

Ekspresija transkripcijskog faktora BACH2 u T-limfomu čovjeka

Rozman, Marija

Master's thesis / Diplomski rad

2021

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:420325>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-06**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno - matematički fakultet
Biološki odsjek

Marija Rozman

Ekspresija transkripcijskog faktora BACH2 u T-
limfomu čovjeka

Diplomski rad

Zagreb, 2021

Ovaj rad izrađen je na Zavodu za molekularnu biologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod vodstvom izv. prof. dr. sc. Petre Korać. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra molekularne biologije.

ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem svojoj mentorici izv. prof. dr. sc. Petri Korać i asistentici mag. biol. mol. Pauli Gršković koje su mi omogućile radno iskustvo tijekom prakse i izrade diplomskog rada te svu pomoć i savjete koji su mi bili potrebni.

Zahvaljujem svojim roditeljima koji su mi omogućili priliku za studiranje te me podržavali tijekom svih ovih godina.

Zahvaljujem svom dečku i prijateljima koji su bili moja emocionalna podrška tijekom ovog perioda studiranja te uvijek bili uz mene u teškim trenucima.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Diplomski rad

Ekspresija transkripcijskog faktora *BACH2* u T-limfomu čovjeka

Marija Rozman

Rooseveltov trg 6, 10 000 Zagreb

T-stanični limfomi čine 10% ne-Hodgkinovih limfoma te najčešće nastaju iz zrelih T-stanica timusa čime pripadaju skupini perifernih limfoma T-stanica. Limfomi ove skupine su zbog rijetke zastupljenosti slabije istraženi. Cilj ovog rada je utvrditi potencijalnu promjenu ekspresije transkripcijskog faktora *BACH2* u tumorskim stanicama perifernog T-staničnog limfoma bez specifičnih obilježja. Stanice T-zone netumorskog sekundarnog limfnog tkiva izolirane su pomoću mikrodisektora i korištene kao kontrola. Izolirana RNA je prevedena u cDNA metodom reverzne transkripcije te je ekspresija gena *BACH2* i endogene kontrole, gena *HPRT1*, analizirana metodom qPCR. Korištenjem relativne kvantifikacije ekspresije gena utvrđeno je značajno smanjenje ekspresije *BACH2* u tumorskom tkivu. Smanjenje ekspresije upućuje na promjene u tumorskim stanicama koje pridonose mehanizmu izbjegavanja apoptoze. Ovakvi rezultati suprotni su dostupnim podacima o promjenama ekspresije *BACH2* u većini tipova B- staničnih limfoma gdje je njegova prekomjerna ekspresija povezana s lošijom prognozom oboljelih što upućuje na drugačiju ulogu ovog transkripcijskog faktora ovisno o unutarstaničnom miljeu.

(27 stranica, 10 slika, 2 tablice, 34 literaturna navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Ključne riječi: ne-Hodgkinov limfom, T-limfom, *BACH2*, apoptoza

Voditelj: izv. prof. dr. sc. Petra Korać

Ocjenitelji: izv.prof.dr.sc. Petra Korać

doc.dr.sc. Tomislav Ivanković

izv.prof.dr.sc. Dijana Škorić

Rad prihvaćen: 8.7. 2021.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb

Faculty of Science

Department of Biology

Master thesis

Expression of transcription factor *BACH2* in human T-cell lymphoma

Marija Rozman

Rooseveltova trg 6, 10 000 Zagreb

T-cell lymphomas make 10% of non-Hodgkin lymphomas and most often develop from mature T-cells in thymus which makes them part of peripheral T-cell lymphoma subtype. Lymphomas of this subtype are poorly understood because of their rare occurrence. The aim of this research is to determine the potential change in expression of transcription factor *BACH2* in tumour cells of peripheral T-cell lymphoma, not otherwise specified. T-cell zone from histological specimens of healthy secondary lymphoid tissue was separated with microdissector and used as a control. Isolated RNA was reverse-transcribed into cDNA and the expression of *BACH2* was quantified by qPCR, with *HPRT1* gene used as endogenous control. Relative quantification of gene expression showed significantly lower expression of *BACH2* in tumour tissue. Lower expression indicates changes in tumour cells that contribute to mechanisms of apoptosis avoidance. The results are different from the observations of *BACH2* expression in B-cell lymphoma where its lower expression indicates poorer survival which points out to different roles of this transcription factor depending on the inside of the cell.

(27 pages, 10 figures, 2 tables, 34 references, original language: Croatian)

Keywords: non-Hodgkin lymphoma, T-lymphoma, *BACH2*, apoptosis

Supervisor: Petra Korać, PhD, Assoc. Prof.

Reviewers: izv.prof.dr.sc. Petra Korać

doc.dr.sc. Tomislav Ivanković

izv.prof.dr.sc. Dijana Škorić

Thesis accepted: July 8th, 2021.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1 Uloga limfocita u imunom sustavu	1
1.2 Razvoj limfoma	2
1.2.2 ne-Hodgkinovi limfomi	2
1.2.1 Periferni T-stanični limfomi	3
1.2.2 Periferni T-stanični limfomi, bez drugih osobina	4
1.4. Uloga transkripcijskog faktora BACH2 u B-stanicama i T-stanicama.....	6
1.5 Cilj istraživanja.....	10
2. MATERIJALI I METODE	11
2.1 Materijali:	11
2.2 Izolacija stanica T-zone netumorskog limfnog tkiva.....	11
2.3 Izolacija RNA	13
2.4 Reverzna transkripcija	13
2.5 qPCR	14
3. REZULTATI	15
3.1 Uspješnost izolacije RNA.....	15
3.2 Relativna kvantifikacija ekspresije gena <i>BACH2</i>	17
4. RASPRAVA	20
5. ZAKLJUČAK.....	23
6. LITERATURA	24

1.UVOD

1.1 Uloga limfocita u imunosnom sustavu

Limfociti su leukociti koje sudjeluju u imunosnoj obrani organizma, prisutni su u krvi, limfi i limfoidnim organima. Prolaskom kroz limfu eliminiraju strane čestice poput bakterija i virusa te se skladište u limfnim čvorovima i ostalim sekundarnim limfnim organima, gdje se i pojačano repliciraju za vrijeme infekcije. Limfocite dijelimo na B-stanice, T-stanice i stanice NK (NK, od eng. *natural killer cells*). Sve stanice limfocitne loze proizvode se u koštanoj srži, primarnom limfnom organu, te krvotokom dolaze u limfu gdje sudjeluju u mehanizmima obrane stečene imunosti, tijekom primarne infekcije će dio stanica nastalih naglom proliferacijom u sekundarnom limfnom tkivu postati memorijske stanice koje će omogućiti bržu obranu od sljedeće infekcije (LaRosa & Orange, 2008). Imunosni odgovor B-stanica i T-stanica se razlikuje, no zajednička karakteristika je lučenje molekula poput citokina koje će za vrijeme infekcije potaknuti aktivaciju ostatka imunosnog sustava. B-stanice dio su humoralne imunosti stečenog imunosnog sustava i pripadaju stanicama koje prezentiraju antigen. Aktivirane B-stanice u obliku plazma-stanica proizvode antitijela specifična za prisutni patogen čija je svrha obilježavanje patogena za fagocitozu makrofagima (Lebien & Tedder, 2008). Proizvodnja antitijela je omogućena somatskom hipermutacijom te rekombinacijom grupa gena koji kodiraju antitijela. T-stanice ne proizvode antitijela nego direktno ubijaju stanice citotoksičnim djelovanjem. Razlikujemo tri vrste T-stanica: pomoćničke i citotoksične T-stanice te memorijske T-stanice. Pomoćničke T-stanice za vrijeme infekcije izlučuju citokine koji povećavaju aktivnost makrofaga, neutrofila i ostalih limfocita te su ključni za sazrijevanje citotoksičnih T-stanica. Također, pomoćničke T-stanice potiču B-stanice na proizvodnju antitijela. Citotoksične T-stanice prepoznaju antigene, odnosno peptide, koji su na inficiranim stanicama prezentirani preko glavnog sustava tkivne podudarnosti grupe I (MHC, od eng. *Major histocompatibility complex*). Molekule grupe MHC I nalaze se na membranama svih stanica s jezgrom, a prepoznaju ih T-stanični receptor (eng. TCR, od *T cell receptor*) u suradnji s koreceptorom CD8 koji se nalaze na citotoksičnim T stanicama. Osim molekula grupe MHC I, postoje i molekule grupe MHC II koje su prisutne samo na stanicama koje prezentiraju antigen kao što su makrofagi, neutrofil i B-stanice. Ove molekule prepoznaje T-stanični receptor u suradnji s koreceptorom CD4, koji se nalaze na pomoćničkim limfocitima T, čije je djelovanje nužno za aktivaciju citotoksičnih T-stanica (Kaiser, 2019).

1.2 Razvoj limfoma

Tumori limfocita nazivaju se limfomi i pripadaju tumorima hematopoetskog i limfnog tkiva, a mogu zahvaćati B-stanice (B-stanični limfomi), T-stanice (T-stanični limfomi) i stanice NK. Tumori stanica NK također se svrstavaju u skupinu T-staničnih limfoma. Ne postoje definirani faktori rizika koji dovode do pojave limfoma, ali je potvrđena njihova povezanost s prijašnjom pojavom limfoma u obitelji, supresijom imunskog sustava te izloženosti određenim virusima poput virusa Eppstein-Barr i ljudskog T-limfotropnog virusa 1 (HTLV1, od eng. *Human T-lymphotropic virus type 1*). Osnovna podjela limfoma je na Hodgkinove limfome, i ne-Hodgkinove limfome.

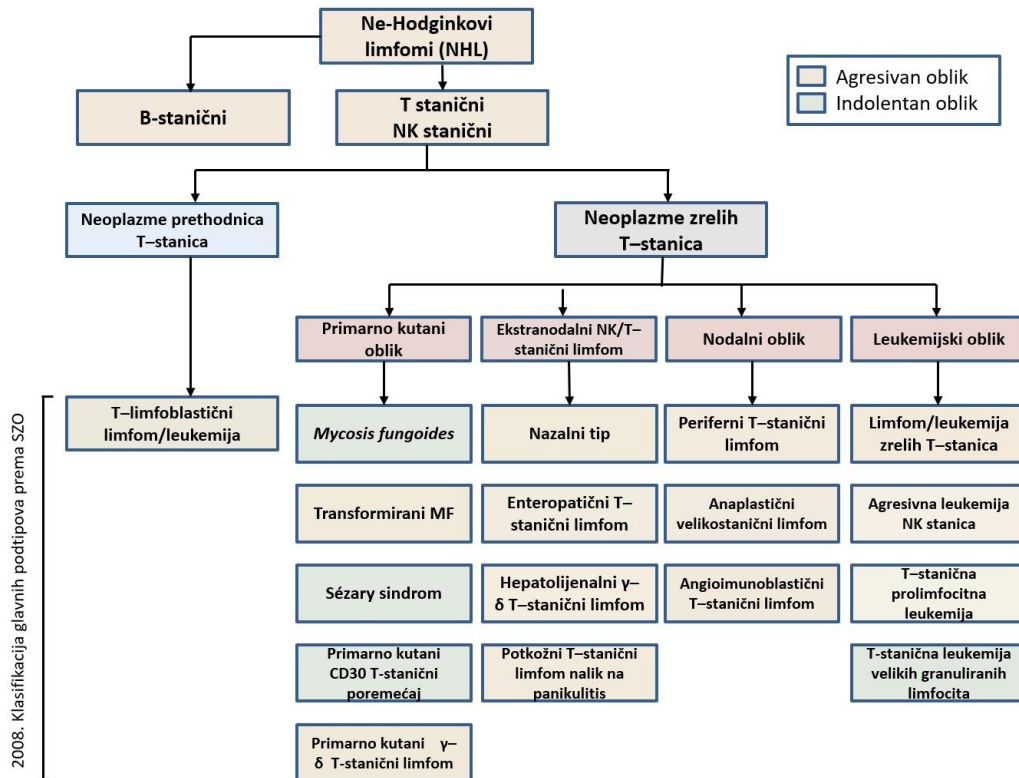
1.2.2 ne-Hodgkinovi limfomi

Ne-Hodgkinovi limfomi su heterogena i uglavnom agresivna skupina limfoma sa slabim odgovorom na terapiju te skraćenim životnim vijekom pacijenata. Čine 60% dijagnosticiranih limfoma kod djece te se obično dijagnosticiraju u već uznapredovalom stadiju. Prezentiraju se kao povećanje veličine i mase limfnih čvorova i povećanje slezene uz čestu pojavu opstrukcije dišnih puteva i sindroma tumorske lize kao što su hiperfosfatemija, hiperkalemija i hipokalcemija uzrokovane raspadom tumorskih stanica (Ansell, 2020). U ne-Hodgkinove limfome ubrajamo T-stanične limfome i B-stanične limfome gdje T-stanični limfomi čine svega 10%-15% ne-Hodgkinovih limfoma. Najčešće dijagnosticirani B-stanični limfomi ove skupine su difuzni B-velikostanični limfom (DLBCL, od eng. *Diffuse large B-cell lymphoma*), folikularni limfom, limfom stanica plaštene zone (MCL, od eng. *Mantle cell lymphoma*) i limfomi marginalne zone. Rjeđe zastupljeni oblici B-staničnog limfoma su Burkittov limfom, koji se smatra jednim od najagresivnijih tipova limfoma, a i limfoplaznocitoidni limfom. T-stanični limfomi se dijele na T-staničnu prolimfocitnu leukemiju, T-staničnu leukemiju zrnatih limfocita, kroničan limfoproliferativan poremećaj stanica NK, agresivnu leukemiju stanica NK, Epstein-Barr virus-pozitivne T-stanice i limfoproliferativne stanice NK kod djece, T-stanične limfome odraslih, ekstrapodalne T-stanične limfome nazalnog tipa, intestinalne T-stanične limfome, hepatosplenične T-stanične

limfome, potkožne T-stanične limfome nalik na panikulitis, Mycosis fungoides, Sezaryjev sindrom, primarne potkožne CD30-pozitivne T-stanice, primarne kožne periferne T-stanične limfome, periferne T-stanične limfome bez drugih osobina, angioimunoblastične T-stanične limfome, anaplastične limfome velikih stanica ALK-pozitivne i ALK-negativne i limfome velikih stanica povezanih s implantatima za dojke (<https://publications.iarc.fr/Book-And-Report-Series/Who-Classification-Of-Tumours/WHO-Classification-Of-Tumours-Of-Haematopoietic-And-Lymphoid-Tissues-2017>). T-stanični limfomi se mogu razviti iz nezrelih ili zrelih T-stanica ili iz stanica NK.

1.2.1 Periferni T-stanični limfomi

Tumori nastali iz zrelih T-stanica i stanica NK pripadaju skupini perifernih T-staničnih limfoma (PTCL, od eng. *Peripheral T-cell lymphoma*) te čine većinu skupine T-staničnih limfoma (Jiang et al., 2017). PTCL je skupina agresivnih limfoma koji mogu biti nodalni, odnosno zahvaćati limfne čvorove, ektranodalni i leukemični tipovi limfoma ili periferni limfomi bez drugih osobina (PTCL-NOS, od eng. *Peripheral T-cell lymphoma - not otherwise specified*) koji se zbog česte zahvaćenosti nodalnih mjesta često svrstavaju u nodalnu skupinu PTCL-limfoma (Slika 2.). Zbog stalne proizvodnje upalnih citokina, pacijenti s tipom limfoma PTCL često imaju paraneoplastične i hemofagocitične sindrome te eozinofiliju (<https://www.sciencedirect.com/topics/medicine-and-dentistry/peripheral-t-cell-lymphoma>). Veličina tumorskih stanica PTCL-a varira od malih do velikih stanica koje mogu imati bazofilnu ili amfifilnu citoplazmu ili citoplazmu jednaku netumorskim stanicama. Metode brze i djelotvorne detekcije genskih promjena za dijagnozu PTCL nisu razvijene zbog njegove velike heterogenosti te je nedostatak rano uočljivih markera često rezultat krive ili prekasne dijagnoze pacijenata (Rassidakis et al., 2002). Također, rijetka pojava ove vrste limfoma je razlog nedostatka velikih kliničkih istraživanja kako bi se bolje pratila uspješnost kemoterapija te razvijale preciznije metode liječenja (<https://oncohemakey.com/t-cell-lymphomas-2/>).



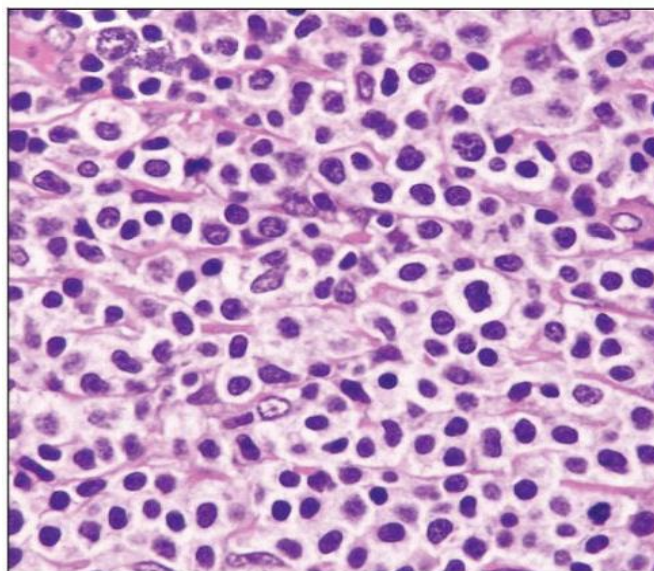
Slika 2. Podjela limfoma zrelih T-stanica i stanica NK prema WHO-klasifikaciji PTCL-NOS je na slici prikazan u skupini nodalnih limfoma, ali se zbog velike heterogenosti stanica i raznolikosti simptoma često odvajaju kao zasebna skupina (Jaffe, 2009).

1.2.2 Periferni T-stanični limfomi, bez drugih osobina

Limfom PTCL-NOS je, uz angioimunoblastičan T-limfom (AITL, od eng. *Angioimmunoblastic T-cell lymphoma*), najčešći tip limfoma zrelih T-stanica te čini oko 30% limfoma skupine PTCL. Zbog morfološke i molekularne varijabilnosti biopsije tkiva limfoma PTCL-NOS nije ga moguće svrstati niti u jednu definiranu kategoriju PTCL. Prilikom CT-skeniranja se najčešće prezentira kao abnormalnost u veličini, konzistenciji i broju limfnih čvorova dviju ili više nepovezanih regija tijela, što je poznato kao generalizirana limfadenopatija, te ga je teško razlikovati od ostalih vrsta limfoma. Pacijenti oboljeli od PTCL-NOS i AITL često imaju lošu dijagnozu, učestala je ponovna pojava bolesti, a tumori pokazuju rezistenciju na kemoterapiju (Kim et al., 2020).

Limfom PTCL-NOS je jedan od najagresivnijih ne-Hodgkinovih limfoma, karakteriziran je nepravilnim oblicima T-stanica nedefiniranim rasponom veličina uz kojeg je

često vezan gubitak receptora CD5 i CD7 te genski rearanžman T-staničnog receptora (Sibon & Gisselbrecht, 2013). Istraživanja abnormalnosti kariotipa su kod PTCL-NOS pokazala adiciju dijelova kromosoma 1q i 3p te gubitak dijela kromosoma 6q (<https://www.sciencedirect.com/topics/medicine-and-dentistry/peripheral-t-cell-lymphoma>). Opisane su i mutacije gena *FYN* čiji je produkt tirozinska kinaza važna u aktivaciji T-stanica (Sandell et al., 2017). Analizom profila genske ekspresije pokazana je deregulacija 155 gena uključenih u apoptozu, proliferaciju, remodeliranje izvanstaničnog matriksa i adheziju tumorskih stanica (Agostinelli et al., 2008). Kod većine pacijenata PTCL-NOS se prezentira kao nodalni tumor te je kao takav smješten u većinu dosad objavljenih sistematizacijskih kategorija T-staničnih limfoma, no u manjem broju slučajeva zahvaća i ekstranodalna mjesta poput kože, pluća, koštane srži i gastrointestinalnog trakta. Istraživanja ekspresije genetskog profila PTCL-NOS pokazala su da on u većini slučajeva nastaje iz aktiviranih pomoćničkih CD4+ T-stanica (Agostinelli et al., 2008). PTCL-NOS se najčešće sastoji od mješavine populacija stanica različitog oblika i veličine (Slika 3.) s visokim proliferacijskim indeksom. Najčešće je dijagnosticiran u uznapredovalom stadiju te je udio petogodišnjeg preživljenja nakon dijagnoze 20-30% (Oluwasanjo et al., n.d.). Nastanak PTCL-NOS je u 30% povezan s infekcijom tumorskih stanica virusom Epstein-Barr te se ta infekcija povezuje s agresivnijim tipom bolesti (Park et al., 2017).

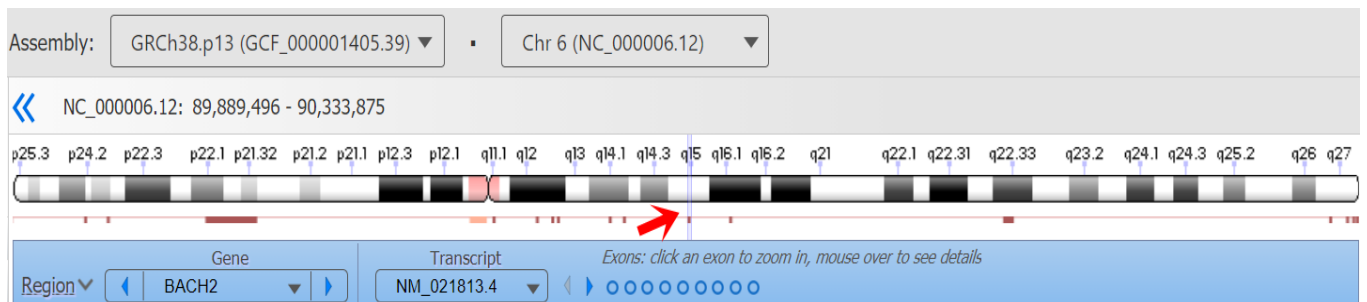


Slika 3. Tumorsko tkivo limfoma PTCL-NOS (preuzeto s: <https://basicmedicalkey.com/peripheral-t-cell-lymphoma-not-otherwise-specified/>).

Veći udio pacijenata oboljelih od PTCL-NOS je dobi starije od 60 godina te češće zahvaća muškarce nego žene. Pacijenti koji boluju od PTCL-NOS od simptoma najčešće konstitutivno prezentiraju povišenje tjelesne temperature, noćna znojenja te neobjašnjiv gubitak tjelesne težine (Agostinelli et al., 2008). Najčešće primjenjivana terapija za PTCL-NOS su ciklusi kemoterapija s ciklofosamidom, doksorubicinom, vinkristinom i prednizonom koji pokazuju povoljno djelovanje u 50-60% slučajeva s i dalje velikim brojem slučajeva ponovne pojave bolesti. Terapija antraciklinom je pokazala uspjeh u suzbijanju progresije bolesti kod pacijenata s visokim rizikom ponovne pojave PTCL (Oluwasanjo et al., n.d.).

1.4. Uloga transkripcijskog faktora BACH2 u B-stanicama i T-stanicama

BACH2 (eng. *BTB [broad complex-tramtrack-bric-a-brac] and CNC [Cap'n'collar] homology-2*) je transkripcijski faktor čija je ekspresija najviša u timusu, slezeni, B-stanicama i T-stanicama. Gen *BACH2* je kod ljudi smješten na šestom kromosomu u regiji 6q15 (Slika 4.), a kodira protein dug ukupno 841 aminokiseline.



Slika 4. Pozicija gena *BACH2* na šestom ljudskom kromosomu vizualizirana pomoću programa Genome Data Viewer (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/gdv/?org=homo-sapiens>), crvena strelica pokazuje poziciju gena *BACH2*, u regiji 6q15.

Uz BACH1, BACH2 pripada porodici transkripcijskih faktora s regijom leucinskog zatvarača (bZIP, od eng. *basic region leucin zipper*). Sadrži N-terminalnu regiju s visokokonzerviranom BTB-domenom koja je odgovorna za interakciju s proteinima poput jezgrinih korepresora i histonskih deacetilaza putem homo- ili heterodimerizacije. Između N-terminalne i C-

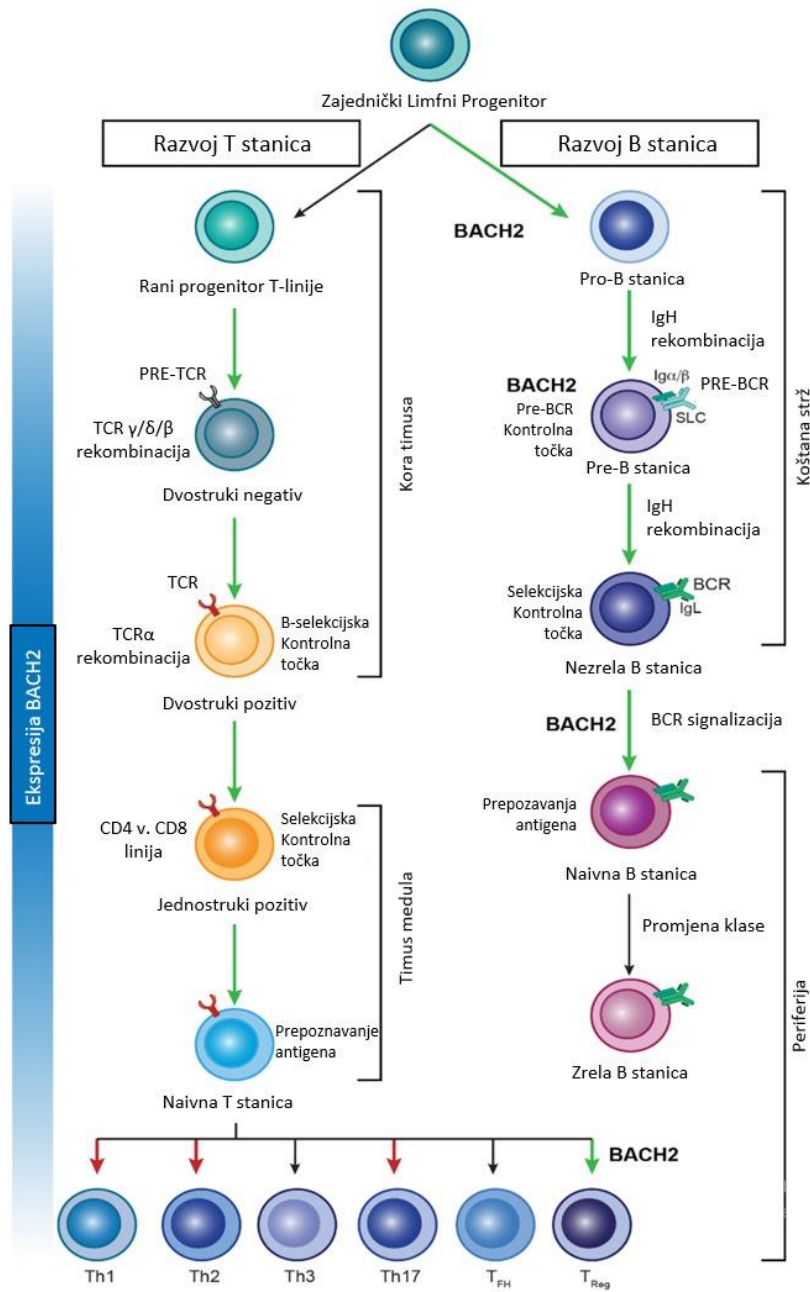
terminalne regije se nalazi regija koja veže hem s pet cisteinsko-prolinskih motiva, koja je važna u održavanju homeostaze hema za vrijeme oksidacijskog stresa (https://mutagenetix.utsouthwestern.edu/phenotypic/phenotypic_rec.cfm?pk=3232). Na C-terminalnom kraju BACH2 sadrži domenu za vezanje DNA uz koju se nalazi domena hidrofobnog leucinskog zatvarača koja mu omogućuje dimerizaciju s proteinom MAFK koji pripada porodici proteina MAF (<http://atlasgeneticsoncology.org>). Ova domena također sadrži jezgrin lokalizacijski signal (Slika 5.).



Slika 5. Prikaz regija proteina BACH2. Na N-terminalnom kraju se nalazi BTB-regija odgovorna za interakciju s ostalim proteinima, 4 CP-regije koje vežu hem se nalaze između BTB-regije i područja leucinskog zatvarača, 5. CP- regija je smještena na C-terminalnom kraju uz jezgrin izlazni signal (NES) (preuzeto s: https://mutagenetix.utsouthwestern.edu/phenotypic/phenotypic_rec.cfm?pk=3232).

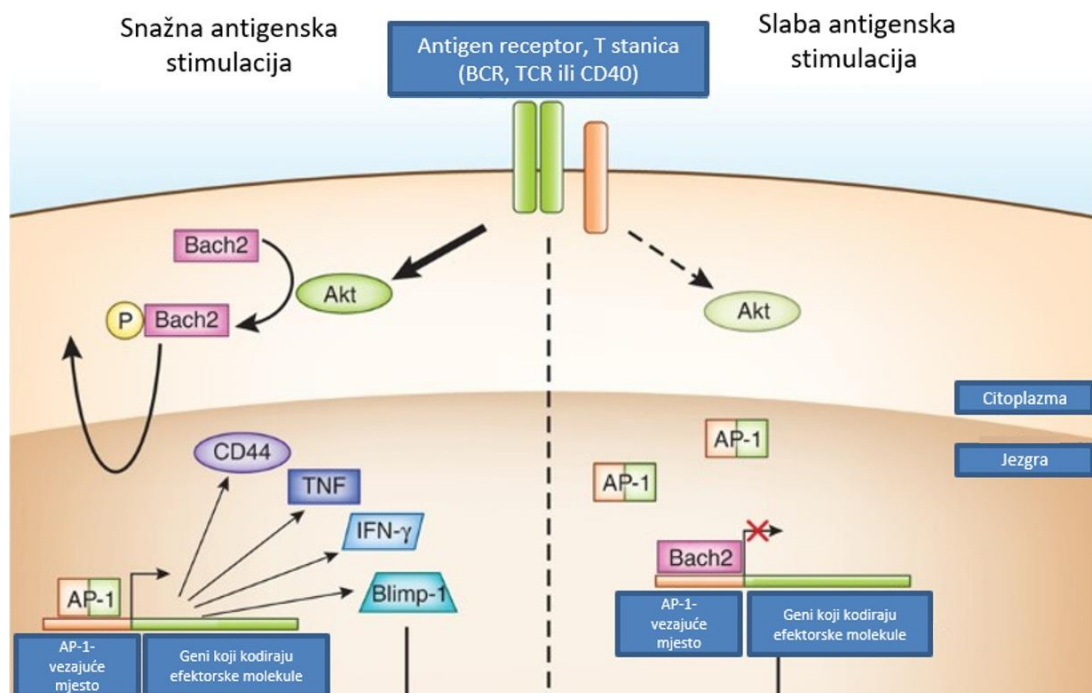
Heterodimer nastao interakcijom proteina BACH2 i MAPK ima odgovarajuću strukturu za vezanje DNA čime se inhibira ekspresija obližnjih gena.

Geni utišani djelovanjem transkripcijskog faktora BACH2 sudjeluju u regulaciji transkripcije gena nužnih za funkcije poput sazrijevanja regulacijskih T-stanica (T_{reg}), stvaranje germinativnog centra te konverziju imunoglobulinskih gena. BACH2 u B-stanicama i T-stanicama djeluje kao represor u mehanizmima regulacije sazrijevanja i u njihovoj terminalnoj diferencijaciji (Slika 6.).



Slika 6. Uloga transkripcijskog faktora BACH2 u diferencijaciji T-stanica i diferencijaciji, sazrijevanju te proliferaciji B-stanica. Ekspresija *BACH2* je povećana u početku diferencijacije T-stanica do stadija T-stanica pozitivnih na CD4 i CD8 receptor koje se nalaze unutar središta timusa nakon čega se njegova ekspresija smanjuje, ali i dalje potiče diferencijaciju stanica T_{reg}. Sudjeluje u sazrijevanju B-stanica iz progenitorskih stanica unutar koštane srži te ima ulogu u signaliziranju posredovanom receptorom B-stanica (BCR, od eng. *B-cell receptor*) ((preuzeto i prilagođeno s: https://mutagenetix.utsouthwestern.edu/phenotypic/phenotypic_rec.cfm?pk=3232).

BACH2 se dominantno nalazi u citoplazmi, no za vrijeme oksidacijskog stresa odlazi u jezgru gdje djeluje kao proapoptotski faktor, a njegovo nakupljanje unutar jezgre dovodi do apoptoze. Pokazano je da BACH2 inhibira skupinu gena ključnih za funkciju efektorskih T-stanica, time inhibira diferencijaciju u memorijske stanice efektorskih T-stanica te održava njihovu homeostazu (Yang et al., 2019). U B-stanicama potiče proliferaciju induciranu receptorom B-stanica (BCR, od eng. *B-cell receptor*). Miševi kod kojih je uklonjen gen *Bach2*, koji su imali deficijenciju proteina BACH2, pokazali su redukciju proliferacije te pojačanu ekspresiju porodice gena inhibitora kinaza ovisnih o ciklinu. Fosforilacija proteina BACH2 se odvija kao odgovor na stimulaciju BCR-a kao dio signalnog puta PI3K-Akt-mTOR, a fosforilirani BACH2 gubi aktivnost transkripcijskog represora (Sidwell & Kallies, 2016) (Slika 7.).



Slika 7. Inaktivacija Bach2 potaknuta snažnom stimulacijom antigena. Signalni put potaknut aktivacijom BCR potiče fosforilaciju Bach2 i njegovo zadržavanje u citoplazmi kod B-stanica. Kod T-stanica, ukoliko Bach2 nije fosforiliran, odlazi u jezgru gdje djeluje kao represor transkripcije gena odgovornih za nastanak memorijskih T-stanica (Sidwell & Kallies, 2016).

Istraživanja promjene limfocita tijekom starenja pokazala su nižu razinu ekspresije *BACH2* s porastom dobi u CD4+ i CD8+ T-stanicama (Chi et al., 2019). U stanicama DLBCL-a čovjeka i miševa primijećena je prekomjerna ekspresija *BACH2* dok je njegova aktivnost u stanicama T-staničnog limfoma slabije istražena. Potrebno je precizno definirati regulacijsku kaskadu njegove aktivnosti prilikom sazrijevanja i aktivacije B-stanica i T-stanica. Preciznim razumijevanjem mehanizama njegova djelovanja bi se bolje razumjela njegova uloga u malignoj transformaciji što bi pridonijelo razvoju uspješnijih terapija za određenu vrstu limfoma (Miura et al., 2018).

1.5 Cilj istraživanja

Cilj ovog istraživanja je analizirati razinu ekspresije gena *BACH2* u tumorskim stanicama limfoma PTCL-NOS te je usporediti s razinom ekspresije toga gena u netumorskim aktiviranim T-limfocitima sekundarnog limfnog tkiva. Hipoteza istraživanja je da je razina ekspresije gena *BACH2* promijenjena u tumorskim limfocitima T.

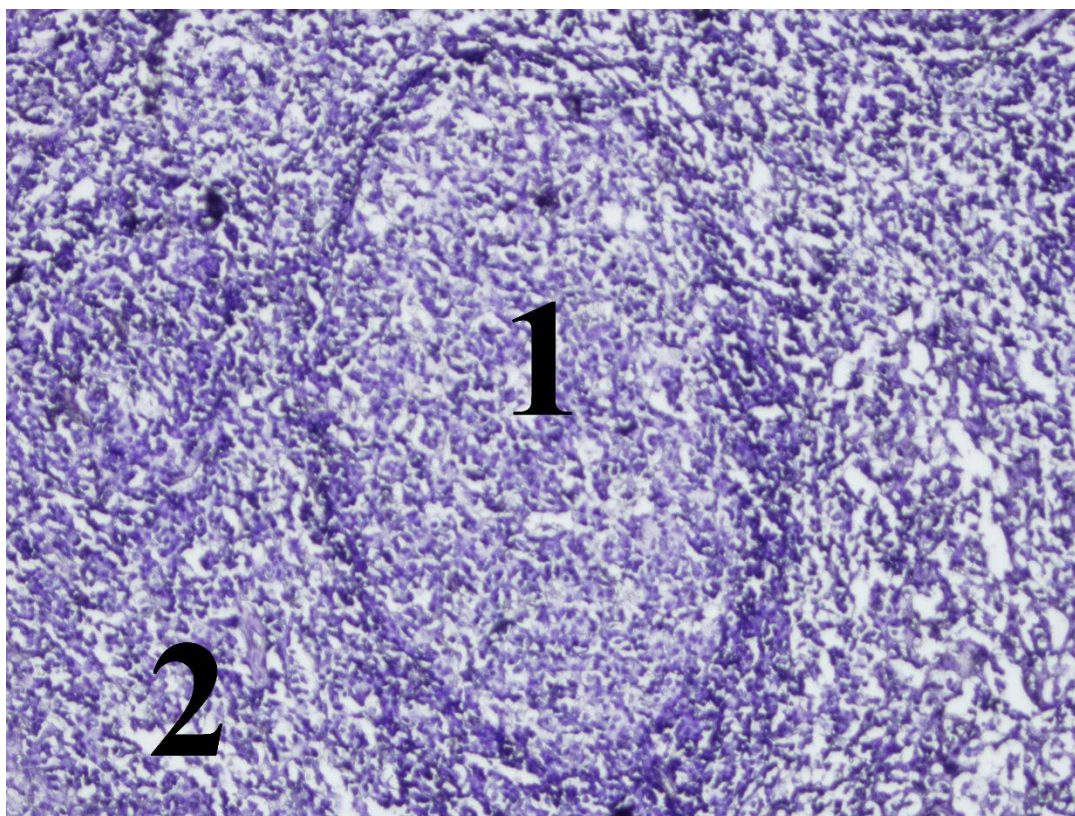
2. MATERIJALI I METODE

2.1 Materijali:

U ovo istraživanje uključeno je 35 tumorskih tkiva oboljelih od PTLC-NOS i 13 netumorskih sekundarnih limfnih tkiva. Istraživanje je dio projekta odobrenog od strane Etičkog povjerenstva KB Merkur i Medicinskog fakulteta u Zagrebu. Sva tkiva fiksirana su formalinom i uklopljena u parafinske kocke (FFPE, od eng. *formalin fixed paraffin embedded*). Kocke s tumorskim tkivom izrezane su na prereze debljine 10 μm koji su korišteni za izolaciju RNA, a kocke netumorskog limfnog tkiva na prereze debljine 4 μm koji su korišteni za mikrodisekciju prije izolacije RNA.

2.2 Izolacija stanica T-zone netumorskog limfnog tkiva

Prerezi netumorskog limfnog tkiva korišteni su za izolaciju T-zone (dijela tkiva koje obiluje zrelim T-stanicama) pomoću mikrodisektora (Nikon Eclipse T2000-S). Unutar prereza limfnog tkiva vidljivi su germinativni centri koji se većinom sastoje od B-stanica, dok su T-stanice prisutni u zonama između germinativnih centara (Slika 8.) sa kojeg su sastrugani pomoću igle.



Slika 8. Germinativni centar netumorskog sekundarnog limfnog tkiva (označen brojem 1) je mjesto gdje se nakupljaju B-stanice, dok je zona oko germinativnih centara bogata T-stanicama (označena brojem 2).

Igle za mikrodisekciju su prije korištenja autoklavirane te sam su prije početka same mikrodisekcije prebrisane 70%-tnim etanolom. Prije svakog novog uzorka sam stavila novu iglu kao i nastavke za uvlačenje sastruganih stanica. Nastavke sam mijenjala po potrebi i tijekom mikrodisekcije istog preparata ukoliko sam primijetila uvlačenje neželjenih stanica primjerice limfocita B iz centra folikula. Za uvlačenje sastruganih stanica sam koristila sterilnu vodu (AccuGENE®, Lonza, Basel, Švicarska) te prikupljene stanice sakupila u sterilne epruvete volumena 1,5 mL.

2.3 Izolacija RNA

Izolaciju RNA iz FFPE-uzoraka tkiva pacijenata i iz kontrolnih uzoraka netumorskog limfnog tkiva sam provela korištenjem kita High Pure RNA Paraffin Kit (Roche, Basel Švicarska) prema protokolu za izolaciju RNA iz tkiva fiksiranih formalinom i uklopljenih u parafin. S obzirom da su kontrolne stanice T-stanice izolirane sa histoloških prereza koji su već bili deparafinirani za njih je preskočen prvi korak deparafinizacije uzoraka. Mikrodisekirane kontrolne stanice sakupljene u vodi centrifugirala sam 3 minute na 10 000 g kako bi nastao talog. Uklonila sam supernatant i na stanice dodala pufer za lizu, SDS te proteinazu K prema prvom koraku protokola te tako obrađene uzorke pohranila u zamrzivač na -20°C. Nakon što sam na taj način sakupila stanice izolirane iz svih 13 histoloških prereza, odmrznula sam uzorke te ih stavila na prekonoćnu inkubaciju na 55 °C. Kod prereza limfnih čvorova pacijenata sam protokol za izolaciju RNA pratila bez odstupanja. Za T-stanice koje sam izolirala mikrodisekcijom sam volumen pufera za eluciju prilagodila na 20 µl kako bih osigurala veću koncentraciju RNA zbog manjeg broja stanica po uzorku. Koncentraciju i čistoću izoliranih RNA sam izmjerila na spektrofotometru NanoVue (Biochrom, Cambridge,UK)

2.4 Reverzna transkripcija

Kako bih mogla odrediti razinu ekspresije gena *BACH2* metodom qPCR-a, izoliranu RNA sam prevela u cDNA reakcijom reverzne transkripcije. Prva reakcijska smjesa reverzne transkripcije je po uzorku sadržavala 1 µl nasumičnih heksamera (Invitrogen, 50 µM, Waltham, Massachusetts, SAD), 1 µl 10 mM dNTP (Sigma Aldrich, 10mM, St. Louis, Missouri, SAD), za uzorke tumorskog tkiva sam stavila 8 µl RNA do konačnog volumena od 10 µl dok sam za kontrolne uzorke stavila odgovarajući volumen RNA za konačnu masu od 20 ng RNA po reakciji te ostatak do 10 µl nadopunila vodom. U svrhu denaturacije RNA sam napravljenu reakcijsku smjesu stavila 5 minuta na 65°C te zatim 5 minuta naglo ohladila na ledu. U ovu reakcijsku smjesu sam dodala 10 µl druge reakcijske smjese za koju sam po uzorku koristila 0,5 µl reverzne transkriptaze (Takara, Kusatsu, Shiga, Japan), 0,5 µl inhibitora RN-aza (Takara, Kusatsu, Shiga, Japan), 4 µl 5x pufera PSRT (Takara, Kusatsu, Shiga, Japan) i 5 µl vode. Ovakvu reakcijsku smjesu napravila sam za 35 uzoraka tumorskog tkiva i 13 uzoraka kontrolnih T-stanica uključujući negativnu kontrolu reverzne transkripcije. Dvije pripremljene

reakcijske smjese sam izmiješala pipetiranjem te inkubirala prema programu: 30°C 10 min, 42°C 60 min, 70°C 15 min, ∞ 4°C.

2.5 qPCR

Za analizu ekspresije gena koristila sam komercijalno dostupne hidrolizirajuće probe (Taqman, Applied Biosystems, Foster City, Kalifornija, SAD), za gen *BACH2* probu Hs00222364_m1, a za gen *HPRT1*, koji sam koristila kao endogenu kontrolu, probu Hs02800695_m1. Za pripremu reakcijske smjese sam za po uzorku koristila 10 µl osnovne reakcijske smjese za hidrolizirajuće probe, 1 µl hidrolizirajućih proba i početnica te 5 µl sterilne vode (AccuGENE, Lonza, Basel, Švicarska). Prema tom protokolu sam napravila reakcijsku smjesu s probama za ciljan gen *BACH2* te reakcijsku smjesu s probama za gen *HPRT1*. Objе reakcijske smjese sam pripremila za 35 uzoraka tumorskog limfnog tkiva te naknadno izoliranih 13 uzoraka kontrolnih T-stanica uz negativnu kontrolu reverzne transkripcije i negativnu kontrolu qPCR-a. Za svaku reakciju sam 16 µl reakcijske smjese pomiješala s 4 µl cDNA te sam za negativnu kontrolu qPCR-a konačan volumen od 20 µl nadopunila s 5 µl vode. Sve uzorke, uključujući i endogenu kontrolu, sam radila u dvije replike te ispipetirala u qPCR pločicu s 96 jažica koju sam prelijepila čistom folijom kako ne bi bilo smetnje prilikom očitavanja signala u uređaju. Program qPCR reakcije je za početnu denaturaciju postavljen 2 min na 95°C te na 40 ciklusa od 95°C tijekom 3 s za denaturaciju i 60 °C na 30 s za prijanjanje početnica i elongaciju. Razinu ekspresije gena u T-staničnom limfomu u odnosu na netumorsko limfno tkivo odredila sam relativnom kvantifikacijom, metodom $\Delta\Delta Ct$.

Za određivanje značajnosti promjene u razini ekspresije gena *BACH2* u tumorskom tkivu u odnosu na netumorsko tkivo iz kojeg tumor nastaje, koristila sam statističku obradu neparametrijskim test Mann-Whitney U. Razina značajnosti bila je $p < 0,05$. Grafički prikaz usporedbe ekspresije *BACH2* između tumorskog tkiva i netumorskih T-stanica je napravljen pomoću programa GraphPad Prism (<https://www.graphpad.com/scientific-software/prism/>).

3. REZULTATI

3.1 Uspješnost izolacije RNA

Dobivena koncentracija RNA 35 parafinskih uzoraka tumorskog tkiva se bila je u rasponu 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ -190 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Omjeri apsorbancija tumorskog tkiva A_{260}/A_{280} bili su u rasponu 0,6-2,3 i A_{260}/A_{230} -1,9-2,7 (Tablica 1.).

Stanice T-zone netumorskog sekundarnog limfnog tkiva su uspješno izolirane pomoću mikrodisektora (Slika 8.).

Tablica 1. Koncentracija RNA i omjeri apsorbancija A_{260}/A_{280} i A_{260}/A_{230} za uzorke tumorskih stanica PTCL-NOS.

Uzorak (tumorsko tkivo)	c(RNA) [$\mu\text{g}/\text{mL}$]	A_{260}/A_{280}	A_{260}/A_{230}
1T	85,60	1,829	0,787
2T	24,00	1,887	0,714
3T	186,40	1,779	0,582
4T	109,20	1,728	0,595
5T	81,60	1,729	0,443
6T	76,80	1,669	0,513
7T	84,40	1,675	0,699
8T	81,60	1,729	1,259
9T	152,00	1,836	0,941
10T	104,80	1,807	0,768
11T	130,40	1,821	0,628
12T	32,00	1,778	1,379
13T	72,20	1,861	2,149
14T	27,40	1,799	2,265
15T	86,40	2,040	2,074
16T	24,20	2,296	2,143
17T	98,80	1,952	1,840
18T	319,40	1,899	1,967
19T	2,40	1,330	0,494
20T	22,40	1,905	0,726
21T	142,80	1,763	0,763
22T	108,80	2,077	2,182
23T	151,00	1,958	1,029
24T	80,60	1,901	1,409
25T	70,20	1,903	0,956
26T	7,45	1,130	0,890
27T	119,00	1,826	2,681
28T	101,20	1,752	0,976
29T	17,80	1,135	-1,994
30T	60,00	1,508	2,884
31T	8,85	0,665	1,859
32T	46,00	1,426	0,903
33T	73,80	1,663	3,371
34T	19,00	1,044	2,706
35T	66,20	1,591	2,824

Stanice T-zone netumorskog sekundarnog limfnog tkiva su uspješno izolirane pomoću mikrodisektora (Slika 8.).

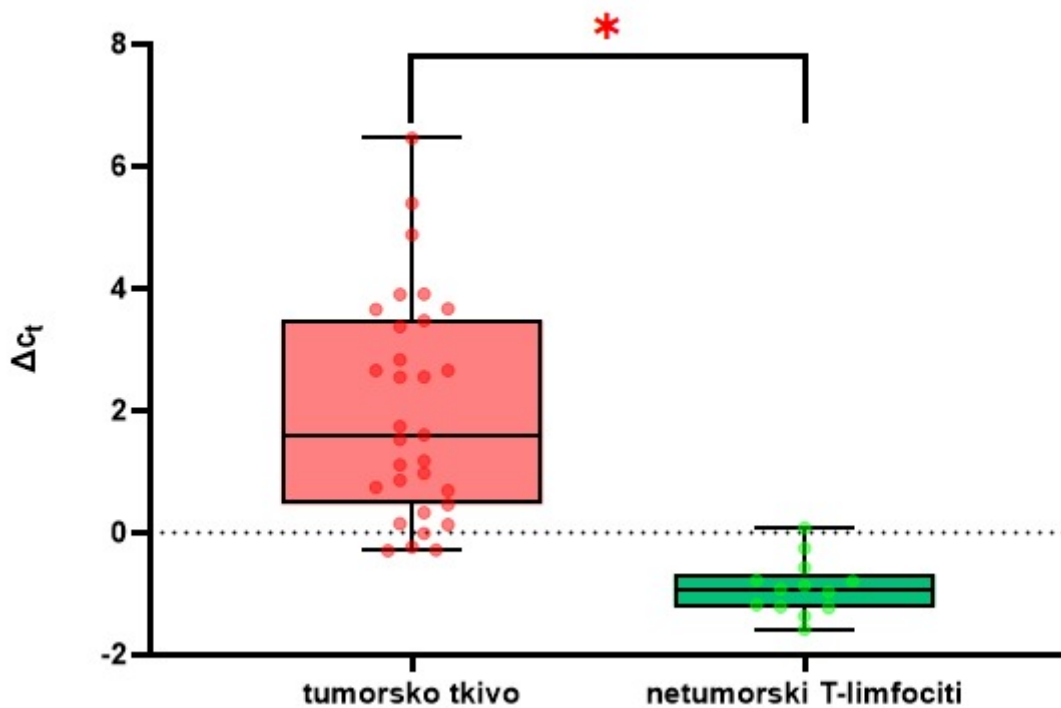
Veličina histoloških preparata te broj germinativnih centara unutar prereza uzorka se razlikovao između 13 kontrolnih uzoraka što je rezultiralo različitom količinom prikupljenih stanica T-zone. Raspon koncentracije RNA je za kontrolne uzorke bio 2 µg/mL-87 µg/mL te su omjeri apsorbancija bili A_{260}/A_{280} 0,6-2,3 i A_{260}/A_{230} -1,4-1,0 (Tablica 2.).

Tablica 2. Koncentracija RNA i omjeri apsorbancija A_{260}/A_{280} i A_{260}/A_{230} za netumorske T-stanice izolirane iz sekundarnog limfnog tkiva.

Uzorak	c(RNA) [µg/mL]	A_{260}/A_{280}	A_{260}/A_{230}
1	5,90	0,740	0,149
2	3,50	0,647	0,037
3	25,20	1,750	0,543
4	2,80	1,131	1,865
5	14,00	2,229	0,297
6	86,40	1,350	1,005
7	13,60	1,858	0,472
8	18,00	1,860	0,529
9	6,20	1,703	0,507
10	2,40	1,325	-1,395
11	4,80	3,529	1,111
12	6,90	2,035	0,560
13	14,80	2,139	0,860

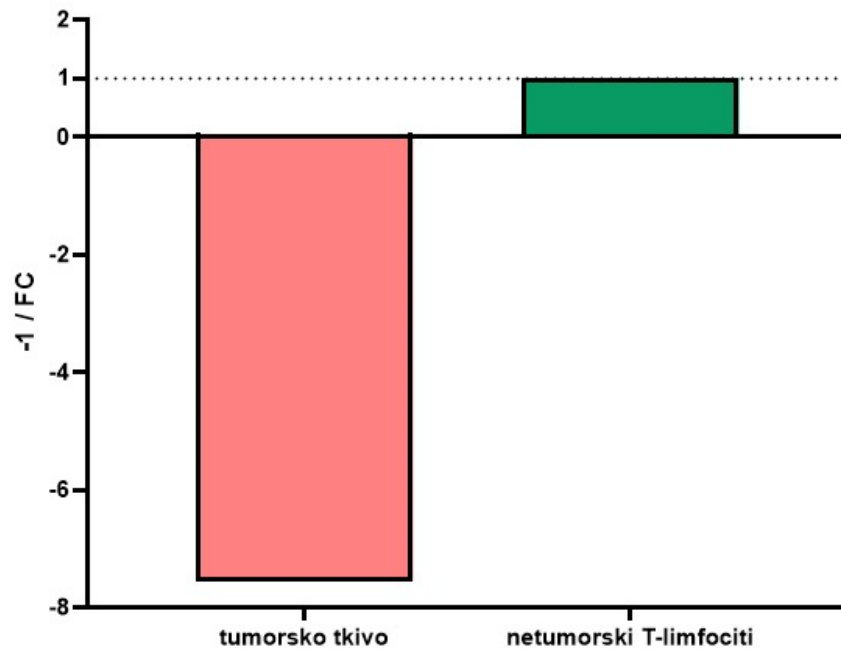
3.2 Relativna kvantifikacija ekspresije gena *BACH2*

Relativna kvantifikacija ekspresije gena $\Delta\Delta C_t$ pokazala je statistički značajno nižu ekspresiju gena *BACH2* u tumorskim stanicama limfoma PTCL-NOS u odnosu na zrele netumorske T-stanice ($p < 0,05$). Medijan ΔC_t vrijednosti bio je značajno veći u tumorskom tkivu (Slika 9.) što ukazuje na nižu ekspresiju gena *BACH2* u tumorskim stanicama.



Slika 9. Usporedba ekspresije gena *BACH2* u tumorskom tkivu i netumorskim T-limfocitima. Značajno veće ΔC_t vrijednosti pojavljuje se kod tumorskog tkiva što ukazuje na smanjenu ekspresiju gena *BACH2*.

Relativnom kvantifikacijom ekspresije gena metodom $\Delta\Delta C_t$ je dobiveno da je ekspresija gena *BACH2* približno 80% niža u tumorskim stanicama limfoma PTCL-NOS nego u T-stanicama netumorskog limfnog tkiva (Slika 10).



Slika 10. Usporedba faktora razlike ekspresije gena *BACH2* ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) tumorskog tkiva i netumorskih T-stanica. U tumorskim stanicama ekspresija *BACH2* 80% je niža nego u netumorskim T-stanicama.

4. RASPRAVA

Rezultati ovog istraživanja u skladu su s postavljenom hipotezom da je ekspresija gena *BACH2* promijenjena u tumorskim stanicama limfoma PTCL-NOS u usporedbi s ekspresijom u T-stanicama netumorskog sekundarnog limfnog tkiva.

Jedna od karakteristika tumorskih stanica je izbjegavanje apoptoze kako bi se omogućila daljnja proliferacija stanica unatoč prisutnim mutacijama koje su štetne za stanicu iz koje tumor nastaje (Wong, 2011). Transkripcijski faktor *BACH2* djeluje kao proapoptotski faktor koji potiče apoptozu u uvjetima oksidacijskog stresa te se njegova značajno smanjena ekspresija u tumorskim stanicama PTCL-NOS može objasniti kao dio mehanizam tumora za izbjegavanje apoptoze. Unatoč tome što ekspresija *BACH2* kod PTCL-NOS nije istražena, poznato je da njegova ekspresija u netumorskim T-stanicama koje eksprimiraju CD4 i B-stanicama koje eksprimiraju CD19 pada proporcionalno s razinom smanjivanja apoptoze stanica. Uloga *BACH2* u apoptozu ukazuje na njegovu važnost u održavanju povoljnog proliferacijskog indeksa koji podrazumijeva kontrolirano dijeljenje stanica nakon prolaska svih kontrolnih točaka staničnog ciklusa. Mehanizam održavanja povoljnog proliferacijskog indeksa je narušen kod tumorskih stanica. Tumorske stanice će se dijeliti unatoč primjerice nepotpunoj replikaciji DNA ili prisutstvu mutacija koje bi kod zdravih stanica eliminirane popravkom DNA ili bi u prisutstvu višestrukih mutacija otišle u apoptozu. Također, niža ekspresija *BACH2* u PTCL-NOS u odnosu na netumorske T-stanice može se povezati i sa sniženjem njegove ekspresije tijekom starenja stanica u pomoćničkim i citotoksičnim T-stanicama (Chi et al., 2019). Starenjem stanice slabe osnovni funkcionalni mehanizmi rasta i diobe te stanice postaju podložnije mutacijama i nakupljanju reaktivnih kisikovih radikala (Diloreto et al., 2013). Moguće je da tumorske stanice PTCL-NOS oponašaju proces starenja stanica deregulacijom ekspresije *BACH2* jer, poput stanica koje stare, nakupljaju mutacije zbog snižene razine apoptoze. S druge strane, tumorske stanice, za razliku od stanica koje stare, i dalje imaju visok proliferacijski indeks koji je kod tumorskih stanica nekontroliran. U istraživanju na miševima su inhibitori drugih faktora apoptotskih signalnih putova poput inhibicije antiapoptotskih proteina Bcl-2 i Bcl-xL pokazali uspješnost u citotoksičnom djelovanju na limfome (Wong, 2011) što čini proapoptotski faktor *BACH2* potencijalnim kandidatom za buduće terapije. Terapija selektivnim inhibitorom Bcl-2 Venetoclax je pokazala značajno smanjenje tumorskog rasta kod miševa injektiranih stanicama ne-Hodgkinovog limfoma s prekomjernom ekspresijom Bcl-2. Uspješnost Venetoclaxa je djelotvornija ukoliko

se primjenjuje u kombinaciji s epigenetskim modulatorima poput histonskih deacetilaza i ciljanim djelovanjem na antiapoptotske proteine (Carneiro & El-deiry, n.d.). Ciljano djelovanje na specifične proteine stvaranjem kompleksa s histonskim deacetilazama je također primijećeno i kod djelovanja BACH2 što bi mogao biti način poboljšanja ciljane terapije koja bi djelovala na inhibitore BACH2 u budućem razvoju terapija. Deregulacijom aktivnosti inhibitora BACH2 se povećava njegova aktivnost u stanicama, s obzirom da je BACH2 proapoptotski faktor je u interesu potaknuti njegovo djelovanje u tumorskim stanicama. Njegova varijabilna ekspresija je rezultat uključenosti u mnoge signalne putove proliferacije i apoptoze zbog čega je teško predvidjeti njegovo djelovanje u različitim vrstama limfoma.

Rezultati većine dosadašnjih istraživanja promjene ekspresije *BACH2* kod B-staničnih limfoma se značajno razlikuju od rezultata dobivenih u ovom radu. Budući da je teže provesti detaljna klinička istraživanja T-staničnih limfoma zbog njihove rijetke pojavnosti te dijagnoze koja se postavlja tek u uznapredovalom stadiju gdje su limfomi već prisutni u različitim dijelovima tijela podaci o T-staničnim limfomima su oskudni. Različita promjena ekspresije *BACH2* između limfoma B i T-stanica može biti i rezultat njegove različite funkcije i vremenske ekspresije prilikom sazrijevanja i diferencijacije te dvije skupine limfocita (Sidwell et al., 2020). U istraživanju Burkittovog limfoma kod djece je primijećena povećana ekspresija *BACH2* (*Sixth International Symposium on Childhood, Adolescent and Young Adult Non-Hodgkin Lymphoma Pre-Congress Workshop – Childhood and Adolescent NHL Wellness and Survivorship Invited Oral Presentations*, 2018) te se povećana ekspresija *BACH2* kod limfoma DLBCL povezuje s lošijim trogodišnjim preživljenjem u usporedbi sa stanicama smanjene ekspresije (Miura et al., 2018). S druge strane, kod limfoma MCL se smanjena ekspresija *BACH2* pripisuje uznapredovalom stadiju bolesti (Xie et al., 2017).

Također, u zrelih netumorskim B-stanicama BACH2 omogućuje represiju transkripcije gena čiji je produkt protein sazrijevanja B-stanica (Blimp-1, od eng. *B-lymphocyte maturation protein 1*) odgovoran za diferencijaciju B-stanica u plazma-stanice (Eckschlager et al., 2017). Ova uloga BACH2 je moguće objašnjenje njegove povećane ekspresije u nekim tipovima B-staničnih limfoma, budući da plazma-stanice proizvode antitijela čije protupalno djelovanje odgovara tumorskim stanicama zbog nastanka mikrookoliša pogodnog za daljnje širenje. Također, represiju *Prdm1* omogućuje proteinski kompleks BACH2 i histonske deacetilaze 3 koja potiče histonsku deacetilaciju na ciljanom mjestu. Ovo ukazuje na moguće postojanje histonskih modifikacija ciljanih gena BACH2 koje im omogućuju da budu prepoznate od histonske deacetilaze 3 (Miura et al., 2018). Genetski profil ekspresije *BACH2*

kod skupine PTCL nije istražen, dok je kod ne-Hodgkinovih B-staničnih limfoma kod većine tipova primijećena njegova povećana ekspresija (Ichikawa et al., 2014). Neki tipovi ne-Hodgkinovih limfoma pokazuju smanjenu ekspresiju *BACH2* kao što je kod MCL tipa B-staničnog limfoma (Xie et al., 2017), no značajnost smanjena ekspresije *BACH2* u B-limfomima je mnogo manja nego sniženje ekspresije dobiveno u ovom radu. Naime, s obzirom da se mehanizmi sazrijevanja i diferencijacije u kojima sudjeluje *BACH2* razlikuju između limfocita T-stanica i B.stanica, treba uzeti u obzir da je stoga teško usporediti njegovu ekspresiju između B-staničnih limfoma i T-staničnih limfoma.

Rezultati ovog istraživanja trebali bi se potvrditi na većoj, međunarodnoj kohorti pacijenata uz posebnu pažnju na vrstu uzoraka i njihovu kvalitetu. Kod obje vrste tkiva, zdravog i tumorskog, je dobiven širok raspon koncentracija RNA te omjeri apsorbancija $A_{260/280}$ i $A_{260/230}$ su bili preniski odnosno upućivali na kontaminaciju. Širok raspon koncentracija RNA kod uzoraka zdravog tkiva je prisutan zbog nejednakih veličina histoloških preparata i različitog broja folikula na preparatima. Kod uzoraka tumorskih tkiva, objašnjenje raznolike koncentracije RNA može biti različita starost uzoraka te također mogu biti rezultat pogreške pri radu. Za iduće istraživanje bi stoga trebalo uzeti što jednoličnije uzorke koji će biti podjednake veličine i starosti te bi trebalo ujednačiti broj izrezanih folikula na zdravom tkivu. Također, cijeli postupak ovog rada bi trebao biti proveden u što sterilnijim uvjetima kako bi se dobili što vjerodostojniji rezultati.

5. ZAKLJUČAK

Tumorske stanice PTLC-NOS pokazuju značajno smanjenje ekspresije gena *BACH2* u odnosu na netumorske T-stanice iz kojih taj tumor nastaje. Ovakvi rezultati sugeriraju važnost transkripcijskog faktora *BACH2* u T-limfogenezi, najvjerojatnije zbog njegove uloge u signalnim putovima koji su odgovorni za apoptozu.

6. LITERATURA

- Agostinelli, C., Piccaluga, P. P., Went, P., Rossi, M., Gazzola, A., Righi, S., Sista, T., Campidelli, C., Zinzani, P. L., Falini, B., & Pileri, S. A. (2008). Peripheral T cell lymphoma, not otherwise specified: The stuff of genes, dreams and therapies. *Journal of Clinical Pathology*, *61*(11), 1160–1167. <https://doi.org/10.1136/jcp.2008.055335>
- Ansell, S. M. (2020). *ANNUAL CLINICAL UPDATES IN HEMATOLOGICAL Hodgkin lymphoma : A 2020 update on diagnosis , risk-stratification , and management*. April, 1–12. <https://doi.org/10.1002/ajh.25856>
- Carneiro, B. A., & El-deiry, W. S. (n.d.). Targeting apoptosis in cancer therapy. *Nature Reviews Clinical Oncology*. <https://doi.org/10.1038/s41571-020-0341-y>
- Chi, V. L. D., Garaud, S., De Silva, P., Thibaud, V., Stamatopoulos, B., Berehad, M., Gu-Trantien, C., Krayem, M., Duvillier, H., Lodewyckx, J. N., Willard-Gallo, K., Sibille, C., & Bron, D. (2019). Age-related changes in the BACH2 and PRDM1 genes in lymphocytes from healthy donors and chronic lymphocytic leukemia patients 11 Medical and Health Sciences 1107 Immunology 06 Biological Sciences 0604 Genetics. *BMC Cancer*, *19*(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s12885-019-5276-2>
- Diloreto, R., Murphy, C. T., & Bement, W. (2013). *The cell biology of aging*. 08544, 4524–4531. <https://doi.org/10.1091/mbc.E14-06-1084>
- Eckschlager, T., Plch, J., Stiborova, M., & Hrabeta, J. (2017). Histone deacetylase inhibitors as anticancer drugs. *International Journal of Molecular Sciences*, *18*(7), 1–25. <https://doi.org/10.3390/ijms18071414>
- Ichikawa, S., Fukuhara, N., Katsushima, H., Takahashi, T., Yamamoto, J., Yokoyama, H., Sasaki, O., Fukuhara, O., Nomura, J., Ishizawa, K., Ichinohasama, R., Muto, A., Igarashi, K., & Harigae, H. (2014). Association between BACH2 expression and clinical prognosis in diffuse large B-cell lymphoma. *Cancer Science*, *105*(4), 437–444. <https://doi.org/10.1111/cas.12361>
- Jaffe, E. S. (2009). The 2008 WHO classification of lymphomas: implications for clinical practice and translational research. *Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology*. *American Society of Hematology. Education Program*,

523–531. <https://doi.org/10.1182/asheducation-2009.1.523>

Jiang, M., Bennani, N. N., & Feldman, A. L. (2017). Lymphoma classification update: T-cell lymphomas, Hodgkin lymphomas, and histiocytic/dendritic cell neoplasms. *Expert Review of Hematology*, *10*(3), 239–249.

<https://doi.org/10.1080/17474086.2017.1281122>

Kaiser, G. (2019). *Gary Kaiser*. 782.

Kim, S., Kwon, D., Koh, J., Nam, S. J., Kim, Y. A., Kim, T. M., Kim, C. W., & Jeon, Y. K. (2020). Clinicopathological features of programmed cell death-1 and programmed cell death-ligand-1 expression in the tumor cells and tumor microenvironment of angioimmunoblastic T cell lymphoma and peripheral T cell lymphoma not otherwise specified. *Virchows Archiv*, *477*(1), 131–142. <https://doi.org/10.1007/s00428-020-02790-z>

LaRosa, D. F., & Orange, J. S. (2008). 1. Lymphocytes. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *121*(2 SUPPL. 2), 364–369. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2007.06.016>

Lebien, T. W., & Tedder, T. F. (2008). B lymphocytes: How they develop and function. *Blood*, *112*(5), 1570–1580. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-02-078071>

Miura, Y., Morooka, M., Sax, N., Itoh-nakadai, A., Brydun, A., Nakayama, K., & Satomi, S. (2018). *Bach2 Promotes B Cell Receptor – Induced Proliferation of B Lymphocytes and Represses Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors*.

<https://doi.org/10.4049/jimmunol.1601863>

Oluwasanjo, A., Kartan, S., Johnson, W., Alpdogan, O., Gru, A., Mishra, A., Haverkos, B. M., Gong, J., & Porcu, P. (n.d.). *Peripheral T-Cell Lymphoma, not Otherwise Specified (PTCL-NOS)*. Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-99716-2>

Park, H. S., McIntosh, L., Braschi-Amirfarzan, M., Shinagare, A. B., & Krajewski, K. M. (2017). T-cell non-hodgkin lymphomas: Spectrum of disease and the role of imaging in the management of common subtypes. *Korean Journal of Radiology*, *18*(1), 71–83.

<https://doi.org/10.3348/kjr.2017.18.1.71>

Rassidakis, G. Z., Jones, D., Thomaidis, A., Sen, F., Lai, R., Cabanillas, F., McDonnell, T. J., & Medeiros, L. J. (2002). *Apoptotic Rate in Peripheral T-Cell Lymphomas A Study*

Using a Tissue Microarray With Validation on Full Tissue Sections. 328–334.

Sandell, R. F., Boddicker, R. L., & Feldman, A. L. (2017). *Genetic Landscape and Classification of Peripheral T Cell Lymphomas.* <https://doi.org/10.1007/s11912-017-0582-9>

Sibon, D., & Gisselbrecht, C. (2013). Peripheral T-cell lymphoma. *Non-Hodgkin Lymphomas: Advanced Diagnostics & Personalized Therapies*, 25, 285–302. <https://doi.org/10.2217/EBO.12.135>

Sidwell, T., & Kallies, A. (2016). Bach2 is required for B cell and T cell memory differentiation. *Nature Publishing Group*, 17(7), 744–745. <https://doi.org/10.1038/ni.3493>

Sidwell, T., Liao, Y., Garnham, A. L., Vasanthakumar, A., Gloury, R., Blume, J., Teh, P. P., Chisanga, D., Thelemann, C., de Labastida Rivera, F., Engwerda, C. R., Corcoran, L., Kometani, K., Kurosaki, T., Smyth, G. K., Shi, W., & Kallies, A. (2020). Attenuation of TCR-induced transcription by Bach2 controls regulatory T cell differentiation and homeostasis. *Nature Communications*, 11(1), 1–17. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-14112-2>

Sixth International Symposium on Childhood , Adolescent and Young Adult Non-Hodgkin Lymphoma Pre-Congress Workshop – Childhood and Adolescent NHL Wellness and Survivorship Invited Oral Presentations. (2018). 5–109. <https://doi.org/10.1111/bjh.15536>

Wong, R. S. Y. (2011). *Apoptosis in cancer : from pathogenesis to treatment.* 1–14.

Xie, M., Lu, C., & Wang, J. (2017). *Let ' s give BACH2 a breath of fresh air.* 130(6), 696–698. <https://doi.org/10.1182/blood-2017-05-786210>

Yang, L., Chen, S., Zhao, Q., Sun, Y., & Nie, H. (2019). *Review Article The Critical Role of Bach2 in Shaping the Balance between CD4 + T Cell Subsets in Immune-Mediated Diseases.* 2019.

<http://atlasgeneticsoncology.org/Anomalies/ClassicHodgkinID1569.html> (pristupljeno 27.6. 2021.)

<https://basicmedicalkey.com/peripheral-t-cell-lymphoma-not-otherwise-specified/>
(pristupljeno 27.6. 2021.)

<https://www.cancer.org.au> (pristupljeno 24.6. 2021.)

<https://www.cancercenter.com/cancer-types/non-hodgkin-lymphoma/types> (pristupljeno 23.6. 2021.)

https://mutagenetix.utsouthwestern.edu/phenotypic/phenotypic_rec.cfm?pk=3232
(pristupljeno 30.6. 2021.)

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/gdv/?org=homo-sapiens> (pristupljeno 25.6. 2021.)

<https://www.sciencedirect.com/topics/medicine-and-dentistry/peripheral-t-cell-lymphoma>
(pristupljeno 28.6. 2021.)

<https://oncohemakey.com/t-cell-lymphomas-2/> (pristupljeno 28.6. 2021.)

ŽIVOTOPIS

Rođena sam 24. 5. 1996. godine u Sisku, završila sam osnovnu školu Stjepana Kefelje i opću gimnaziju Tina Ujevića u Kutini te 2015. godine upisala preddiplomski studij molekularne biologije na Prirodoslovno – matematičkom fakultetu u Zagrebu. Preddiplomski studij sam završila 2019. godine kada sam upisala istoimeni diplomski studij. Tijekom obrazovanja sam odradila laboratorijsku stručnu praksu na Zavodu za animalnu fiziologiju gdje sam stekla iskustvo rada sa životinjama i na Zavodu za Molekularnu biologiju gdje sam usavršila brojne metode molekularne biologije. Godinu dana sam radila kao laboratorijski asistent u laboratoriju Inovagen, AnimaLabs gdje sam također stekla bogato iskustvo u metodama molekularne biologije. Sudjelovala sam u popularizaciji znanosti unutar projekta „Dan i noć na PMF-u“ te unutar Udruge studenata biologije (BIUS) vodila grupu za astrobiologiju gdje sam održavala edukativna predavanja.