojeva. Stanične linije označene su: CAL: CAL-27, CALa: CAL-27 *ESR1*^{KI} i CALb: CAL-27 *ESR2*^{KI}.



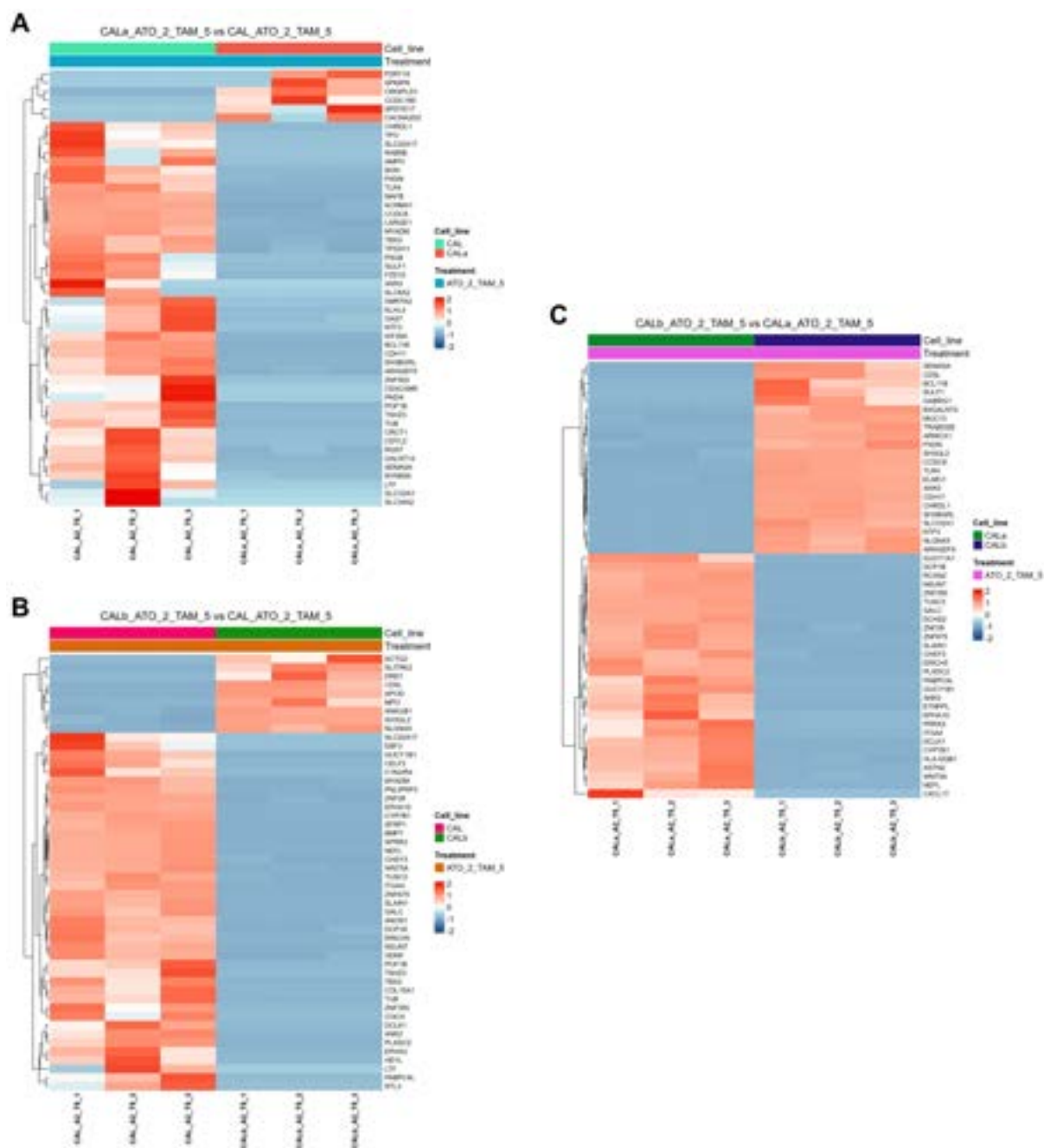
Slika 44. Dijagrami prikaza preklapanja diferencijalno eksprimiranih gena između staničnih linija nakon tretmana (A) arsenovim trioksidom, (B) tamoksifenom i (C) kombinacijom navedenih spojeva. Prikazani su presjeci između roditeljske linije CAL-27 (CAL) te klonova CAL-27 *ESR1*^{KI} (CALa) i CAL-27 *ESR2*^{KI} (CALb) za svaki pojedini tretman.

U skladu s navedenim razlikama u opsegu preklapanja DEG-ova, u nastavku analize su detaljnije istražene razlike u razinama genske ekspresije između pojedinih staničnih linija primjenom dijagrama „vulkana“. Zbog velikog broja mogućih usporedbi, na Slici 45. su prikazani isključivo reprezentativni dijagrami za kombinirani tretman ATO-om i TAM-om. Prikazane su usporedbe između CAL-27 *ESR1*^{KI} i roditeljske linije CAL-27 (Slika 45. A), CAL-27 *ESR2*^{KI} i CAL-27 (Slika 45. B) te CAL-27 *ESR2*^{KI} i CAL-27 *ESR1*^{KI} (Slika 45. C). Dijagrami jasno ilustriraju opseg i smjer promjena u genskoj ekspresiji između analiziranih linija, pri čemu je vidljiv veliki broj značajno pojačano i smanjeno eksprimiranih gena, osobito u usporedbama između klonalnih linija. Radi detaljnijeg prikaza promjena u genskoj ekspresiji za iste parne usporedbe staničnih linija nakon primjene kombiniranog tretmana izrađene su toplinske mape za 50 diferencijalno eksprimiranih gena s najvećim promjenama u ekspresiji (Slika 46.). Ekspresija gena prikazana je na temelju transformiranih vrijednosti TPM i standardizirana po genu, čime je omogućena usporedba obrazaca ekspresije između uzoraka. Prikazani uzorci grupirani su prema staničnoj liniji, uz dosljednu podudarnost bioloških replikata, dok se između uspoređivanih linija uočavaju jasne razlike pojačane i smanjene ekspresije odabranih gena.

Usporedbom dijagrama „vulkana“ i toplinskih mapa za kombinirani tretman ATO-om i TAM-om kod klona CAL-27 *ESR1*^{KI} i roditeljske linije CAL-27 vidljivo je da dominiraju promjene obilježene smanjenjem ekspresije gena u klonu *ESR1*^{KI}, uključujući gene poput *TLR4*, *CDH11* i *CCDC8*. Funkcionalno, ovi geni su povezani sa prijenosom staničnih signala i staničnim odgovorima na stres i podražaje (*TLR4*), staničnom adhezijom i interakcijama s izvanstaničnim matriksom (*CDH11*) i organizacijom citoskeleta te održavanjem staničnog ciklusa (*CCDC8*). Kod usporedbe CAL-27 *ESR2*^{KI} i CAL-27 također je zabilježen veći broj gena koji su smanjeno eksprimirani u odnosu na roditeljsku liniju, no među genima s pojačanom ekspresijom ističu se *ANKUB1*, *SH3GL2* i *NLGN4X*, koji su povezani s organizacijom membranskih struktura, endocitozom i staničnom komunikacijom. S druge strane, geni *WNT5A*, *BMP7* i *ZNF28* pokazuju smanjenu ekspresiju u *ESR2*^{KI} u odnosu na roditeljsku liniju, što upućuje na zahvaćenost razvojnih puteva i transkripcijske regulacije. Najizraženiji dvosmjerni obrazac diferencijalne ekspresije zabilježen je kod međusobne usporedbe klonalnih linija. Pojačano eksprimirani geni u *ESR2*^{KI} (*CDH11*, *TLR4*, *SH3BGRL*, *TRABD2B*, *ELMO1*, *CHRD11*, *CCDC8*, itd.) povezani su sa staničnim prijenosom signala, adhezijom, interakcijama s izvanstaničnim matriksom i regulacijom dinamike citoskeleta, dok geni s višom ekspresijom u *ESR1*^{KI}, poput *WNT5A*, *ZNF28*, *ZNF675* i *TUSC3*, pripadaju razvojnim i regulatornim signalnim programima. Biološka relevantnost uočenih promjena dodatno je razjašnjena analizom obogaćenih signalnih puteva i bioloških procesa u nastavku rada.



Slika 45. Prikaz rezultata diferencijalne genske ekspresije nakon kombiniranog tretmana arsenovim trioksidom i tamoksifenom u obliku dijagrama „vulkana“. Prikazane su usporedbe između (A) CAL-27 *ESR1*^{KI} i CAL-27, (B) CAL-27 *ESR2*^{KI} i CAL-27 i (C) CAL-27 *ESR2*^{KI} i CAL-27 *ESR1*^{KI}. Na osi x prikazana je vrijednost log₂FC, a na osi y -log₁₀ P-vrijednosti. Statistički značajno diferencijalno eksprimirani geni označeni su plavom (log₂FC ≤ -1, padj ≤ 0,1) i crvenom bojom (log₂FC ≥ 1, padj ≤ 0,1).



Slika 46. Toplinske mape relativne ekspresije 50 diferencijalno eksprimiranih gena s najvećim promjenama u ekspresiji nakon kombiniranog tretmana arsenovim trioksidom i tamoksifenom. Prikazane su usporedbe između (A) CAL-27 *ESRI*^{Kl} i CAL-27, (B) CAL-27 *ESR2*^{Kl} i CAL-27 i (C) CAL-27 *ESR2*^{Kl} i CAL-27 *ESRI*^{Kl}. Vrijednosti su prikazane kao standardizirana ekspresija log₂(TPM+1) po genu. Crvena boja označava višu, a plava nižu relativnu razinu ekspresije. Uzorci su grupirani prema staničnoj liniji, dok su geni hijerarhijski klasterirani prema obrascima ekspresije.

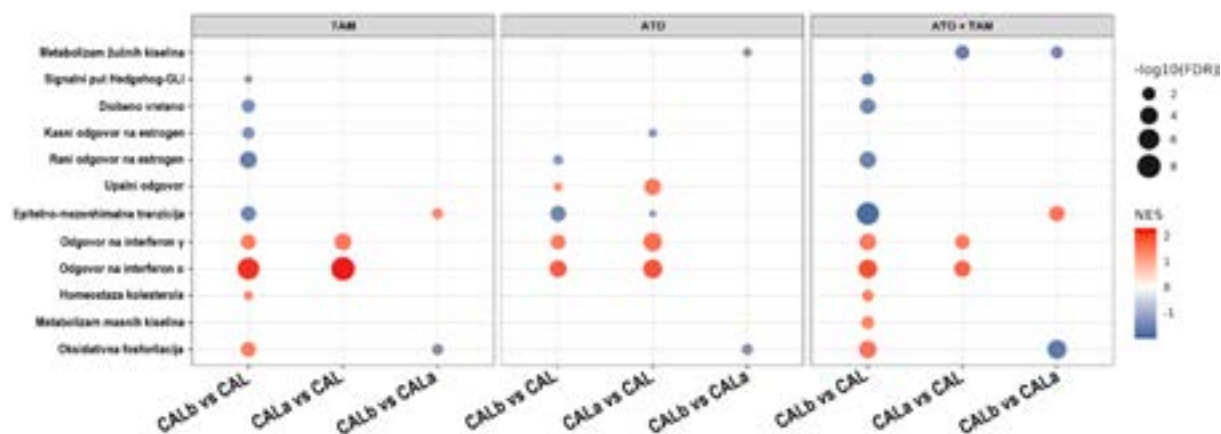
4.5.3. Analiza obogaćenih signalnih puteva i bioloških procesa

Iako analiza diferencijalne ekspresije omogućuje identifikaciju pojedinačnih gena s promijenjenom ekspresijom, ona ne daje izravan uvid u koordinirane promjene unutar bioloških procesa i signalnih puteva. Stoga je za daljnju interpretaciju rezultata primijenjena analiza obogaćenih skupova gena, koja omogućuje funkcionalnu interpretaciju transkriptomskih promjena na razini relevantnih bioloških procesa. U analizi su korišteni unaprijed definirani skupovi gena *Hallmark*, skupovi koji obuhvaćaju biološke procese iz baze *Gene Ontology* i signalne puteve iz baze *Reactome*.

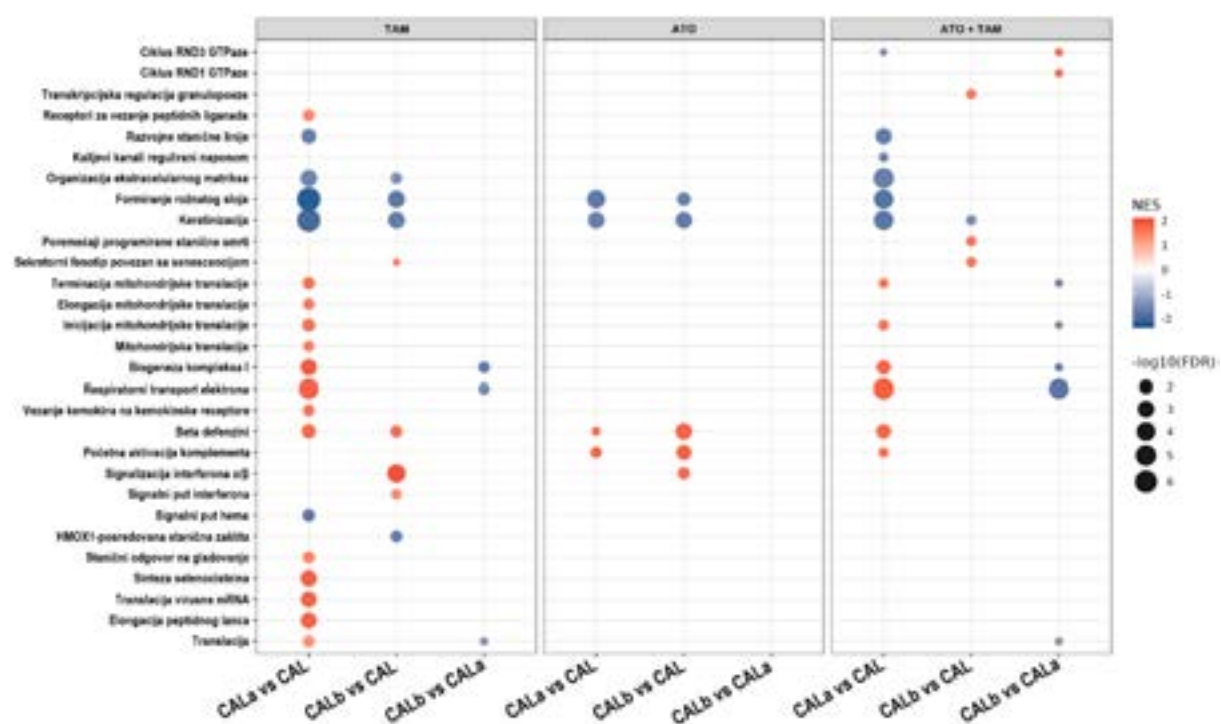
Zbog velikog broja mogućih usporedbi između staničnih linija i tretmana te ukupno tri korištene baze, prikazani su rezultati analize obogaćenih skupova gena *Hallmark* i *Reactome* u sažetom, komparativnom obliku dijagrama *dot-plot*, koji omogućuje izravnu usporedbu smjera i jačine funkcionalnih promjena između roditeljske (CAL-27) i klonalnih linija s pojačanom ekspresijom *ESR1* ili *ESR2*. Statistički značajno obogaćeni putevi, odnosno skupovi gena koji diferenciraju linije i tretmane ($FDR < 0,1$), prikazani su u obliku točaka, pri čemu boja označava smjer i jačinu obogaćenja (NES), a veličina točke vrijednost $-\log_{10}(FDR)$. Detaljni rezultati pojedinačnih usporedbi prikazani su u Prilogu B.

Nakon tretmana TAM-om, u klonu CAL-27 *ESR2*^{KI} u setu gena *Hallmark* primarno dominira obogaćenje procesa povezanih s interferonskim odgovorom (interferon- α i interferon- γ). S druge strane, u klonu CAL-27 *ESR1*^{KI} je uz navedeni upalni odgovor uočeno i pojačanje metaboličkih i mitohondrijskih procesa poput oksidativne fosforilacije, dok su rani i kasni programi estrogenske signalizacije suprimirani u usporedbi s roditeljskom linijom, kao i signalni put HH-GLI (Slika 47.). Analiza *Reactome* dodatno potvrđuje ovaj obrazac kroz vidljivo obogaćenje puteva vezanih uz translaciju proteina u mitohondrijima i respiratorni transport elektrona, uz istodobnu supresiju puteva povezanih s organizacijom izvanstaničnog matriksa i diferencijacijom epitela (Slika 48.). Tretman ATO-om rezultirao je općenito slabijim funkcionalnim odgovorom te je u obje klonalne linije vidljiv usporediv odgovor u odnosu na roditeljsku liniju. Navedeni tretman bio je povezan s obogaćenjem upalnih i interferonskih procesa u obje klonalne linije u setu *Hallmark*, bez izraženih promjena povezanih sa signalnim putevima estrogena i HH-GLI (Slika 47.). Obogaćenje signalnih puteva iz baze *Reactome* kod ovog tretmana pokazuje ograničen broj značajno obogaćenih puteva, pretežito povezanih s imunološkim odgovorom i staničnim stresom te supresijom razvojnih procesa, uz minimalne razlike između klonova (Slika 48.). U usporedbi s pojedinačnim tretmanom TAM-om, kod kojeg su funkcionalne razlike između klonova prisutne, ali ograničenog opsega, kombinirani

tretman ATO-om i TAM-om rezultira najizraženijom razlikom u transkriptomskom odgovoru između staničnih linija. Upravo kod primjene kombiniranog tretmana uočen je jasan suprotan smjer obogaćenja istih skupova gena u klonalnim linijama. Naime, u klonu CAL-27 *ESR1*^{KI} dodatno je naglašeno pojačanje metaboličkih i mitohondrijskih procesa, uključujući oksidativnu fosforilaciju, uz istodobnu supresiju procesa povezanih s epitelno-mezenhimalnom tranzicijom i signalnim putem Hedgehog-GLI. Time se metabolički obrazac, koji je već bio prisutan nakon primjene TAM-a pojedinačno, u uvjetima kombiniranog tretmana dodatno pojačava i jasnije izdvaja klon *ESR1*^{KI} od preostale dvije linije (Slika 47.). S druge strane, u klonu CAL-27 *ESR2*^{KI} kombinirani tretman dovodi do relativnog pojačanja procesa povezanih s epitelno-mezenhimalnom tranzicijom, staničnom adhezijom i remodeliranjem izvanstaničnog matriksa, dok su metabolički i mitohondrijski programi suprimirani. Kao i kod ostalih usporedbi, i u ovom alučaju analiza *Reactome* potvrđuje i dodatno precizira uočene razlike među linijama. Iz dobivenih rezultata vidljivo je da su translacija mitohondrijskih proteina, respiratorni transport elektrona i biogeneza respiratornih kompleksa pozitivno obogaćeni kod klona *ESR1*^{KI} i negativno obogaćeni u klonu *ESR2*^{KI}. Najzanimljivija razlika između klonova nakon primjene kombiniranog tretmana je obogaćenje setova gena uključenih u programiranu staničnu smrt i sekretorni fenotip povezan sa senescencijom (eng. *senescence-associated secretory phenotype*, SASP) kod klona CAL-27 *ESR2*^{KI}, što nije zabilježeno u *ESR1*^{KI} (Slika 48.). Ovi rezultati ukazuju na to da primjena kombiniranog tretmana dovodi aktivacije različitih transkripcijskih programa u klonalnim linijama, pri čemu je odgovor klona *ESR1*^{KI} obilježen dominantno metaboličkim odgovorom, dok klon *ESR2*^{KI} pokazuje primarno stresni odgovor koji naginje prema senescenciji i staničnoj smrti.



Slika 47. Analiza obogaćenih skupova gena temeljena na skupu gena *Hallmark*. Prikazane su usporedbe između roditeljske stanične linije CAL-27 (CAL) i klonova CAL-27 *ESR1*^{KI} (CALa) i CAL-27 *ESR2*^{KI} (CALb) nakon tretmana tamoksifenom (TAM), arsenovim trioksidom (ATO) i njihovom kombinacijom (ATO + TAM). Svaka točka predstavlja značajno obogaćeni skup gena (FDR < 0,1), pri čemu je smjer obogaćenja izražen vrijednošću NES.



Slika 48. Analiza obogaćenih skupova gena temeljena na bazi *Reactome*. Prikazane su usporedbe između roditeljske stanične linije CAL-27 (CAL) i klonova CAL-27 *ESR1*^{KI} (CALa) i CAL-27 *ESR2*^{KI} (CALb) nakon tretmana tamoksifenom (TAM), arsenovim trioksidom (ATO) i njihovom kombinacijom (ATO + TAM). Svaka točka predstavlja značajno obogaćeni skup gena (FDR < 0,1), pri čemu je smjer obogaćenja izražen vrijednošću NES.

5. RASPRAVA

Rak pločastih stanica sluznice glave i vrata ostaje klinički izazovna i biološki izrazito heterogena bolest, s ograničenim napretkom u ukupnom preživljenju [2]. Heterogenost ove bolesti nije samo posljedica različitih anatomskih sijela i etioloških čimbenika, nego i odraz složenih signalnih mreža koje omogućavaju prilagodbu tumora na terapijske pritiske, održavanje invazivnog fenotipa i razvoj rezistencije [242]. Stoga je razumijevanje signalnih puteva koji doprinose heterogenosti i adaptivnosti tumora preduvjet za identifikaciju pouzdanih biljega bolesti i moguće primjene kombiniranih terapija u liječenju HNSCC-a. Jedan od fenomena koji uporno sugerira da biološki čimbenici nadilaze klasične kliničke rizike povezane s razvojem ovog tipa tumora je izražena spolna razlika u incidenciji i smrtnosti HNSCC-a [1]. Iako je dio te razlike objašnjiv većom konzumacijom alkohola i pušenjem kod muškaraca [3], dostupni podatci upućuju na to da razlika nije u potpunosti povezana s načinom života, što otvara pitanje doprinosa endokrinog mikrokoliša i hormonske signalizacije [4].

Stoga estrogene i receptori estrogene predstavljaju jednu od mogućih polazišnih točaka za razmatranje bioloških čimbenika povezanih s tumorigenezom HNSCC-a. Naime, s jedne strane postoje epidemiološki rezultati koji pokazuju zaštitni učinak estrogene kod žena [38,39], dok s druge strane eksperimentalni podatci pokazuju da estrogene mogu imati dvosmjerne učinke ovisno o staničnom i tumorskom kontekstu, uključujući modulaciju proliferacije, apoptoze i ostalih bioloških obilježja premalignih lezija [45–47]. Ključno ograničenje dostupne literature o signalnom putu estrogene u HNSCC-u je metodološka i biološka neujednačenost, pošto različite studije analiziraju različita primarna sijela i različite kohorte pacijenata, često bez standardizirane stratifikacije ključnih kliničko-patoloških karakteristika. Dodatno, interpretaciju postojećih rezultata otežava i složenost molekularnih mehanizama djelovanja estrogene, koja uključuje paralelno djelovanje jezgrinih i membranskih receptora estrogene, uz postojanje izoformi koje dodatno mogu mijenjati funkcionalni odgovor na ligande i antiestrogene [33,77,93]. Upravo ta slojevitost može objasniti zašto se u pojedinim kohortama ekspresija pojedinih podtipova ER-a povezuje s povoljnijim ishodima, dok se u drugima povezuje s agresivnijim tijekom bolesti. Paralelno s tim, Hedgehog-GLI predstavlja razvojni put koji se u tumorigenezi reaktivira i doprinosi proliferaciji, invazivnosti, EMT-u, održavanju tumorskih matičnih stanica i terapijskoj rezistenciji [6]. U HNSCC-u su opisane pojačane razine komponenti puta HH-GLI u odnosu na normalnu sluznicu [169,170], uz naznake povezanosti s uznapredovalim stadijima i nepovoljnim ishodom [168], iako literatura nije u potpunosti

konzistentna. Terapijski pokušaji inhibicije signalnog puta HH-GLI prikazuju problem razvoja rezistencije, osobito na primjeru inhibicije koreceptora SMO [186]. Takav pristup često pokazuje ograničenu učinkovitost uslijed nekanonske aktivacije faktora GLI, neovisne o uzvodnoj signalizaciji putem SMO-a [201]. Stoga je rastući interes usmjeren prema inhibiciji efektorskih proteina GLI, kao i prema kombiniranim pristupima koji ciljaju više puteva istovremeno. Upravo na razini signalnih mreža postaje relevantno pitanje međuodnosa signalnih puteva receptora estrogena i puta HH-GLI. Istraživanja u drugim tumorskim modelima upućuju na postojanje dvosmjernog funkcionalnog ispreplitanja ovih signalnih puteva [7,217,219]. Dodatnu poveznicu između ovih puteva čini zajednička metabolička osnova vezana uz kolesterol, koji je prekursor u sintezi steroidnih hormona [212], ali i jedan od ključnih čimbenika posttranslacijske modifikacije i aktivacije liganda SHH [214]. Ova zajednička ovisnost o lipidnom metabolizmu pruža biološki utemeljen okvir za pretpostavku da metaboličke promjene u tumoru mogu istodobno utjecati na oba signalna puta i regulirati njihovu međusobnu interakciju. Na temelju svega navedenog, istraživanje osi ER – HH-GLI u HNSCC-u predstavlja logičan korak u smjeru objašnjenja dijela biološke heterogenosti ove bolesti. Posebno je relevantno što dosadašnji dokazi o interakciji navedenih puteva potiču iz tumora ovisnim o hormonima, dok je njihov značaj u HNSCC-u ostao slabo istražen, unatoč istodobnoj aktivnosti oba puta u pojedinim podtipovima HNSCC-a. U tom kontekstu, naš prethodni rad, koji pokazuje da aktivna forma SHH (SHH-N) može ostvariti stabilnu interakciju visokog afiniteta s ER α , dodatno proširuje pojam međudjelovanja ovih signalnih puteva i, osim transkripcijskih mehanizama regulacije, upućuje na mogućnost nekanonske interakcije između liganda HH i receptora estrogena [9]. Na toj osnovi strukturirana je interpretacija rezultata ovog doktorskog rada, usmjerena na analizu povezanosti obrazaca ekspresije, funkcionalnih učinaka modulacije navedenih signalnih puteva i eksperimentalne potvrde njihove interakcije.

U skladu s postavljenom hipotezom o međudjelovanju signalnih puteva receptora estrogena i puta HH-GLI, ovo istraživanje je provedeno u dva glavna dijela. U prvom dijelu naglasak je stavljen na analizu obrazaca ekspresije gena od interesa u svježim uzorcima tkiva, s ciljem identifikacije onih komponenti navedenih signalnih puteva koje su diferencijalno izražene u tumorskom tkivu u odnosu na zdravu sluznicu. Takav pristup osigurao je da se daljnje funkcionalne analize *in vitro* temelje na biološki relevantnim promjenama opaženima u kliničkim uzorcima, a ne isključivo na unaprijed odabranim genima iz literature. Analiza ekspresije gena provedena je na ukupno 160 svježih uzoraka tkiva, uključujući 95 primarnih tumora HNSCC-a, 25 metastatskih limfnih čvorova i 40 uzoraka zdrave sluznice. Dobiveni rezultati analizirani su u odnosu na dostupne kliničko-patološke karakteristike pacijenata, što

je omogućilo procjenu njihove povezanosti s obilježjima bolesti i ishodom liječenja. Ispitivana kohorta u velikoj je mjeri odražavala poznate epidemiološke i kliničke značajke HNSCC-a. Pacijenti s primarnim tumorima bili su statistički značajno stariji u usporedbi s ispitanicima kontrolne skupine, uz izraženu predominaciju muškog spola, što je u skladu s podacima o većoj incidenciji ovog tipa raka u starijoj populaciji i među muškarcima [1,2]. Pušenje je bilo znatno učestalije među oboljelima nego u kontrolnoj skupini, potvrđujući njegovu ulogu kao jednog od ključnih čimbenika rizika u razvoju HNSCC-a [10]. S obzirom na anatomsko sjelo, najveći udio primarnih tumora potjecao je iz usne šupljine i grkljana, dok su tumori orofarinksa, hipofarinksa te nosne šupljine i paranazalnih sinusa bili zastupljeni u manjem udjelu. Takva distribucija anatomskih sijela u našoj kohorti usklađena je s podacima iz europskih i globalnih registara. Naime, unatoč ograničenju da su uzorci prikupljeni u samo jednoj hrvatskoj bolnici, zabilježena distribucija primarnih sijela ostaje visoko konzistentna s podacima iz baze GLOBOCAN (eng. *Global Cancer Observatory*) [1]. Nadalje, u ovom istraživanju je status HPV-a određen u svim svježim uzorcima primarnih tumora, čime je omogućena pouzdana stratifikacija pacijenata prema virusnoj etiologiji. Unatoč tome, udio HPV-pozitivnih tumora u ispitivanoj kohorti bio je relativno nizak, što se može povezati s predominacijom tumora usne šupljine i grkljana, anatomskih sijela koja su rjeđe povezana s HPV-om u usporedbi s tumorima orofarinksa [14]. U skladu s literaturom, najzastupljeniji onkogeni tip HPV-a u primarnim tumorima bio je HPV-16, dok su ostali visokorizični tipovi, uključujući HPV-18 i -33, bili zastupljeni u manjem udjelu [15]. Također, važno je naglasiti da je većina tumora u trenutku dijagnoze bila u uznapredovalom stadiju bolesti, s visokim udjelom pT3-pT4 tumora i čestom zahvaćenošću regionalnih limfnih čvorova. Takav kliničko-patološki profil, uključujući prisutnost invazivnih obilježja poput limfovaskularne i perineuralne invazije, omogućio je analizu obrazaca ekspresije u kontekstu biološki agresivnijeg oblika bolesti.

Analiza ekspresije gena pokazala je da su jezgrini receptori estrogena, *ESR1* i *ESR2*, bili detektirani u svim analiziranim skupinama, pri čemu je njihova relativna ekspresija bila značajno pojačana u primarnim tumorima HNSCC-a i metastatskim limfnim čvorovima u usporedbi sa zdravom sluznicom. Dosadašnja istraživanja u području HNSCC-a također ukazuju na pojačanu ekspresiju jezgrinih receptora estrogena u tumorima glave i vrata, pri čemu se ER β u više studija opisuje kao dominantno eksprimirani podtip jezgrinih receptora, primarno kod planocelularnog karcinoma usne šupljine, ali i u tumorima larinksa i hipofarinksa [60–62,66]. S druge strane, dio studija izvještava o predominantnoj ekspresiji ER α u pojedinim anatomskim sjelima glave i vrata, poput larinksa [63]. Ovakva neujednačenost nalaza u literaturi vjerojatno je odraz značajne razlike u sastavu ispitivanih kohorti, uključujući

zastupljenost pojedinih anatomskih sjela, status HPV-a, spolnu i dobnu strukturu kohorte, kao i varijabilnost metodoloških pristupa, odnosno korištenih metoda detekcije. Unatoč navedenoj heterogenosti literaturnih podataka, rezultati ovog rada pokazali su da su oba jezgrina receptora estrogena značajno zastupljena u tumorskom tkivu HNSCC-a. Njihova pojačana ekspresija u primarnim tumorima, uz njezino očuvanje u metastazama, upućuje na to da su promjene u estrogenskoj signalizaciji stabilno obilježje tumorskog fenotipa u ispitivanoj kohorti. Za razliku od jezgrinih receptora, analiza ekspresije membranskih receptora estrogena, *GPER1* i *SCN2A*, nije pokazala značajne razlike između tumorskog tkiva i zdravih kontrola, iako su oba receptora bila detektirana u svim analiziranim skupinama. Navedeni rezultat ne isključuje njihovu biološku relevantnost, budući da dosadašnja istraživanja upućuju na to da se funkcionalni učinci membranskih receptora često ne ostvaruju ovisno o promjenama u razinama genske ekspresije, već kroz modulaciju signalnih kaskada i interakcije s drugim signalnim putevima [96,98]. U tom smislu, membranska signalizacija može imati ulogu u modulaciji tumorigeneze i bez izraženih transkripcijskih promjena. Paralelno s analizom ekspresije receptora estrogena, ispitana je i ekspresija ključnih komponenti signalnog puta HH-GLI u istoj kohorti. Rezultati su pokazali da je razina ekspresije *SHH*, *PTCH1* i *GLII* detektabilna u svim analiziranim skupinama i s jasno diferenciranim obrascima ekspresije između tumorskog i zdravog tkiva. Dok je ekspresija liganda *SHH* bila značajno smanjena u primarnim tumorima u usporedbi sa zdravom sluznicom, ekspresija receptora *PTCH1* bila je značajno pojačana, kako u primarnim tumorima, tako i u metastazama. Istodobno, transkripcijski čimbenik *GLII* pokazao je pojačanu ekspresiju u primarnim tumorima, dok u metastatskim čvorovima nije zabilježena statistički značajna razlika u odnosu na zdravo tkivo. Većina dosadašnjih istraživanja signalnog puta HH-GLI u HNSCC-u provedena je primarno na OSCC-u i opisuje pojačanu ekspresiju većine njegovih ključnih komponenti, uz postupno pojačanje njihove ekspresije napredovanjem bolesti [171]. Više studija pokazalo je da je pojačana ekspresija *SHH* i *GLI1* povezana s uznapredovalim TNM-stadijem, pojavom recidiva i metastaziranjem u regionalne limfne čvorove [172,177,178]. Stoga je pojačana ekspresija *PTCH1* i *GLII* u tumorskom tkivu, opisana u ovom radu, u skladu s literaturom, posebno s obzirom na to da je većina primarnih tumora u našoj kohorti, kao što je već navedeno, bila kategorizirana kao pT3-pT4, odnosno pripadala uznapredovalim stadijima bolesti. Pojačane razine ovih komponenti povezane su s agresivnijim ponašanjem tumora, uključujući pojačanu invazivnost, sklonost EMT-u i metastaziranju te nepovoljniji klinički ishod [172,177–179]. S druge strane, smanjena ekspresija *SHH* u primarnim tumorima u odnosu na zdravu sluznicu odstupa od dijela literature u kojoj je *SHH* opisan kao pojačano eksprimiran u OSCC-u i povezan s progresijom bolesti

[171,172,175]. Ova razlika može se djelomično objasniti analizom ekspresije na razini cijele kohorte, bez stratifikacije prema anatomskom sijelu, kao i činjenicom da je ekspresija *SHH* u ovom radu određivana isključivo na genskoj, a ne i na proteinskoj razini, što predstavlja jedno od potencijalnih ograničenja ove studije. Budući da je signalni put HH-GLI snažno reguliran na posttranskripcijskoj i posttranslacijskoj razini, uključujući obradu liganda SHH, stabilnost proteina i substaničnu lokalizaciju transkripcijskih čimbenika GLI, buduća istraživanja trebala bi uključiti analizu proteinske ekspresije svih ključnih komponenti puta. Unatoč navedenom, dobiveni rezultati podupiru mogućnost da se u uznapredovalim stadijima HNSCC-a aktivacija puta HH-GLI barem djelomično odvija neovisno o ligandu SHH, kroz nekanonske mehanizme koji dovode do aktivacije transkripcijskih faktora GLI [6,135–137].

Povezanost ekspresije analiziranih gena s kliničko-patološkim karakteristikama pacijenata pružila je niz dokaza koji upućuju na moguću ulogu signalnih puteva estrogena i HH-GLI u biološkoj heterogenosti HNSCC-a. U odnosu na dob pacijenata, pojačana ekspresija *GPER1* i *SCN2A*, kao i transkripcijskog čimbenika *GLII*, uočena je u skupini starijih bolesnika, dok je u odnosu na spol zabilježena niža ekspresija *SCN2A* i sva tri gena pokazatelja aktivnosti signalnog puta HH-GLI kod muškaraca u odnosu na žene. Navedene razlike mogu se tumačiti u kontekstu dobno i spolno uvjetovanih razlika u hormonskom i signalnom mikrokolišu tumora. Poznato je da se s porastom dobi mijenja ravnoteža spolnih hormona, osobito kroz smanjenje sistemske, ali relativno povećanje lokalne, ekstragonadalne sinteze estrogena, što može rezultirati pojačanom aktivacijom negenomskih signalnih puteva estrogena u tumorskom tkivu [36]. U tom kontekstu, pojačana ekspresija membranskih receptora estrogena kod starijih bolesnika može se smatrati očekivanom, pošto su ovi receptori uključeni u brze, negenomske signalne odgovore koji ne ovise nužno o visokoj razini cirkulirajućih estrogena. S druge strane, u pojedinim stadijima bolesti dolazi do fluktuacije endogene razine i poremećenog metabolizma estrogena [46]. Stoga se niža ekspresija *SCN2A* i komponenti signalnog puta HH-GLI kod muškaraca u odnosu na žene može povezati s razlikama u hormonskom statusu i estrogenskoj signalizaciji između spolova. Iako muškarci imaju znatno višu incidenciju HNSCC-a, postoje dokazi da estrogeni i njihovi receptori mogu imati modulirajuću aktivnost u tumorima glave i vrata [4,32,38], što je u skladu s konceptom spolno specifičnih regulatornih mehanizama u HNSCC-u, premda se ti odnosi u literaturi još uvijek rijetko sustavno analiziraju. Nadalje, pojačana ekspresija *ESR1* u tumorima s prisutnom limfovaskularnom invazijom upućuje na moguću povezanost ovog receptora s invazivnijim tumorskim fenotipom. Iako takva povezanost do sada nije opisana u HNSCC-u, slični odnosi zabilježeni su u drugim solidnim tumorima, uključujući karcinom dojke [243], jajnika [244] i endometrija [245]. Prisutnost

dodatnog pokazatelja invazivnosti tumora, perineuralne invazije, povezana je s pojačanom ekspresijom *SHH*. Takva povezanost već je opisana u pojedinim tipovima tumora, poput karcinoma gušterače, gdje parakrina signalizacija SHH aktivira stromalne stanice i pospješuje migraciju stanica uz živčane strukture [246]. U kontekstu HNSCC-a, takav odnos do sada nije opisan te stoga predstavlja jedan od prvih pokazatelja moguće uključenosti signalnog puta HH-GLI u ovaj oblik agresivnog ponašanja tumora. Dodatan pokazatelj je i pojačana ekspresija *PTCH1* kod HPV-pozitivnih tumora, što također predstavlja prvo takvo opažanje u ovom tipu tumora i dodatno naglašava potrebu za budućim istraživanjima koja bi razjasnila funkcionalni značaj signalnog puta HH-GLI u odnosu na HPV-status HNSCC-a. Zanimljivo, pojačana ekspresija *SHH* u našoj kohorti pokazala se i kao nezavisni prognostički biljeg lošijeg ukupnog preživljenja bolesnika, što je potvrđeno multivarijatnom Coxovom regresijskom analizom. Ovaj rezultat u skladu je s prethodnim kliničkim istraživanjem Cierpikowskog i sur., u kojem je na razini imunohistokemijskog bojanja također pokazano da je SHH nezavisni prognostički faktor ukupnog preživljenja kod tumora usne šupljine [175]. Očekivano, osim *SHH*, negativan utjecaj na ukupno preživljenje imala su i sva tri pokazatelja pojačane invazivnosti tumora (ECS, LVI i PNI), kao i pojačana ekspresija *ESR1* i *SCN2A* te viši patološki stadij zahvaćenosti limfnih čvorova (pN3) u odnosu na niže stadije (pN0-N2). Osim s preživljenjem, ekspresija *SCN2A* povezana je i sa zahvaćenošću limfnih čvorova, pri čemu je smanjena ekspresija povezana sa stadijem pN2 u usporedbi s pN0, dok je pojačana ekspresija *GPER1* bila povezana s većom veličinom tumora. Iako su rezultati iz literature o povezanosti ekspresije $ER\alpha$ s preživljenjem pacijenata s HNSCC-om kontradiktorni, a podaci za membranske receptore zasad izostaju, istraživanje Dolla i sur. pokazalo je da je ekspresija $ER\alpha$ u muškoj kohorti pacijenata s OSCC-om povezana s kraćim ukupnim preživljenjem i preživljenjem bez recidiva [69]. Zanimljivo je da su u našoj kohorti čak dva receptora estrogena povezana s lošijim preživljenjem, što dodatno naglašava potencijalnu ulogu ovog signalnog puta u nepovoljnijem ishodu bolesti, unatoč kontradiktornim nalazima iz literature. Konačno, dobiveni obrasci korelacija između ekspresija svih analiziranih gena upućuju na to da su međusobni odnosi istraživanih signalnih puteva ovisni o biološkom kontekstu napredovanja bolesti. Naime, u zdravoj sluznici uočene su brojne umjerene do vrlo visoke korelacije, osobito između membranskih receptora estrogena, kao i njihove korelacije sa *SHH*, dok je *PTCH1* pokazao suprotan, negativan odnos s navedena tri gena, što možemo povezati s njegovom ulogom tumor supresora u signalnom putu HH-GLI [6]. U primarnim tumorima dolazi do preoblikovanja ovih odnosa, pri čemu se gubi korelacija između jezgrinih receptora *ESR1* i *ESR2*, kao i negativna korelacija vezana uz *PTCH1*, dok se zadržava umjerena korelacija između membranskih receptora i *SHH*, kao i izraženija korelacija

GLII s membranskim receptorima i preostalim komponentama signalnog puta HH-GLI. U tom je kontekstu vrlo važno naglasiti da se pozitivna korelacija između *PTCHI* i *GLII* postupno pojačava od primarnih tumora prema metastazama, uz istodobno pojačanu ekspresiju oba gena u odnosu na zdravu sluznicu. Budući da je *PTCHI* nizvodni ciljni gen *GLII* [247], ovakav obrazac upućuje na progresivno jačanje aktivacije osi HH-GLI tijekom napredovanja bolesti, za razliku od zdrave sluznice u kojem takva povezanost nije prisutna. Dodatno, ovakav pomak upućuje na sve izraženiju ulogu negenomskih učinaka estrogena u primarnim tumorima, pri čemu istodobna međusobna koreliranost svih jezgrinih i membranskih receptora estrogena ukazuje na očuvanost i funkcionalnu aktivnost navedenog signalnog puta, a korelacija s komponentama puta HH-GLI moguću interakciju ta dva puta u tumorskom tkivu. Zanimljivo, iako je u drugim tipovima tumora, kao što je rak dojke, pokazana vrlo visoka pozitivna korelacija između *GLI1* i *ERα* [248], u našoj kohorti dolazi do gubitka korelacije između *ESR1* i *GLII* u primarnim tumorima i metastazama, s vidljivim pomakom korelacije *GLII* prema membranskim formama receptora. U metastatskom tkivu uočen je daljnji gubitak korelacije koje uključuju jezgrine receptore, dok su međusobni odnosi između membranskih receptora i članova signalnog puta HH-GLI djelomično očuvani. Zadržana je umjerena pozitivna korelacija između *GPER1* i *SCN2A*, kao i njihova koreliranost sa *SHH*, što upućuje na moguće prevladavanje membranske signalizacije u kontekstu metastaza. Istodobno, unutar puta HH-GLI očuvana je korelacija između *PTCHI* i *GLII*, sugerirajući da osnovna nizvodna regulacija i dalje ostaje aktivna. Takav obrazac podržava zaključak da se u uznapredovalim stadijima bolesti komunikacija između ovih signalnih puteva preusmjerava prema membranskim i nekanonskim mehanizmima, uz očuvanje ključnih interakcija unutar i između navedenih puteva. Sveukupno, obrasci korelacije dobiveni u ovoj kohorti nisu ukazali na izolirane promjene pojedinih gena, već na progresivnu reorganizaciju regulatorne mreže tijekom napredovanja HNSCC-a. Također, gubitak korelacije između *ESR1* i *ESR2* u primarnim tumorima predstavlja ključnu točku razdvajanja njihovih funkcionalnih uloga u malignom kontekstu, za razliku od zdrave sluznice u kojoj su oba receptora djelovala koordinirano. Istodobno, progresivno jačanje korelacije između *PTCHI* i *GLII*, uz njihovu pojačanu ekspresiju u tumorskom i osobito metastatskom tkivu, upućuje na stabilizaciju i učvršćivanje aktivnosti osi HH-GLI tijekom progresije ove bolesti. Paralelno s time, pomak korelacijskog obrasca *GLII* prema membranskim receptorima estrogena, uz istodobni gubitak korelacije s jezgrinim receptorima, sugerira da se međusobna komunikacija signalnih puteva ER i HH-GLI u tumorskom tkivu ne odvija kroz mrežno integriranu regulaciju. Takva reorganizacija, koja uključuje divergenciju *ERα* i *ERβ*, uz istodobno jačanje osi HH-GLI, predstavlja jedan od

moćućih temeljnih molekularnih obrazaca biološke heterogenosti HNSCC-a. Zaključno, ovo je prvo istraživanje koje u istoj kohorti bolesnika s HNSCC-om integrirano analizira jezgrine i membranske receptore estrogena i komponente signalnog puta HH-GLI kroz ekspresijske, kliničko-patološke, prognostičke i korelacijske obrasce, čime se otkriva složenost njihove međusobne regulatorne mreže. Za razliku od membranskih receptora, čiji su obrasci korelacija relativno stabilni kroz različite stadije bolesti, jezgrini receptori pokazuju izraženu varijabilnost, diferencijalnu ekspresiju i povezanost s invazivnim obilježjima i ukupnim preživljenjem. Upravo ta biološka i klinička diferencijacija jezgrinih receptora, u kombinaciji s njihovim prognostičkim značajem, predstavlja ključni razlog za daljnje istraživanje njihove funkcionalne uloge u HNSCC-u, uz istodobno razmatranje njihove interakcije s putem HH-GLI kao dijela šire, integrirane signalne mreže u HNSCC-u.

Stoga je u drugom dijelu istraživanja fokus bio usmjeren na pristup *in vitro*, radi detaljnije funkcionalne analize i tumačenja rezultata dobivenih analizom tumorskog tkiva HNSCC-a. Na temelju utvrđene diferencijalne ekspresije *ESR1* i *ESR2* u tumorskim uzorcima, kao i njihove povezanosti s kliničko-patološkim karakteristikama bolesti, uspostavljeni su stabilni stanićni modeli s ciljano pojaćanom ekspresijom navedenih receptora. Time je omogućeno ispitivanje izravnih učinaka *ESR1* i *ESR2* u kontroliranim eksperimentalnim uvjetima i povezivanje transkripcijskih promjena uoćenih u tkivima s molekularnim mehanizmima na razini tumorskih stanica. Posebnu metodološku vrijednost ovog rada predstavljaju upravo uspostavljene nove stanićne linije s ciljanom genomskom ugradnjom *ESR1* ili *ESR2* u lokus *AAVS1* pomoću sustava CRISPR/Cas9. Navedena tehnologija danas predstavlja zlatni standard za precizno uređivanje genoma zbog svoje visoke specifićnosti, učinkovitosti i mogućnosti trajne genomske modifikacije [249]. Za razliku od nasumićne integracije ili episomalne ekspresije, ciljana ugradnja gena omogućava kontroliranu i predvidivu ekspresiju transgena. Lokus *AAVS1* na kromosomu 19 široko je prihvaćen kao tzv. regija „sigurne luke“ (eng. *safe harbor*) za ugradnju transgena u ljudski genom, jer omogućava stabilnu ekspresiju kloniranog transgena, bez narušavanja osnovnih stanićnih funkcija ili eventualnih štetnih učinaka, poput kancerogeneze [250]. Odabir lokusa *AAVS1* u ovom istraživanju omogućio je dugotrajnu, konstitutivnu i relativno uniformnu ekspresiju gena od interesa u različitim stanićnim linijama. S druge strane, kriterij za odabir stanićnih linija koje su korištene kao modeli u ovom dijelu istraživanja uključivao je zastupljenost primarnog sijela tumora u kohorti bolesnika korištenih u prvom dijelu istraživanja. Inicijalni plan bio je uključiti stanićne linije usne šupljine i grkljana, kao dva najzastupljenija primarna sijela HNSCC-a. Međutim, zbog logistićkih ogranićenja u trenutku uspostave klonova i nemogućnosti uvoza

stanične linije larinksa u Republiku Hrvatsku, odlučeno je koristiti dvije stanične linije raka jezika, odnosno usne šupljine (CAL-27 i SCC-25), koje su bile dostupne u laboratoriju. Na taj način je omogućeno ispitivanje reproduktivnosti učinaka *ESR1* i *ESR2* u dvama neovisnim modelima istog anatomskog sijela. Iako ovakav dizajn ne omogućuje izravnu usporedbu između različitih sijela, dobiveni podatci pružaju čvrstu osnovu za buduća istraživanja koja bi uključivala širi spektar sijela. Važno je istaknuti i inherentna ograničenja rada s odabranim linijama. Naime, većina linija HNSCC-a, uključujući CAL-27 i SCC-25, pokazuje aneuploidiju i kromosomske aberacije, što je tipično za tumorske stanice [251]. Posljedično, iako je ugradnja *ESR1* i *ESR2* bila ciljana u lokus *AAVSI*, nije bilo moguće precizno kontrolirati broj kopija ugrađenog transgena po stanici. Genomska aneuploidija može rezultirati varijabilnim brojem integracijskih događaja ili neravnomjernom zastupljenosti alela, što potencijalno modulira razinu i stabilnost ekspresije transgena. Ipak, činjenica da su odabrani klonovi pokazivali reproducibilnost ekspresije tijekom višemjesečnog uzgoja u kulturi ukazuje na to da takva varijabilnost nije kompromitirala funkcionalne analize. Dodatno potencijalno metodološko ograničenje odnosi se na činjenicu da je u lokus *AAVSI* ugrađena isključivo kodirajuća sekvenca gena, a ne kompletan genski lokus s intronskim i regulatornim elementima. Ovakav dizajn rezultira konstitutivnom i stabilnom ekspresijom pod kontrolom promotora vektora, ali istodobno isključuje regulaciju putem endogenih pojačivača (eng. *enhancer*), represora i alternativnog prekrajanja. To potencijalno može dovesti do pojednostavljenog modela regulacije u odnosu na stvarno tumorsko tkivo, međutim, upravo navedena konstitutivnost predstavlja i prednost modela, jer omogućava jasniju interpretaciju uzročno-posljedičnih odnosa između pojačane ekspresije receptora estrogena i nizvodnih signalnih promjena, bez interferencije varijabilne endogene regulacije. U usporedbi s pristupom prolazne transfekcije, koji je inicijalno razmatran, stabilna genomska ugradnja pruža znatno veću eksperimentalnu konzistentnost. Prolazna transfekcija često rezultira heterogenom populacijom stanica s različitim razinama ekspresije transgena i vremenski ograničenim trajanjem ekspresije, što može značajno otežati interpretaciju funkcionalnih testova. Suprotno tome, u ovom je istraživanju primjenom metode sekvenciranja po Sangeru potvrđena točnost i integritet sekvence *ESR1* i *ESR2* unutar konstruiranih plazmidnih vektora prije transfekcije, dok je selekcija klonova temeljena na selekciji antibiotikom omogućila odabir klonova s uspješno ugrađenim konstruktima. Naknadna izolacija pojedinačnih klonova i njihova karakterizacija na razini genske i proteinske ekspresije omogućile su identifikaciju stabilnih klonalnih linija s reproducibilno pojačanom ekspresijom ciljnih gena. Na taj način je osigurano da su u daljnje funkcionalne analize uključeni isključivo klonovi s potvrđenom i dugoročno stabilnom

ekspresijom gena od interesa, čime je smanjena mogućnost tehničkih artefakata povezanih s heterogenošću stanične populacije ili varijabilne ekspresije transgena.

Analiza genske ekspresije u uspostavljenim klonalnim linijama potvrdila je da su stabilni modeli „*knock-in*“ uspješno uspostavljeni i da omogućavaju pouzdano proučavanje učinaka pojačane ekspresije *ESR1* i *ESR2* u ovom tumorskom modelu. Važno je naglasiti da su za daljnje analize odabrani reprezentativni klonovi s najvišom i dugoročno stabilnom razinom ekspresije, potvrđenom kroz više neovisnih izolacija RNA. Uočena razlika u razinama relativnih ekspresija gena između staničnih modela vjerojatno je posljedica gore opisanih kromosomopatija koje potječu iz roditeljskih staničnih linija CAL-27 i SCC-25. Nadalje, rezultati genske ekspresije jasno su pokazali da pojačana ekspresija *ESR1* i *ESR2* dovodi do suprotnih i stanično-specifičnih promjena u ekspresiji *SHH*, *PTCH1* i *GLII*, što sugerira da jezgri receptori estrogena ne djeluju uniformno, već da njihova funkcija ovisi o širem molekularnom kontekstu tumorske stanice. Naime, u staničnoj liniji CAL-27, pojačana ekspresija *ESR1* bila je povezana sa smanjenjem ekspresije svih analiziranih komponenti signalnog puta HH-GLI, što upućuje na potencijalni inhibitorski učinak ER α na ovu signalnu os. S obzirom na to da interakcija ovih puteva do sada nije istražena u HNSCC-u, dobiveni rezultati mogu se usporediti samo s podacima koji su dostupni na temelju istraživanjima u drugim solidnim tumorima, prvenstveno tumorima ovisnim o hormonima, gdje je pokazano da ER α može regulirati signalni put HH-GLI putem indukcije ekspresije *SHH* u ER α + staničnim linijama dojke [7] i želudca [217]. Suprotno tome, pojačana ekspresija *ESR2* u istom modelu dovela je do značajnog pojačanja ekspresije *SHH*, *PTCH1* i *GLII*, što sugerira na aktivacijski učinak ER β . Ovakav antagonistički odnos između ER α i ER β opisan je u literaturi [252], pri čemu se u nekim tumorima, kao što su papilarni karcinom štitnjače [65] i orofarinksa [66], ER β smatra protutumorskim ili diferencijacijskim čimbenikom, dok ER α češće sudjeluje u proliferacijskim procesima [64]. S druge strane, u staničnoj liniji SCC-25 uočen je drugačiji obrazac regulacije, pri čemu je pojačana ekspresija *ESR1* bila povezana s pojačanjem ekspresije *GLII* i istim trendom vidljivim kod *SHH*, dok je *ESR2* imala pretežito inhibitorski učinak na *PTCH1* i *GLII*, što je u skladu s gore opisanim literaturnim navodima. Takva stanično-specifična regulacija vjerojatno odražava razlike u bazalnoj aktivnosti signalnog puta HH-GLI, ekspresiji koregulatora receptora estrogena i potencijalnim interakcijama s drugim čimbenicima, poput EGFR-a, koji je često dereguliran u HNSCC-u [25]. Rezultati dobiveni na razini proteina dodatno su naglasili složenost regulacije receptora estrogena u HNSCC-u. Izostanak detekcije ER α pune duljine u svim analiziranim uzorcima, uključujući klonove *ESR1*^{K1}, sugerira da su u ovim staničnim modelima dominantno izražene kraće izoforme ER α .

Takvi oblici ER α , posebno ER α 36, koji je najjače eksprimiran u klonu SCC-25 *ESR1*^{KI}, u literaturi su povezani s nekanonskim prijenosom signala, uključujući citoplazmatsku signalizaciju i interakcije s drugim proteinima, neovisno o klasičnoj estrogen-ovisnoj transkripciji [93–97]. Za razliku od ER α , ekspresija ER β pokazala je konzistentniji obrazac ekspresije, gdje je detekcijom izoforme pune duljine pokazano da ER β u ovom modelu djeluje prvenstveno kao jezgrini receptor s transkripcijskom aktivnošću. Imunofluorescentna analiza dodatno je potvrdila da se pojačana ekspresija receptora estrogena odražava i na njihovu staničnu lokalizaciju, pri čemu je izrazito snažna akumulacija signala ER α u jezgri linije SCC-25 *ESR1*^{KI} bila u skladu s većim zabilježenim porastom ekspresije *ESR1* upravo u toj liniji u odnosu na CAL-27 *ESR1*^{KI}. Što se tiče analize proteinskih komponenti signalnog puta HH-GLI, ista je pokazala djelomičnu nepodudarnost s transkripcijskim rezultatima, što upućuje na postojanje dodatnih posttranskripcijskih i posttranslacijskih mehanizama regulacije. Posebno je značajan rezultat dosljednog pojačanja ekspresije SHH i njegovog procesiranog oblika SHH-N u svim klonalnim linijama, posebno kod klonova *ESR1*^{KI}, neovisno o staničnom modelu. Ovaj rezultat sugerira da ER α može utjecati na stabilnost, procesiranje ili sekreciju proteina SHH, što je jedan od ključnih dokaza potencijalne nekanonske interakcije navedenih signalnih puteva u HNSCC-u, koji je dodatno istražen na razini koimunoprecipitacije u sljedećem dijelu rada. U odnosu na rezultate dobivene na transkripcijskoj razini, rezultati dobiveni na proteinskoj razini su u skladu s gore opisanim literaturnim navodima o međusobnoj pozitivnoj korelaciji između ER α i SHH [7,217]. Također, na proteinskoj razini uočeno je izraženo pojačanje ekspresije GLI1 u liniji CAL-27 *ESR1*^{KI} u odnosu na roditeljsku liniju i klon *ESR2*^{KI}, kao i u oba klona modela SCC-25, s izraženijim pojačanjem u liniji SCC-25 *ESR2*^{KI}. Navedene promjene na jednak način je pratilo i pojačanje ekspresije PTCH1, što dodatno potvrđuje da ova dva stanična modela pokazuju diferencijalni odgovor na pojačanu ekspresiju pojedinih receptora estrogena, ali ono što je još važnije, da je aktivnost signalnog puta HH-GLI u HNSCC-u ovisna o jezgrinim receptorima estrogena. Navedena interakcija SHH i GLI1 također je prethodno opisana u raku dojke, gdje je pokazano da inhibicija puta HH-GLI ili smanjenje ekspresije GLI1 smanjuje proliferaciju i invaziju ER α -negativnih tumorskih stanica [217], dok je pojačana ekspresija GLI1 povezana s rezistencijom na TAM i lošijim kliničkim ishodom [219], a tretman estradiolom dovodi do aktivacije GLI1 i poticanja EMT-a i obnavljanja populacije tumorskih matičnih stanica, što u konačnici rezultira povećanom invazivnošću tumora [220]. Sveukupno, dobiveni rezultati upućuju na funkcionalno relevantnu i stanično-specifičnu povezanost signalnih puteva estrogena i HH-GLI u HNSCC-u, čime je postavljena jasna osnova za daljnju funkcionalnu karakterizaciju uspostavljenih klonalnih linija primjenom tretmana usmjerenih na

inhibiciju navedenih signalnih puteva.

Funkcionalna karakterizacija uspostavljenih staničnih linija *ESR1^{KI}* i *ESR2^{KI}* u usporedbi s roditeljskim linijama bila je usmjerena na ispitivanje terapijski relevantnih meta unutar signalnih puteva receptora estrogena i HH-GLI, čija je međusobna povezanost potvrđena na razini genske i proteinske ekspresije. Cilj je bio utvrditi u kojoj mjeri farmakološka inhibicija navedenih puteva utječe na osnovna obilježja tumorskih stanica. Kao prvi parametar analiziran je učinak pojedinačne i kombinirane inhibicije navedenih puteva na vijabilnost stanica, kako bi se procijenila njihova uloga u održavanju proliferativnog kapaciteta i preživljenja u roditeljskim i klonalnim linijama. Dobiveni rezultati testa MTT pokazali su da su i estrogenska signalizacija i put HH-GLI funkcionalno relevantni za održavanje vijabilnosti stanica, pri čemu je odgovor na farmakološku inhibiciju bio jasno ovisan o staničnom modelu i ER-statusu. Tretman TAM-om doveo je do smanjenja vijabilnosti u svim analiziranim roditeljskim i klonalnim linijama, ali uz izražene razlike u osjetljivosti između klonova. U staničnom modelu CAL-27, klon *ESR1^{KI}* pokazao je izraženije smanjenje vijabilnosti u usporedbi s roditeljskom linijom, dok je klon *ESR2^{KI}* bio manje osjetljiv na tretman TAM-om, osobito pri srednjim koncentracijama inhibitora. S druge strane, u modelu SCC-25 zabilježen je blaži pad vijabilnosti u klonu *ESR1^{KI}* u odnosu na roditeljsku liniju i klon *ESR2^{KI}*, što dodatno potvrđuje da odgovor na inhibiciju ER nije uniforman. U klonovima *ESR1^{KI}* prethodno je utvrđena dominacija kraćih izoformi ER α , što može dodatno modulirati odgovor stanica na TAM i doprinijeti heterogenim učincima opaženima među pojedinim klonovima. Dobiveni rezultati u skladu su s prethodnim istraživanjima *in vitro* u modelima HNSCC i OSCC, u kojima je pokazano da TAM inhibira proliferaciju tumorskih stanica, prvenstveno inducirajući zastoj staničnog ciklusa u fazama G1/S [253]. Ipak, literaturni podatci ukazuju na izraženu heterogenost odgovora staničnih linija HNSCC-a na tretman TAM-om, pri čemu je osjetljivost u pojedinim modelima bila povezana s razinom i profilom ekspresije ER. Naime, u nekim je studijama zabilježen izraženiji učinak u ER+ linijama, dok su druge studije pokazale da ER- linije mogu reagirati na više koncentracije TAM-a, što ukazuje na složenost njegove farmakodinamike u HNSCC-u [45,106,107]. Takvi rezultati naglašavaju potrebu za molekularnom stratifikacijom tumora prema profilu ER i pratećim obilježjima tumora prije potencijalne upotrebe antiestrogenske terapije u HNSCC-u. S obzirom na prethodno utvrđenu modulaciju signalnog puta HH-GLI u klonalnim linijama s pojačanom ekspresijom *ESR1* i *ESR2*, u nastavku je analiziran učinak inhibicije puta HH-GLI na vijabilnost stanica. U tu svrhu korišteni su inhibitori usmjereni na različite razine signalne kaskade, uključujući inhibitore koreceptora SMO (vismodegib i sonidegib) i inhibitore završnih efektorskih komponenti puta (GANT 61 i arsenov trioksid). Rezultati su pokazali da inhibicija

primjenom svakog od inhibitora dovodi do smanjenja vijabilnosti u svim analiziranim linijama, no uz jasno uočljive razlike ovisno o razini na kojoj je put bio farmakološki inhibiran. Inhibitori koreceptora SMO uzrokovali su postupno smanjenje vijabilnosti ovisno o dozi, ali bez izraženijih razlika između roditeljskih i klonalnih linija, osobito pri nižim koncentracijama inhibitora. Takav odgovor u skladu je s prethodnim opažanjima da tumorski modeli često aktiviraju put HH-GLI putem nekanonskih mehanizama, neovisno o uzvodnoj osi PTCH-SMO, što predstavlja jedan od glavnih razloga ograničene učinkovitosti inhibitora SMO-a u solidnim tumorima [6,186]. S druge strane, inhibitori transkripcijskih čimbenika GLI, GANT 61 i ATO, pokazali su snažniji učinak u usporedbi sa inhibitorima SMO-a, pri čemu je ATO imao najizraženiji i klonalno specifičan učinak. Posebno se ističe rezultat da su klonovi *ESR2^{KI}* u oba stanična modela pokazali najizraženiji pad vijabilnosti nakon tretmana ATO-om. U literaturi je već opisano da ATO pokazuje antitumorsku aktivnost u solidnim tumorima, uključujući HNSCC [203], pri čemu smanjuje ekspresiju GLI1 i inducira morfološke promjene [204], povećava radiosenzitivnost stanica HNSCC-a [208] i osjetljivost stanica na cisplatinu, pospješujući njihov sinergistički antitumorski učinak [205–207], što ga čini terapijski relevantnom metom u HNSCC-u. Na temelju dobivenih vrijednosti IC₅₀ za daljnje su analize odabrane niže, biološki relevantne koncentracije TAM-a (5 μM) i ATO-a (2 μM), koje su omogućile pouzdanu procjenu učinaka pojedinačnih i kombiniranih tretmana na biološke karakteristike stanica, bez izraženog nespecifičnog citotoksičnog učinka i gubitka adhezije stanica. Upravo zbog djelovanja na završnu efektorsku komponentu signalne kaskade, ATO se pokazao osobito pogodan za primjenu u kombinirani terapijskim pristupima te je stoga u ovom radu ispitan njegov učinak u kombinaciji s TAM-om, s ciljem procjene potencijalne dodatne terapijske koristi i klonalno specifičnih razlika u osjetljivosti na navedenu kombinaciju. U oba stanična modela kombinirani tretman doveo je do izraženijeg i konzistentnijeg smanjenja vijabilnosti u odnosu na pojedinačne tretmane. Unutar klonalnih linija uočen je diferencijalni odgovor, gdje su klonovi *ESR2^{KI}* pokazali najsnažniji pad vijabilnosti, dok su klonovi *ESR1^{KI}* bili relativno manje osjetljivi u odnosu na roditeljske linije. Pošto je povećana osjetljivost klonova *ESR2^{KI}* bila vidljiva već pri primjeni ATO-a kao pojedinačne terapije, a kombinirani tretman je dodatno potencirao taj sinergistički učinak, dobiveni rezultati podupiru hipotezu da istodobno ciljanje ERβ i HH-GLI ima terapijski potencijal kod ERβ-pozitivnih tumora glave i vrata. Zanimljivo, ovo je jedan od prvih dokaza takvog djelovanja ATO-a na ERβ-pozitivne stanične linije, pošto je u literaturi opisana njegova uloga isključivo kao modulatora ERα. Naime, Chen i sur. opisali su da ATO pri nižim dozama specifično i reverzibilno inhibira ekspresiju i transkripcijsku aktivnost ERα, dok pri višim dozama značajno smanjuje

preživljenje ER α ⁺ stanica raka dojke [254,255]. Nadalje, u ER α ⁻ stanicama raka dojke epigenetski reaktivira ekspresiju ER α inducirajući parcijalnu demetilaciju promotora ER α putem inhibicije DNA metiltransferaze 1 (eng. *DNA methyltransferase 1*, DNMT1) i 3A (eng. *DNA methyltransferase 3 alpha*, DNMT3A), čime stanice postaju osjetljive na terapiju antiestrogenima [256,257]. I najzanimljivije, studija Kumara i sur. pokazala je da se ATO direktno veže na E2, što dovodi do međusobne neutralizacije njihovih signalnih učinaka na preživljenje i migraciju stanica raka dojke, što dovodi do funkcionalne inhibicije signalnog puta estrogena [258]. Na temelju svega navedenog, dobiveni rezultati u ovom radu upućuju na mogućnost postojanja do sada neopisanog mehanizma djelovanja ATO-a u staničnim modelima HNSCC-a, koji uključuje funkcionalnu povezanost ER β i HH-GLI, čime se otvara mogućnost za istraživanje potencijalno nove terapijske strategije usmjerene na ER β - pozitivne tumore glave i vrata.

Sljedeća funkcionalna karakteristika koja je bila analizirana je migracijska sposobnost stanica koristeći test zacjeljivanja rane. Rezultati navedenog testa pokazali su da učinak pojedinačnih tretmana, kao i njihove kombinacije na migraciju stanica nije uniforman, već ovisi o staničnom modelu, statusu ER i vremenu izlaganja, što je u skladu s općim konceptom heterogenog odgovora linija HNSCC-a na antiestrogensku modulaciju [45,106,107]. U liniji CAL-27 nakon 24 sata nije bilo razlika u migraciji između tretmana, dok se nakon 48 sati pojavljuje jasna osjetljivost na TAM i kombinaciju ATO-a i TAM-a, što sugerira da je za fenotipski učinak na migraciju potrebna dulja izloženost i/ili kumulativni pomak u signalnim mrežama koje reguliraju migraciju stanica. S druge strane, u liniji CAL-27 *ESR1*^{KI} zabilježen je specifičan, vremenski ograničen odgovor, pri kojem TAM nakon 24 sata potiče migraciju, dok se taj učinak gubi nakon 48 sati, kada nijedan tretman više ne pokazuje učinak. Istodobno, bazalna migracija ove linije je općenito niska, što može suziti raspon detekcije dodatne inhibicije u kasnijoj vremenskoj točki. Također, u kontekstu ranije utvrđene dominacije kraćih izoformi ER α u klonovima *ESR1*^{KI}, ovakav prolazni učinak TAM-a razumno je interpretirati kao moguću modulaciju signalizacije ER-a pri nižoj dozi (5 μ M), pri čemu TAM ne mora djelovati kao čisti inhibitor migracije u svim uvjetima, već njegov finalni učinak može ovisiti o izoformnom sastavu receptora i koregulatorima ekspresije [93–97]. Unatoč tome što je u ovom klonu na proteinskoj razini zabilježeno pojačanje GLI1 i PTCH1, izostanak inhibicije migracije pri kombiniranom tretmanu može upućivati na to da je kod ovog fenotipa dominantna signalizacija ER α te da je stoga migracijski fenotip slabije ovisan o GLI-posredovanoj transkripcijskoj aktivnosti. U modelu CAL-27 upravo klon *ESR2*^{KI} pokazuje najinformativniji obrazac, pri čemu nakon 24 sata nema učinka tretmana, ali nakon 48 sati kombinacija ATO-a i

TAM-a dovodi do izrazitog pada migracijske sposobnosti, dok pojedinačni tretmani ne pokazuju statistički značajan učinak. Ovaj rezultat se dobro nadovezuje na rezultate vijabilnosti, gdje je kombinirana inhibicija pokazala jači učinak u odnosu na pojedinačne tretmane u kontekstu *ESR2^{KI}*, što upućuje na to da se kod ovog klona fenotipska promjena jasnije očituje tek pri istodobnom ciljanju obje signalne osi. Takva potreba za kombiniranim pristupom u skladu je s literaturnim opažanjima da tumorske stanice često održavaju fenotip putem mrežne redundancije i križanja signalnih puteva te da je ciljanje osi HH-GLI često izraženije kod primjene kombinacije terapeutika nego pojedinačno [6,200]. Što se tiče modela SCC-25, u roditeljskoj liniji zabilježen je sličan rezultat kao i u CAL-27, gdje TAM pojedinačno i u kombinaciji s ATO-om inhibira migraciju nakon 48 sati, ali s inhibicijom vidljivom već nakon 24 sata za tretman TAM-om, što može odražavati razlike u bazalnoj ekspresiji ER između linija, a ranije je istaknuto kao važan izvor varijabilnosti odgovora na TAM [45,106,107]. Sličan obrazac zabilježen je i kod klona SCC-25 *ESR1^{KI}*, gdje TAM smanjuje migraciju u obje vremenske točke, a kombinacija dodatno pojačava inhibiciju. To je u skladu s opažanjem da je u navedenoj liniji zabilježen vrlo izražen signal ER α na proteinskoj razini te sugerira da je migracijski fenotip ove linije izraženije podložan modulaciji ER, što se ovdje jasno očituje kroz stabilnu osjetljivost na TAM. Konačno, klon SCC-25 *ESR2^{KI}* pokazao je obrazac osjetljivosti koji je usklađen s prethodnim rezultatima pojačane ekspresije GLI1 i PTCH1. Naime, jedino u ovoj liniji ATO primijenjen pojedinačno doveo je do značajnog smanjenja migracijske sposobnosti u obje vremenske točke, dok dodatak TAM-a nije rezultirao pojačanjem učinka. Ovakav rezultat sugerira da je migracijski fenotip u ovom modelu snažno povezan s GLI-posredovanom signalizacijom i da ciljanje osi HH-GLI predstavlja dominantniji mehanizam modulacije migracije, dok dodatna inhibicija ER ne doprinosi tom učinku, što dodatno podupire relevantnost puta HH-GLI kao regulatora biološke aktivnosti ER β -pozitivnih HNSCC-ova.

Rezultati testa invazije pokazali su da je invazivni fenotip stanica HNSCC-a također reguliran interakcijom signalnih mreža ER i HH-GLI i, za razliku od testa migracije, predstavlja biološku karakteristiku u kojoj je navedena interakcija snažnije očitovana. Naime, dok su u testu migracije učinci inhibicije bili vremenski ovisni i djelomično reverzibilni, u testu invazije uočeni su jasnije definirani obrasci osjetljivosti, što upućuje na to da invazija zahtjeva koordinirano djelovanje više signalnih osi uključenih u remodeliranje izvanstaničnog matriksa i održavanje invazivnog potencijala stanica. Ovakva regulacija invazije na više razina u skladu je s literaturom koja opisuje signalizaciju putem HH-GLI kao jedan od ključnih regulatora EMT-a i invazivnosti u solidnim tumorima [138,220]. Važno je istaknuti da je u obje roditeljske linije, CAL-27 i SCC-25, tretman TAM-om, kao i kombinirani tretman ATO-om i TAM-om,

doveo do potpune inhibicije invazije nakon 48 sati, što potvrđuje da je invazivnost u osnovnom tumorskom kontekstu ovisna o estrogenskoj signalizaciji. Ovaj rezultat lijepo se nadovezuje na rezultate migracije i dodano potvrđuje funkcionalnu relevantnost signalnog puta ER u regulaciji agresivnih obilježja HNSCC-a. Također, osim utjecaja na proliferaciju, iz literature je poznato da TAM inhibira invazivnost i inducira staničnu smrt u linijama OSCC-a [60]. Međutim, u klonalnim linijama modela CAL-27 uočeni su rezultati koji djelomično odstupaju od fenotipa roditeljske linije i time pružaju dodatni uvid u regulaciju invazije. U liniji CAL-27 *ESR1*^{KI} vidljiva je potpuna inhibicija invazije nakon tretmana TAM-om i kombinacije, usporediva s roditeljskom linijom, što sugerira da pojačana ekspresija *ESR1* u ovom kontekstu ne mijenja temeljni invazivni fenotip. Suprotno tome, klon CAL-27 *ESR2*^{KI} pokazao je izrazito povišenu bazalnu invazivnost, ali i nepotpunu inhibiciju invazije nakon pojedinačnog tretmana TAM-om. Potpuna inhibicija invazije u ovom klonu postignuta je tek primjenom kombiniranog tretmana, što je također u potpunosti u skladu s prethodnim rezultatima funkcionalnih analiza. Takav rezultat podudara se i s prethodnim istraživanjima u drugim tipovima tumora. Kameda i sur. pokazali su da primjena ciklopamina, kao i smanjenje ekspresije *GLI1* u ER α - staničnim linijama dojke, značajno smanjuje proliferaciju i invaziju stanica [218]. Nadalje, Sun i sur. uočili su da tretman estradiolom aktivira *GLI1*, čime se potiče obnavljanje populacije CSC-ova i EMT, što rezultira povećanom invazivnošću tumora [220]. Ovi podatci snažno podupiru koncept funkcionalne međuovisnosti navedenih signalnih puteva u regulaciji invazivnog fenotipa. U tom kontekstu, potreba za kombiniranim tretmanima u pojedinim modelima HNSCC-a, osobito onima s pojačanom ekspresijom *ESR2* i aktivnošću *GLI1*, dobiva dodatno biološko opravdanje. U modelu SCC-25 uočen je sličan obrazac, no ovdje je roditeljska linija pokazala najvišu bazalnu invazivnost, dok su sve tri linije pokazale potpunu inhibiciju invazije nakon TAM-a i kombiniranog tretmana. Jedini jasno izdvojeni rezultat unutar ovog modela zabilježen je u klonu SCC-25 *ESR1*^{KI}, gdje je primjena ATO-a pojedinačno rezultirala povećanjem invazivne sposobnosti, za razliku od ostalih linija, u kojima nije zabilježen takav učinak. Iako se ovaj rezultat na prvi pogled čini kontradiktornim, on je u skladu sa signalnom plastičnošću puta HH-GLI i mogućnošću nekanonskih odgovora na parcijalnu inhibiciju signalne kaskade. U ovom je klonu prethodno zabilježena izrazito snažna ekspresija ER α na proteinskoj razini, pri čemu je dominirala ekspresija kraćih izoformi ER α . Iz literature je poznato da ER α 36 može poticati proliferaciju, preživljenje i invazivna obilježja tumorskih stanica putem aktivacije PKC-a i regulaciju ekspresije angiogenih i metastatskih čimbenika poput VEGF-a u tumoru grkljana [96]. Osim toga, pojačana ekspresija ER α 36 u epitelu oko tumora sugerira na postojanje većeg rizika od zloćudne transformacije stanica grkljana, čime bi

ER α 36 mogao postati biljeg za identifikaciju visokorizičnih lezija, a identifikacija i stratifikacija pacijenata prema statusu ER α 36 mogla bi unaprijediti personaliziranu terapiju i praćenje progresije bolesti [103]. U tom kontekstu, privremeno pojačanje invazije posredovane ATO-om u klonu SCC-25 *ESR1*^{KI} može se interpretirati kao posljedica deregulacije između signalnih puteva ER i HH-GLI, pri čemu parcijalna inhibicija faktora GLI nije dovoljna za supresiju invazivnog fenotipa u ER α -dominantnim uvjetima, već može dovesti do aktivacije kompenzacijskih, nekanonskih mehanizama. Važno je naglasiti da je potpuna inhibicija invazije u ovom klonu ponovno uspostavljena primjenom TAM-a i kombiniranog tretmana, što potvrđuje da je invazivni fenotip snažno ovisan o estrogenskoj signalizaciji.

Zajedno, rezultati migracije i invazije otvorili su pitanje utječe li pojedinačna i kombinirana inhibicija stanica HNSCC-a pomoću ATO-a i TAM-a na dugoročnu sposobnost preživljenja i klonalnog rasta, analiziranu testom formiranja kolonija. Rezultati ove analize potvrdili su izražen inhibitorski učinak ATO-a u klonu CAL-27 *ESR2*^{KI}, pri višoj koncentraciji, što dodatno upućuje na pojačanu osjetljivost navedene linije na inhibiciju signalizacije HH-GLI u kontekstu održavanja dugoročnog proliferativnog potencijala, u skladu s opažanjima iz kratkoročnog testa vijabilnosti. S druge strane, učinak TAM-a na formiranje kolonija pokazao je izraženu ovisnost o dozi i staničnom modelu. Naime, pri nižoj koncentraciji (1 μ M) uočen je blagi porast broja kolonija u pojedinim linijama, što je u skladu s prethodno opisanim parcijalno agonističkim ili modulacijskim učinkom TAM-a pri subinhibitorskim dozama [259], dok je pri višoj koncentraciji (5 μ M) zabilježen jasan inhibitorski učinak. Pri tome se u modelu CAL-27 najizraženija inhibicija uočava u klonu *ESR1*^{KI}, dok u modelu SCC-25 isti obrazac pokazuje klon *ESR2*^{KI}, što se također podudara s rezultatima testa vijabilnosti i dodatno potvrđuje da dugoročni proliferativni odgovor na antiestrogensku terapiju ovisi o dominantnom profilu ER u stanicama [107]. Konačno, kombinirani tretman ATO-om i TAM-om pokazao je najsnažniji inhibitorski učinak na sposobnost formiranja kolonija u oba stanična modela, s potpunom inhibicijom klonalnog rasta pri višim kombiniranim dozama u roditeljskim i klonalnim linijama. Budući da je u literaturi opisano da inhibicija signalnog puta HH-GLI dovodi do najznačajnijeg smanjenja sposobnosti formiranja kolonija i dugoročnog proliferativnog kapaciteta stanica HNSCC-a upravo kod primjene kombiniranih terapija [193,198], ovakav rezultat potvrđuje ulogu puta HH-GLI u održavanju klonogenosti stanica HNSCC-a te da istodobno ciljanje oba puta učinkovitije narušava programe održavanja tumorske populacije nego pojedinačni tretmani.

Analiza staničnog ciklusa pokazala je da roditeljska linija CAL-27 ne pokazuje statistički značajne promjene u raspodjeli faza nakon primjene pojedinačnih tretmana, niti

njihove kombinacije u obje vremenske točke. Ovakav rezultat upućuje na relativnu bazalnu otpornost ove linije na kratkotrajnu farmakološku modulaciju ER i HH-GLI na razini regulacije ciklusa. Nasuprot tome, roditeljska linija SCC-25 pokazuje pomake u raspodjeli stanica već nakon 24 sata tretmana TAM-om i kombinacijom, a nakon 48 sati i nakon primjene ATO-a, što ukazuje na pojačanu osjetljivost ovog modela na regulaciju proliferativne dinamike putem navedenih signalnih osi. Unutar klonalnih linija TAM je najkonzistentnije inducirao zastoj u fazi G0/G1, osobito u klonovima CAL-27 *ESR1*^{KI} i SCC-25 *ESR1*^{KI}, gdje je povećanje udjela stanica u fazi G0/G1 bilo prisutno u obje vremenske točke. Ovakav obrazac odgovara poznatom učinku TAM-a koji uzrokuje zastoj staničnog ciklusa na prijelazu iz faze G1 u fazu S. Taj se učinak ostvaruje modulacijom ključnih regulatora staničnog ciklusa, ponajprije kroz pojačanu ekspresiju inhibitora kinaza ovisnih o ciklinu 1B (p27) (eng. *cyclin-dependent kinase inhibitor 1B*), uz istodobno smanjenje ekspresije ciklina E i kinaze ovisne o ciklinu 6 (eng. *cyclin-dependent kinase 6*, CDK6) [253]. S druge strane, u literaturi su opisani različiti učinci ATO-a na regulaciju staničnog ciklusa, pri čemu su zabilježeni zastoji na svim kontrolnim točkama, ovisno o tipu stanica i eksperimentalnim uvjetima. Zastoj u fazi G1 induciran je aktivacijom signalnog puta p53, pri čemu dolazi do supresije ekspresije fosfataze CDC25A (eng. *cell division cycle 25A*) putem osi p53-ATF3 (eng. *activating transcription factor 3*), što onemogućava aktivaciju kompleksa ciklin E-CDK2 (eng. *cyclin-dependent kinase 2*) i ulazak stanica u fazu S [260–262]. Tijekom faze S ATO dodatno smanjuje razine CDC25A na razini mRNA i proteina, čime se usporava ili zaustavlja progresija sinteze DNA [263]. Konačno, veliki broj radova naglašava dominantan G2/M-zastoj, koji je povezan s oštećenjem DNA, aktivacijom p53, ATM-posredovanom fosforilacijom p53, indukcijom p21 te uključenjem kontrolnih proteina poput GADD45 (eng. *growth arrest and DNA damage-inducible 45*) i inhibicijom kompleksa CDC2/ciklin B, što rezultira ulaskom u mitozu [264–267]. U kontekstu HNSCC-a pokazano je da ATO smanjuje proliferaciju tumorskih stanica modulacijom ključnih regulatora staničnog ciklusa, ponajprije ciklina D1 i osi p53/pRb, pri čemu su učinci izraženiji u HPV-pozitivnim tumorima i potvrđeni *in vivo* [268]. Dodatno, u OSCC-u je također opisano da ATO inducira oštećenje DNA i degradaciju ciklina D1 uz inhibiciju CDK4/6, što naglašava važnost kontrole prijelaza G1/S [269]. Noviji podatci upućuju na povećanu osjetljivost p53-deficijentnih tumora na ATO, pri čemu se antitumorski učinak povezuje s oštećenjem DNA, dominantnim zastojem u fazama G2/M i apoptozom [203]. Istodobno, recentna istraživanja pokazuju da produljeni G2/M-zastoj u HNSCC-u može imati i protektivnu ulogu u odgovoru na terapiju, pridonoseći radiootpornosti, što upućuje na složenu ulogu kontrolne točke G2/M kao odgovor na ATO u ovom tipu tumora [270]. U skladu s literaturnim podacima, učinci

ATO-a na stanični ciklus u ovom su radu pokazali izraženu vremensku ovisnost. Naime, najizraženiji učinak ATO-a na stanični ciklus očitovao se u vidu akumulacije stanica u fazi G2/M nakon 48 sati u klonovima CAL-27 *ESR1*^{KI} i osobito SCC-25 *ESR2*^{KI}, dok su iste linije nakon 24 sata pokazivale pomak prema zastoju u fazama G0/G1 i S. Ovakav vremenski ovisan pomak u profilu staničnog ciklusa u skladu je s gore opisanom literaturom koja opisuje da ATO inicijalno može usporiti ulazak i progresiju kroz rane faze ciklusa, dok produljena izloženost dovodi do dominantne aktivacije kontrolne točke G2/M, povezane s nakupljanjem oštećenja DNA i sekundarnim odgovorom stanica na terapijski stres. Kao i u prethodnim funkcionalnim analizama, kombinirani tretman ATO-om i TAM-om potvrdio je da je regulacija staničnog ciklusa usko povezana s obrascima koji su već vidljivi u prethodnim funkcionalnim analizama. U linijama koje su se prethodno pokazale funkcionalno osjetljivijima na pojedinačnu ili kombiniranu inhibiciju, osobito CAL-27 *ESR2*^{KI} i SCC-25 *ESR1*^{KI}, kombinirani tretman je rezultirao zaustavljanjem staničnog ciklusa u fazi G0/G1 i smanjenjem udjela stanica u fazi G2/M, što je posebno vidljivo nakon 48 sati tretmana. Zanimljivo, navedeni efekt bio je vidljiv i kod linije CAL-27 *ESR1*^{KI}, kao i kod SCC-25 nakon 24 sata, no nakon 48 sati se u potpunosti gubi efekt kombiniranog tretmana u navedenim linijama, što govori u prilog većoj plastičnosti istih. Konačno, kod klona SCC-25 *ESR2*^{KI} kombinacija je u pojedinim vremenskim točkama dovela do redistribucije stanica unutar faza G2/M ili S, što se uklapa u literaturne podatke prema kojima ATO dominantno aktivira kontrolnu točku G2/M, kroz mehanizme povezane s oštećenjem DNA i regulacijom osi p53/p21 [203], dok TAM prvenstveno djeluje na prijelaz G1/S modulacijom aktivnosti CDK6 [253], pri čemu konačni učinak njihove kombinacije ovisi o dominantnoj signalnoj mreži u pojedinom klonu.

S obzirom na to da apoptoza potencijalno predstavlja završni ishod kumulativnog djelovanja regulatornih poremećaja u proliferaciji, staničnom ciklusu i signalnim mehanizmima koji reguliraju preživljenje stanica, samim time čini logičan završni funkcionalni test u ovom istraživanju. Nakon što su u prethodnim analizama utvrđene promjene u vijabilnosti, migraciji, invazivnosti, klonogenosti i raspodjeli staničnog ciklusa, analiza aktivacije kaspaza 3/7 omogućila je procjenu prelaze li navedeni učinci u programiranu staničnu smrt. Najslabiji učinak na apoptozu pokazao je pojedinačni tretman ATO-om. Iako je u dosadašnjoj literaturi dobro dokumentirano da ATO može djelovati proapoptotski u HNSCC-u, u ovom eksperimentalnom modelu nije pokazao konzistentan proapoptotski učinak [203,204]. Kratkotrajan tretman od 24 sata u većini analiziranih linija nije inducirao porast apoptotskih populacija, već je u roditeljskim linijama CAL-27 i SCC-25 zabilježen porast udjela živih stanica uz smanjenje populacije stanica u kasnoj apoptozi. Tek nakon produljenog izlaganja (48

sati) uočeni su blagi proapoptotski učinci u pojedinim linijama, ponajprije u roditeljskim linijama i CAL-27 *ESR1*^{KI}, dok su u navedenoj vremenskoj točki klonovi *ESR2*^{KI} pokazali antiapoptotski učinak na tretman ATO-om. Iako je ATO u klonovima *ESR2*^{KI} snažno utjecao na vijabilnost i klonogenost, nije nužno inducirao apoptozu ovisnu o kaspazama 3/7, što potvrđuje da inhibicija signalnog puta HH-GLI u staničnim modelima HNSCC-a može primarno djelovati kroz poremećaj proliferacije i adaptivnih programa. S druge strane, primarni proapoptotski učinak nakon 24 sata tretmana TAM-om pokazali su oni klonovi koji su već ranije bili osjetljiviji na antiestrogensku modulaciju, osobito CAL-27 *ESR1*^{KI} i SCC-25 *ESR2*^{KI}. Iako su u modelu CAL-27 sve tri linije pokazale povećanu osjetljivost na TAM, u modelu SCC-25 održani proapoptotski odgovor nakon 48 sati bio je ograničen isključivo na klon SCC-25 *ESR2*^{KI}. Ono što je osobito zanimljivo jest da je u literaturi opisan specifičan oblik apoptoze putem kojega TAM djeluje u OSCC-u, a to je anoikis, oblik programirane stanične smrti koji se aktivira gubitkom adhezije stanica za izvanstanični matriks i susjedne stanice [271]. Naime, osim učinaka na proliferaciju, pokazano je da TAM inhibira invazivnost i inducira anoikis u staničnim linijama OSCC-a, kao rezultat inhibicije adhezije i smanjenja fosforilacije FAK, ERK i MAPK, što dovodi do poremećaja signala preživljavanja [60]. I u ovom istraživanju su uočeni obrasci odgovora na TAM koji upućuju na povećanu osjetljivost stanica na gubitak adhezije, što je bio jedan od razloga, obrazloženih u medološkom dijelu rada, za primjenu blago snižene koncentracije TAM-a, kako bi se omogućila usporedivost učinaka pojedinih i kombiniranih tretmana. Međutim, biološki najrelevantniji učinak na apoptozu zabilježen je pri kombiniranom tretmanu, gdje je u oba stanična modela zabilježen progresivan porast udjela apoptotskih stanica u klonovima *ESR2*^{KI}. Suprotno tome, u klonovima *ESR1*^{KI} ovaj tretman je pokazao vremenski ograničen učinak, koji je nakon 48 sati bio oslabljen ili izgubljen. Ovi rezultati upućuju na to da u ERβ-pozitivnim klonovima istodobno ciljanje ER i HH-GLI dovodi do aktivacije proapoptotskih procesa, dok u ERα klonovima dolazi do djelomične adaptacije na kombinirani terapijski pritisak. Zanimljivo, u literaturi je pokazano da kombinirani terapijski pristupi, koji uključuju TAM u kombinaciji s drugim antitumorskim agensima, dovode do pojačane indukcije apoptoze u OSCC-u. Naime, u uvjetima *in vitro* pokazano je da kombinacija TAM-a i cisplatine rezultira pojačanom razinom citotoksičnosti i aktivacijom apoptotskih mehanizama, potencijalno posredovanih inhibicijom PKC i pojačanom sekrecijom transformirajućeg faktora rasta beta-1 (eng. *transforming growth factor beta 1*, TGF-β1) [110].

Funkcionalne analize pokazale su da modulacija signalnih puteva receptora estrogena i HH-GLI dovodi do jasno diferenciranih fenotipskih učinaka u staničnim modelima HNSCC-a. Usporedba pojedinačnih i kombiniranih tretmana ukazala je da istodobno ciljanje ovih puteva

rezultira kvalitativno drugačijim odgovorima stanica u odnosu na pojedinačne terapije, osobito u kontekstu vijabilnosti, klonogenosti i apoptoze. Važno je naglasiti da se opaženi funkcionalni učinci nisu uvijek podudarali s razinama ekspresije pojedinih komponenti signalnih puteva, već su ovisili o podtipu ER i staničnom kontekstu. Takav obrazac upućuje na postojanje dodatnih regulatornih mehanizama koji nadilaze klasičnu transkripcijsku kontrolu. Slijedom toga, u nastavku rada ispitana je mogućnost izravnog međudjelovanja signalnih puteva ER i HH-GLI na razini proteinskih kompleksa primjenom koimunoprecipitacije. Rezultati koimunoprecipitacije pokazali su da proteini ER α i ER β mogu stupiti u proteinske komplekse s ligandom SHH, ali uz jasno izražene razlike u kvaliteti i funkcionalnim posljedicama te interakcije. Nakon imunoprecipitacije proteina ER α primjenom specifičnog antitijela anti-ER α , detektirana je puna forma proteina SHH u svim analiziranim uzorcima, pri čemu je u oba klonu *ESR1*^{KI} zabilježeno blago pojačanje intenziteta signala u odnosu na odgovarajuće roditeljske linije. Međutim, biološki aktivna forma SHH-N, detektirana je selektivno i to isključivo u klonu SCC-25 *ESR1*^{KI}. Ovaj rezultat upućuje na to da pojačana ekspresija *ESR1* može biti povezana s povećanom dostupnošću ili stabilnošću liganda SHH, ali da procesiranje i uključivanje njegove aktivne forme u stabilan proteinski kompleks s ER α ovisi o dodatnim, stanično-specifičnim čimbenicima. Suprotno tome, nakon imunoprecipitacije proteina ER β primjenom antitijela anti-ER β , u roditeljskim linijama uočena je izražena prisutnost SHH-N u proteinskim kompleksima. Zanimljivo, u klonovima *ESR2*^{KI} ta se interakcija gubi ili je značajno oslabljena, uz gotovo potpuni izostanak detekcije SHH-N, što ukazuje da pojačana ekspresija ER β ne dovodi do stabilizacije interakcije s aktivnim ligandom, već naprotiv, do njezina poremećaja. Ovakav gubitak interakcije u klonovima *ESR2*^{KI} predstavlja jasan kvalitativni pomak u regulaciji osi HH-GLI u odnosu na bazalni tumorski kontekst. U usporedbi s rezultatima funkcionalnih analiza, prisutnost interakcije SHH-N i ER α potencijalno je povezana s očuvanom vijabilnošću i slabijom indukcijom apoptoze, što upućuje na protumorsku ulogu ER α u staničnim modelima HNSCC-a. Suprotno tome, klonovi *ESR2*^{KI} u kojima je interakcija s SHH-N smanjena ili izgubljena, pokazuju izraženiju osjetljivu na farmakološku inhibiciju i jaču indukciju apoptoze. Takav obrazac sugerira da ER β , iako može sudjelovati u interakcijama s punom formom SHH, ne djeluje kao funkcionalni aktivator puta HH-GLI i da izostanak ER α -posredovane aktivacije HH-GLI rezultira smanjenom aktivacijom signalnih mehanizama preživljenja. Dobiveni rezultati u skladu su s prethodnim istraživanjima, osobito u staničnim modelima karcinoma dojke i želudca, gdje je pokazano da ER α inducira ekspresiju liganda SHH i posljedično aktivira signalni put HH-GLI, čime se potiče proliferacija i preživljenje tumorskih stanica [7,217]. Kliničke studije dodatno potvrđuju pozitivnu korelaciju između navedenih

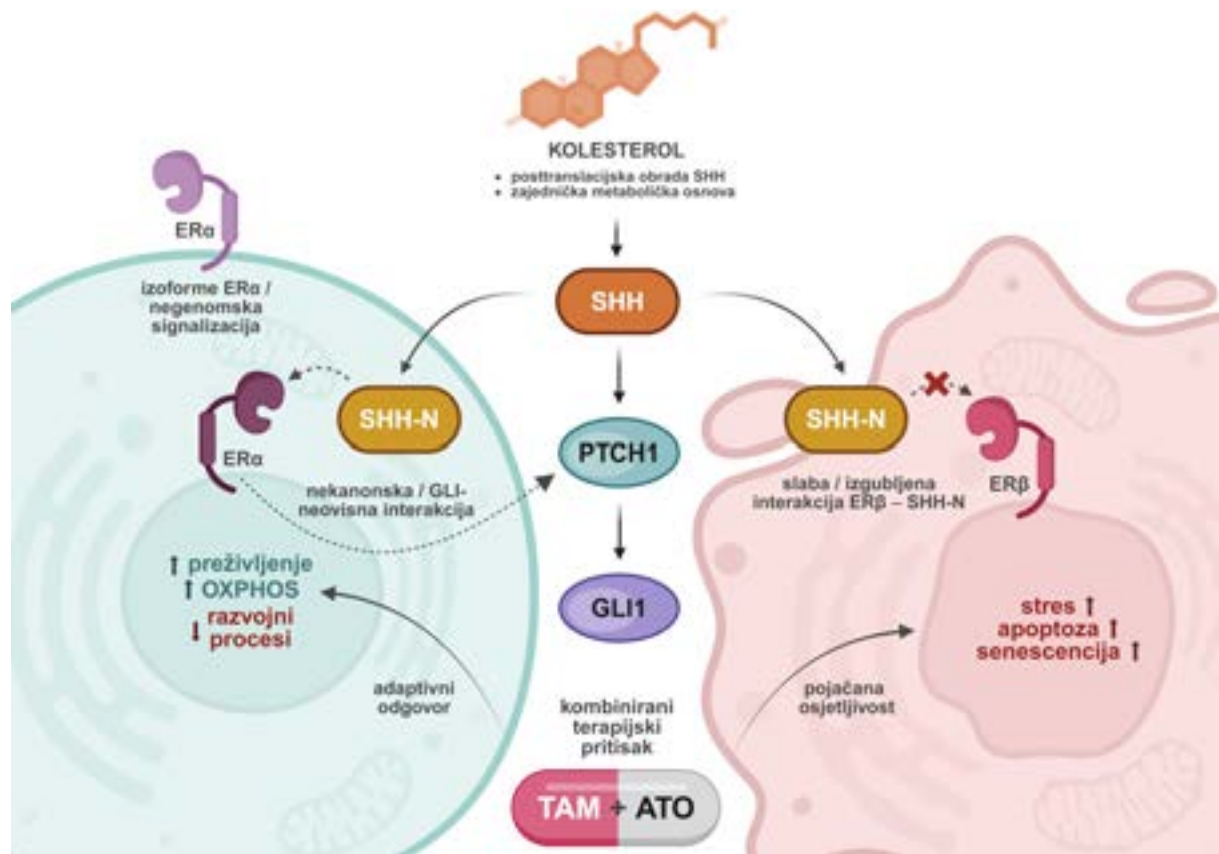
puteva i njihov zajednički utjecaj na ishod bolesti u raku dojke [219]. U ovom je radu također na razini tumorskog tkiva pokazano da su pojačana ekspresija *SHH* i *ESR1* neovisno povezane s lošijim ukupnim preživljenjem bolesnika s HNSCC-om. Nadalje, pokazano je da SHH može aktivirati ER α neovisno o transkripcijskoj aktivnosti faktora GLI1, upućujući upravo na postojanje nekanonskih, proteinski posredovanih mehanizama međudjelovanja ovih signalnih puteva [8]. U tom kontekstu, ovo je prvo istraživanje koje u HNSCC-u eksperimentalno pokazuje fizičku interakciju receptora estrogena i liganda SHH te diferencijalnu ulogu ER α i ER β . Ovi rezultati ujedno predstavljaju izravnu eksperimentalnu potvrdu prethodnih rezultata *in silico* dobivenih u našoj grupi, koji su predvidjeli visoki afinitet vezanja biološki aktivne forme SHH-N za ER α [9]. Time se dodatno učvršćuje koncept da interakcija ER α -SHH predstavlja biološki relevantan, nekanonski mehanizam regulacije preživljenja tumorskih stanica, koji u kontekstu HNSCC-a do sada nije bio opisan.

Na temelju svega navedenog, kao posljednji korak ovog rada provedena je transkriptomaska analiza temeljena na sekvenciranju RNA, kako bi se razjasnili molekularni mehanizmi koji stoje u podlozi uočenih fenotipskih učinaka u modelu CAL-27. Iako RNA-seq inicijalno nije bio primarni cilj istraživanja, njegova provedba omogućila je sustavno sagledavanje globalnih promjena genske ekspresije te identifikaciju koordiniranih signalnih mreža koje nisu bile u potpunosti vidljive kroz provedene funkcionalne analize. Rezultati analize RNA-seq pokazali su da je tehnička kvaliteta sekvenciranja bila vrlo visoka, uz ujednačenu distribuciju očitavanja i visoku učinkovitost mapiranja na referentni genom, čime je osigurana pouzdana osnova za daljnju analizu diferencijalne ekspresije i obogaćenja skupova gena. Analiza PCA pokazala je da se uzorci primarno razdvajaju prema genetskoj podlozi, odnosno roditeljska linija od klonova te klonovi međusobno, dok korišteni tretmani predstavljaju dodatan sloj varijabilnosti unutar svake skupine. Ovakav obrazac potvrđuje da pojačana ekspresija *ESR1* i *ESR2* ne predstavlja samo kvantitativnu promjenu razine receptora, već dovodi do sustavne reorganizacije transkripcijskog odgovora stanica. Ključni interpretacijski korak ove analize temelji se na analizi GSEA, čiji rezultati su jasno pokazali najveće razlike upravo kod primjene kombinacije tretmana ATO-om i TAM-om. Naime, ovom analizom je pokazano da kombinirana inhibicija ne predstavlja jednostavan zbroj učinaka pojedinačnih tretmana, već aktivira divergentne adaptacijske programe ovisno o podtipu ER. U klonu CAL-27 *ESR1*^{KI} kombinirani tretman doveo je do obogaćenja puteva povezanih s oksidativnom fosforilacijom, translacijom proteina u mitohondrijima i respiratornim lancem, uz relativnu supresiju EMT-a, razvojnih programa, signalnog puta HH-GLI i programa povezanih s estrogen-ovisnim odgovorom stanica. Ovakav transkriptomski potpis upućuje na

metaboličko-mitohondrijsku adaptaciju kao dominantan odgovor na terapijski stres. U kontekstu funkcionalnih analiza, takav odgovor u skladu je s očuvanom vijabilnošću stanica i modulacijom apoptotskog odgovora, sugerirajući da stanice preusmjeravaju energetske i biosintetske resurse prema održavanju preživljenja. Također, uzimajući u obzir prethodne rezultate koimunoprecipitacije, koji upućuju na postojanje funkcionalne interakcije ER α i SHH-N, ovi rezultati sugeriraju da os ER α -SHH u bazalnim uvjetima djeluje kao adaptivni protumorski mehanizam. S druge strane, istodobna inhibicija estrogenske signalizacije TAM-om i signalnog puta HH-GLI ATO-om dovodi do funkcionalnog gašenja ove signalne osi. Aktivacija oksidativne fosforilacije u klonu *ESR1*^{KI} stoga se može interpretirati kao kompenzacijski mehanizam preživljenja u uvjetima gubitka ER- i HH-GLI-ovisnih signala, a ne kao pokazatelj pojačane tumorske agresivnosti, već kao metabolička adaptacija na terapijski stres. Na taj način narušava se signalna redundancija koja omogućuje adaptaciju tumora na terapijski stres, što pruža racionalno objašnjenje uočenih razlika u funkcionalnim testovima između klonova s dominantnom signalizacijom ER α odnosno ER β . Ipak, rezultati testa formiranja kolonija pokazuju da produljena i kumulativna izloženost kombiniranoj inhibiciji u konačnici nadilazi početne adaptacijske mehanizme te dovodi do gubitka dugoročnog proliferativnog kapaciteta i smrti tumorskih stanica, neovisno o klonalnom kontekstu. Suprotno tome, u klonu *ESR2*^{KI} kombinirani tretman inducirao je obogaćenje programa povezanih s EMT-om, remodeliranjem izvanstaničnog matriksa te signalnim putevima uključenima u programiranu staničnu smrt i sekretorni fenotip povezan sa senescencijom. Istodobno je zabilježena supresija metaboličko-mitohondrijskih programa koji su bili dominantni kod klona *ESR1*^{KI}. Ovakav transkriptomski profil pruža objašnjenje izraženije osjetljivosti klonova *ESR2*^{KI} na kombiniranu inhibiciju. Integracija rezultata RNA-seqa s prethodnim rezultatima dodatno osnažuje interpretaciju diferencijalne uloge receptora estrogena u HNSCC-u. Na razini tumorskog tkiva pokazano je da su pojačana ekspresija *SHH* i *ESR1* povezane s lošijim ukupnim preživljenjem bolesnika, dok su u staničnim modelima klonovi *ESR1*^{KI} pokazali veću sposobnost održavanja protumorskih programa i adaptacije na terapijski pritisak. Nasuprot tome, klonovi *ESR2*^{KI} pokazali su gubitak stabilne interakcije sa SHH-N i veću sklonost aktivaciji stresnih i proapoptotskih programa. Stoga rezultati RNA-seqa predstavljaju transkriptomsku potvrdu da se ER α i ER β razlikuju ne samo u pojedinačnim signalnim interakcijama, nego i u globalnoj organizaciji odgovora stanice na kombiniranu inhibiciju osi ER–HH-GLI. U tom smislu, dobiveni rezultati otvaraju i pitanje međusobne regulacije transkripcije između signalnog puta HH-GLI i ER. Naime, u literaturi su opisane naznake dvosmjerne regulacije u kojem ER α može inducirati aktivaciju signalnog puta HH-GLI, dok

istodobno postoje indicacije da GLI1 može sudjelovati u regulaciji transkripcije *ESR1*, što sugerira postojanje recipročnog regulatornog odnosa između ovih signalnih puteva [219,272]. Iako u ovom radu takav odnos nije izravno ispitan, kombinacija korelacijskih obrazaca u tumorskom tkivu, funkcionalnih analiza u dijelu istraživanja *in vitro*, kao i rezultata transkriptomске analize pruža dodatni kontekst za razmatranje ovakvog regulatornog modela. Korelacijski podatci pokazuju da je u zdravoj sluznici prisutna povezanost *GLI1* s *ESR1*, dok se u primarnim tumorima taj odnos gubi, uz istodobnu aktivaciju, odnosno očuvanost korelacije komponenti *PTCH1* i *GLI1* s *ESR2*. Navedeni pomak upućuje na to da se u tumorskom tkivu transkripcijska aktivnost signalnog puta HH-GLI primarno povezuje s ER β , dok se *ESR1* odvaja od GLI-posredovane regulacije genske ekspresije, što upućuje na mogućnost da se uloga ER α u odnosu na os HH-GLI u tumorskom kontekstu ostvaruje putem regulatornih mehanizama koji nisu ograničeni na klasični kanonski model. Takva interpretacija u skladu je s rezultatima dobivenima u modelima *in vitro*, u kojima je pojačana ekspresija *ESR1* bila praćena dominacijom kraćih izoformi ER α , funkcionalno povezanih s negenomskom i membranski posredovanom signalizacijom [93–97]. Također, upravo u tom kontekstu pokazana je stabilna interakcija ER α s biološki aktivnom formom SHH-N, što sugerira da izostanak korelacije *ESR1* i *GLI1* u tumorskom tkivu ne isključuje funkcionalnu povezanost ovih puteva, već upućuje na njihovo međudjelovanje na razini koja nije ograničena na GLI1-ovisnu regulaciju genske ekspresije. Rezultati funkcionalnih analiza i transkriptomске analize dodatno podupiru ovaj rezultat. U klonovima s pojačanom ekspresijom *ESR1*, kombinirana inhibicija signalnih puteva ER i HH-GLI dovodi do supresije estrogenski ovisnih programa i signalnog puta HH-GLI, uz istodobnu aktivaciju metaboličkih adaptacijskih odgovora, dok klonovi *ESR2*^{K1} pokazuju izraženiju osjetljivost na istodobnu inhibiciju obje signalne osi, uz aktivaciju stresnih i proapoptotskih programa. Zajedno, ovi podatci sugeriraju da se u tumorskom kontekstu međudjelovanje signalnih puteva ER i HH-GLI ne odvija isključivo kroz kanonsku, GLI-posredovanu regulaciju transkripcije, već uključuje signalne mehanizme čije djelovanje ovisi o izoformama receptora i međudjelovanju signalnih mreža, što predstavlja jedan od potencijalno ključnih elemenata molekularne heterogenosti HNSCC-a (Slika 49.). Stoga, integracijom kliničkih, proteinskih i transkriptomskih podataka ovaj rad po prvi puta u HNSCC-u definira funkcionalnu dihotomiju između ER α - i ER β -posredovane signalizacije. Dok ER α kroz interakciju sa SHH i aktivaciju adaptivnih metaboličkih programa doprinosi održavanju protumorskog preživljenja, ER β gubitkom te interakcije pogoduje aktivaciji stresnih, senescentnih i proapoptotskih odgovora. Dvostruko ciljanje osi ER i HH-GLI time narušava signalnu redundanciju tumora i dugoročno ograničava njegov proliferativni potencijal. Ovi

rezultati stoga ne predstavljaju samo deskriptivni uvid u međudjelovanje signalnih puteva, već uspostavljaju konceptualni okvir za biološku stratifikaciju HNSCC-a i primjenu kombiniranih terapijskih strategija u liječenju ove bolesti.



Slika 49. Predloženi model međudjelovanja signalnih puteva ER i HH-GLI u HNSCC-u.

Shema prikazuje dihotomni odgovor stanica HNSCC-a na kombinirani terapijski pritisak tamoksifenom i arsenovim trioksidom (TAM + ATO), ovisno o kontekstu ER. U stanicama s dominantnom signalizacijom ERα, nekanonska i djelomično GLI-neovisna interakcija biološki aktivne forme liganda SHH (SHH-N) s ERα, povezana je s aktivacijom adaptivnih programa preživljenja, uključujući pojačanu oksidativnu fosforilaciju i gašenje razvojnih signalnih mreža. Ovakav signalni kontekst omogućuje djelomičnu prilagodbu na terapijski stres i očuvanje tumorskog fenotipa. Suprotno tome, u stanicama s dominantnom signalizacijom ERβ izostanak ili gubitak stabilne interakcije ERβ-SHH-N rezultira pojačanom osjetljivošću na kombiniranu inhibiciju, uz aktivaciju stresnih odgovora, apoptoze i programa stanične senescencije. Izrađeno pomoću BioRender.com.

6. ZAKLJUČAK

Na temelju rezultata koji su dobiveni u ovom radu mogu se izvesti sljedeći zaključci:

1. U uzorcima HNSCC-a potvrđena je značajno pojačana ekspresija *ESR1* i *ESR2* u primarnim tumorima i metastatskim limfnim čvorovima u usporedbi sa zdravom sluznicom.
2. Membranski receptori estrogena *GPER1* i *SCN2A* nisu pokazali diferencijalnu ekspresiju u uzorcima tkiva, no njihova ekspresija bila je povezana s brojnim kliničko-patološkim karakteristikama bolesnika.
3. Signalni put HH-GLI pokazuje diferencijalni obrazac ekspresije, obilježen pojačanom ekspresijom *PTCH1* i *GLI1* te smanjenom ekspresijom *SHH* u primarnim tumorima.
4. Ekspresija pojedinih komponenti signalnih puteva ER i HH-GLI povezana je s agresivnijim obilježjima bolesti, pri čemu je *SHH* identificiran kao nezavisni prognostički čimbenik lošijeg ukupnog preživljenja.
5. Uspješno su uspostavljeni i validirani vektori za sustav CRISPR/Cas9 te je potvrđena ciljna ugradnja *ESR1* i *ESR2* u lokus *AAVS1*.
6. Uspostavljene su stabilne klonalne linije CAL-27 i SCC-25 s trajno pojačanom ekspresijom *ESR1* ili *ESR2*, koje predstavljaju vrijedan eksperimentalni model za proučavanje uloge receptora estrogena u HNSCC-u.
7. Analiza proteinske ekspresije u roditeljskim i klonalnim linijama pokazala je dominaciju kraćih izoformi ER α , dok ER β pokazuje ekspresiju pune izoforme u svim linijama.
8. Farmakološka inhibicija pokazala je da su inhibitori faktora GLI učinkovitiji od inhibitora SMO, pri čemu je arsenov trioksid imao najizraženiji učinak, osobito u klonovima *ESR2*^{KI}.
9. Kombinirana inhibicija estrogenske signalizacije i puta HH-GLI tamoksifenom i arsenovim trioksidom dovela je do izraženijeg smanjenja vijabilnosti, klonogenog i invazivnog potencijala u odnosu na pojedinačne tretmane.
10. Učinci primijenjenih tretmana na migraciju, invazivnost, stanični ciklus i apoptozu bili su ovisni o tipu dominantno eksprimiranog tipa receptora estrogena.
11. Koimunoprecipitacijom je potvrđena ranije neopisana fizička interakcija receptora estrogena i SHH u HNSCC-u, pri čemu je biološki aktivna forma SHH-N selektivno detektirana u kompleksu s ER α , dok je u klonovima *ESR2*^{KI} ta interakcija bila oslabljena

ili je u potpunosti izostala.

12. Transkriptomska analiza sekvenciranja RNA pokazala je da kombinirani tretman tamoksifenom i arsenovim trioksidom inducira adaptivne transkripcijske programe u klonu CAL-27 *ESR1*^{KI}, dok u liniji CAL-27 *ESR2*^{KI} prevladavaju stresni i proapoptotski odgovori.
13. Ovim je istraživanjem pokazana ranije neprepoznata integrirana funkcionalna i proteinska povezanost signalnih puteva receptora estrogena i HH-GLI u HNSCC-u, uključujući njihovu fizičku interakciju, čime je uspostavljen novi molekularni okvir za razumijevanje biološke heterogenosti i terapijskog odgovora ove bolesti.

7. LITERATURA

1. Bray, F.; Laversanne, M.; Sung, H.; Ferlay, J.; Siegel, R.L.; Soerjomataram, I.; Jemal, A. Global Cancer Statistics 2022: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* **2024**, *74*, 229–263, doi:10.3322/caac.21834.
2. Pulte, D.; Brenner, H. Changes in Survival in Head and Neck Cancers in the Late 20th and Early 21st Century: A Period Analysis. *Oncologist* **2010**, *15*, 994–1001, doi:10.1634/theoncologist.2009-0289.
3. Dong, M.; Cioffi, G.; Wang, J.; Waite, K.A.; Ostrom, Q.T.; Kruchko, C.; Lathia, J.D.; Rubin, J.B.; Berens, M.E.; Connor, J.; et al. Sex Differences in Cancer Incidence and Survival: A Pan-Cancer Analysis. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* **2020**, *29*, 1389–1397, doi:10.1158/1055-9965.EPI-20-0036.
4. Park, J.-O.; Nam, I.-C.; Kim, C.-S.; Park, S.-J.; Lee, D.-H.; Kim, H.-B.; Han, K.-D.; Joo, Y.-H. Sex Differences in the Prevalence of Head and Neck Cancers: A 10-Year Follow-Up Study of 10 Million Healthy People. *Cancers (Basel)* **2022**, *14*, 2521, doi:10.3390/cancers14102521.
5. Kranjčević, J.-K.; Čonkaš, J.; Ozretić, P. The Role of Estrogen and Estrogen Receptors in Head and Neck Tumors. *Cancers (Basel)* **2024**, *16*, 1575, doi:10.3390/cancers16081575.
6. Niyaz, M.; Khan, M.S.; Mudassar, S. Hedgehog Signaling: An Achilles' Heel in Cancer. *Transl Oncol* **2019**, *12*, 1334–1344, doi:10.1016/j.tranon.2019.07.004.
7. Koga, K.; Nakamura, M.; Nakashima, H.; Akiyoshi, T.; Kubo, M.; Sato, N.; Kuroki, S.; Nomura, M.; Tanaka, M.; Katano, M. Novel Link between Estrogen Receptor Alpha and Hedgehog Pathway in Breast Cancer. *Anticancer Res* **2008**, *28*, 731–740.
8. Sabol, M.; Trnski, D.; Uzarevic, Z.; Ozretic, P.; Musani, V.; Rafaj, M.; Cindric, M.; Levanat, S. Combination of Cyclopamine and Tamoxifen Promotes Survival and Migration of MCF-7 Breast Cancer Cells – Interaction of Hedgehog-Gli and Estrogen Receptor Signaling Pathways. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e114510, doi:10.1371/journal.pone.0114510.
9. Tomić, A.; Čonkaš, J.; Ozretić, P. Let's Talk about Sex Hormone Receptors and Their Physical Interaction with Sonic Hedgehog Protein: A Computational Study with Emphasis on Progesterone Receptor. *Applied Sciences* **2024**, *14*, 562, doi:10.3390/app14020562.
10. Lubin, J.H.; Purdue, M.; Kelsey, K.; Zhang, Z.-F.; Winn, D.; Wei, Q.; Talamini, R.; Szeszenia-Dabrowska, N.; Sturgis, E.M.; Smith, E.; et al. Total Exposure and Exposure Rate Effects for Alcohol and Smoking and Risk of Head and Neck Cancer: A Pooled Analysis of Case-Control Studies. *Am J Epidemiol* **2009**, *170*, 937–947, doi:10.1093/aje/kwp222.
11. Miranda-Galvis, M.; Loveless, R.; Kowalski, L.P.; Teng, Y. Impacts of Environmental Factors on Head and Neck Cancer Pathogenesis and Progression. *Cells* **2021**, *10*, 389, doi:10.3390/cells10020389.
12. Krump, N.A.; You, J. Molecular Mechanisms of Viral Oncogenesis in Humans. *Nat Rev Microbiol* **2018**, *16*, 684–698, doi:10.1038/s41579-018-0064-6.
13. Johnson, D.E.; Burtneess, B.; Leemans, C.R.; Lui, V.W.Y.; Bauman, J.E.; Grandis, J.R. Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Nat Rev Dis Primers* **2020**, *6*, 92, doi:10.1038/s41572-020-00224-3.
14. Michaud, D.S.; Langevin, S.M.; Eliot, M.; Nelson, H.H.; Pawlita, M.; McClean, M.D.; Kelsey, K.T. High-Risk HPV Types and Head and Neck Cancer. *Int J Cancer* **2014**, *135*, 1653–1661, doi:10.1002/ijc.28811.
15. Windon, M.J.; D'Souza, G.; Rettig, E.M.; Westra, W.H.; van Zante, A.; Wang, S.J.; Ryan, W.R.; Mydlarz, W.K.; Ha, P.K.; Miles, B.A.; et al. Increasing Prevalence of Human

- Papillomavirus-Positive Oropharyngeal Cancers among Older Adults. *Cancer* **2018**, *124*, 2993–2999, doi:10.1002/cncr.31385.
16. Osazuwa-Peters, N.; Simpson, M.C.; Zhao, L.; Boakye, E.A.; Olomukoro, S.I.; Deshields, T.; Loux, T.M.; Varvares, M.A.; Schootman, M. Suicide Risk among Cancer Survivors: Head and Neck versus Other Cancers. *Cancer* **2018**, *124*, 4072–4079, doi:10.1002/cncr.31675.
 17. Krishnamurthy, S.; Dong, Z.; Vodopyanov, D.; Imai, A.; Helman, J.I.; Prince, M.E.; Wicha, M.S.; Nör, J.E. Endothelial Cell-Initiated Signaling Promotes the Survival and Self-Renewal of Cancer Stem Cells. *Cancer Res* **2010**, *70*, 9969–9978, doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-1712.
 18. Cramer, J.D.; Burtneess, B.; Le, Q.T.; Ferris, R.L. The Changing Therapeutic Landscape of Head and Neck Cancer. *Nat Rev Clin Oncol* **2019**, *16*, 669–683, doi:10.1038/s41571-019-0227-z.
 19. Lee, N.C.J.; Kelly, J.R.; Park, H.S.; An, Y.; Judson, B.L.; Burtneess, B.A.; Husain, Z.A. Patterns of Failure in High-Metastatic Node Number Human Papillomavirus-Positive Oropharyngeal Carcinoma. *Oral Oncol* **2018**, *85*, 35–39, doi:10.1016/j.oraloncology.2018.08.001.
 20. Golusiński, W. Functional Organ Preservation Surgery in Head and Neck Cancer: Transoral Robotic Surgery and Beyond. *Front Oncol* **2019**, *9*, 293, doi:10.3389/fonc.2019.00293.
 21. Cooper, J.S.; Pajak, T.F.; Forastiere, A.A.; Jacobs, J.; Campbell, B.H.; Saxman, S.B.; Kish, J.A.; Kim, H.E.; Cmelak, A.J.; Rotman, M.; et al. Postoperative Concurrent Radiotherapy and Chemotherapy for High-Risk Squamous-Cell Carcinoma of the Head and Neck. *New England Journal of Medicine* **2004**, *350*, 1937–1944, doi:10.1056/NEJMoa032646.
 22. Adelstein, D.J.; Li, Y.; Adams, G.L.; Wagner, H.; Kish, J.A.; Ensley, J.F.; Schuller, D.E.; Forastiere, A.A. An Intergroup Phase III Comparison of Standard Radiation Therapy and Two Schedules of Concurrent Chemoradiotherapy in Patients with Unresectable Squamous Cell Head and Neck Cancer. *J Clin Oncol* **2003**, *21*, 92–98, doi:10.1200/JCO.2003.01.008.
 23. Posner, M.R.; Hershock, D.M.; Blajman, C.R.; Mickiewicz, E.; Winkvist, E.; Gorbounova, V.; Tjulandin, S.; Shin, D.M.; Cullen, K.; Ervin, T.J.; et al. Cisplatin and Fluorouracil Alone or with Docetaxel in Head and Neck Cancer. *N Engl J Med* **2007**, *357*, 1705–1715, doi:10.1056/NEJMoa070956.
 24. Kozakiewicz, P.; Grzybowska-Szatowska, L. Application of Molecular Targeted Therapies in the Treatment of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Oncol Lett* **2018**, *15*, 7497–7505, doi:10.3892/ol.2018.8300.
 25. Argiris, A.; Karamouzis, M.V.; Raben, D.; Ferris, R.L. Head and Neck Cancer. *Lancet* **2008**, *371*, 1695–1709, doi:10.1016/S0140-6736(08)60728-X.
 26. Lurje, G.; Lenz, H.-J. EGFR Signaling and Drug Discovery. *Oncology* **2009**, *77*, 400–410, doi:10.1159/000279388.
 27. Kang, J.J.; Ko, A.; Kil, S.H.; Mallen-St Clair, J.; Shin, D.S.; Wang, M.B.; Srivatsan, E.S. EGFR Pathway Targeting Drugs in Head and Neck Cancer in the Era of Immunotherapy. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer* **2023**, *1878*, 188827, doi:10.1016/j.bbcan.2022.188827.
 28. McGuire, W.L.; Chamness, G.C.; Costlow, M.E.; Shepherd, R.E. Hormone Dependence in Breast Cancer. *Metabolism* **1974**, *23*, 75–100, doi:10.1016/0026-0495(74)90106-1.
 29. Modugno, F.; Laskey, R.; Smith, A.L.; Andersen, C.L.; Haluska, P.; Oesterreich, S. Hormone Response in Ovarian Cancer: Time to Reconsider as a Clinical Target? *Endocr Relat Cancer* **2012**, *19*, R255–279, doi:10.1530/ERC-12-0175.
 30. Fontana, F.; Limonta, P. Dissecting the Hormonal Signaling Landscape in Castration-Resistant Prostate Cancer. *Cells* **2021**, *10*, 1133, doi:10.3390/cells10051133.
 31. Singh, H.; Kumar, P.; Goel, R.; Kumar, A. Sex Hormones in Head and Neck Cancer: Current Knowledge and Perspectives. *Clin Cancer Investig J* **2012**, *1*, 2–5,

doi:10.4103/2278-0513.95011.

32. Suba, Z. Gender-Related Hormonal Risk Factors for Oral Cancer. *Pathol Oncol Res* **2007**, *13*, 195–202, doi:10.1007/BF02893499.
33. Fuentes, N.; Silveyra, P. Estrogen Receptor Signaling Mechanisms. *Adv Protein Chem Struct Biol* **2019**, *116*, 135–170, doi:10.1016/bs.apcsb.2019.01.001.
34. Evans, C.T.; Ledesma, D.B.; Schulz, T.Z.; Simpson, E.R.; Mendelson, C.R. Isolation and Characterization of a Complementary DNA Specific for Human Aromatase-System Cytochrome P-450 mRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1986**, *83*, 6387–6391, doi:10.1073/pnas.83.17.6387.
35. Vrtačnik, P.; Ostanek, B.; Mencej-Bedrač, S.; Marc, J. The Many Faces of Estrogen Signaling. *Biochem Med* **2014**, *24*, 329–342, doi:10.11613/BM.2014.035.
36. Simpson, E.R. Sources of Estrogen and Their Importance. *J Steroid Biochem Mol Biol* **2003**, *86*, 225–230, doi:10.1016/s0960-0760(03)00360-1.
37. Hu, J.; Zhang, Z.; Shen, W.-J.; Azhar, S. Cellular Cholesterol Delivery, Intracellular Processing and Utilization for Biosynthesis of Steroid Hormones. *Nutr Metab (Lond)* **2010**, *7*, 47, doi:10.1186/1743-7075-7-47.
38. Micheli, A.; Ciampichini, R.; Oberaigner, W.; Ciccolallo, L.; de Vries, E.; Izarzugaza, I.; Zambon, P.; Gatta, G.; De Angelis, R.; EURO CARE Working Group The Advantage of Women in Cancer Survival: An Analysis of EURO CARE-4 Data. *Eur J Cancer* **2009**, *45*, 1017–1027, doi:10.1016/j.ejca.2008.11.008.
39. Hashim, D.; Sartori, S.; Vecchia, C.L.; Serraino, D.; Maso, L.D.; Negri, E.; Smith, E.; Levi, F.; Boccia, S.; Cadoni, G.; et al. Hormone Factors Play a Favorable Role in Female Head and Neck Cancer Risk. *Cancer Medicine* **2017**, *6*, 1998–2007, doi:10.1002/cam4.1136.
40. Freedman, N.D.; Lacey, J.V.; Hollenbeck, A.R.; Leitzmann, M.F.; Schatzkin, A.; Abnet, C.C. The Association of Menstrual and Reproductive Factors with Upper Gastrointestinal Tract Cancers in the NIH-AARP Cohort. *Cancer* **2010**, *116*, 1572–1581, doi:10.1002/ncr.24880.
41. Yuk, J.-S.; Kim, B.Y. Relationship between Menopausal Hormone Therapy and Oral Cancer: A Cohort Study Based on the Health Insurance Database in South Korea. *Journal of Clinical Medicine* **2022**, *11*, 5848, doi:10.3390/jcm11195848.
42. Castro, G.D.; Castro, J.A. Alcohol Drinking and Mammary Cancer: Pathogenesis and Potential Dietary Preventive Alternatives. *World J Clin Oncol* **2014**, *5*, 713–729, doi:10.5306/wjco.v5.i4.713.
43. Purohit, V. Can Alcohol Promote Aromatization of Androgens to Estrogens? A Review. *Alcohol* **2000**, *22*, 123–127, doi:10.1016/S0741-8329(00)00124-5.
44. Peltonen, J.; Tuomainen, K.; Sallinen, T.; Faress, I.; Suleymanova, I.; Al-Samadi, A.; Salo, T.; Åström, P. Effect of Sex Steroid Hormones on Tongue Cancer Cells In Vitro. *Anticancer Research* **2020**, *40*, 6029–6037, doi:10.21873/anticancer.14624.
45. Robbins, K.T.; Vu, T.P.; Diaz, A.; Varki, N.M. Growth Effects of Tamoxifen and Estradiol on Laryngeal Carcinoma Cell Lines. *Archives of Otolaryngology–Head & Neck Surgery* **1994**, *120*, 1261–1266, doi:10.1001/archotol.1994.01880350067012.
46. Yoo, H.J.; Sepkovic, D.W.; Bradlow, H.L.; Yu, G.P.; Sirilian, H.V.; Schantz, S.P. Estrogen Metabolism as a Risk Factor for Head and Neck Cancer. *Otolaryngol Head Neck Surg* **2001**, *124*, 241–247, doi:10.1067/mhn.2001.113507.
47. Shatalova, E.G.; Klein-Szanto, A.J.P.; Devarajan, K.; Cukierman, E.; Clapper, M.L. Estrogen and Cytochrome P450 1B1 Contribute to Both Early- and Late-Stage Head and Neck Carcinogenesis. *Cancer Prevention Research* **2011**, *4*, 107–115, doi:10.1158/1940-6207.CAPR-10-0133.
48. Grober, O.M.; Mutarelli, M.; Giurato, G.; Ravo, M.; Cicatiello, L.; De Filippo, M.R.; Ferraro, L.; Nassa, G.; Papa, M.F.; Paris, O.; et al. Global Analysis of Estrogen Receptor

- Beta Binding to Breast Cancer Cell Genome Reveals an Extensive Interplay with Estrogen Receptor Alpha for Target Gene Regulation. *BMC Genomics* **2011**, *12*, 36, doi:10.1186/1471-2164-12-36.
49. Weikum, E.R.; Liu, X.; Ortlund, E.A. The Nuclear Receptor Superfamily: A Structural Perspective. *Protein Sci* **2018**, *27*, 1876–1892, doi:10.1002/pro.3496.
 50. Flouriot, G.; Brand, H.; Denger, S.; Metivier, R.; Kos, M.; Reid, G.; Sonntag-Buck, V.; Gannon, F. Identification of a New Isoform of the Human Estrogen Receptor-alpha (hER- α) That Is Encoded by Distinct Transcripts and That Is Able to Repress hER- α Activation Function 1. *The EMBO Journal* **2000**, *19*, 4688–4700, doi:10.1093/emboj/19.17.4688.
 51. Wang, Z.; Zhang, X.; Shen, P.; Loggie, B.W.; Chang, Y.; Deuel, T.F. Identification, Cloning, and Expression of Human Estrogen Receptor-A36, a Novel Variant of Human Estrogen Receptor-A66. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2005**, *336*, 1023–1027, doi:10.1016/j.bbrc.2005.08.226.
 52. Enmark, E.; Peltö-Huikko, M.; Grandien, K.; Lagercrantz, S.; Lagercrantz, J.; Fried, G.; Nordenskjöld, M.; Gustafsson, J.-Å. Human Estrogen Receptor β -Gene Structure, Chromosomal Localization, and Expression Pattern1. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **1997**, *82*, 4258–4265, doi:10.1210/jcem.82.12.4470.
 53. Ogawa, S. Molecular Cloning and Characterization of Human Estrogen Receptor Beta α : A Potential Inhibitor of Estrogen Action in Human. *Nucleic Acids Research* **1998**, *26*, 3505–3512, doi:10.1093/nar/26.15.3505.
 54. Klinge, C.M. Estrogen Receptor Interaction with Estrogen Response Elements. *Nucleic Acids Research* **2001**, *29*, 2905–2919, doi:10.1093/nar/29.14.2905.
 55. Porter, B.A.; Ortiz, M.A.; Bratslavsky, G.; Kotula, L. Structure and Function of the Nuclear Receptor Superfamily and Current Targeted Therapies of Prostate Cancer. *Cancers* **2019**, *11*, 1852, doi:10.3390/cancers11121852.
 56. Savatier, J.; Jalaguier, S.; Ferguson, M.L.; Cavallès, V.; Royer, C.A. Estrogen Receptor Interactions and Dynamics Monitored in Live Cells by Fluorescence Cross-Correlation Spectroscopy. *Biochemistry* **2010**, *49*, 772–781, doi:10.1021/bi9013006.
 57. Hall, J.M.; McDonnell, D.P.; Korach, K.S. Allosteric Regulation of Estrogen Receptor Structure, Function, and Coactivator Recruitment by Different Estrogen Response Elements. *Molecular Endocrinology* **2002**, *16*, 469–486, doi:10.1210/mend.16.3.0814.
 58. Hall, J.M.; McDonnell, D.P. The Estrogen Receptor β -Isoform (ER β) of the Human Estrogen Receptor Modulates ER α Transcriptional Activity and Is a Key Regulator of the Cellular Response to Estrogens and Antiestrogens1. *Endocrinology* **1999**, *140*, 5566–5578, doi:10.1210/endo.140.12.7179.
 59. Doll, C.; Arsenic, R.; Lage, H.; Jöhrens, K.; Hartwig, S.; Nelson, K.; Raguse, J.D. Expression of Estrogen Receptors in OSCC in Relation to Histopathological Grade. *Anticancer Res* **2015**, *35*, 5867–5872.
 60. Ishida, H.; Wada, K.; Masuda, T.; Okura, M.; Kohama, K.; Sano, Y.; Nakajima, A.; Kogo, M.; Kamisaki, Y. Critical Role of Estrogen Receptor on Anoikis and Invasion of Squamous Cell Carcinoma. *Cancer Science* **2007**, *98*, 636–643, doi:10.1111/j.1349-7006.2007.00437.x.
 61. Marocchio, L.S.; Giudice, F.; Corrêa, L.; Pinto Junior, D.D.S.; De Sousa, S.O.M. Estrogens and Androgen Receptors in Oral Squamous Cell Carcinoma. *Acta Odontologica Scandinavica* **2013**, *71*, 1513–1519, doi:10.3109/00016357.2013.775335.
 62. Lukits, J.; Remenár, E.; Rásó, E.; Ladányi, A.; Kásler, M.; Tímár, J. Molecular Identification, Expression and Prognostic Role of Estrogen- and Progesterone Receptors in Head and Neck Cancer. *Int J Oncol* **2007**, *30*, 155–160, doi:10.3892/ijo.30.1.155.
 63. Fei, M.; Zhang, J.; Zhou, J.; Xu, Y.; Wang, J. Sex-Related Hormone Receptor in Laryngeal Squamous Cell Carcinoma: Correlation with Androgen Estrogen- α and Prolactin Receptor

- Expression and Influence of Prognosis. *Acta Otolaryngol* **2018**, *138*, 66–72, doi:10.1080/00016489.2017.1373851.
64. Fan, D.; Liu, S.Y.W.; van Hasselt, C.A.; Vlantis, A.C.; Ng, E.K.W.; Zhang, H.; Dong, Y.; Ng, S.K.; Chu, R.; Chan, A.B.W.; et al. Estrogen Receptor α Induces Prosurvival Autophagy in Papillary Thyroid Cancer via Stimulating Reactive Oxygen Species and Extracellular Signal Regulated Kinases. *J Clin Endocrinol Metab* **2015**, *100*, E561–571, doi:10.1210/jc.2014-3257.
 65. Huang, Y.; Dong, W.; Li, J.; Zhang, H.; Shan, Z.; Teng, W. Differential Expression Patterns and Clinical Significance of Estrogen Receptor- α and β in Papillary Thyroid Carcinoma. *BMC Cancer* **2014**, *14*, 383, doi:10.1186/1471-2407-14-383.
 66. Grsic, K.; Opacic, I.L.; Sitic, S.; Milkovic Perisa, M.; Sutton, P.; Sarcevic, B. The Prognostic Significance of Estrogen Receptor β in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Oncol Lett* **2016**, *12*, 3861–3865, doi:10.3892/ol.2016.5142.
 67. Koenigs, M.B.; Lefranc-Torres, A.; Bonilla-Velez, J.; Patel, K.B.; Hayes, D.N.; Glomski, K.; Busse, P.M.; Chan, A.W.; Clark, J.R.; Deschler, D.G.; et al. Association of Estrogen Receptor Alpha Expression With Survival in Oropharyngeal Cancer Following Chemoradiation Therapy. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute* **2019**, *111*, 933–942, doi:10.1093/jnci/djy224.
 68. Kwon, S.; Ahn, S.-H.; Jeong, W.-J.; Jung, Y.H.; Bae, Y.J.; Paik, J.H.; Chung, J.-H.; Kim, H. Estrogen Receptor α as a Predictive Biomarker for Survival in Human Papillomavirus-Positive Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma. *Journal of Translational Medicine* **2020**, *18*, 240, doi:10.1186/s12967-020-02396-8.
 69. Doll, C.; Bestendonek, C.; Kreutzer, K.; Neumann, K.; Pohrt, A.; Trzpis, I.; Koerdt, S.; Dommerich, S.; Heiland, M.; Raguse, J.-D.; et al. Prognostic Significance of Estrogen Receptor Alpha in Oral Squamous Cell Carcinoma. *Cancers* **2021**, *13*, 5763, doi:10.3390/cancers13225763.
 70. Drake, V.; Bigelow, E.; Fakhry, C.; Windon, M.; Rooper, L.M.; Ha, P.; Miles, B.; Gourin, C.; Mandal, R.; Mydlarz, W.; et al. Biologic and Behavioral Associations of Estrogen Receptor Alpha Positivity in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Oral Oncology* **2021**, *121*, 105461, doi:10.1016/j.oraloncology.2021.105461.
 71. Siegfried, J.M.; Stabile, L.P. Estrongenetic Steroid Hormones in Lung Cancer. *Semin Oncol* **2014**, *41*, 5–16, doi:10.1053/j.seminoncol.2013.12.009.
 72. Marino, M.; Ascenzi, P. Membrane Association of Estrogen Receptor Alpha and Beta Influences 17 β -Estradiol-Mediated Cancer Cell Proliferation. *Steroids* **2008**, *73*, 853–858, doi:10.1016/j.steroids.2007.12.003.
 73. Filardo, E.J.; Quinn, J.A.; Bland, K.I.; Frackelton, A.R. Estrogen-Induced Activation of Erk-1 and Erk-2 Requires the G Protein-Coupled Receptor Homolog, GPR30, and Occurs via Trans-Activation of the Epidermal Growth Factor Receptor through Release of HB-EGF. *Molecular Endocrinology* **2000**, *14*, 1649–1660, doi:10.1210/mend.14.10.0532.
 74. Sula, A.; Hollingworth, D.; Ng, L.C.T.; Larmore, M.; DeCaen, P.G.; Wallace, B.A. A Tamoxifen Receptor within a Voltage-Gated Sodium Channel. *Molecular Cell* **2021**, *81*, 1160–1169.e5, doi:10.1016/j.molcel.2020.12.048.
 75. Qiu, J.; Bosch, M.A.; Tobias, S.C.; Grandy, D.K.; Scanlan, T.S.; Rønnekleiv, O.K.; Kelly, M.J. Rapid Signaling of Estrogen in Hypothalamic Neurons Involves a Novel G-Protein-Coupled Estrogen Receptor That Activates Protein Kinase C. *J. Neurosci.* **2003**, *23*, 9529–9540, doi:10.1523/JNEUROSCI.23-29-09529.2003.
 76. Toran-Allerand, C.D.; Guan, X.; MacLusky, N.J.; Horvath, T.L.; Diano, S.; Singh, M.; Connolly, E.S.; Nethrapalli, I.S.; Tinnikov, A.A. ER-X: A Novel, Plasma Membrane-Associated, Putative Estrogen Receptor That Is Regulated during Development and after Ischemic Brain Injury. *J Neurosci* **2002**, *22*, 8391–8401, doi:10.1523/JNEUROSCI.22-19-

08391.2002.

77. Soltysik, K.; Czekaj, P. Membrane Estrogen Receptors - Is It an Alternative Way of Estrogen Action? *J Physiol Pharmacol* **2013**, *64*, 129–142.
78. Rosano, C.; Ponassi, M.; Santolla, M.F.; Pisano, A.; Felli, L.; Vivacqua, A.; Maggiolini, M.; Lappano, R. Macromolecular Modelling and Docking Simulations for the Discovery of Selective GPER Ligands. *AAPS J* **2016**, *18*, 41–46, doi:10.1208/s12248-015-9844-3.
79. Arterburn, J.B.; Prossnitz, E.R. G Protein–Coupled Estrogen Receptor GPER: Molecular Pharmacology and Therapeutic Applications. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2023**, *63*, 295–320, doi:10.1146/annurev-pharmtox-031122-121944.
80. Masi, M.; Racchi, M.; Travelli, C.; Corsini, E.; Buoso, E. Molecular Characterization of Membrane Steroid Receptors in Hormone-Sensitive Cancers. *Cells* **2021**, *10*, 2999, doi:10.3390/cells10112999.
81. Filardo, E.J.; Thomas, P. Minireview: G Protein-Coupled Estrogen Receptor-1, GPER-1: Its Mechanism of Action and Role in Female Reproductive Cancer, Renal and Vascular Physiology. *Endocrinology* **2012**, *153*, 2953–2962, doi:10.1210/en.2012-1061.
82. Revankar, C.M.; Cimino, D.F.; Sklar, L.A.; Arterburn, J.B.; Prossnitz, E.R. A Transmembrane Intracellular Estrogen Receptor Mediates Rapid Cell Signaling. *Science* **2005**, *307*, 1625–1630, doi:10.1126/science.1106943.
83. Thomas, P.; Pang, Y.; Filardo, E.J.; Dong, J. Identity of an Estrogen Membrane Receptor Coupled to a G Protein in Human Breast Cancer Cells. *Endocrinology* **2005**, *146*, 624–632, doi:10.1210/en.2004-1064.
84. Grande, F.; Occhiuzzi, M.A.; Lappano, R.; Cirillo, F.; Guzzi, R.; Garofalo, A.; Jacquot, Y.; Maggiolini, M.; Rizzuti, B. Computational Approaches for the Discovery of GPER Targeting Compounds. *Front. Endocrinol.* **2020**, *11*, 517, doi:10.3389/fendo.2020.00517.
85. Cao, L.-Y.; Ren, X.-M.; Li, C.-H.; Zhang, J.; Qin, W.-P.; Yang, Y.; Wan, B.; Guo, L.-H. Bisphenol AF and Bisphenol B Exert Higher Estrogenic Effects than Bisphenol A via G Protein-Coupled Estrogen Receptor Pathway. *Environ Sci Technol* **2017**, *51*, 11423–11430, doi:10.1021/acs.est.7b03336.
86. Méndez-Luna, D.; Martínez-Archundia, M.; Maroun, R.C.; Ceballos-Reyes, G.; Fragosó-Vázquez, M.J.; González-Juárez, D.E.; Correa-Basurto, J. Deciphering the GPER/GPR30-Agonist and Antagonists Interactions Using Molecular Modeling Studies, Molecular Dynamics, and Docking Simulations. *J Biomol Struct Dyn* **2015**, *33*, 2161–2172, doi:10.1080/07391102.2014.994102.
87. Qin, C.; Lu, Y.; Zhang, H.; Zhang, Z.; Xu, W.; Wen, S.; Gao, W.; Wu, Y. Biological Roles and Clinical Significance of Estrogen and Androgen Receptors in Head and Neck Cancers. *J. Cancer* **2022**, *13*, 2189–2199, doi:10.7150/jca.66707.
88. Pepermans, R.A.; Sharma, G.; Prossnitz, E.R. G Protein-Coupled Estrogen Receptor in Cancer and Stromal Cells: Functions and Novel Therapeutic Perspectives. *Cells* **2021**, *10*, 672, doi:10.3390/cells10030672.
89. Litt, M. Localization of a Human Brain Sodium Channel Gene (SCN2A) to Chromosome 2. *Genomics* **1989**, *5*, 204–208, doi:10.1016/0888-7543(89)90047-5.
90. De Lera Ruiz, M.; Kraus, R.L. Voltage-Gated Sodium Channels: Structure, Function, Pharmacology, and Clinical Indications. *J. Med. Chem.* **2015**, *58*, 7093–7118, doi:10.1021/jm501981g.
91. Smitherman, K.A.; Sontheimer, H. Inhibition of Glial Na⁺ and K⁺ Currents by Tamoxifen. *J. Membrane Biol.* **2001**, *181*, 125–135, doi:10.1007/s00232-001-0016-2.
92. Mao, W.; Zhang, J.; Körner, H.; Jiang, Y.; Ying, S. The Emerging Role of Voltage-Gated Sodium Channels in Tumor Biology. *Front. Oncol.* **2019**, *9*, 124, doi:10.3389/fonc.2019.00124.
93. Wang, Z.; Zhang, X.; Shen, P.; Loggie, B.W.; Chang, Y.; Deuel, T.F. A Variant of Estrogen

- Receptor- α , hER- α 36: Transduction of Estrogen- and Antiestrogen-Dependent Membrane-Initiated Mitogenic Signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2006**, *103*, 9063–9068, doi:10.1073/pnas.0603339103.
94. Lin, S.-L.; Yan, L.-Y.; Zhang, X.-T.; Yuan, J.; Li, M.; Qiao, J.; Wang, Z.-Y.; Sun, Q.-Y. ER-A36, a Variant of ER- α , Promotes Tamoxifen Agonist Action in Endometrial Cancer Cells via the MAPK/ERK and PI3K/Akt Pathways. *PLOS ONE* **2010**, *5*, e9013, doi:10.1371/journal.pone.0009013.
 95. Tong, J.-S.; Zhang, Q.-H.; Wang, Z.-B.; Yang, C.-R.; Fu, X.-Q.; Hou, Y.; Wang, Z.-Y.; Sheng, J.; Sun, Q.-Y. ER-A36, a Novel Variant of ER- α , Mediates Estrogen-Stimulated Proliferation of Endometrial Carcinoma Cells via the PKC δ /ERK Pathway. **2010**, *5*, doi:10.1371/journal.pone.0015408.
 96. Schwartz, N.; Chaudhri, R.A.; Hadadi, A.; Schwartz, Z.; Boyan, B.D. 17Beta-Estradiol Promotes Aggressive Laryngeal Cancer Through Membrane-Associated Estrogen Receptor-Alpha 36. *Horm Canc* **2014**, *5*, 22–32, doi:10.1007/s12672-013-0161-y.
 97. Chaudhri, R.A.; Olivares-Navarrete, R.; Cuenca, N.; Hadadi, A.; Boyan, B.D.; Schwartz, Z. Membrane Estrogen Signaling Enhances Tumorigenesis and Metastatic Potential of Breast Cancer Cells via Estrogen Receptor-A36 (ER α 36). *J Biol Chem* **2012**, *287*, 7169–7181, doi:10.1074/jbc.M111.292946.
 98. Li, S.; Wang, B.; Tang, Q.; Liu, J.; Yang, X. Bisphenol A Triggers Proliferation and Migration of Laryngeal Squamous Cell Carcinoma via GPER Mediated Upregulation of IL-6. *Cell Biochemistry & Function* **2017**, *35*, 209–216, doi:10.1002/cbf.3265.
 99. Fan, Y.-C.; Wu, W.; Leng, X.-F.; Zhang, H.-W. Utility of G Protein-Coupled Oestrogen Receptor 1 as a Biomarker for Pan-Cancer Diagnosis, Prognosis and Immune Infiltration: A Comprehensive Bioinformatics Analysis. *Aging* **2023**, *15*, 12021–12067, doi:10.18632/aging.205162.
 100. Gao, R.; Shen, Y.; Cai, J.; Lei, M.; Wang, Z. Expression of Voltage-Gated Sodium Channel α Subunit in Human Ovarian Cancer. *Oncol Rep* **2010**, *23*, doi:10.3892/or_00000763.
 101. Pinatti, L.M.; Walline, H.M.; Carey, T.E. Human Papillomavirus Genome Integration and Head and Neck Cancer. *J Dent Res* **2018**, *97*, 691–700, doi:10.1177/0022034517744213.
 102. Irimie, A.; Braicu, C.; Cojocneanu, R.; Magdo, L.; Onaciu, A.; Ciocan, C.; Mehterov, N.; Dudea, D.; Buduru, S.; Berindan-Neagoe, I. Differential Effect of Smoking on Gene Expression in Head and Neck Cancer Patients. *IJERPH* **2018**, *15*, 1558, doi:10.3390/ijerph15071558.
 103. Verma, A.; Schwartz, N.; Cohen, D.J.; Patel, V.; Nageris, B.; Bachar, G.; Boyan, B.D.; Schwartz, Z. Loss of Estrogen Receptors Is Associated with Increased Tumor Aggression in Laryngeal Squamous Cell Carcinoma. *Sci Rep* **2020**, *10*, 4227, doi:10.1038/s41598-020-60675-2.
 104. Lee, C.I.; Goodwin, A.; Wilcken, N. Fulvestrant for Hormone-sensitive Metastatic Breast Cancer. *Cochrane Database Syst Rev* **2017**, *2017*, CD011093, doi:10.1002/14651858.CD011093.pub2.
 105. Wakeling, A.E. Similarities and Distinctions in the Mode of Action of Different Classes of Antioestrogens. *Endocrine-related cancer* **2000**, 17–28, doi:10.1677/erc.0.0070017.
 106. Hoffmann, T.K.; Bojar, H.; Eckel, J.; Van Lierop, A.; Balz, V.; Friebe-Hoffmann, U.; Hauser, U.; Bier, H. Effects of Tamoxifen on Human Squamous Cell Carcinoma Lines of the Head and Neck: *Anti-Cancer Drugs* **2002**, *13*, 521–531, doi:10.1097/00001813-200206000-00011.
 107. Grenman, R.; Virolainen, E.; Shapira, A.; Carey, T. In Vitro Effects of Tamoxifen on UM-SCC Head and Neck Cancer Cell Lines: Correlation with the Estrogen and

- Progesterone Receptor Content. *Int J Cancer* **1987**, 39, 77–81, doi:10.1002/ijc.2910390114.
108. Tavassoli, M.; Soltaninia, J.; Rudnicka, J.; Mashanyare, D.; Johnson, N.; Gäken, J. Tamoxifen Inhibits the Growth of Head and Neck Cancer Cells and Sensitizes These Cells to Cisplatin Induced-Apoptosis: Role of TGF-B1. *Carcinogenesis* **2002**, 23, 1569–1575, doi:10.1093/carcin/23.10.1569.
 109. Kim, M.-J.; Lee, J.-H.; Kim, Y.-K.; Myoung, H.; Yun, P.-Y. The Role of Tamoxifen in Combination with Cisplatin on Oral Squamous Cell Carcinoma Cell Lines. *Cancer Letters* **2007**, 245, 284–292, doi:10.1016/j.canlet.2006.01.017.
 110. Nakata, B.; Albright, K.D.; Barton, R.M.; Howell, S.B.; Los, G. Synergistic Interaction between Cisplatin and Tamoxifen Delays the Emergence of Cisplatin Resistance in Head and Neck Cancer Cell Lines. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **1995**, 35, 511–518, doi:10.1007/BF00686837.
 111. Zhang, X.; Ding, L.; Kang, L.; Wang, Z.-Y. Estrogen Receptor-Alpha 36 Mediates Mitogenic Antiestrogen Signaling in ER-Negative Breast Cancer Cells. *PLOS ONE* **2012**, 7, e30174, doi:10.1371/journal.pone.0030174.
 112. Wang, Z.-Y.; Yin, L. Estrogen Receptor Alpha-36 (ER-A36): A New Player in Human Breast Cancer. *Mol Cell Endocrinol* **2015**, 418 Pt 3, 193–206, doi:10.1016/j.mce.2015.04.017.
 113. Su, X.; Xu, X.; Li, G.; Lin, B.; Cao, J.; Teng, L. ER-A36: A Novel Biomarker and Potential Therapeutic Target in Breast Cancer. *Onco Targets Ther* **2014**, 7, 1525–1533, doi:10.2147/OTT.S65345.
 114. Osborne, C.K.; Wakeling, A.; Nicholson, R.I. Fulvestrant: An Oestrogen Receptor Antagonist with a Novel Mechanism of Action. *Br J Cancer* **2004**, 90, S2–S6, doi:10.1038/sj.bjc.6601629.
 115. Fawell, S.E.; White, R.; Hoare, S.; Sydenham, M.; Page, M.; Parker, M.G. Inhibition of Estrogen Receptor-DNA Binding by the “Pure” Antiestrogen ICI 164,384 Appears to Be Mediated by Impaired Receptor Dimerization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1990**, 87, 6883–6887, doi:10.1073/pnas.87.17.6883.
 116. Kang, L.; Wang, Z.-Y. Breast Cancer Cell Growth Inhibition by Phenethyl Isothiocyanate Is Associated with Down-Regulation of Oestrogen Receptor-Alpha36. *J Cell Mol Med* **2010**, 14, 1485–1493, doi:10.1111/j.1582-4934.2009.00877.x.
 117. Grünow, J.; Rong, C.; Hischmann, J.; Zaoui, K.; Flechtenmacher, C.; Weber, K.-J.; Plinkert, P.; Hess, J. Regulation of Submaxillary Gland Androgen-Regulated Protein 3A via Estrogen Receptor 2 in Radioresistant Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Cells. *J Exp Clin Cancer Res* **2017**, 36, 25, doi:10.1186/s13046-017-0496-2.
 118. Nelson, K.; Helmstaedter, V.; Moreau, C.; Lage, H. Estradiol, Tamoxifen and ICI 182,780 Alter A3 and B1 Integrin Expression and Laminin-1 Adhesion in Oral Squamous Cell Carcinoma Cell Cultures. *Oral Oncology* **2008**, 44, 94–99, doi:10.1016/j.oraloncology.2007.01.007.
 119. Singh, M.M. Centchroman, a Selective Estrogen Receptor Modulator, as a Contraceptive and for the Management of Hormone-related Clinical Disorders. *Medicinal Research Reviews* **2001**, 21, 302–347, doi:10.1002/med.1011.
 120. Lal, J. Clinical Pharmacokinetics and Interaction of Centchroman — A Mini Review. *Contraception* **2010**, 81, 275–280, doi:10.1016/j.contraception.2009.11.007.
 121. Srivastava, V.K.; Gara, R.K.; Bhatt, M.L.B.; Sahu, D.P.; Mishra, D.P. Centchroman Inhibits Proliferation of Head and Neck Cancer Cells through the Modulation of PI3K/mTOR Pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2011**, 404, 40–45, doi:10.1016/j.bbrc.2010.11.049.
 122. Nüsslein-Volhard, C.; Wieschaus, E. Mutations Affecting Segment Number and

- Polarity in *Drosophila*. *Nature* **1980**, 287, 795–801.
123. Ingham, P.W. Hedgehog Signaling in Animal Development: Paradigms and Principles. *Genes & Development* **2001**, 15, 3059–3087, doi:10.1101/gad.938601.
 124. Kinzler, K.; Bigner, S.; Bigner, D.; Trent, J.; Law, M.; O'Brien, S.; Wong, A.; Vogelstein, B. Identification of an Amplified, Highly Expressed Gene in a Human Glioma. *Science* **1987**, 236, 70–73, doi:10.1126/science.3563490.
 125. Kinzler, K.W.; Vogelstein, B. The GLI Gene Encodes a Nuclear Protein Which Binds Specific Sequences in the Human Genome. *Molecular and Cellular Biology* **1990**, 10, 634–642.
 126. Ruppert, J.M.; Kinzler, K.W.; Wong, A.J.; Bigner, S.H.; Kao, F.T.; Law, M.L.; Seuanez, H.N.; O'Brien, S.J.; Vogelstein, B. The GLI-Kruppel Family of Human Genes. *Mol. Cell. Biol* **1988**, 8, 3104–3113.
 127. Rohatgi, R.; Milenkovic, L.; Scott, M.P. Patched1 Regulates Hedgehog Signaling at the Primary Cilium. *Science* **2007**, 317, 372–376, doi:10.1126/science.1139740.
 128. Sharpe, H.J.; Pau, G.; Dijkgraaf, G.J.; Basset-Seguin, N.; Modrusan, Z.; Januario, T.; Tsui, V.; Durham, A.B.; Dlugosz, A.A.; Haverty, P.M.; et al. Genomic Analysis of Smoothed Inhibitor Resistance in Basal Cell Carcinoma. *Cancer Cell* **2015**, 27, 327–341, doi:10.1016/j.ccell.2015.02.001.
 129. Luchetti, G.; Sircar, R.; Kong, J.H.; Nachtergaele, S.; Sagner, A.; Byrne, E.F.; Covey, D.F.; Siebold, C.; Rohatgi, R. Cholesterol Activates the G-Protein Coupled Receptor Smoothed to Promote Hedgehog Signaling. *eLife* **2016**, 5, doi:10.7554/eLife.20304.
 130. Shi, Q.; Han, Y.; Jiang, J. Suppressor of Fused Impedes Ci/Gli Nuclear Import by Opposing Trn/Kap β 2 in Hedgehog Signaling. *J Cell Sci* **2014**, jcs.142828, doi:10.1242/jcs.142828.
 131. Huntzicker, E.G. Dual Degradation Signals Control Gli Protein Stability and Tumor Formation. *Genes & Development* **2006**, 20, 276–281, doi:10.1101/gad.1380906.
 132. Pan, Y.; Bai, C.B.; Joyner, A.L.; Wang, B. Sonic Hedgehog Signaling Regulates Gli2 Transcriptional Activity by Suppressing Its Processing and Degradation. *Molecular and cellular biology* **2006**, 26, 3365–3377.
 133. Takenaka, K.; Kise, Y.; Miki, H. GSK3 [Beta] Positively Regulates Hedgehog Signaling through Sufu in Mammalian Cells. *Biochemical and biophysical research communications* **2007**, 353, 501–508.
 134. Katoh, Y.; Katoh, M. Hedgehog Target Genes: Mechanisms of Carcinogenesis Induced by Aberrant Hedgehog Signaling Activation. *Current Molecular Medicine* **2009**, 9, 873–886.
 135. Jenkins, D. Hedgehog Signalling: Emerging Evidence for Non-Canonical Pathways. *Cell Signal* **2009**, 21, 1023–1034, doi:10.1016/j.cellsig.2009.01.033.
 136. Brennan, D.; Chen, X.; Cheng, L.; Mahoney, M.; Riobo, N.A. Noncanonical Hedgehog Signaling. *Vitam Horm* **2012**, 88, 55–72, doi:10.1016/B978-0-12-394622-5.00003-1.
 137. Girardi, D.; Barrichello, A.; Fernandes, G.; Pereira, A. Targeting the Hedgehog Pathway in Cancer: Current Evidence and Future Perspectives. *Cells* **2019**, 8, 153, doi:10.3390/cells8020153.
 138. Riquelme, I.; Roa, J.C. Activated Status of Hedgehog Pathway in Oral Squamous Cell Carcinoma (OSCC): The Door Is Still Open. *Translational Cancer Research* **2016**, 5, doi:10.3978/j.issn.2218-676X.2016.01.01.
 139. Yoo, Y.A.; Kang, M.H.; Lee, H.J.; Kim, B.; Park, J.K.; Kim, H.K.; Kim, J.S.; Oh, S.C. Sonic Hedgehog Pathway Promotes Metastasis and Lymphangiogenesis via Activation of Akt, EMT, and MMP-9 Pathway in Gastric Cancer. *Cancer Research* **2011**, 71, 7061–7070, doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-1338.
 140. Po, A.; Silvano, M.; Miele, E.; Capalbo, C.; Eramo, A.; Salvati, V.; Todaro, M.;

- Besharat, Z.M.; Catanzaro, G.; Cucchi, D.; et al. Noncanonical GLI1 Signaling Promotes Stemness Features and in Vivo Growth in Lung Adenocarcinoma. *Oncogene* **2017**, *36*, 4641–4652, doi:10.1038/onc.2017.91.
141. Matsui, W.H. Cancer Stem Cell Signaling Pathways. *Medicine (Baltimore)* **2016**, *95*, S8–S19, doi:10.1097/MD.00000000000004765.
 142. Chiang, C.; Litingtung, Y.; Lee, E.; Young, K.E.; Corden, J.L.; Westphal, H.; Beachy, P.A. Cyclopia and Defective Axial Patterning in Mice Lacking Sonic Hedgehog Gene Function. *Nature* **1996**, *383*, 407–413, doi:10.1038/383407a0.
 143. Xu, J.; Iyyanar, P.P.R.; Lan, Y.; Jiang, R. Sonic Hedgehog Signaling in Craniofacial Development. *Differentiation* **2023**, *133*, 60–76, doi:10.1016/j.diff.2023.07.002.
 144. Belloni, E.; Muenke, M.; Roessler, E.; Traverso, G.; Siegel-Bartelt, J.; Frumkin, A.; Mitchell, H.F.; Donis-Keller, H.; Helms, C.; Hing, A.V.; et al. Identification of Sonic Hedgehog as a Candidate Gene Responsible for Holoprosencephaly. *Nat Genet* **1996**, *14*, 353–356, doi:10.1038/ng1196-353.
 145. Hu, D.; Helms, J.A. The Role of Sonic Hedgehog in Normal and Abnormal Craniofacial Morphogenesis. *Development* **1999**, *126*, 4873–4884, doi:10.1242/dev.126.21.4873.
 146. Abramyan, J. Hedgehog Signaling and Embryonic Craniofacial Disorders. *J Dev Biol* **2019**, *7*, 9, doi:10.3390/jdb7020009.
 147. He, Q.; Hao, X.; Bao, S.; Wu, X.; Xu, L.; Hou, Y.; Huang, Y.; Peng, L.; Huang, H.; Ding, Y.; et al. A392V and R945X Mutations Cause Orofacial Clefts via Impairing PTCH1 Function. *Genomics* **2022**, *114*, 110507, doi:10.1016/j.ygeno.2022.110507.
 148. Kurosaka, H. The Roles of Hedgehog Signaling in Upper Lip Formation. *Biomed Res Int* **2015**, *2015*, 901041, doi:10.1155/2015/901041.
 149. Heyne, G.W.; Melberg, C.G.; Doroodchi, P.; Parins, K.F.; Kietzman, H.W.; Everson, J.L.; Ansen-Wilson, L.J.; Lipinski, R.J. Definition of Critical Periods for Hedgehog Pathway Antagonist-Induced Holoprosencephaly, Cleft Lip, and Cleft Palate. *PLOS ONE* **2015**, *10*, e0120517, doi:10.1371/journal.pone.0120517.
 150. Seppala, M.; Fraser, G.J.; Birjandi, A.A.; Xavier, G.M.; Cobourne, M.T. Sonic Hedgehog Signaling and Development of the Dentition. *J Dev Biol* **2017**, *5*, 6, doi:10.3390/jdb5020006.
 151. Hosoya, A.; Shalehin, N.; Takebe, H.; Shimo, T.; Irie, K. Sonic Hedgehog Signaling and Tooth Development. *Int J Mol Sci* **2020**, *21*, 1587, doi:10.3390/ijms21051587.
 152. Cochrane, C.; Szczepny, A.; Watkins, D.; Cain, J. Hedgehog Signaling in the Maintenance of Cancer Stem Cells. *Cancers* **2015**, *7*, 1554–1585, doi:10.3390/cancers7030851.
 153. Yauch, R.L.; Gould, S.E.; Scales, S.J.; Tang, T.; Tian, H.; Ahn, C.P.; Marshall, D.; Fu, L.; Januario, T.; Kallop, D.; et al. A Paracrine Requirement for Hedgehog Signalling in Cancer. *Nature* **2008**, *455*, 406–410, doi:10.1038/nature07275.
 154. Pandolfi, S.; Stecca, B. Cooperative Integration between HEDGEHOG-GLI Signalling and Other Oncogenic Pathways: Implications for Cancer Therapy. *Expert Rev Mol Med* **2015**, *17*, e5, doi:10.1017/erm.2015.3.
 155. Dierks, C.; Grbic, J.; Zirlik, K.; Beigi, R.; Englund, N.P.; Guo, G.-R.; Veelken, H.; Engelhardt, M.; Mertelsmann, R.; Kelleher, J.F.; et al. Essential Role of Stromally Induced Hedgehog Signaling in B-Cell Malignancies. *Nat. Med.* **2007**, *13*, 944–951, doi:10.1038/nm1614.
 156. Medema, J.P. Cancer Stem Cells: The Challenges Ahead. *Nat Cell Biol* **2013**, *15*, 338–344, doi:10.1038/ncb2717.
 157. Po, A.; Ferretti, E.; Miele, E.; De Smaele, E.; Paganelli, A.; Canettieri, G.; Coni, S.; Di Marcotullio, L.; Biffoni, M.; Massimi, L.; et al. Hedgehog Controls Neural Stem Cells through P53-Independent Regulation of Nanog. *EMBO J.* **2010**, *29*, 2646–2658,

doi:10.1038/emboj.2010.131.

158. Gan, G.N.; Eagles, J.; Keysar, S.B.; Wang, G.; Glogowska, M.J.; Altunbas, C.; Anderson, R.T.; Le, P.N.; Morton, J.J.; Frederick, B.; et al. Hedgehog Signaling Drives Radioresistance and Stroma-Driven Tumor Repopulation in Head and Neck Squamous Cancers. *Cancer Res* **2014**, *74*, 7024–7036, doi:10.1158/0008-5472.CAN-14-1346.
159. Okamoto, N.; Naruto, T.; Kohmoto, T.; Komori, T.; Imoto, I. A Novel PTCH1 Mutation in a Patient with Gorlin Syndrome. *Hum Genome Var* **2014**, *1*, 14022, doi:10.1038/hgv.2014.22.
160. Hahn, H.; Wicking, C.; Zaphiropoulous, P.G.; Gailani, M.R.; Shanley, S.; Chidambaram, A.; Vorechovsky, I.; Holmberg, E.; Unden, A.B.; Gillies, S.; et al. Mutations of the Human Homolog of Drosophila Patched in the Nevoid Basal Cell Carcinoma Syndrome. *Cell* **1996**, *85*, 841–851, doi:10.1016/s0092-8674(00)81268-4.
161. Johnson, R.L.; Rothman, A.L.; Xie, J.; Goodrich, L.V.; Bare, J.W.; Bonifas, J.M.; Quinn, A.G.; Myers, R.M.; Cox, D.R.; Epstein, E.H.; et al. Human Homolog of Patched, a Candidate Gene for the Basal Cell Nevus Syndrome. *Science* **1996**, *272*, 1668–1671, doi:10.1126/science.272.5268.1668.
162. Axelson, M.; Liu, K.; Jiang, X.; He, K.; Wang, J.; Zhao, H.; Kufrin, D.; Palmby, T.; Dong, Z.; Russell, A.M.; et al. U.S. Food and Drug Administration Approval: Vismodegib for Recurrent, Locally Advanced, or Metastatic Basal Cell Carcinoma. *Clin Cancer Res* **2013**, *19*, 2289–2293, doi:10.1158/1078-0432.CCR-12-1956.
163. Tu, Y.; Niu, M.; Xie, P.; Yue, C.; Liu, N.; Qi, Z.; Gao, S.; Liu, H.; Shi, Q.; Yu, R.; et al. Smoothened Is a Poor Prognosis Factor and a Potential Therapeutic Target in Glioma. *Sci Rep* **2017**, *7*, 42630, doi:10.1038/srep42630.
164. Zhao, H.; Tang, H.; Xiao, Q.; He, M.; Zhao, L.; Fu, Y.; Wu, H.; Yu, Z.; Jiang, Q.; Yan, Y.; et al. The Hedgehog Signaling Pathway Is Associated with Poor Prognosis in Breast Cancer Patients with the CD44+/CD24- Phenotype. *Mol Med Rep* **2016**, *14*, 5261–5270, doi:10.3892/mmr.2016.5856.
165. Lim, S.; Lim, S.M.; Kim, M.J.; Park, S.Y.; Kim, J.H. Sonic Hedgehog Pathway as the Prognostic Marker in Patients with Extensive Stage Small Cell Lung Cancer. *Yonsei Med J* **2019**, *60*, 898–904, doi:10.3349/ymj.2019.60.10.898.
166. Jian-Hui, C.; Er-Tao, Z.; Si-Le, C.; Hui, W.; Kai-Ming, W.; Xin-Hua, Z.; Chuang-Qi, C.; Shi-Rong, C.; Yu-Long, H. CD44, Sonic Hedgehog, and Gli1 Expression Are Prognostic Biomarkers in Gastric Cancer Patients after Radical Resection. *Gastroenterology Research and Practice* **2016**, *2016*, 1013045, doi:10.1155/2016/1013045.
167. Lv, L.; Yang, Z.; Ma, T.; Xuan, Y. Gli1, a Potential Cancer Stem Cell Marker, Is Strongly Associated with Prognosis in Prostate Cancer. *Int J Clin Exp Pathol* **2018**, *11*, 4957–4966.
168. Schneider, S.; Thurnher, D.; Kloimstein, P.; Leitner, V.; Petzelbauer, P.; Pammer, J.; Brunner, M.; Erovic, B.M. Expression of the Sonic Hedgehog Pathway in Squamous Cell Carcinoma of the Skin and the Mucosa of the Head and Neck. *Head Neck* **2011**, *33*, 244–250, doi:10.1002/hed.21437.
169. Srinath, S.; Iyengar, A.R.; Mysorekar, V. Sonic Hedgehog in Oral Squamous Cell Carcinoma: An Immunohistochemical Study. *J Oral Maxillofac Pathol* **2016**, *20*, 377–383, doi:10.4103/0973-029X.190906.
170. Dimitrova, K.; Stoehr, M.; Dehghani, F.; Dietz, A.; Wichmann, G.; Bertolini, J.; Mozet, C. Overexpression of the Hedgehog Signalling Pathway in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Onkologie* **2013**, *36*, 279–286, doi:10.1159/000350322.
171. Gonzalez, A.C.; Ferreira, M.; Ariel, T.; Reis, S.R.; Andrade, Z.; Peixoto Medrado, A. Immunohistochemical Evaluation of Hedgehog Signalling in Epithelial/Mesenchymal

- Interactions in Squamous Cell Carcinoma Transformation: A Pilot Study. *J Oral Pathol Med* **2016**, *45*, 173–179, doi:10.1111/jop.12346.
172. Huaitong, X.; Yuanyong, F.; Yueqin, T.; Peng, Z.; Wei, S.; Kai, S. Microvesicles Releasing by Oral Cancer Cells Enhance Endothelial Cell Angiogenesis via Shh/RhoA Signaling Pathway. *Cancer Biol Ther* **2017**, *18*, 783–791, doi:10.1080/15384047.2017.1373213.
 173. Chen, G.; Yan, M.; Li, R.R.; Chen, W.T. Sonic Hedgehog Signalling Activation Contributes to ALCAM Over-Expression and Poor Clinical Outcome in Patients with Oral Squamous Cell Carcinoma. *Chin J Dent Res* **2018**, *21*, 31–40, doi:10.3290/j.cjdr.a39916.
 174. Rodrigues, M.F.S.D.; Miguita, L.; De Andrade, N.P.; Heguedusch, D.; Rodini, C.O.; Moyses, R.A.; Toporcov, T.N.; Gama, R.R.; Tajara, E.E.; Nunes, F.D. GLI3 Knockdown Decreases Stemness, Cell Proliferation and Invasion in Oral Squamous Cell Carcinoma. *Int J Oncol* **2018**, *53*, 2458–2472, doi:10.3892/ijo.2018.4572.
 175. Cierpikowski, P.; Lis-Nawara, A.; Bar, J. Sonic Hedgehog Is a Novel Prognostic Biomarker in Patients with Oral Squamous Cell Carcinoma. *Neoplasma* **2021**, *68*, 867–874, doi:10.4149/neo_2021_201204N1304.
 176. Lu, X.; Wang, Z.; Huang, H.; Wang, H. Hedgehog Signaling Promotes Multidrug Resistance by Regulation of ABC Transporters in Oral Squamous Cell Carcinoma. *J Oral Pathol Med* **2020**, *49*, 897–906, doi:10.1111/jop.13050.
 177. Wang, Y.-F.; Chang, C.-J.; Lin, C.-P.; Chang, S.-Y.; Chu, P.-Y.; Tai, S.-K.; Li, W.-Y.; Chao, K.S.C.; Chen, Y.-J. Expression of Hedgehog Signaling Molecules as a Prognostic Indicator of Oral Squamous Cell Carcinoma. *Head Neck* **2012**, *34*, 1556–1561, doi:10.1002/hed.21958.
 178. Fan, H.-X.; Wang, S.; Zhao, H.; Liu, N.; Chen, D.; Sun, M.; Zheng, J.-H. Sonic Hedgehog Signaling May Promote Invasion and Metastasis of Oral Squamous Cell Carcinoma by Activating MMP-9 and E-Cadherin Expression. *Med Oncol* **2014**, *31*, 41, doi:10.1007/s12032-014-0041-5.
 179. Dantas, R.C.M.; Guimarães, V.S.N.; de Souza, R.O.; Valverde, L.F.; Vidal, M.T.A.; Nogueira, R.L.R.; da Rocha, L.O.S.; Araújo, G.T.; Dos Santos, J.N.; Rocha, C.A.G. Immunodetection of Epithelial-Mesenchymal Transition and Tumor Proliferation Markers in GLI-1-Positive Oral Squamous Cell Carcinoma. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* **2021**, *29*, 335–344, doi:10.1097/PAI.0000000000000866.
 180. Qiao, Q.; Xu, L.; Li, Q.; Wang, Y.; Lu, H.; Zhao, N.; Pu, Y.; Wang, L.; Guo, Y.; Guo, C. Bone Morphogenetic Protein Receptor 1 α Promotes Osteolytic Lesion of Oral Squamous Cell Carcinoma by SHH-Dependent Osteoclastogenesis. *Cancer Sci* **2022**, *113*, 1639–1651, doi:10.1111/cas.15330.
 181. Honami, T.; Shimo, T.; Okui, T.; Kurio, N.; Hassan, N.M.M.; Iwamoto, M.; Sasaki, A. Sonic Hedgehog Signaling Promotes Growth of Oral Squamous Cell Carcinoma Cells Associated with Bone Destruction. *Oral Oncol* **2012**, *48*, 49–55, doi:10.1016/j.oraloncology.2011.08.026.
 182. Noman, A.S.M.; Parag, R.R.; Rashid, M.I.; Rahman, M.Z.; Chowdhury, A.A.; Sultana, A.; Jerin, C.; Siddiqua, A.; Rahman, L.; Shirin, A.; et al. Widespread Expression of Sonic Hedgehog (Shh) and Nrf2 in Patients Treated with Cisplatin Predicts Outcome in Resected Tumors and Are Potential Therapeutic Targets for HPV-Negative Head and Neck Cancer. *Ther Adv Med Oncol* **2020**, *12*, 1758835920911229, doi:10.1177/1758835920911229.
 183. Richtig, G.; Aigelsreiter, A.M.; Asslaber, M.; Weiland, T.; Pichler, M.; Eberhard, K.; Sygulla, S.; Schauer, S.; Hoefler, G.; Aigelsreiter, A. Hedgehog Pathway Proteins SMO and GLI Expression as Prognostic Markers in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Histopathology* **2019**, *75*, 118–127, doi:10.1111/his.13860.
 184. Enzenhofer, E.; Parzefall, T.; Haymerle, G.; Schneider, S.; Kadletz, L.; Heiduschka, G.;

- Pammer, J.; Oberndorfer, F.; Wrba, F.; Loader, B.; et al. Impact of Sonic Hedgehog Pathway Expression on Outcome in HPV Negative Head and Neck Carcinoma Patients after Surgery and Adjuvant Radiotherapy. *PLoS One* **2016**, *11*, e0167665, doi:10.1371/journal.pone.0167665.
185. Binns, W.; James, L.F.; Shupe, J.L.; Everett, G. A CONGENITAL CYCLOPIAN-TYPE MALFORMATION IN LAMBS INDUCED BY MATERNAL INGESTION OF A RANGE PLANT, VERATRUM CALIFORNICUM. *Am J Vet Res* **1963**, *24*, 1164–1175.
 186. Nguyen, N.M.; Cho, J. Hedgehog Pathway Inhibitors as Targeted Cancer Therapy and Strategies to Overcome Drug Resistance. *Int J Mol Sci* **2022**, *23*, 1733, doi:10.3390/ijms23031733.
 187. Lézet, F.; Corre, I.; Morice, S.; Rédini, F.; Verrecchia, F. SHH Signaling Pathway Drives Pediatric Bone Sarcoma Progression. *Cells* **2020**, *9*, 536, doi:10.3390/cells9030536.
 188. Patel, H.; Joshi, J.; Raval, A.; Shah, F. Identification of Natural Compounds to Inhibit Sonic Hedgehog Pathway in Oral Cancer. *Anticancer Agents Med Chem* **2022**, *22*, 905–913, doi:10.2174/1871520621666210708100747.
 189. Jiang, J.; Liu, Z.; Zhou, X.; Peng, F.; Wang, Z.; Li, F.; Li, M. Resveratrol Induces Apoptosis, Suppresses Migration, and Invasion of Cervical Cancer Cells by Inhibiting the Hedgehog Signaling Pathway. *Biomed Res Int* **2022**, *2022*, 8453011, doi:10.1155/2022/8453011.
 190. Gampala, S.; Yang, J.-Y. Hedgehog Pathway Inhibitors against Tumor Microenvironment. *Cells* **2021**, *10*, 3135, doi:10.3390/cells10113135.
 191. Migden, M.R.; Guminski, A.; Gutzmer, R.; Dirix, L.; Lewis, K.D.; Combemale, P.; Herd, R.M.; Kudchadkar, R.; Trefzer, U.; Gogov, S.; et al. Treatment with Two Different Doses of Sonidegib in Patients with Locally Advanced or Metastatic Basal Cell Carcinoma (BOLT): A Multicentre, Randomised, Double-Blind Phase 2 Trial. *The Lancet Oncology* **2015**, *16*, 716–728, doi:10.1016/S1470-2045(15)70100-2.
 192. Arber, D.A.; Erba, H.P. Diagnosis and Treatment of Patients With Acute Myeloid Leukemia With Myelodysplasia-Related Changes (AML-MRC). *Am J Clin Pathol* **2020**, *154*, 731–741, doi:10.1093/ajcp/aqaa107.
 193. Mozet, C.; Stoeher, M.; Dimitrova, K.; Dietz, A.; Wichmann, G. Hedgehog Targeting by Cyclopamine Suppresses Head and Neck Squamous Cell Carcinoma and Enhances Chemotherapeutic Effects. *Anticancer Res* **2013**, *33*, 2415–2424.
 194. Hehlhans, S.; Booms, P.; Güllülü, Ö.; Sader, R.; Rödel, C.; Balermipas, P.; Rödel, F.; Ghanaati, S. Radiation Sensitization of Basal Cell and Head and Neck Squamous Cell Carcinoma by the Hedgehog Pathway Inhibitor Vismodegib. *Int J Mol Sci* **2018**, *19*, 2485, doi:10.3390/ijms19092485.
 195. Freitas, R.D.; Dias, R.B.; Vidal, M.T.A.; Valverde, L. de F.; Gomes Alves Costa, R.; Damasceno, A.K.A.; Sales, C.B.S.; Siquara da Rocha, L. de O.; dos Reis, M.G.; Soares, M.B.P.; et al. Inhibition of CAL27 Oral Squamous Carcinoma Cell by Targeting Hedgehog Pathway With Vismodegib or Itraconazole. *Front Oncol* **2020**, *10*, 563838, doi:10.3389/fonc.2020.563838.
 196. Xie, H.; Paradise, B.D.; Ma, W.W.; Fernandez-Zapico, M.E. Recent Advances in the Clinical Targeting of Hedgehog/GLI Signaling in Cancer. *Cells* **2019**, *8*, 394, doi:10.3390/cells8050394.
 197. Keysar, S.B.; Le, P.N.; Anderson, R.T.; Morton, J.J.; Bowles, D.W.; Paylor, J.J.; Vogler, B.W.; Thorburn, J.; Fernandez, P.; Glogowska, M.J.; et al. Hedgehog Signaling Alters Reliance on EGF Receptor Signaling and Mediates Anti-EGFR Therapeutic Resistance in Head and Neck Cancer. *Cancer Res* **2013**, *73*, 3381–3392, doi:10.1158/0008-5472.CAN-12-4047.
 198. Liebig, H.; Günther, G.; Kolb, M.; Mozet, C.; Boehm, A.; Dietz, A.; Wichmann, G.

- Reduced Proliferation and Colony Formation of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma (HNSCC) after Dual Targeting of EGFR and Hedgehog Pathways. *Cancer Chemother Pharmacol* **2017**, *79*, 411–420, doi:10.1007/s00280-017-3239-3.
199. Liu, J.; Xie, Y.; Wu, S.; Lv, D.; Wei, X.; Chen, F.; Wang, Z. Combined Effects of EGFR and Hedgehog Signaling Blockade on Inhibition of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Int J Clin Exp Pathol* **2017**, *10*, 9816–9828.
 200. Kleszcz, R.; Frąckowiak, M.; Dorna, D.; Paluszczak, J. Combinations of PRI-724 Wnt/ β -Catenin Pathway Inhibitor with Vismodegib, Erlotinib, or HS-173 Synergistically Inhibit Head and Neck Squamous Cancer Cells. *Int J Mol Sci* **2023**, *24*, 10448, doi:10.3390/ijms241310448.
 201. Booker, B.E.; Steg, A.D.; Kovac, S.; Landen, C.N.; Amm, H.M. The Use of Hedgehog Antagonists in Cancer Therapy: A Comparison of Clinical Outcomes and Gene Expression Analyses. *Cancer Biol Ther* **2020**, *21*, 873–883, doi:10.1080/15384047.2020.1806640.
 202. Bowles, D.W.; Keysar, S.B.; Eagles, J.R.; Wang, G.; Glogowska, M.J.; McDermott, J.D.; Le, P.N.; Gao, D.; Ray, C.E.; Rochon, P.J.; et al. A Pilot Study of Cetuximab and the Hedgehog Inhibitor IPI-926 in Recurrent/Metastatic Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Oral Oncol* **2016**, *53*, 74–79, doi:10.1016/j.oraloncology.2015.11.014.
 203. Boyko-Fabian, M.; Niehr, F.; Distel, L.; Budach, V.; Tinhofer, I. Increased Growth-Inhibitory and Cytotoxic Activity of Arsenic Trioxide in Head and Neck Carcinoma Cells with Functional P53 Deficiency and Resistance to EGFR Blockade. *PLoS One* **2014**, *9*, e98867, doi:10.1371/journal.pone.0098867.
 204. Nogueira, R.L.R.; de Araújo, T.B.S.; Valverde, L.F.; Silva, V.A.O.; Cavalcante, B.R.R.; Rossi, E.A.; Allahdadi, K.J.; Dos Reis, M.G.; Pereira, T.A.; Coletta, R.D.; et al. Arsenic Trioxide Triggers Apoptosis of Metastatic Oral Squamous Cells Carcinoma with Concomitant Downregulation of GLI1 in Hedgehog Signaling. *Biomedicines* **2022**, *10*, 3293, doi:10.3390/biomedicines10123293.
 205. Hu, W.-C.; Teo, W.-H.; Huang, T.-F.; Lee, T.-C.; Lo, J.-F. Combinatorial Low Dose Arsenic Trioxide and Cisplatin Exacerbates Autophagy via AMPK/STAT3 Signaling on Targeting Head and Neck Cancer Initiating Cells. *Front Oncol* **2020**, *10*, 463, doi:10.3389/fonc.2020.00463.
 206. Nakaoka, T.; Ota, A.; Ono, T.; Karnan, S.; Konishi, H.; Furuhashi, A.; Ohmura, Y.; Yamada, Y.; Hosokawa, Y.; Kazaoka, Y. Combined Arsenic Trioxide-Cisplatin Treatment Enhances Apoptosis in Oral Squamous Cell Carcinoma Cells. *Cell Oncol (Dordr)* **2014**, *37*, 119–129, doi:10.1007/s13402-014-0167-7.
 207. Kotowski, U.; Heiduschka, G.; Brunner, M.; Erovic, B.M.; Martinek, H.; Thurnher, D. Arsenic Trioxide Enhances the Cytotoxic Effect of Cisplatin in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Cell Lines. *Oncol Lett* **2012**, *3*, 1326–1330, doi:10.3892/ol.2012.643.
 208. Kumar, P.; Gao, Q.; Ning, Y.; Wang, Z.; Krebsbach, P.H.; Polverini, P.J. Arsenic Trioxide Enhances the Therapeutic Efficacy of Radiation Treatment of Oral Squamous Carcinoma While Protecting Bone. *Mol Cancer Ther* **2008**, *7*, 2060–2069, doi:10.1158/1535-7163.MCT-08-0287.
 209. Yan, M.; Wang, L.; Zuo, H.; Zhang, Z.; Chen, W.; Mao, L.; Zhang, P. HH/GLI Signalling as a New Therapeutic Target for Patients with Oral Squamous Cell Carcinoma. *Oral Oncol* **2011**, *47*, 504–509, doi:10.1016/j.oraloncology.2011.03.027.
 210. Bacelar Sacramento de Araújo, T.; de Oliveira Siquara da Rocha, L.; Torres Andion Vidal, M.; Cerqueira Coelho, P.L.; Galvão Dos Reis, M.; Solano de Freitas Souza, B.; Botelho Pereira Soares, M.; Almeida Pereira, T.; Della Coletta, R.; Pereira Bezerra, D.; et al. GANT61 Reduces Hedgehog Molecule (GLI1) Expression and Promotes Apoptosis in Metastatic Oral Squamous Cell Carcinoma Cells. *Int J Mol Sci* **2020**, *21*, doi:10.3390/ijms21176076.

211. Zubčić, V.; Rinčić, N.; Kurtović, M.; Trnski, D.; Musani, V.; Ozretić, P.; Levanat, S.; Leović, D.; Sabol, M. GANT61 and Lithium Chloride Inhibit the Growth of Head and Neck Cancer Cell Lines Through the Regulation of GLI3 Processing by GSK3 β . *Int J Mol Sci* **2020**, *21*, 6410, doi:10.3390/ijms21176410.
212. Miller, W.L.; Auchus, R.J. The Molecular Biology, Biochemistry, and Physiology of Human Steroidogenesis and Its Disorders. *Endocr Rev* **2011**, *32*, 81–151, doi:10.1210/er.2010-0013.
213. Baek, A.E.; Nelson, E.R. The Contribution of Cholesterol and Its Metabolites to the Pathophysiology of Breast Cancer. *Horm Cancer* **2016**, *7*, 219–228, doi:10.1007/s12672-016-0262-5.
214. Porter, J.A.; Young, K.E.; Beachy, P.A. Cholesterol Modification of Hedgehog Signaling Proteins in Animal Development. *Science* **1996**, *274*, 255–259.
215. Pepinsky, R.B.; Zeng, C.; Wen, D.; Rayhorn, P.; Baker, D.P.; Williams, K.P.; Bixler, S.A.; Ambrose, C.M.; Garber, E.A.; Miatkowski, K.; et al. Identification of a Palmitic Acid-Modified Form of Human Sonic Hedgehog. *J. Biol. Chem* **1998**, *273*, 14037–14045.
216. Briscoe, J.; Théron, P.P. The Mechanisms of Hedgehog Signalling and Its Roles in Development and Disease. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **2013**, *14*, 418–431, doi:10.1038/nrm3598.
217. Kameda, C.; Nakamura, M.; Tanaka, H.; Yamasaki, A.; Kubo, M.; Tanaka, M.; Onishi, H.; Katano, M. Oestrogen Receptor- α Contributes to the Regulation of the Hedgehog Signalling Pathway in ER α -Positive Gastric Cancer. *Br J Cancer* **2010**, *102*, 738–747, doi:10.1038/sj.bjc.6605517.
218. Kameda, C.; Tanaka, H.; Yamasaki, A.; Nakamura, M.; Koga, K.; Sato, N.; Kubo, M.; Kuroki, S.; Tanaka, M.; Katano, M. The Hedgehog Pathway Is a Possible Therapeutic Target for Patients with Estrogen Receptor-Negative Breast Cancer. *Anticancer research* **2009**, *29*, 871–880.
219. Diao, Y.; Azatyan, A.; Rahman, M.F.-U.; Zhao, C.; Zhu, J.; Dahlman-Wright, K.; Zaphiropoulos, P.G. Blockade of the Hedgehog Pathway Downregulates Estrogen Receptor Alpha Signaling in Breast Cancer Cells. *Oncotarget* **2016**, *7*, 71580–71593, doi:10.18632/oncotarget.12259.
220. Sun, Y.; Wang, Y.; Fan, C.; Gao, P.; Wang, X.; Wei, G.; Wei, J. Estrogen Promotes Stemness and Invasiveness of ER-Positive Breast Cancer Cells through Gli1 Activation. *Molecular cancer* **2014**, *13*, 1.
221. Massah, S.; Foo, J.; Li, N.; Truong, S.; Nouri, M.; Xie, L.; Prins, G.S.; Buttyan, R. Gli Activation by the Estrogen Receptor in Breast Cancer Cells: Regulation of Cancer Cell Growth by Gli3. *Mol Cell Endocrinol* **2021**, *522*, 111136, doi:10.1016/j.mce.2020.111136.
222. Vossler, J.L.; Forbes, B.A.; Adelson, M.D. Evaluation of the Polymerase Chain Reaction for the Detection of Human Papillomavirus from Urine. *J Med Virol* **1995**, *45*, 354–360, doi:10.1002/jmv.1890450321.
223. Gravitt, P.E.; Peyton, C.L.; Alessi, T.Q.; Wheeler, C.M.; Coutlée, F.; Hildesheim, A.; Schiffman, M.H.; Scott, D.R.; Apple, R.J. Improved Amplification of Genital Human Papillomaviruses. *J Clin Microbiol* **2000**, *38*, 357–361, doi:10.1128/JCM.38.1.357-361.2000.
224. Soler, C.; Allibert, P.; Chardonnet, Y.; Cros, P.; Mandrand, B.; Thivolet, J. Detection of Human Papillomavirus Types 6, 11, 16 and 18 in Mucosal and Cutaneous Lesions by the Multiplex Polymerase Chain Reaction. *J Virol Methods* **1991**, *35*, 143–157, doi:10.1016/0166-0934(91)90130-r.
225. van den Brule, A.J.; Meijer, C.J.; Bakels, V.; Kenemans, P.; Walboomers, J.M. Rapid Detection of Human Papillomavirus in Cervical Scrapes by Combined General Primer-Mediated and Type-Specific Polymerase Chain Reaction. *J Clin Microbiol* **1990**, *28*, 2739–

- 2743, doi:10.1128/jcm.28.12.2739-2743.1990.
226. Eichberger, T.; Sander, V.; Schnidar, H.; Regl, G.; Kasper, M.; Schmid, C.; Plamberger, S.; Kaser, A.; Aberger, F.; Frischauf, A.M. Overlapping and Distinct Transcriptional Regulator Properties of the GLI1 and GLI2 Oncogenes. *Genomics* **2006**, *87*, 616–632.
 227. Madureira, P.A.; Varshochi, R.; Constantinidou, D.; Francis, R.E.; Coombes, R.C.; Yao, K.-M.; Lam, E.W.-F. The Forkhead Box M1 Protein Regulates the Transcription of the Estrogen Receptor Alpha in Breast Cancer Cells. *J. Biol. Chem* **2006**, *281*, 25167–25176, doi:10.1074/jbc.M603906200.
 228. Guo, L.; Lin, W.; Zhang, Y.; Wang, J. A Systematic Analysis Revealed the Potential Gene Regulatory Processes of ATRA-Triggered Neuroblastoma Differentiation and Identified a Novel RA Response Sequence in the *NTRK2* Gene. *BioMed Research International* **2020**, *2020*, 1–19, doi:10.1155/2020/6734048.
 229. Kallassy, M.; Toftgård, R.; Ueda, M.; Nakazawa, K.; Vorechovský, I.; Yamasaki, H.; Nakazawa, H. Patched (Ptch)-Associated Preferential Expression of Smoothened (Smoh) in Human Basal Cell Carcinoma of the Skin. *Cancer Res* **1997**, *57*, 4731–4735.
 230. Regl, G.; Neill, G.W.; Eichberger, T.; Kasper, M.; Ikram, M.S.; Koller, J.; Hintner, H.; Quinn, A.G.; Frischauf, A.-M.; Aberger, F. Human GLI2 and GLI1 Are Part of a Positive Feedback Mechanism in Basal Cell Carcinoma. *Oncogene* **2002**, *21*, 5529–5539, doi:10.1038/sj.onc.1205748.
 231. Kurtović, M.; Piteša, N.; Bartoniček, N.; Ozretić, P.; Musani, V.; Čonkaš, J.; Petrić, T.; King, C.; Sabol, M. RNA-Seq and ChIP-Seq Identification of Unique and Overlapping Targets of GLI Transcription Factors in Melanoma Cell Lines. *Cancers (Basel)* **2022**, *14*, 4540, doi:10.3390/cancers14184540.
 232. Ozretić, P.; Hanžić, N.; Proust, B.; Sabol, M.; Trnski, D.; Radić, M.; Musani, V.; Ciribilli, Y.; Milas, I.; Puljiz, Z.; et al. Expression Profiles of P53/P73, NME and GLI Families in Metastatic Melanoma Tissue and Cell Lines. *Sci Rep* **2019**, *9*, 12470, doi:10.1038/s41598-019-48882-y.
 233. Babraham Bioinformatics - FastQC A Quality Control Tool for High Throughput Sequence Data Available online: <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/> (accessed on 21 February 2026).
 234. Bolger, A.M.; Lohse, M.; Usadel, B. Trimmomatic: A Flexible Trimmer for Illumina Sequence Data. *Bioinformatics* **2014**, *30*, 2114–2120, doi:10.1093/bioinformatics/btu170.
 235. Dobin, A.; Davis, C.A.; Schlesinger, F.; Drenkow, J.; Zaleski, C.; Jha, S.; Batut, P.; Chaisson, M.; Gingeras, T.R. STAR: Ultrafast Universal RNA-Seq Aligner. *Bioinformatics* **2013**, *29*, 15–21, doi:10.1093/bioinformatics/bts635.
 236. Liao, Y.; Smyth, G.K.; Shi, W. featureCounts: An Efficient General Purpose Program for Assigning Sequence Reads to Genomic Features. *Bioinformatics* **2014**, *30*, 923–930, doi:10.1093/bioinformatics/btt656.
 237. Love, M.I.; Huber, W.; Anders, S. Moderated Estimation of Fold Change and Dispersion for RNA-Seq Data with DESeq2. *Genome Biol* **2014**, *15*, 550, doi:10.1186/s13059-014-0550-8.
 238. Yu, G.; Wang, L.-G.; Han, Y.; He, Q.-Y. clusterProfiler: An R Package for Comparing Biological Themes among Gene Clusters. *OMICS* **2012**, *16*, 284–287, doi:10.1089/omi.2011.0118.
 239. Yu, G.; He, Q.-Y. ReactomePA: An R/Bioconductor Package for Reactome Pathway Analysis and Visualization. *Mol Biosyst* **2016**, *12*, 477–479, doi:10.1039/c5mb00663e.
 240. Subramanian, A.; Tamayo, P.; Mootha, V.K.; Mukherjee, S.; Ebert, B.L.; Gillette, M.A.; Paulovich, A.; Pomeroy, S.L.; Golub, T.R.; Lander, E.S.; et al. Gene Set Enrichment Analysis: A Knowledge-Based Approach for Interpreting Genome-Wide Expression

- Profiles. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2005**, *102*, 15545–15550, doi:10.1073/pnas.0506580102.
241. Ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis | Springer Nature Link Available online: <https://link.springer.com/book/10.1007/978-3-319-24277-4> (accessed on 21 February 2026).
 242. Gauss, C.; Stone, L.D.; Ghafouri, M.; Quan, D.; Johnson, J.; Fribley, A.M.; Amm, H.M. Overcoming Resistance to Standard-of-Care Therapies for Head and Neck Squamous Cell Carcinomas. *Cells* **2024**, *13*, 1018, doi:10.3390/cells13121018.
 243. ÇAVDAR, E.; İRİAĞAÇ, Y. Predictors of Lymphovascular Invasion in Estrogen Receptor Positive/Her-2 Negative Breast Cancer Patients Treated with Neoadjuvant Chemotherapy. *Turk J Med Sci* **52**, 1111–1117, doi:10.55730/1300-0144.5414.
 244. Matsuo, K.; Sheridan, T.B.; Mabuchi, S.; Yoshino, K.; Hasegawa, K.; Studeman, K.D.; Im, D.D.; Rosenshein, N.B.; Roman, L.D.; Sood, A.K. Estrogen Receptor Expression and Increased Risk of Lymphovascular Space Invasion in High-Grade Serous Ovarian Carcinoma. *Gynecol Oncol* **2014**, *133*, 473–479, doi:10.1016/j.ygyno.2014.03.563.
 245. Fidiawati, W.A.; Andrijono; Siregar, N.C.; Prihartono, J.; Purwoto, G.; Hellyanti, T. Estrogen Receptor Expression in Type 1 Endometrial Cancer and Its Association with Lymphovascular Space Invasion. *Medical Journal of Indonesia* **2025**, *34*, 278–284, doi:10.13181/mji.oa.257842.
 246. Li, X.; Wang, Z.; Ma, Q.; Xu, Q.; Liu, H.; Duan, W.; Lei, J.; Ma, J.; Wang, X.; Lv, S.; et al. Sonic Hedgehog Paracrine Signaling Activates Stromal Cells to Promote Perineural Invasion in Pancreatic Cancer. *Clin Cancer Res* **2014**, *20*, 4326–4338, doi:10.1158/1078-0432.CCR-13-3426.
 247. Agren, M.; Kogerman, P.; Kleman, M.I.; Wessling, M.; Toftgård, R. Expression of the PTCH1 Tumor Suppressor Gene Is Regulated by Alternative Promoters and a Single Functional Gli-Binding Site. *Gene* **2004**, *330*, 101–114, doi:10.1016/j.gene.2004.01.010.
 248. Xu, L.; Kwon, Y.-J.; Frolova, N.; Steg, A.D.; Yuan, K.; Johnson, M.R.; Grizzle, W.E.; Desmond, R.A.; Frost, A.R. Gli1 Promotes Cell Survival and Is Predictive of a Poor Outcome in ER α -Negative Breast Cancer. *Breast Cancer Res Treat* **2010**, *123*, 59–71, doi:10.1007/s10549-009-0617-5.
 249. Jinek, M.; Chylinski, K.; Fonfara, I.; Hauer, M.; Doudna, J.A.; Charpentier, E. A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity. *Science* **2012**, *337*, 816–821, doi:10.1126/science.1225829.
 250. DeKelver, R.C.; Choi, V.M.; Moehle, E.A.; Paschon, D.E.; Hockemeyer, D.; Meijsing, S.H.; Sancak, Y.; Cui, X.; Steine, E.J.; Miller, J.C.; et al. Functional Genomics, Proteomics, and Regulatory DNA Analysis in Isogenic Settings Using Zinc Finger Nuclease-Driven Transgenesis into a Safe Harbor Locus in the Human Genome. *Genome Res.* **2010**, *20*, 1133–1142, doi:10.1101/gr.106773.110.
 251. Albertson, D.G.; Collins, C.; McCormick, F.; Gray, J.W. Chromosome Aberrations in Solid Tumors. *Nat Genet* **2003**, *34*, 369–376, doi:10.1038/ng1215.
 252. Matthews, J.; Wihlén, B.; Tujague, M.; Wan, J.; Ström, A.; Gustafsson, J.-A. Estrogen Receptor (ER) Beta Modulates ER α -Mediated Transcriptional Activation by Altering the Recruitment of c-Fos and c-Jun to Estrogen-Responsive Promoters. *Mol Endocrinol* **2006**, *20*, 534–543, doi:10.1210/me.2005-0140.
 253. Ku, T.K.S.; Crowe, D.L. Coactivator-Mediated Estrogen Response in Human Squamous Cell Carcinoma Lines. *Journal of Endocrinology* **2007**, *193*, 147–155, doi:10.1677/JOE-06-0029.
 254. Chen, G.-C.; Guan, L.-S.; Hu, W.-L.; Wang, Z.-Y. Functional Repression of Estrogen Receptor α by Arsenic Trioxide in Human Breast Cancer Cells. *Anticancer Res* **2002**, *22*, 633–638.

255. Chow, S.K.Y.; Chan, J.Y.W.; Fung, K.P. Suppression of Cell Proliferation and Regulation of Estrogen Receptor Alpha Signaling Pathway by Arsenic Trioxide on Human Breast Cancer MCF-7 Cells. *J Endocrinol* **2004**, *182*, 325–337, doi:10.1677/joe.0.1820325.
256. Du, J.; Zhou, N.; Liu, H.; Jiang, F.; Wang, Y.; Hu, C.; Qi, H.; Zhong, C.; Wang, X.; Li, Z. Arsenic Induces Functional Re-Expression of Estrogen Receptor α by Demethylation of DNA in Estrogen Receptor-Negative Human Breast Cancer. *PLOS ONE* **2012**, *7*, e35957, doi:10.1371/journal.pone.0035957.
257. Zhang, W.; Wang, L.; Fan, Q.; Wu, X.; Wang, F.; Wang, R.; Ma, Z.; Yang, J.; Lu, S.H. Arsenic Trioxide Re-Sensitizes ER α -Negative Breast Cancer Cells to Endocrine Therapy by Restoring ER α Expression in Vitro and in Vivo. *Oncol Rep* **2011**, *26*, 621–628, doi:10.3892/or.2011.1352.
258. Kumar, S.; Mukherjee, T.K.; Guptasarma, P. Arsenic and 17- β -Estradiol Bind to Each Other and Neutralize Each Other's Signaling Effects. *Biochem Biophys Res Commun* **2016**, *477*, 575–580, doi:10.1016/j.bbrc.2016.06.087.
259. Reddel, R.R.; Sutherland, R.L. Tamoxifen Stimulation of Human Breast Cancer Cell Proliferation in Vitro: A Possible Model for Tamoxifen Tumour Flare. *Eur J Cancer Clin Oncol* **1984**, *20*, 1419–1424, doi:10.1016/0277-5379(84)90062-2.
260. Zhao, S.; Tsuchida, T.; Kawakami, K.; Shi, C.; Kawamoto, K. Effect of As₂O₃ on Cell Cycle Progression and Cyclins D1 and B1 Expression in Two Glioblastoma Cell Lines Differing in P53 Status. *Int J Oncol* **2002**, *21*, 49–55.
261. Busino, L.; Chiesa, M.; Draetta, G.F.; Donzelli, M. Cdc25A Phosphatase: Combinatorial Phosphorylation, Ubiquitylation and Proteolysis. *Oncogene* **2004**, *23*, 2050–2056, doi:10.1038/sj.onc.1207394.
262. Sagata, N. Molecular Biology. Untangling Checkpoints. *Science* **2002**, *298*, 1905–1907, doi:10.1126/science.1079225.
263. Lehmann, G.M.; McCabe, M.J. Arsenite Slows S Phase Progression via Inhibition of cdc25A Dual Specificity Phosphatase Gene Transcription. *Toxicol Sci* **2007**, *99*, 70–78, doi:10.1093/toxsci/kfm142.
264. Yih, L.H.; Lee, T.C. Arsenite Induces P53 Accumulation through an ATM-Dependent Pathway in Human Fibroblasts. *Cancer Res* **2000**, *60*, 6346–6352.
265. Chen, H.; Liu, J.; Zhao, C.Q.; Diwan, B.A.; Merrick, B.A.; Waalkes, M.P. Association of C-Myc Overexpression and Hyperproliferation with Arsenite-Induced Malignant Transformation. *Toxicol Appl Pharmacol* **2001**, *175*, 260–268, doi:10.1006/taap.2001.9253.
266. Park, W.H.; Seol, J.G.; Kim, E.S.; Hyun, J.M.; Jung, C.W.; Lee, C.C.; Kim, B.K.; Lee, Y.Y. Arsenic Trioxide-Mediated Growth Inhibition in MC/CAR Myeloma Cells via Cell Cycle Arrest in Association with Induction of Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor, P21, and Apoptosis. *Cancer Res* **2000**, *60*, 3065–3071.
267. Hyun Park, W.; Hee Cho, Y.; Won Jung, C.; Oh Park, J.; Kim, K.; Hyuck Im, Y.; Lee, M.H.; Ki Kang, W.; Park, K. Arsenic Trioxide Inhibits the Growth of A498 Renal Cell Carcinoma Cells via Cell Cycle Arrest or Apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* **2003**, *300*, 230–235, doi:10.1016/s0006-291x(02)02831-0.
268. Du, S.; Liu, K.; Gao, P.; Li, Z.; Zheng, J. Differential Anticancer Activities of Arsenic Trioxide on Head and Neck Cancer Cells with Different Human Papillomavirus Status. *Life Sci* **2018**, *212*, 182–193, doi:10.1016/j.lfs.2018.09.033.
269. Zhu, G.; Li, X.; Li, J.; Zhou, W.; Chen, Z.; Fan, Y.; Jiang, Y.; Zhao, Y.; Sun, G.; Mao, W. Arsenic Trioxide (ATO) Induced Degradation of Cyclin D1 Sensitized PD-1/PD-L1 Checkpoint Inhibitor in Oral and Esophageal Squamous Cell Carcinoma. *J Cancer* **2020**, *11*, 6516–6529, doi:10.7150/jca.47111.
270. Kelley, V.M.; Baro, M.; Gasperi, W.E.; Ader, N.R.; Lea, H.; Lee, H.; Phoomak, C.;

- Kabeche, L.; King, M.C.; Contessa, J.N. Loss of JAK1 Function Causes G2/M Cell Cycle Defects Vulnerable to KIF18A Inhibition. *Cancer Res* **2026**, doi:10.1158/0008-5472.CAN-25-1423.
271. Gilmore, A.P. Anoikis. *Cell Death & Differentiation* **2005**, *12*, 1473–1477, doi:10.1038/sj.cdd.4401723.
272. Zhao, J.; Chen, G.; Cao, D.; Li, Y.; Diao, F.; Cai, H.; Jin, Y.; Lu, J. Expression of Gli1 Correlates with the Transition of Breast Cancer Cells to Estrogen-Independent Growth. *Breast Cancer Res Treat* **2010**, *119*, 39–51, doi:10.1007/s10549-009-0323-3.
- <https://www.fda.gov/drugs/resources-information-approved-drugs/fda-approves-neoadjuvant-and-adjuvant-pembrolizumab-resectable-locally-advanced-head-and-neck> (Pristupljeno: 06.08.2025.)
- <https://www.origene.com/catalog/gene-expression/qpcr-primer-pairs/hp225829-estrogen-receptor-beta-esr2-human-qpcr-primer-pair-nm-001437> (Pristupljeno: 15.12.2025.)
- <https://www.origene.com/catalog/gene-expression/qpcr-primer-pairs/hp234520-g-protein-coupled-receptor-30-gper1-human-qpcr-primer-pair-nm-001505> (Pristupljeno: 15.12.2025.)

8. PRILOZI

PRILOG A: Popis kratica

16α-OHE1	16 α -hidroksiestron
17β-HSD	17 β -hidroksisteroid dehidrogenaza
2-OHE1	2-hidroksiestron
5-FU	5-fluorouracil
AF-1	regija aktivacijske fukcije 1 (eng. <i>activation function 1</i>)
AKT	proteinska kinaza B
ANOVA	analiza varijance (eng. <i>analysis of variance</i>)
APS	amonijev persulfat
ATF3	eng. <i>activating transcription factor 3</i>
ATO	arsenov trioksid
ATP	adenozin trifosfat (eng. <i>adenosine triphosphate</i>)
BCC	bazocelularni karcinom (eng. <i>basal cell carcinoma</i>)
BSA	albumin iz goveđeg seruma (eng. <i>bovine serum albumine</i>)
cAMP	ciklički adenzin-monofosfat
CDK2	kinaza ovisna o ciklinu 2 (eng. <i>cyclin-dependent kinase 2</i>)
CDK6	kinaza ovisna o ciklinu 6 (eng. <i>cyclin-dependent kinase 6</i>)
CDC25A	eng. <i>cell division cycle 25A</i>
CI	interval pouzdanosti (eng. <i>confidence interval</i>)
CK1	kazeinska kinaza 1 (eng. <i>casein kinase 1</i>)
Co-IP	koimunoprecipitacija (eng. <i>co-immunoprecipitation</i>)
CSC	tumorske matične stanice (eng. <i>cancer stem cells</i>)
Ct	eng. <i>cycle threshold</i>
CYP11A1	enzim cijepanja bočnog lanca kolesterola (eng. <i>cholesterol side-chain cleavage enzyme</i>)
CYP17A1	17 α -hidroksilaza/17,20-liaza/17,20-dezmozolaza
CYP19A1	aromataza
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DBD	domena za vezanje DNA (eng. <i>DNA-binding domain</i>)
DEGs	diferencijalno eksprimirani geni (eng. <i>differentially expressed genes</i>)
DHEA	dehidroepiandrosteron
DHH	eng. <i>desert hedgehog</i>
DMEM	eng. <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	dimetil sulfoksid
DNMT1	DNA metiltransferaza 1 (eng. <i>DNA methyltransferase 1</i>)
DNMT3A	DNA metiltransferaza 3A (eng. <i>DNA methyltransferase 3 alpha</i>)
DTT	ditiotreitol
dTTP	deoksitimidin-trifosfat (eng. <i>deoxythymidine triphosphate</i>)
dUTP	deoksiuridin-trifosfat (eng. <i>deoxyuridine triphosphate</i>)

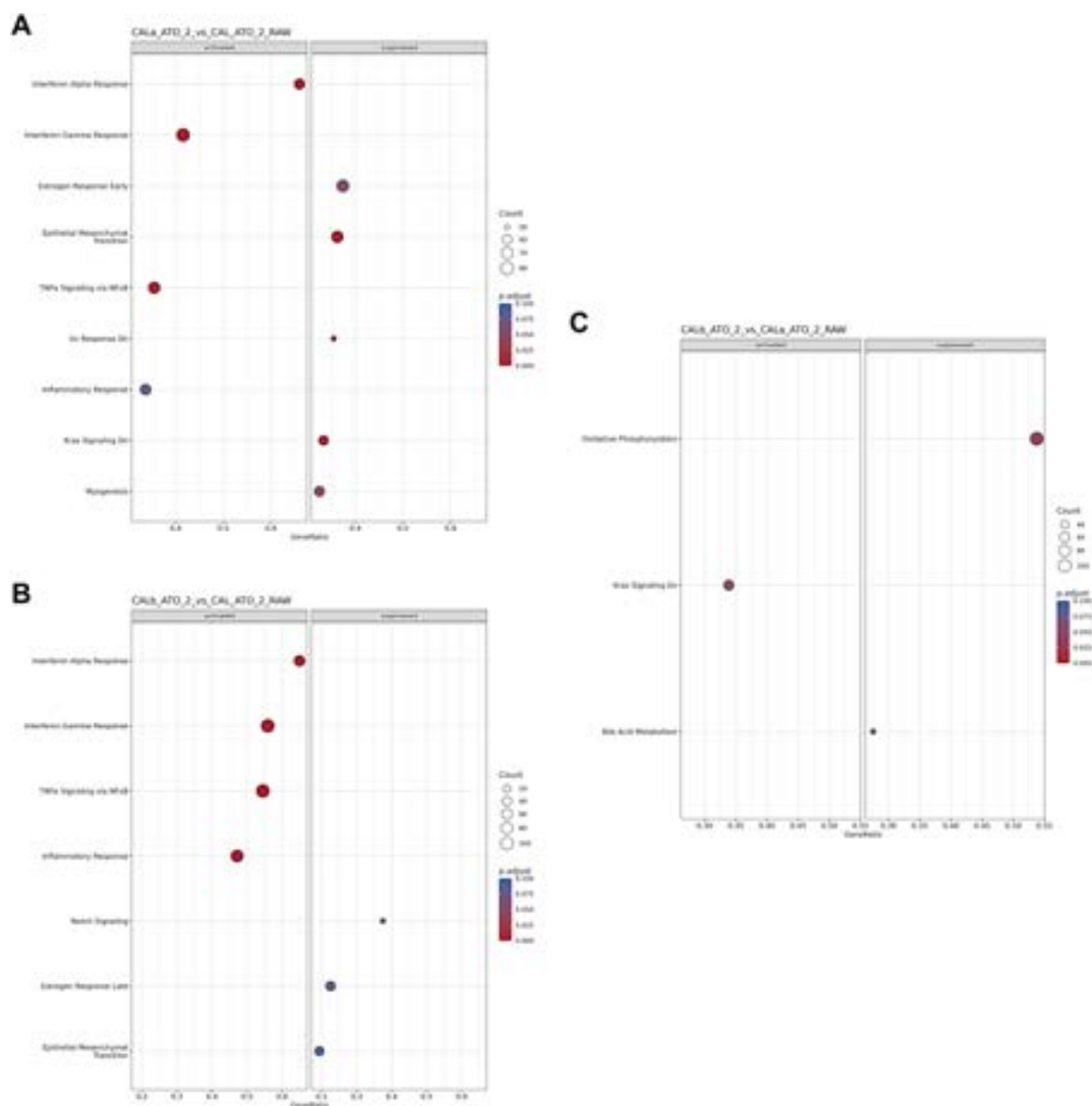
E1	estron
E2	estradiol
E2–ER	kompleks estradiol–estrogenski receptor
E3	estriol
E4	estetrol
ECS	ekstrakapsularno širenje tumora (eng. <i>extracapsular spread</i>)
EDTA	etilendiamintetraoctena kiselina
EGFR	receptor epidermalnog faktora rasta (eng. <i>epidermal growth factor receptor</i>)
EMT	epitelno-mezenhimalna tranzicija
ERE	eng. <i>estrogen response element</i>
ERG	eng. <i>estrogen-responsive genes</i>
ERK	kinaze regulirane ekstracelularnim signalima (eng. <i>extracellular signal-regulated kinases</i>)
ERα	estrogen receptor alfa, kodiran genom <i>ESR1</i>
ERβ	estrogen receptor beta, kodiran genom <i>ESR2</i>
FAK	kinaza fokalne adhezije (eng. <i>focal adhesion kinase</i>)
FBS	fetalni goveđi serum (eng. <i>fetal bovine serum</i>)
FDA	Američka agencija za hranu i lijekove (eng. <i>Food and Drug Administration</i>)
FDR	stopa lažnog otkrića (eng. <i>false discovery rate</i>)
FSH	folikulostimulirajući hormon
GADD45	eng. <i>growth arrest and DNA damage-inducible 45</i>
GLI1	homolog onkogeni povezan s gliomom 1 (eng. <i>glioma-associated oncogene homolog 1</i>)
GLI2	homolog onkogeni povezan s gliomom 2 (eng. <i>glioma-associated oncogene homolog 2</i>)
GLI3	homolog onkogeni povezan s gliomom 3 (eng. <i>glioma-associated oncogene homolog 3</i>)
GLM	generalizirani linearni model (eng. <i>generalized linear model</i>)
GLOBOCAN	eng. <i>Global Cancer Observatory</i>
GnRH	gonadotropin-oslobađajući hormon (eng. <i>gonadotropin-releasing hormone</i>)
GPCR	receptor spregnut s G-proteinom (eng. <i>G protein-coupled receptor</i>)
GPER1	receptor estrogena povezan s G-proteinom 1 (eng. <i>G protein-coupled estrogen receptor 1</i>)
GSEA	analiza obogaćivanja skupa gena (eng. <i>Gene Set Enrichment Analysis</i>)
GSK3β	kinaza glikogen sintaze 3 β (eng. <i>glycogen synthase kinase 3 beta</i>)
HD	zglobna domena (eng. <i>hinge domain</i>)
HER2	receptor humanog epidermalnog faktora rasta 2 (eng. <i>human epidermal growth factor receptor 2</i>)
HER3	receptor humanog epidermalnog faktora rasta 3 (eng. <i>human epidermal growth factor receptor 3</i>)
HH	eng. <i>hedgehog</i>
HH-GLI	signalni put Hedgehog-GLI
HNSCC	rak pločastih stanica sluznice glave i vrata (eng. <i>head and neck squamous cell carcinoma</i>)

HPV	papilomavirus čovjeka (eng. <i>human papillomavirus</i>)
HR	omjer rizika (eng. <i>hazard ratio</i>)
HRP	peroksidaza hrena (eng. <i>horseradish peroxidase</i>)
HSD3B2	3 β -hidroksisteroid dehidrogenaza tip 2
IF	imunofluorescencija
IFG-1	inzulinu sličan faktor rasta 1 (eng. <i>insulin-like growth factor 1</i>)
IHH	eng. <i>Indian hedgehog</i>
IL-6	interleukin 6
JNK	c-Jun N-terminalna kinaza
Kapβ2	eng. <i>Transportin-1</i>
LB	Luria-Bertani broth
LBD	domena za vezanje liganda (eng. <i>ligand binding domain</i>)
LCR	duga kodirajuća regija (eng. <i>long coding region</i>)
LDL	lipoproteini niske gustoće (eng. <i>low-density lipoprotein</i>)
LH	luteinizirajući hormon
log₂FC	eng. <i>logarithmic fold change</i>
LVI	limfovaskularna invazija (eng. <i>lymphovascular invasion</i>)
MAPK	kinaza aktivirana mitogenom (eng. <i>mitogen-activated protein kinase</i>)
mER	membranski receptori estrogena (eng. <i>membrane estrogen receptors</i>)
MMP-9	metaloproteinaza matriksa 9 (eng. <i>matrix metalloproteinase-9</i>)
mTOR	meta rapamicin kinaze kod sisavaca (eng. <i>mammalian target of rapamycin kinase</i>)
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijev bromid
nER	jezgrini receptori estrogena (eng. <i>nuclear estrogen receptors</i>)
NES	normalizirana vrijednost obogaćivanja (eng. <i>normalized enrichment score</i>)
NF-κB	nuklearni faktor kappa B (eng. <i>nuclear factor kappa B</i>)
NHE1	Na ⁺ /H ⁺ izmjenjivač 1 (eng. <i>sodium-hydrogen exchanger 1</i>)
NLS	signal za ulazak u jezgru (eng. <i>nuclear localization signal</i>)
NTD	N-terminalna domena (eng. <i>N-terminal domain</i>)
OFC	orofacijalni rascjepi (eng. <i>orofacial cleft</i>)
OS	ukupno preživljenje (eng. <i>overall survival</i>)
OSCC	planocelularni karcinom usne šupljine (eng. <i>oral squamous cell carcinoma</i>)
p27	inhibitor kinaza ovisnih o ciklinu p27 (eng. <i>cyclin-dependent kinase inhibitor 1B</i>)
padj	prilagođena statistička značajnost (eng. <i>adjusted p-value</i>)
PBS	fosfatni pufer (eng. <i>phosphate-buffered saline</i>)
PCA	analiza glavnih komponenti (eng. <i>principal component analysis</i>)
PCR	lančana reakcija polimerazom (eng. <i>polymerase chain reaction</i>)
PD-1	protein 1 programirane stanične smrti (eng. <i>programmed cell death protein 1</i>)
PDGF	trombocitni faktor rasta (eng. <i>platelet-derived growth factor</i>)
PI	propidijev jodid (eng. <i>propidium iodide</i>)
PI3K	fosfatidilinozitol 3-kinaza (eng. <i>phosphoinositide 3-kinase</i>)

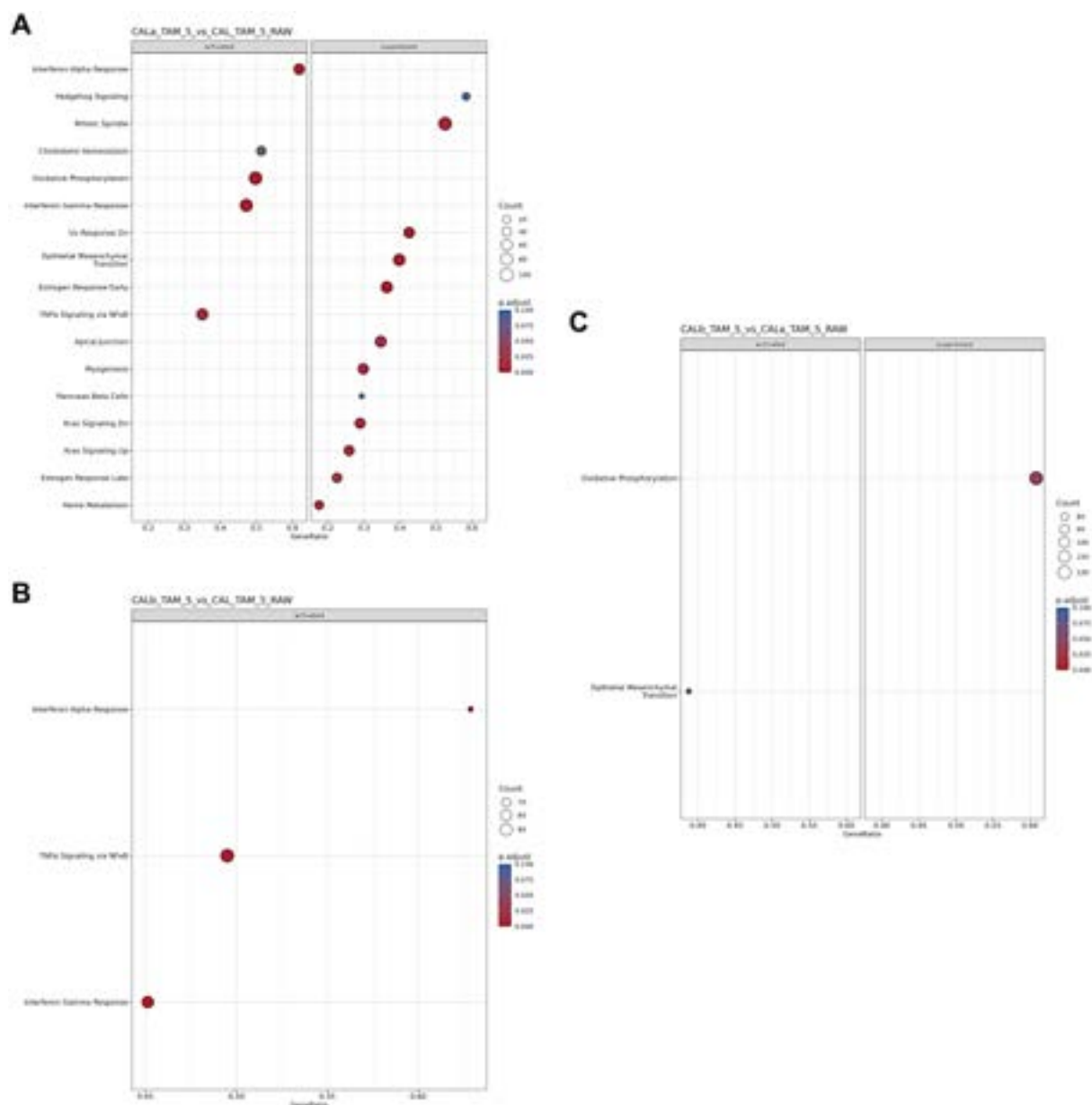
PKA	proteinska kinaza A
PKC	proteinska kinaza C
PNI	perineuralna invazija (eng. <i>perineural invasion</i>)
PTCH1	eng. <i>Patched 1</i>
ROC	eng. <i>receiver operating characteristic</i>
RPK	eng. <i>reads per kilobase</i>
SASP	sekretorni fenotip povezan sa senescencijom (eng. <i>senescence-associated secretory phenotype</i>)
SCN2A	alfa podjedinica natrijevog kanala reguliranog naponom tipa 2 (eng. <i>sodium channel protein type 2 subunit alpha</i>)
SDS	natrijev dodecil sulfat (eng. <i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SERD	selektivni degradatori receptora estrogena (eng. <i>selective estrogen receptor degraders</i>)
SERM	selektivni modulatori receptora estrogena (eng. <i>selective estrogen receptor modulators</i>)
SHH	eng. <i>sonic hedgehog</i>
SHH-N	N-terminalni fragment proteina SHH (signalna domena)
SMO	eng. <i>Smoothened</i>
STAT3	transduktor signala i aktivator transkripcije 3 (eng. <i>signal transducer and activator of transcription 3</i>)
SUFU	eng. <i>supressor of fused homolog</i>
TAM	tamoksifen
TEMED	tetrametiletilendiamin
TGF-β1	transformirajući faktora rasta beta-1 (eng. <i>transforming growth factor beta 1</i>)
TKI	inhibitori tirozin kinaze (eng. <i>tyrosine kinase inhibitors</i>)
TPM	eng. <i>transcripts per million</i>
VEGF	vaskularni endotelni faktor rasta (eng. <i>vascular endothelial growth factor</i>)
WB	westernska metoda otiska (eng. <i>western blot</i>)
βTrCP	eng. <i>beta-transducin repeat containing E3 ubiquitin protein ligase</i>

PRILOG B: Dodatne funkcionalne analize transkriptomskih podataka

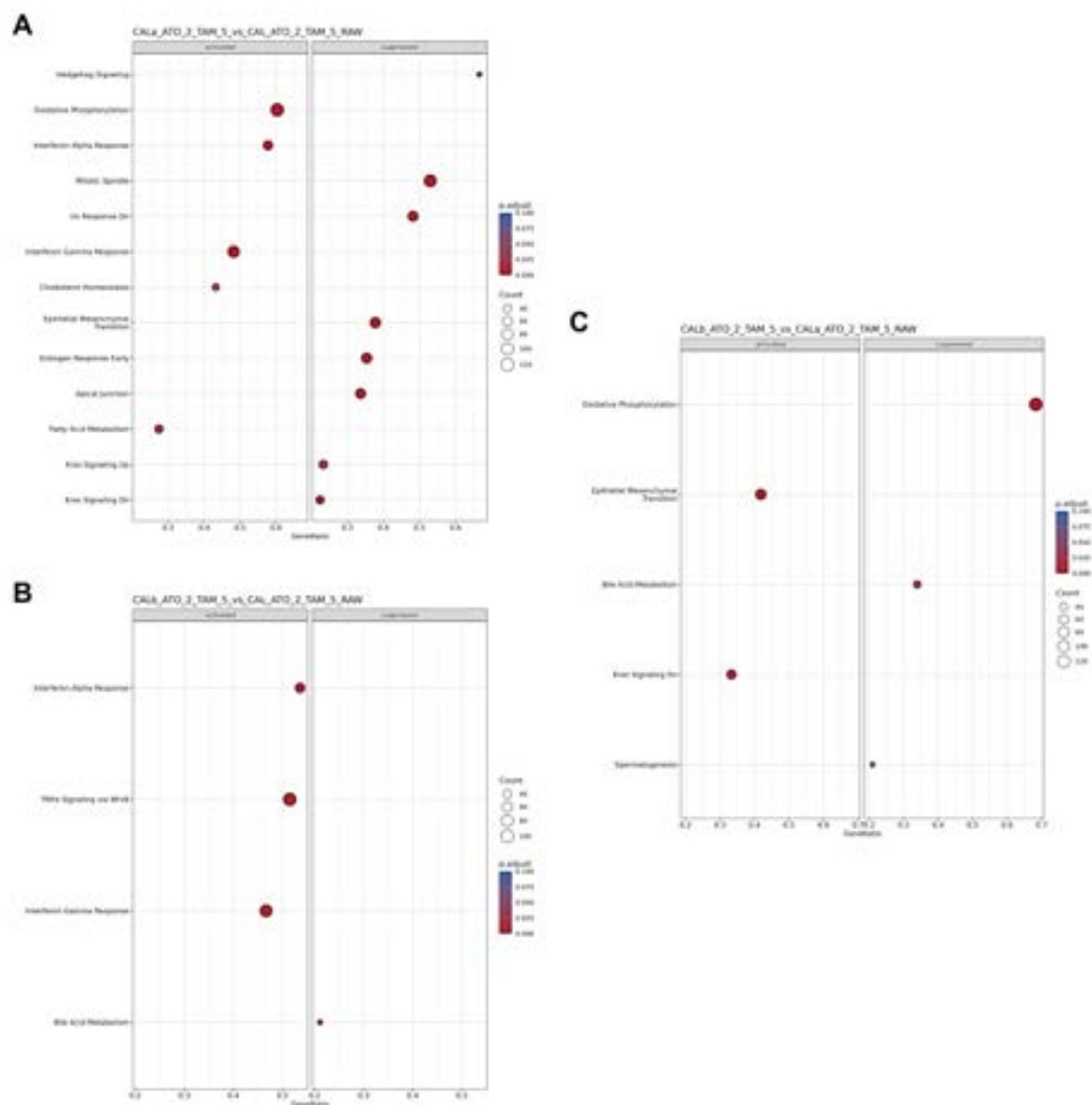
Ovaj prilog sadrži dodatne grafičke i tablične prikaze funkcionalne interpretacije podataka dobivenih sekvenciranjem RNA, koji nadopunjuju rezultate prikazane u glavnom dijelu rada.



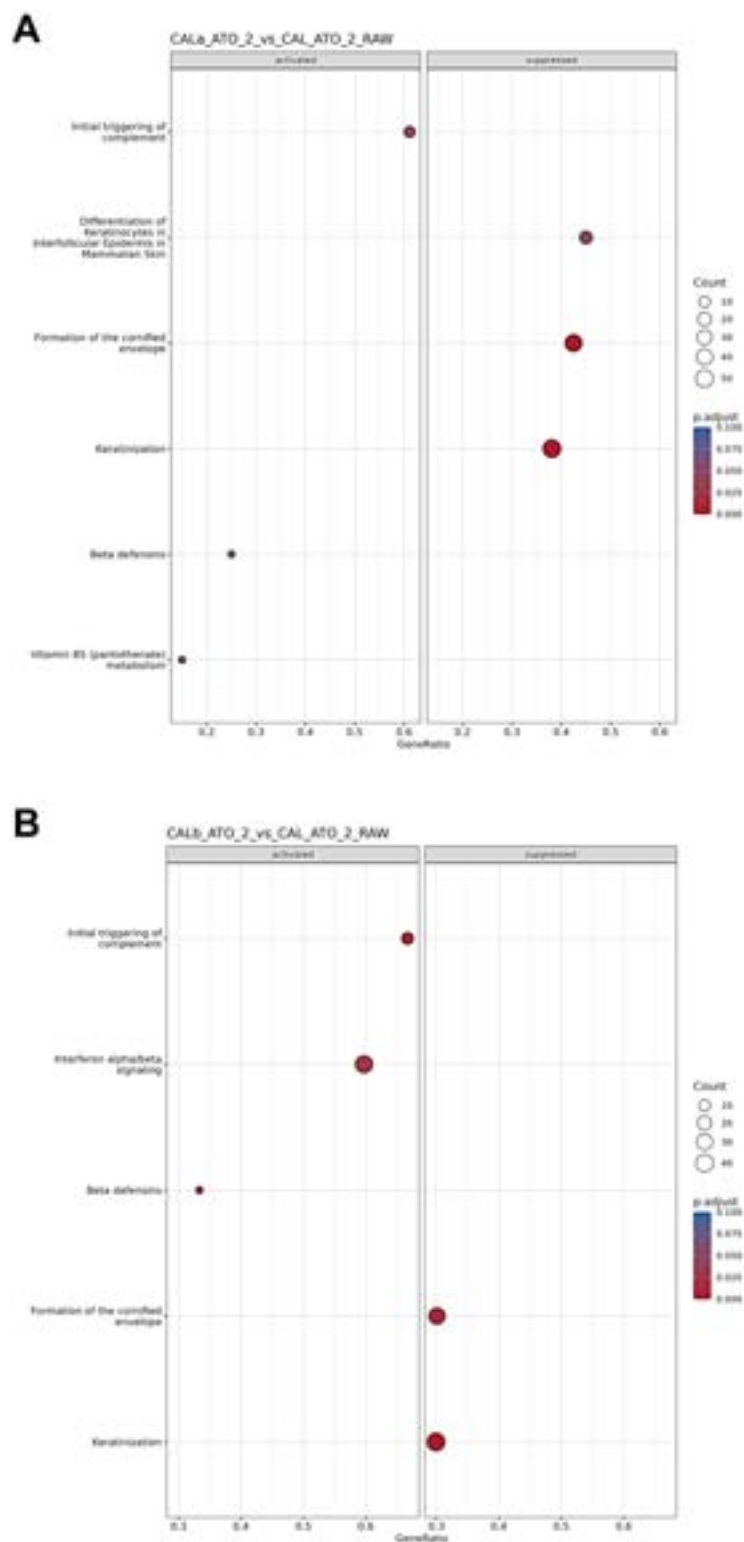
Slika P1. Analiza obogaćenih skupova gena temeljena na skupu gena *Hallmark* nakon tretmana arsenovim trioksidom (ATO 2 μ M). Prikazane su usporedbe između (A) CAL-27 ESR1^{KI} i CAL-27, (B) CAL-27 ESR2^{KI} i CAL-27 i (C) CAL-27 ESR2^{KI} i CAL-27 ESR1^{KI}. Oznake na y-osi predstavljaju nazive genskih skupova *Hallmark*. Veličina kružića označava broj gena (Count), a boja prilagođena P-vrijednost (FDR, padj ≤ 0,1). Dijagrami su podijeljeni na aktivirane (eng. *activated*) (NES > 0) i suprimirane (eng. *suppressed*) (NES < 0) skupove.



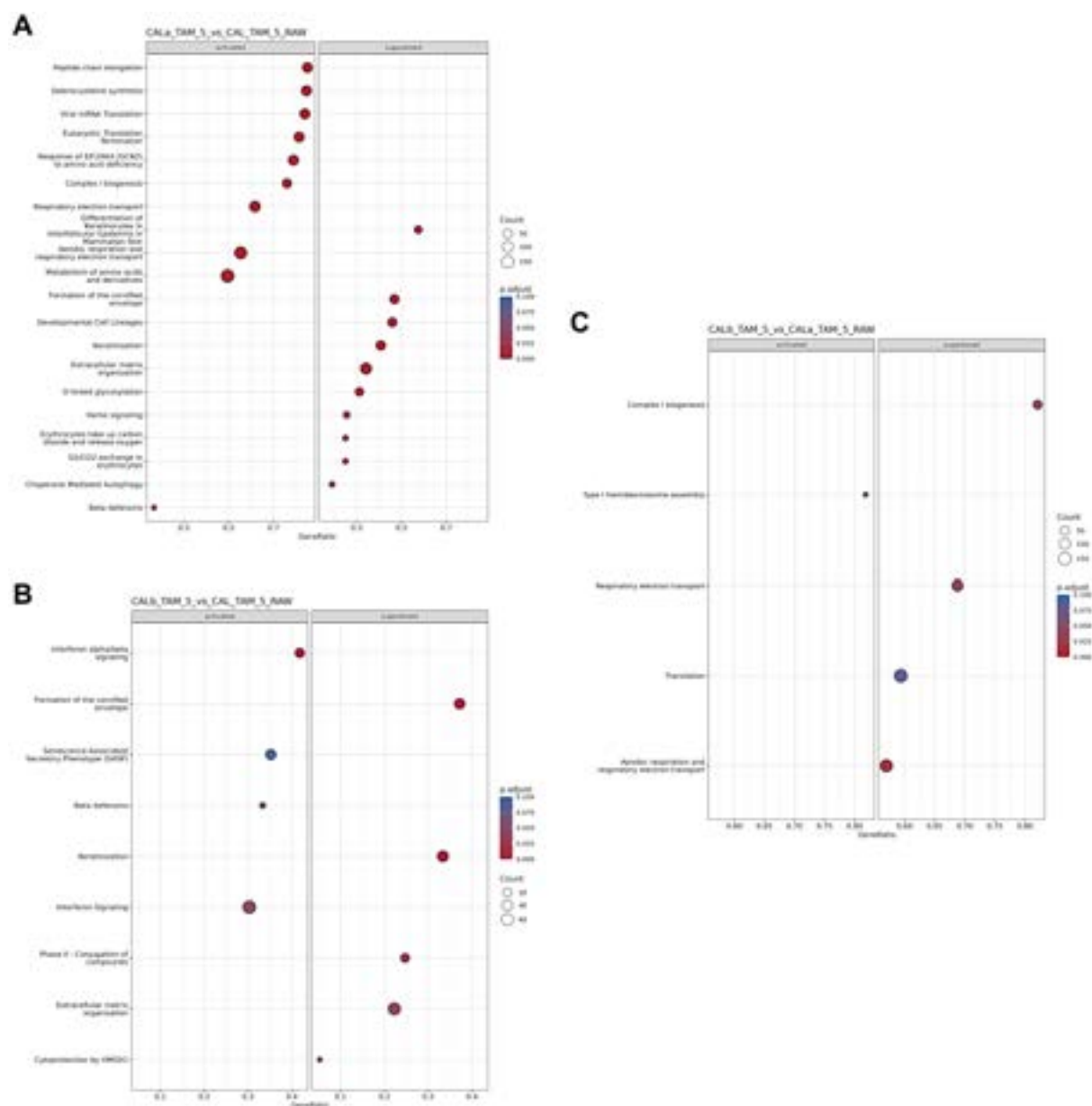
Slika P2. Analiza obogaćenih skupova gena temeljena na skupu gena *Hallmark* nakon tretmana tamoksifenom (TAM 5 μ M). Prikazane su usporedbe između (A) CAL-27 *ESRI*^{Kl} i CAL-27, (B) CAL-27 *ESR2*^{Kl} i CAL-27 i (C) CAL-27 *ESR2*^{Kl} i CAL-27 *ESR1*^{Kl}. Oznake na y-osi predstavljaju nazive genskih skupova *Hallmark*. Veličina kružića označava broj gena (Count), a boja prilagođenu *P*-vrijednost (FDR, padj $\leq 0,1$). Dijagrami su podijeljeni na aktivirane (eng. *activated*) (NES > 0) i suprimirane (eng. *suppressed*) (NES < 0) skupove.



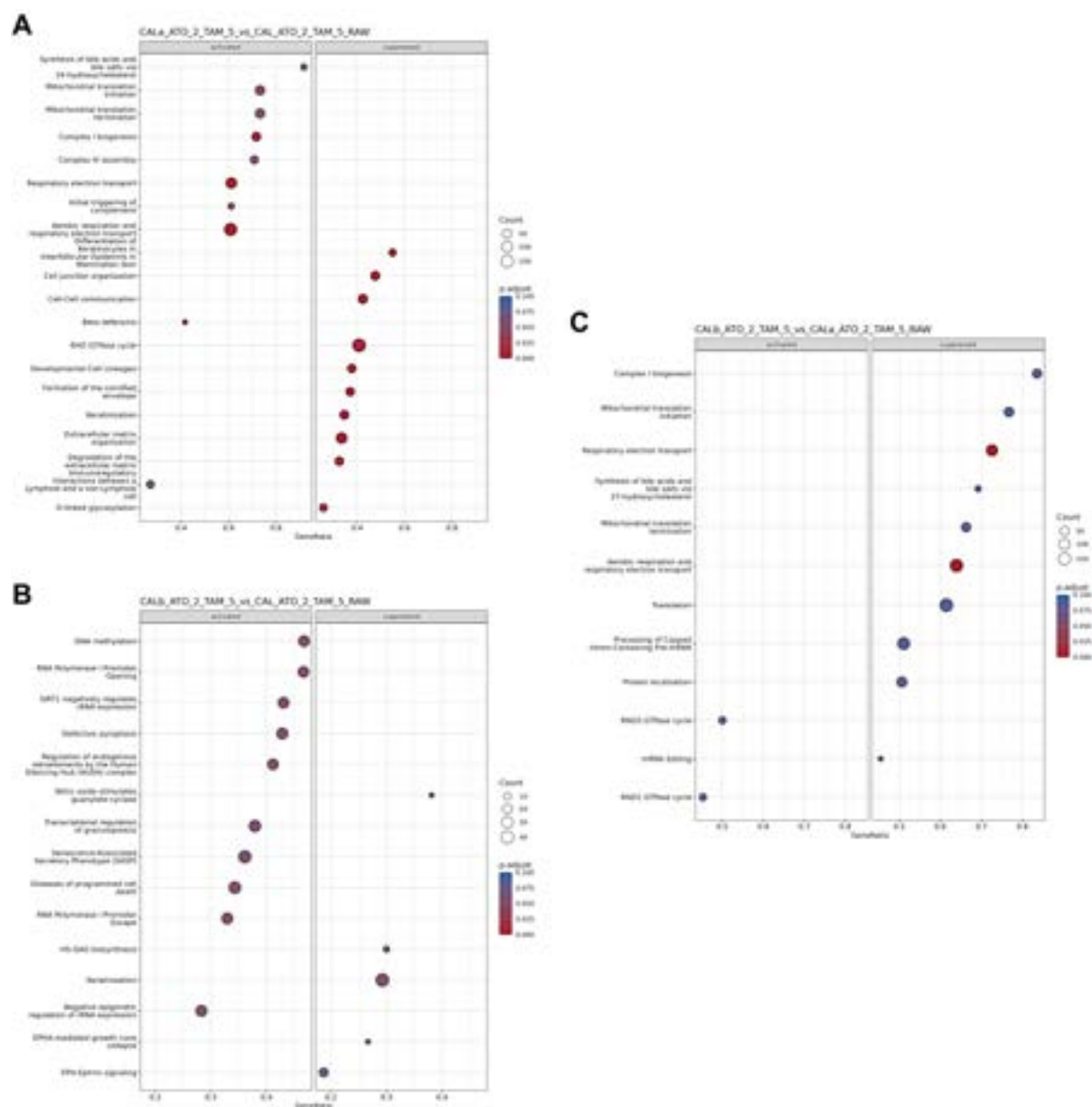
Slika P3. Analiza obogaćenih skupova gena temeljena na skupu gena *Hallmark* nakon kombiniranog tretmana arsenovim trioksidom (ATO 2 μ M) i tamoksifenom (TAM 5 μ M). Prikazane su usporedbe između (A) CAL-27 ESR1^{KI} i CAL-27, (B) CAL-27 ESR2^{KI} i CAL-27 i (C) CAL-27 ESR2^{KI} i CAL-27 ESR1^{KI}. Oznake na y-osi predstavljaju nazive genskih skupova *Hallmark*. Veličina kružića označava broj gena (Count), a boja prilagođenu *P*-vrijednosti (FDR, padj $\leq 0,1$). Dijagrami su podijeljeni na aktivirane (eng. *activated*) (NES > 0) i suprimirane (eng. *suppressed*) (NES < 0) skupove.



Slika P4. Analiza obogaćenih skupova gena temeljena na bazi *Reactome* nakon tretmana arsenovim trioksidom (ATO 2 μ M). Prikazane su usporedbe između (A) CAL-27 *ESR1*^{KI} i CAL-27, (B) CAL-27 *ESR2*^{KI} i CAL-27. Usporedba CAL-27 *ESR2*^{KI} i CAL-27 *ESR1*^{KI} nije pokazala značajnu aktivaciju određenih skupova gena. Oznake na y-osi predstavljaju nazive genskih skupova *Hallmark*. Veličina kružića označava broj gena (Count), a boja prilagođenu *P*-vrijednost (FDR, padj $\leq 0,1$). Dijagrami su podijeljeni na aktivirane (eng. *activated*) (NES > 0) i suprimirane (eng. *suppressed*) (NES < 0) skupove.



Slika P5. Analiza obogaćenih skupova gena temeljena na bazi *Reactome* nakon tretmana tamoksifonom (TAM 5 μ M). Prikazane su usporedbe između (A) CAL-27 *ESR1*^{KI} i CAL-27, (B) CAL-27 *ESR2*^{KI} i CAL-27 i (C) CAL-27 *ESR2*^{KI} i CAL-27 *ESR1*^{KI}. Oznake na y-osi predstavljaju nazive genskih skupova *Hallmark*. Veličina kružića označava broj gena (Count), a boja prilagođenu *P*-vrijednost (FDR, padj $\leq 0,1$). Dijagrami su podijeljeni na aktivirane (eng. *activated*) (NES > 0) i suprimirane (eng. *suppressed*) (NES < 0) skupove.



Slika P6. Analiza obogaćenih skupova gena temeljena na bazi *Reactome* nakon kombiniranog tretmana arsenovim trioksidom (ATO 2 μ M) i tamoksifenom (TAM 5 μ M). Prikazane su usporedbe između (A) CAL-27 *ESR1*^{K1} i CAL-27, (B) CAL-27 *ESR2*^{K1} i CAL-27 i (C) CAL-27 *ESR2*^{K1} i CAL-27 *ESR1*^{K1}. Oznake na y-osi predstavljaju nazive genskih skupova *Hallmark*. Veličina kružića označava broj gena (Count), a boja prilagođenu *P*-vrijednost (FDR, padj $\leq 0,1$). Dijagrami su podijeljeni na aktivirane (eng. *activated*) (NES > 0) i suprimirane (eng. *suppressed*) (NES < 0) skupove.

9. ŽIVOTOPIS

Josipa Jelačić (djevojačko prezime Čonkaš) rođena je 17. ožujka 1997. godine u Čakovcu. Osnovno i srednjoškolsko obrazovanje završila je u Prelogu, gdje je 2015. godine maturirala u općoj gimnaziji Srednje škole Prelog. Iste godine upisala je preddiplomski studij Biologije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu i 2018. stekla titulu sveučilišne prvostupnice biologije, obranivši završni rad „*Neurobiološka podloga autizma*“, pod mentorstvom prof. dr. sc. Dubravke Hranilović. Potom je upisala diplomski sveučilišni studij Eksperimentalne biologije, modul Fiziologija i imunobiologija, koji je završila 2021. s najvećom pohvalom (summa cum laude), obranivši diplomski rad naslova „*Konstrukcija vektora za ekspresiju proteina SHH u staničnoj liniji melanoma čovjeka CHL-1*“, pod mentorstvom dr. sc. Maje Sabol. Povodom Dana fakulteta 2020. primila je Dekaničinu nagradu za najboljeg studenta diplomskog studija, a diplomski rad joj je nagrađen priznanjem „Zoran Zgaga“ Hrvatske udruge genetičkih inženjera. Tijekom studija stekla je vrijedno iskustvo kroz tri laboratorijske prakse, položila tečaj za rad s pokusnim životinjama i sudjelovala na prvom projektu društveno korisnog učenja na području mikrobiologije u Hrvatskoj, „*U društvu mikroba*“, kao i u provedbi niza popularno-znanstvenih manifestacija „*Noć biologije*“, koja je dio veće manifestacije „*Dan i noć na PMF-u*“. Također, tijekom cijelog studija bila je dobitnica nagrade „*Naj student*“ Grada Preloga i stipendije Zaklade Mikec za nadarene studente.

Godine 2021. zaposlena je kao asistent na projektima „Regulacija GLI koda u tumorima ovisnim o BRAF/NRAS mutacijama“ (istraživački projekt Hrvatske zaklade za znanost) i „Deciphering Mechanisms of Endocrin Resistance to Discover New Predictive Biomarkers and Combination Therapy for Hormone Receptor-Positive Breast Cancers“ (donacija The Terry Fox Foundation), u Laboratoriju za nasljedni rak Zavoda za molekularnu medicinu Instituta Ruđer Bošković. Iste godine upisala je i doktorski studij Biologija na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. U navedenom periodu objavila je šest izvornih i tri pregledna znanstvena rada te bila autor na ukupno 26 priopćenja sa skupova, od kojih je na 11 priopćenja bila prezentirajući autor, uključujući osam posterskih izlaganja, jedno kratko usmeno predavanje i dva pozvana predavanja. Samim time aktivno je sudjelovala na brojnim domaćim i međunarodnim znanstvenim skupovima i radionicama. Nadalje, bila je član organizacijskog odbora dvije međunarodne konferencije Hrvatskog društva za istraživanje raka, 2022. i 2024. godine. Kao jedina stipendistica iz Hrvatske primila je EACR Travel Grant za sudjelovanje na konferenciji „*EACR 2024: Innovative Cancer Science*“ u Rotterdamu i

nagradu „*FEBS OpenBio Best Young Researcher Poster Award*“ za najbolje postersko izlaganje na međunarodnoj konferenciji „*The 1st Regional SDIR-HDIR-MOKAD Congress*“. Također, dobitnica je potpore Zaklade za obrazovanje Dr. Vinko Žganec i financijske potpore IRB-a za mobilnost istraživača u svrhu jednomjesečnog usavršavanja na Institutu za bioinformatiku Biocentra Medicinskog sveučilišta Innsbrucku, u grupi izv. prof. dr. sc. Huberta Hackla, gdje je boravila u siječnju 2026. Tijekom izrade doktorskog rada bila je neposredni voditelj pet diplomskih radova i nekoliko studentskih praksi, aktivno sudjelovala u provedbi pet znanstvenih projekata i brojnim manifestacijama za popularizaciju znanosti. Aktivna je članica Federacije europskih biokemijskih društava (FEBS), Hrvatskog društva za biokemiju i molekularnu biologiju (HDBMB), Europskog društva za istraživanje raka (EACR) te Hrvatskog društva za istraživanje raka (HDIR).

Popis objavljenih znanstvenih radova:

1. Kurtović, M.; Piteša, N.; Bartoniček, N.; Ozretić, P.; Musani, V.; **Čonkaš, J.**; Petrić, T.; King, C.; Sabol, M. *RNA-seq and ChIP-seq Identification of Unique and Overlapping Targets of GLI Transcription Factors in Melanoma Cell Lines*. *Cancers* 2022, 14, 4540.
2. Budimir, I.; Tomasović-Lončarić, Č.; Kralik, K.; **Čonkaš, J.**; Eljuga, D.; Žic, R.; Gorjanc, B.; Tucaković, H.; Caktaš, D.; Jaman, J.; Lisek, V.; Vlajčić, Z.; Martić, K.; Ozretić, P. *Higher Expressions of SHH and AR Are Associated with A Positive Receptor Status and Have Impact on Survival in A Cohort of Croatian Breast Cancer Patients*. *Life* 2022, 12, 1559.
3. **Čonkaš, J.**; Sabol, M.; Ozretić, P. *‘Toxic Masculinity’: What Is Known about the Role of Androgen Receptors in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma*. *Int. J. Mol. Sci.* 2023, 24, 3766.
4. Piteša, N.; Kurtović, M.; Bartoniček, N.; Gkotsi, D.S.; **Čonkaš, J.**; Petrić, T.; Musani, V.; Ozretić, P.; Riobo-Del Galdo, N.A.; Sabol, M. *Signaling Switching from Hedgehog-GLI to MAPK Signaling Potentially Serves as a Compensatory Mechanism in Melanoma Cell Lines Resistant to GANT-61*. *Biomedicines* 2023, 11, 1353.
5. Tomić, A.; **Čonkaš, J.**; Ozretić, P. *Let’s Talk about Sex Hormone Receptors and Their Physical Interaction with Sonic Hedgehog Protein: A Computational Study with Emphasis on Progesterone Receptor*. *Appl. Sci.* 2024, 14, 562.
6. Kranjčević, J.-K.⁺; **Čonkaš, J.**⁺; Ozretić, P. *The Role of Estrogen and Estrogen Receptors in Head and Neck Tumors*. *Cancers* 2024, 16, 1575.
7. Kurtović, M.; Piteša, N.; **Čonkaš, J.**; Hajpek, H.; Vučić, M.; Musani, V.; Ozretić, P.; Sabol, M. *GLI Transcriptional Targets S100A7 and KRT16 Show Upregulated Expression Patterns in Epidermis Overlying the Tumor Mass in Melanoma Samples*. *Int. J. Mol. Sci.* 2024, 25, 6084.
8. Kvolik Pavić, A.; **Čonkaš, J.**; Mumlek, I.; Zubčić, V.; Ozretić, P. *Clinician’s Guide to Epitranscriptomics: An Example of N1-Methyladenosine (m1A) RNA Modification and Cancer*. *Life* 2024, 14, 1230.

9. **Jelačić, J.**; Milutin, N.; Stojković, I.; Vugrinec, O.; Kvolik, A.; Vušković, S.; Mumlek, I.; Zubčić, V.; Leović, D.; Bilić, M.; Ozretić, P. *Gene Expression Profiling of Progesterone Receptors in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma*. *Int. J. Mol. Sci.* 2026, 27, 1853.

Kongresna priopćenja:

1. **Čonkaš, J.**; Josić, J.; Piteša, N.; Kurtović, M.; Petrić, T.; Musani, V.; Sabol, M.; Vugrinec, O.; Leović, D.; Ozretić, P. The role of androgen and androgen receptors in metastasis of head and neck tumors. *6th Faculty of Science PhD student symposium*, Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, 2022. (poster)
2. **Čonkaš, J.**; Josić, J.; Piteša, N.; Kurtović, M.; Petrić, T.; Musani, V.; Sabol, M.; Vugrinec, O.; Leović, D.; Ozretić, P. Membrane androgen receptor OXER1 indicates a potential role in metastasis of head and neck tumors. *"HDIR-6: Targeting Cancer" The 6th Meeting of the Croatian Association for Cancer Research with International Participation*, Hrvatsko društvo za istraživanje raka (HDIR), Zagreb, 2022. (poster i član organizacijskog odbora)
3. **Čonkaš, J.** Potential interaction between Hedgehog-GLI signaling and androgen receptors in HNSCC. *BBSRC International Partnering Award: 'The GLI transcription factors: from upstream regulators to downstream targets'*, Sveučilište u Leedsu, Ujedinjeno Kraljevstvo (pozvano predavanje)
4. **Čonkaš, J.**; Josić, J.; Kranjčević, J.-K.; Piteša, N.; Kurtović, M.; Musani, V.; Sabol, M.; Vugrinec, O.; Mumlek, I.; Kvolik Pavić, A.; Zubčić, V.; Leović, D.; Ozretić, P. Correlation between the sex hormone receptors expression and demographic parameters in HNSCC patients. *7th Faculty of Science PhD student symposium*, Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, 2023. (poster)
5. **Čonkaš, J.**; Josić, J.; Kranjčević, J.-K.; Milutin Gašperov, N.; Piteša, N.; Kurtović, M.; Musani, V.; Sabol, M.; Vugrinec, O.; Mumlek, I.; Kvolik Pavić, A.; Zubčić, V.; Leović, D.; Ozretić, P. Expression Profile of Sex Hormone Receptors in Head and Neck Cancer: Unraveling Gender Disparities. *6th Congress of SDIR: From Collaboration to Innovation in Cancer Research*, Beograd, 2023. (poster)
6. **Čonkaš, J.**; Josić, J.; Kranjčević, J.-K.; Milutin, N.; Vugrinec, O.; Mumlek, I.; Kvolik Pavić, A.; Sabol, M.; Leović, D.; Ozretić, P. Gender-Specific Insights into HNSCC: Examining Sex Hormone Receptors Expression and Their Clinical Significance. *EACR 2024: Innovative Cancer Science*, Rotterdam, 2024. (poster)
7. **Čonkaš, J.**; Josić, J.; Kranjčević, J.-K.; Milutin, N.; Vugrinec, O.; Mumlek, I.; Kvolik Pavić, A.; Leović, D.; Ozretić, P. Unraveling Sex-Specific Patterns in HNSCC: Exploring the Clinical Significance of Sex Hormone Receptors Differential Expression in HNSCC. *FEBS3+ Meeting: Exploring Molecular Frontiers*, Hrvatsko društvo za biokemiju i molekularnu biologiju, Pula, 2024. (poster)
8. **Čonkaš, J.**; Kranjčević, J.-K.; Milutin, N.; Vugrinec, O.; Mumlek, I.; Kvolik Pavić, A.; Leović, D.; Zubčić, V.; Sabol, M.; Ozretić, P. Exploring the Role of Estrogen Receptors in Head and Neck Cancer: Implications for Progression and Treatment. *HDIR-7: Advances in Cancer Research and Treatment*, Hrvatsko društvo za istraživanje raka (HDIR), Zagreb, 2024. (kratko predavanje i član organizacijskog odbora)
9. **Čonkaš, J.** Uloga receptora estrogena u raku pločastih stanica sluznice glave i vrata.

- 10. simpozij Apoptoza i novotvorine*, Hrvatska akademija znanosti i umjetnosti, Zagreb, 2025. (pozvano predavanje)
10. **Čonkaš, J.**; Kranjčević, J.-K.; Milutin, N.; Vugrinec, O.; Mumlek, I.; Kvolik Pavić, A.; Leović, D.; Zubčić, V.; Sabol, M.; Ozretić, P. Exploring the Link Between Estrogen Receptors and Hedgehog-GLI Pathway in HNSCC. *9th Faculty of Science PhD Student Symposium*, Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, 2025. (poster)
11. **Jelačić, J.**; Kranjčević, J.-K.; Milutin, N.; Vugrinec, O.; Mumlek, I.; Kvolik Pavić, A.; Leović, D.; Zubčić, V.; Sabol, M.; Ozretić, P. Estrogen Receptor Modulation and Hedgehog-GLI Crosstalk in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *The 1st Regional SDIR-HDIR-MOKAD Congress*, Beograd, 2025. (poster)