

# Ekspresija proteina uključenih u regulaciju staničnog ciklusa i replikacije u limfomagenezi

---

**Magdić, Nives**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2019**

*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:217:014245>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-11-28**



*Repository / Repozitorij:*

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



Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Nives Magdić

Ekspresija proteina uključenih u regulaciju staničnog ciklusa i replikacije u  
limfomagenezi

Diplomski rad

Zagreb, 2019.

Ovaj rad je izrađen 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.

Veliko hvala mojoj mentorici izv. prof. dr. sc. Petri Korać na stručnom vodstvu, velikoj pomoći, svim konstruktivnim kritikama i puno strpljenja tijekom istraživanja i izrade ovog rada.

Zahvaljujem Suzani Hančić, mag. med. lab. diag. i ostalim djelatnicima Kliničkog zavoda za patologiju i citologiju KB Merkur na doprinosu u istraživanju i prikupljanju materijala.

Jako sam zahvalna svojoj obitelji, a posebno mami i tati. Njihova neizmjerena podrška tijekom cijelog obrazovanja, kao i sve što su mi pružili, izuzetno mi puno znači pa im zbog toga posvećujem ovaj rad.

Hvala i svima onima koji su, svojim neprestanim pitanjima o trenutnom stanju izrade rada i poticanju na pisanje, doprinijeli njegovom privođenju kraju i pružili mi motivaciju onda kad je bila najpotrebnija.

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

---

Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Diplomski rad

## EKSPRESIJA PROTEINA UKLJUČENIH U REGULACIJU STANIČNOG CIKLUSA I REPLIKACIJE U LIMFOMAGENEZI

Nives Magdić

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Limfociti su nositelji stečene imunosti. Nastaju u primarnim limfnim organima, a u sekundarnim limfnim organima aktiviraju se antigenom i postaju zrele efektorske stanice. U sekundarnom limfnom tkivu nalaze se germinativni centri, mjesta sazrijevanja B-limfocita. Germinativne centre karakterizira vrlo visoka proliferacijska stopa stanica te njihove česte i brze diobe kojima prethodi replikacija DNA. Replikacija je pod strogom kontrolom sustava enzima i drugih proteina, a ukoliko dođe do promjena u ekspresiji nekog od njih, doći će do poremećene kontrole staničnog ciklusa i replikacije. Takvi su poremećaji posebno česti kod tumora nastalih iz stanica sekundarnog limfnog tkiva. Cilj ovog istraživanja bio je analizirati ekspresiju proteina uključenih u regulaciju staničnog ciklusa i replikacije: MCM2, PCNA, GMNN, DNMT1, p300, CDT1 i EZH2 u limfomima. Korišteno je 35 uzoraka tkiva netumorskih tonzila i limfnih čvorova pacijenata s folikularnim limfomom i difuznim B-velikostaničnim limfomom. Korištenjem imunohistokemijskog bojenja, određena je količina stanica koje ekspimiraju navedene proteine. Utvrđena je statistički značajna razlika u količini stanica koje ekspimiraju MCM2, PCNA i EZH2 usporedbom količine netumorskih stanica tonzila i tumorskih stanica navedenih limfoma, a usporedbom količine tumorskih stanica folikularnog limfoma i difuznog B-velikostaničnog limfoma, statistički su značajne razlike utvrđene u ekspresiji MCM2, DNMT1, CDT1 i GMNN. Rezultati upućuju na uključenost navedenih proteina u staničnu proliferaciju, ali i njihovu potencijalnu ulogu u nastanku limfoma.

40 stranica, 12 slika, 35 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

**Ključne riječi:** germinativni centar, replikacija, regulatorni proteini, limfom

**Voditelj:** izv. prof. dr. sc. Petra Korac

**Ocjenitelji:** izv. prof. dr. sc. Mirta Tkalec, izv. prof. dr. sc. Goran Kovačević

**Rad prihvaćen:** 1.3.2019.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

---

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Department of Biology

Graduation Thesis

### EXPRESSION OF PROTEINS INVOLVED IN CELL CYCLE REGULATION AND REPLICATION IN LYMPHOMAGENESIS

Nives Magdić

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Lymphocytes are the carriers of acquired immunity. They originate from primary lymphoid organs. In secondary lymphoid organs they are activated by antigen and become mature effector cells. In secondary lymphoid tissues there are germinal centers, sites where B-lymphocytes undergo maturation process. The germinal centers are characterized by very high cell proliferation rate and frequent and rapid cell divisions preceded by DNA replication. Replication is under strict control of the complex system of enzymes and proteins. If changes in their expression occur, result could be dysregulation of cell cycle control and replication. Such aberrations are particularly common in tumors originating in secondary lymphoid tissues. Aim of this study was to analyze the expression of proteins involved in cell cycle regulation and replication: MCM2, PCNA, GMNN, DNMT1, p300, CDT1 and EZH2 in lymphoma development. 35 samples of non-cancerous tonsils and lymph nodes of patients with follicular lymphoma as well as diffuse large B-cell lymphoma were used. By using immunohistochemical staining, the amount of cells expressing proteins of interest was determined. Statistically significant difference in the amount of cells expressing MCM2, PCNA and EZH2 was found when non-cancerous tonsil cells were compared with lymphoma cells. Comparison of the amount of tumor cells of follicular lymphoma and diffuse large B-cell lymphoma showed statistically significant differences in the expression of MCM2, DNMT1, CDT1 and GMNN. The results indicate that these proteins are included in cell proliferation, but also show their potential role in lymphoma formation.

40 pages, 12 figures, 35 references, original in: Croatian

Thesis deposited in the Central Biological Library.

**Key words:** germinal center, replication, regulatory proteins, lymphoma

**Supervisor:** izv. prof. dr. sc. Petra Korać

**Reviewers:** izv. prof. dr. sc. Mirta Tkalec, izv. prof. dr. sc. Goran Kovačević

**Thesis accepted:** 1.3.2019.

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Limfni sustav i hematopoeza.....</b>	<b>1</b>
<b>1.2. Sazrijevanje limfocita u primarnim limfnim organima.....</b>	<b>3</b>
<b>1.3. Sekundarni limfni organi.....</b>	<b>6</b>
<b>1.4. Specifičan imunosni odgovor.....</b>	<b>9</b>
<b>1.5. Replikacija.....</b>	<b>11</b>
<b>1.6. Folikularni limfom.....</b>	<b>16</b>
<b>1.7. Difuzni B-velikostanični limfom.....</b>	<b>17</b>
<b>2. HIPOTEZA I CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....</b>	<b>19</b>
<b>3. MATERIJALI I METODE.....</b>	<b>20</b>
<b>3.1. Materijali.....</b>	<b>20</b>
<b>3.2. Imunohistokemijsko bojenje.....</b>	<b>20</b>
<b>3.3. Analiza imunohistokemijskog bojenja.....</b>	<b>21</b>
<b>3.4. Statistička obrada.....</b>	<b>22</b>
<b>4. REZULTATI.....</b>	<b>23</b>
<b>5. RASPRAVA.....</b>	<b>31</b>
<b>6. ZAKLJUČCI.....</b>	<b>35</b>
<b>7. LITERATURA.....</b>	<b>36</b>
<b>8. ŽIVOTOPIS.....</b>	<b>40</b>

# 1. UVOD

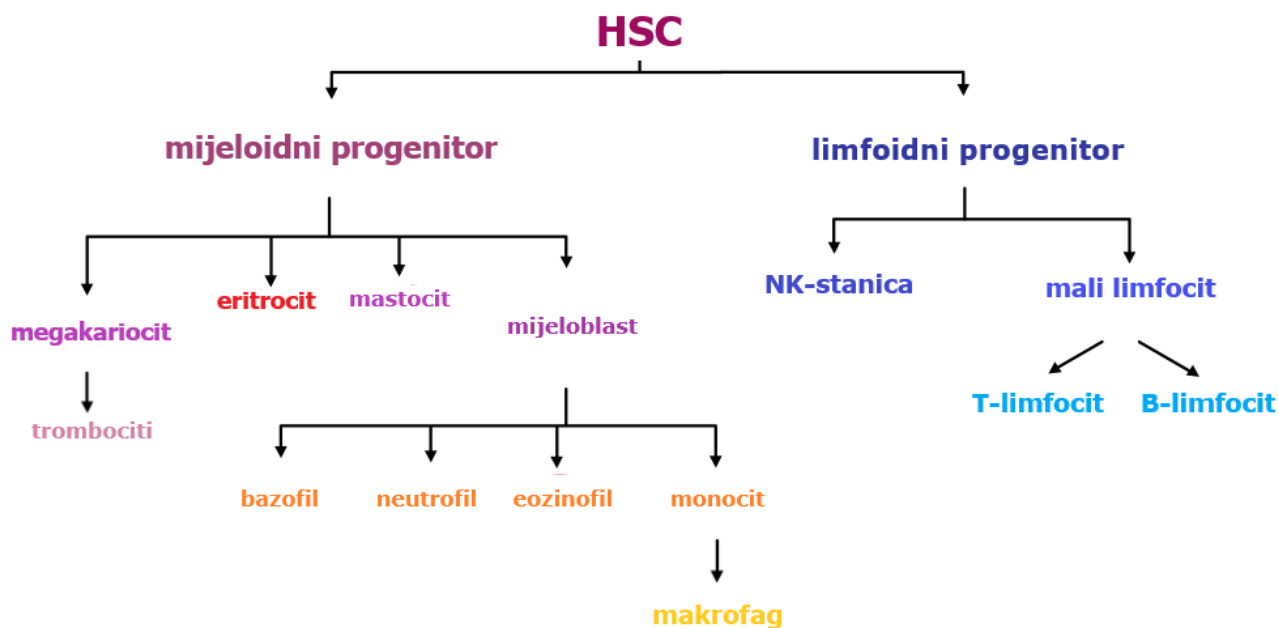
## 1.1. Limfni sustav i hematopoeza

Limfni sustav jedan je od dva optjecajna sustava u tijelu viših kralježnjaka, zajedno sa krvožilnim sustavom. Uključen je u obavljanje nekoliko važnih funkcija, a to su regulacija tkivnog pritiska, imunosni nadzor i apsorpcija masnoća u crijevima. Velikom zanimanju za njegovo istraživanje doprinosi i postojanje sve više dokaza koji ga povezuju s nastankom velikog broja bolesti kao što su limfedemi, tumorske metastaze i različiti upalni poremećaji. Limfni sustav čine limfne žile koje započinju u tkivima gdje sakupljaju limfu, proteinima bogatu tekućinu iz krvnih žila. Mrežom limfnih žila limfa putuje po tijelu te se vraća natrag u krvotok na području lijeve ili desne potključne vene. Osim limfnih žila u dijelove limfnog sustava ubrajaju se i limfni čvorovi i organi koji su ključni za imunosnu funkciju limfnog sustava. Imunosne stanice, limfociti i dendritičke stanice (DC, od eng. *dendritic cells*), transportiraju se limfnim žilama, kroz kožu i ostale organe, sve do limfnih čvorova gdje se inicira specifični imunosni odgovor (Cueni i Detmar 2008). Limfni organi mogu se podijeliti u primarne i sekundarne. Primarni limfni organi su mjesta nastajanja limfocita. U koštanoj srži nastaju i sazrijevaju B-limfociti dok T-limfociti nakon nastanka migriraju iz koštane srži i proces sazrijevanja prolaze u timusu (Mak i sur. 2008).

Limfociti nastaju iz hematopoetskih matičnih stanica (HSC, od eng. *hematopoietic stem cells*) u procesu hematopoeze. Hematopoezom se naziva stvaranje krvnih staničnih komponenti koje započinje tijekom razvoja embrija i odvija se kroz cijeli životni vijek organizma. Kod kralježnjaka se može podijeliti u dva vala hematopoeze: primitivni i definitivni val (Galloway i Zon 2003). Primitivni val događa se tijekom ranog embrijskog razvoja, uključuje eritroidni progenitor i zadužen je za stvaranje eritrocita i makrofaga. S obzirom na ubrzani rast embrija tijekom ranog embrijskog razvoja, povećana je potreba za kisikom pa je svrha primitivnog vala proizvodnja velikog broja eritrocita koji omogućuju oksigenaciju tkiva (Orkin i Zon 2003). Primitivni val je prolazan i eritroidni progenitori u ovom valu nemaju svojstvo pluripotentnosti niti sposobnost samoobnove.



Definitivni val hematopoeze događa se kasnije tijekom razvoja. Kod mnogih organizama postoji prolazni definitivni val u kojem nastaju eritroidno-mijeloidni progenitori (EMP, od eng. *erythroid-myeloid progenitor*). Kasnije definitivni val hematopoeze uključuje HSC koje su multipotentne i mogu se razviti u sve linije krvnih stanica odraslog organizma. Kod ljudi hematopoeza započinje u žumanjčanoj vreći, privremeno se seli u jetru, a onda se događa definitivna hematopoeza u koštanoj srži i timusu (Jagannathan-Bogdan i Zon 2013). U kasnijoj fazi embrijskog razvoja hematopoeza se uglavnom događa u koštanoj srži dugih kostiju, kao što su goljenična i bedrena kost. Nakon rođenja, aktivnost dugih kostiju postepeno opada i zamijenjuje se u odrasloj dobi proizvodnjom hematopoetskih stanica u prsnoj kosti, rebrima i kralježnici, kao i u zdjeličnim kostima te kostima lubanje. Iako HSC zauzimaju tek 0.01% ukupne populacije stanica u koštanoj srži, imaju sposobnost brze proliferacije i diferencijacije ako dođe do povećane potrebe organizma za hematopoezom. HSC su samoobnavljajuće i multipotentne što znači da mogu diferencirati u bilo koji tip krvnih stanica, to jest u stanice koje pripadaju mijeloidnoj i limfoidnoj staničnoj lozi (Mak i sur. 2008). U mijeloidnu lozu spadaju granulociti (bazofili, neutrofil i eozinofili), monociti, makrofagi, megakariociti, eritrociti i mastociti dok su stanice limfoidne loze B- i T-limfociti te NK-stanice (od eng. *natural killer cells*) (slika 1.).



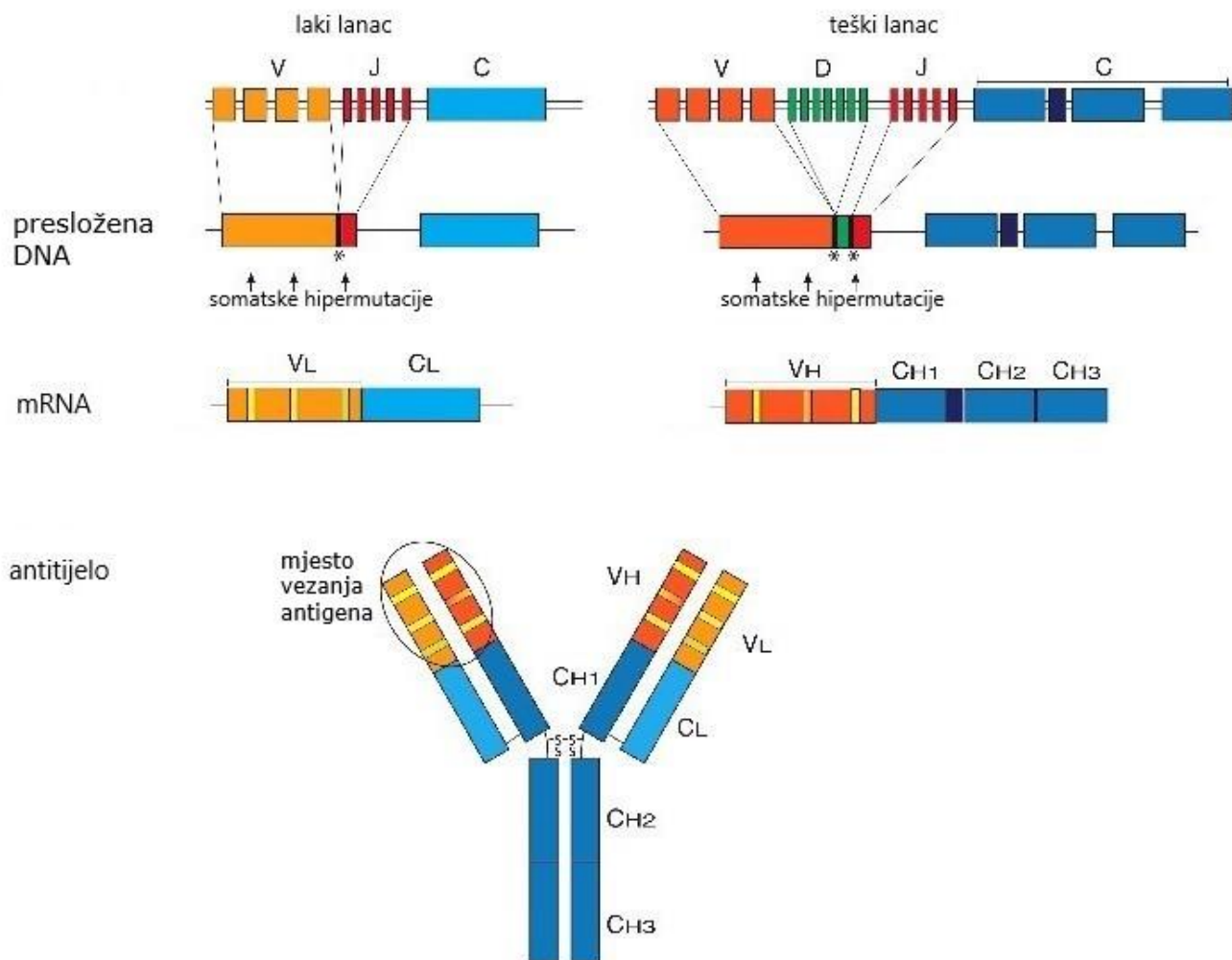
Slika 1. Hematopoeza.

## 1.2. Sazrijevanje limfocita u primarnim limfnim organima

Ljudi posjeduju dva oblika imunodne obrane. Jedan oblik je urođena ili nespecifična imunost koja uključuje različite skupine stanica, porijeklom iz koštane srži, iz kojih bilo koja stanica može napasti strano tijelo koje dospje u organizam jednom kad je prepoznato kao strano. Neke od takvih stanica su granulociti, makrofagi, DC i mastociti. Drugi oblik obrane je stečena ili specifična imunost koja stvara stanice s visokospecifičnim receptorima kako bi svaka stanica reagirala samo na uski krug stranih molekula koje ulaze u organizam. Na staničnoj razini, temelj specifičnog imunodnog odgovora predstavljaju limfociti. Oni, kao i stanice urođene imunosti, potječu iz koštane srži (Rasko i Downes 1995). Kako bi učinkovito savladavali invadirajuće patogene, limfociti neprestano cirkuliraju kroz limfna i ostala tkiva u tijelu. Njihovo kretanje nije nasumično, nego je određeno strogo kontroliranim mehanizmima koji dopuštaju selektivni unos limfocita u sekundarne limfne organe i funkcionalne odjeljke tih organa (Breitfeld i sur. 2000). Stečena imunost može se podijeliti na humoralni odgovor i odgovor posredovan stanicama. Temelj humoralnog odgovora predstavljaju antitijela čija je zadaća obrana organizma od infekcija u tjelesnim tekućinama, dok stanični odgovor predstavljaju citotoksični T-limfociti koji uništavaju inficirane stanice organizma.

B-limfociti započinju sazrijevanje u koštanoj srži od prekursorskih stanica limfoblata. Prilikom nastanka u koštanoj srži, svi su limfociti genetski identični. Tijekom sazrijevanja svaka B-stanica stvara jedinstvenu varijantu standardnog dizajna antitijela, B-stanični receptor (BCR, od eng. *B-cell receptor*), jedinstvenim sustavom preslagivanja gena koji se naziva V(D)J-rekombinacija. V(D)J-rekombinacija započinje u klasterima gena teškog lanca, na 14. kromosomu, nasumičnom rekombinacijom klastera varijabilnih regija  $V_H$ , D i  $J_H$ . Kako bi nastao funkcionalni imunoglobulinski gen teškog lanca, stanica mora spojiti jednu od mnogih varijabilnih regija V, D i J, kao i konstantnu C-regiju gena. Rekombinacijski enzimi prepoznaju rekombinacijske signalne sekvencije koje se pojavljuju na granici svake regije V, D ili J. Nasumično odabrane sekvencije V, D i J spajaju se kako bi stvorile koherentnu sekvenciju koja kodira za varijabilni dio antitijela. Potrebna je i neposredna blizina transkripcijskog pojačivača koji je povezan s regijom konstantnih gena te tada započinje transkripcija. Sličan proces događa se i s genima za laki lanac. Razlika je u tome što klasteri gena lakih lanaca  $\kappa$  i  $\lambda$  ne sadrže regiju D, nego samo varijabilne regije  $V_L$  i  $J_L$

tako da se u tom slučaju radi o VJ-rekombinaciji. Prvo dolazi do preslagivanja klastera gena za lanac  $\kappa$  na 2. kromosomu, a ako nije bilo uspješno presložit će se klaster gena za lanac  $\lambda$  na 22. kromosomu. Nakon provedenih rekombinacija svaki će B-limfocit biti jedinstven po svom specifičnom setu gena za N-terminalne domene lakih i teških lanaca (slika 2.) (Rasko i Downes 1995). Kada je na B-stanicama eksprimiran naivni BCR, koji još nije susreo antigen, naivni B-limfociti napuštaju koštanu srž i putuju krvotokom do sekundarnih limfnih tkiva. Prvo odlaze u slezenu gdje se proizvodi citokin neophodan za njihovo preživljenje. Koloniziraju slezenu i stječu sposobnost migracije u limfne čvorove. Takvi B-limfociti imaju površinsku ekspresiju IgM i IgD i nazivaju se zreli naivni B-limfociti. Kako bi se aktivirali i ušli u diferencijacijsku fazu moraju sresti antigen, ali vjerojatnost za taj događaj je izuzetno mala, 1 od  $10^5$  slučajeva. U suprotnom, zreli naivni B-limfociti umiru apoptozom (Mak i sur. 2008).



**Slika 2.** V(D)J-rekombinacija gena lakog i teškog lanca B-staničnog receptora (preuzeto i prilagođeno iz Feederle i Schepers 2017).

Stjecanje varijabilnosti u T-stanicama odvija se sličnim mehanizmom kao i u B-stanicama, ali je taj mehanizam pažljivo moduliran kako bi omogućio razlikovanje vlastitih antigena i stranih antigena koji se mogu pojaviti na patogenima. Mjesto sazrijevanja T-stanica je timus, a sazrijevanje uključuje preslagivanje klastera gena T-staničnog receptora (TCR, od eng. *T-cell receptor*) V(D)J-rekombinacijom. Svaki TCR sadrži par proteinskih lanaca različitog tipa. Postoje dva moguća tipa receptora:  $\alpha\beta$ , u kojem svaki lanac ima dvije imunoglobulinske domene s vanjskom N-terminalnom varijabilnom domenom, i  $\gamma\delta$ , sa samo jednom varijabilnom domenom na svakom lancu. Ako će nastati T-limfociti s receptorima  $\gamma\delta$ , sazrijevanje započinje

preslagivanjem genskog klastera TCR $\gamma$  na 7. kromosomu VJ-rekombinacijom, zbog toga što na njemu postoje samo varijabilne regije V $\gamma$  i J $\gamma$ , svaka povezana s pripadajućom regijom C $\gamma$ . Nakon toga preslaguje se klaster TCR $\delta$  na 14. kromosomu VDJ-rekombinacijom. Tim procesom nastaju funkcionalni  $\gamma\delta$ -receptori, a to se događa u 3% slučajeva. S puno većom učestalošću nastaju T-limfociti koji imaju  $\alpha\beta$ -receptore. U tom slučaju dolazi do preslagivanja klastera TCR $\beta$  na 7. kromosomu VDJ-rekombinacijom. Slijedi proces preslagivanja klastera TCR $\alpha$  na 14. kromosomu. S obzirom na to da se klaster TCR $\delta$  nalazi između elemenata V $\alpha$  i J $\alpha$ , mora se izrezati iz genoma tijekom VJ-rekombinacije. Krajnji korak u uspješnom razvoju T-stanica je njihova podjela u stanične linije pomoćničkih T-limfocita (T<sub>h</sub>, od eng. *T helper cell*) i citotoksičnih T-limfocita (T<sub>k</sub>, od eng. *T killer cell*). T-stanice ekspimiraju i CD4 i CD8 gene. Nakon što su stekle varijabilnost receptora, stanice proliferiraju u timusu i u nekim će slučajevima transkribirati CD4 gene, dok će druge, iste antigenske specifičnosti, transkribirati CD8 gene. Na taj će način za svaku T<sub>k</sub>CD8<sup>+</sup> staničnu liniju postojati T<sub>h</sub>CD4<sup>+</sup> linija ekvivalentne specifičnosti, spremna da joj pomogne u imunološkom odgovoru. Ipak, u 95% slučajeva, T-stanice neće proći uspješan razvoj. Takve stanice umiru apoptozom prije napuštanja timusa. Ostale, potpuno razvijene T-stanice, izlaze iz timusa i migriraju u krvotok, limfu i sekundarna limfna tkiva gdje se bore protiv stanica koje nose strani antigen (Rasko i Downes 1995).

### 1.3. Sekundarni limfni organi

Sekundarna limfna tkiva i organi mjesta su gdje zreli naivni limfociti prepoznaju antigen, aktiviraju se i prolaze klonalnu selekciju i proliferaciju koju slijedi diferencijacija u efektorske i memorijske stanice. Tu se nakupljaju antigeni, ali i limfociti i DC koji, međusobno surađujući, ostvaruju specifični imunski odgovor kojim se adekvatno bore protiv invadirajućih patogena. S obzirom na to da se ulaz patogena može dogoditi na bilo kojoj lokaciji, sekundarna limfna tkiva i organi su široko rasprostranjeni kroz cijelo tijelo (Mak i sur. 2008). Uključuju limfne čvorove, slezenu, limfno tkivo povezano s kožom (SALT, od eng. *skin-associated lymphoid tissue*) te limfno tkivo vezano uz sluznice (MALT, od eng. *mucosa-associated lymphoid tissue*) u koje

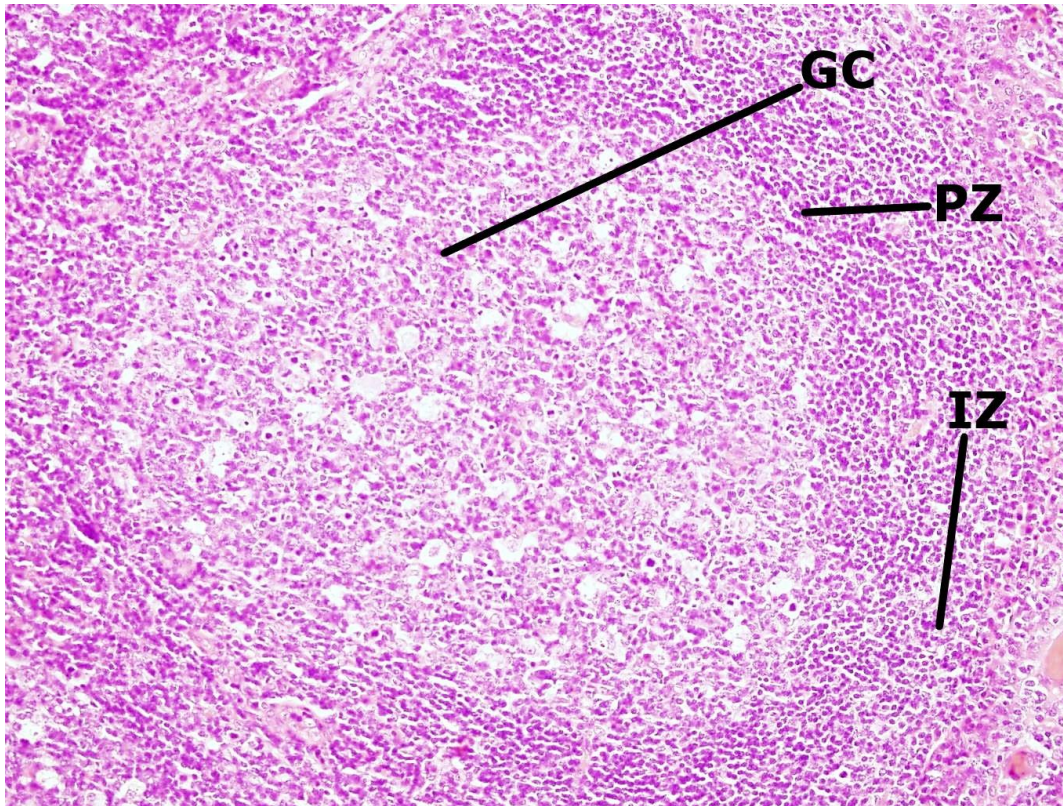
spadaju BALT (od eng. *bronchi-associated lymphoid tissue*) i GALT (od eng. *gut-associated lymphoid tissue*), limfno tkivo koje obuhvaća adenoide, tonzile i apendiks, kao i Peyerove ploče, nakupine limfnog tkiva na sluznici tankog crijeva koje sakupljaju antigen s epitelne površine gastrointestinalnog trakta (Janeway i sur. 2001).

Limfni čvorovi imaju važnu ulogu prilikom primarnog specifičnog odgovora jer predstavljaju mjesta interakcije limfocita i antigena. Iako se protežu duž cijelog limfnog sustava, nakupljaju se na nekoliko ključnih mjesta, primjerice na glavi, vratu ili u donjem predijelu nogu. Protjećući limfnim žilama, limfa prolazi kroz limfne čvorove pomoću ulazne i izlazne limfne žile. Limfni čvorovi su graholikog oblika, obavijeni kapsulom i sadrže visoku koncentraciju limfocita i DC. Središnji dio limfnog čvora okružuju parakorteks i korteks u kojem se nalazi velik broj mirujućih B-stanica, DC i makrofaga organiziranih u limfne folikule. Parakorteks ispunjavaju T-stanice kao i DC, dok je središnji dio limfnog čvora opskrbljen plazma-stanicama koj luče antitijela tijekom specifičnog imunskog odgovora (Mak i sur. 2008).

Tonzile predstavljaju organizacijske centre sekundarnog limfnog tkiva. Njihov položaj na ulazu u probavni i dišni trakt daje im velik imunski značaj prilikom susreta sa stranim antigenom. Građene su od gustog limfnog tkiva koje je prema površini prekriveno tankim epitelom. Tonzile nastaju tijekom fetuskog razvoja, urastanjem epitela u vezivno-tkivnu podlogu između drugog i trećeg brahijalnog luka, u blizini ušća Eustahijeve cijevi te iznad ulaza u grkljan. Ovisno o mjestu nastanka, tonzile se dijele na palatinalne, faringealne, tubarne i lingvalne. Ne mogu se promatrati zasebno jer sve skupa čine cjelinu- Waldeyerov prsten. Svaka je tonzila podjeljena na kripte prekrivene pločastim epitelom koji se proteže u dubinu kripte. Epitel u kriptama je tanak i poluproziran, a u dubini ispod epitela nalazi se limfno tkivo. Na površini tonzile postoje udubljenja kroz koja ulazi sluz i nosi antigene do limfnog tkiva u dubini tonzile gdje se inicira imunski odgovor (Vagić 2003).

Unutar limfnog tkiva mogu se uočiti nakupine limfocita ovalnog oblika koje imaju tamniji rub i svjetliji centar. Takve se nakupine nazivaju folikuli, a u sekundarnim limfnim tkivima i organima egzistiraju u jednom od dva oblika: primarni folikuli i sekundarni folikuli. Primarni folikuli sačinjeni su uglavnom od naivnih B-limfocita koji migriraju u potrazi za antigenom, dok sekundarni folikuli, koji se još nazivaju i aktiviranima, sadrže središnji germinativni centar (GC,

od eng. *germinal center*) pun B-stanica koje prolaze procese sazrijevanja, somatske hipermutacije i rekombinacije klasa antitijela. Ti su procesi važni za stjecanje veće raznovrsnosti BCR-a nastalih V(D)J-rekombinacijom. U procesu somatske hipermutacije dolazi do nakupljanja točkastih mutacija u V-regiji lakih i teških lanaca imunoglobulina kako bi se proizvela visokoafinitetna antitijela. Taj je mehanizam reguliran i koordiniran proteinom AID (od eng. *activation-induced cytidine deaminase*), kao i mehanizam rekombinacije klasa antitijela. Rekombinacija se događa u konstantnoj C-regiji imunoglobulinskog gena, a u tom procesu dolazi do zamjene uzvodne regije C<sub>μ</sub> nizvodnom regijom C<sub>γ</sub> uvođenjem dvolančanog loma. Na taj se način mijenja efektorska funkcija antitijela (Honjo i sur. 2014). Uz središnji GC, mogu se uočiti plaštena i interfolikularna zona u kojoj je T-zona, područje gdje su T-limfociti kao i DC (slika 3.) (Allen i Cyster 2008). Vrlo je važna interakcija između DC i T-stanica u interfolikularnoj zoni jer na taj način započinje inicijalna aktivacija T-limfocita specifičnih za antigen. Inicijacija aktivacije B-limfocita specifičnih za antigen događa se u unutrašnjosti folikula, susretanjem antigena, nakon čega oni migriraju na periferiju folikula. Dolazi do susretanja i interakcije između T- i B-stanica koje se prepoznaju po specifičnosti za antigen, stimulaciji i poticanju specifičnog imunskog odgovora (Kerfoot i sur. 2011).



**Slika 3.** Prerez tonzile obojene hemalaun-eozinom (HE) s uočljivim germinativnim centrom (GC), plaštenom zonom (PZ) i interfolikularnom zonom (IZ).

#### 1.4. Specifičan imunosni odgovor

Stechena imunost temelji se na proizvodnji stanica sa specifičnim receptorima koji prepoznaju i reagiraju na uski krug stranih antigena invadirajućih patogena. Limfociti su nositelji stečene imunosti, a za njihovo je pravilno funkcioniranje potrebna kontrola stanicama koje prezentiraju antigene (APC, od eng. *antigen presenting cells*). Postoji više tipova stanica koje mogu obavljati funkciju prezentacije antigena, a jedan od njih su DC, koje djeluju kao poveznica između urođene i stečene imunosti. Doprinos DC urođenoj imunosti očituje se u proizvodnji različitih citokina koji potiču imunosni odgovor te u aktivaciji urođenih limfocita. Postoji specijalizirani endocitni sustav kojim DC vode do specifičnog imunosnog odgovora. Na periferiji



organizma mogu zarobiti, procesirati i prezentirati antigene, nakon čega migriraju u limfna tkiva gdje traže T-stanice koje će reagirati na prezentirani antigen. One također djeluju kao senzori koji odgovaraju na široki spektar okolišnih signala, diferencijacijom ili sazrijevanjem stanica (Steinman 2006).

Kako bi mogle prezentirati antigene, DC, kao i ostale APC, na površini moraju imati MHC-molekule (od eng. *major histocompatibility complex*), kod ljudi poznate i kao sustav HLA (*human leukocyte antigen*), potreban za determinaciju odgovarajućih transplatanata. Postoje dvije klase MHC-antigena. MHC I prisutni su na gotovo svim stanicama u tijelu. Imunosnim stanicama predstavljaju peptide nastale digestijom unutarstaničnih proteina. Digestija se odvija u proteasomu gdje su proteini razlomljeni na male peptide koji se kombiniraju s molekulama MHC I i izlažu na staničnoj površini. Tada oni postaju potencijalni antigeni za prezentaciju stanicama  $T_kCD8^+$ . Ako TCR prepozna i veže se za peptid,  $T_k$ -stanica je stimulirana za ubijanje stanice koja prezentira antigen. Obično su strani proteini prezentirani na inficiranim stanicama, koje se onda ovim mehanizmom ubijaju, ali stanice koje sadrže abnormalne proteine kao rezultat nakupljenih mutacija su također ciljana skupina. Drugu klasu predstavljaju MHC II koji su, za razliku od MHC I, prisutne samo na APC. Prezentirani peptidi potječu od izvanstaničnih proteina koje domaćinska stanica zarobljava i razgrađuje u lizosomu. Nastaju mali peptidi koji se vežu za molekulu MHC II i prezentiraju se na površini stanice. Nakon toga se predstavljaju stanicama  $T_hCD4^+$ . Ako TCR prepozna prezentirani peptid, otpušta interleukine koji stimuliraju B-stanice i ostale stanice imunološkog sustava.

Specifičan imunosni odgovor može se podijeliti u dva puta: humoralni odgovor i odgovor posredovan stanicama. U humoralnom odgovoru proizvode se i luče antitijela od strane B-stanica stimuliranih antigenom. Ako BCR na površini limfocita prepozna antigen, stvara se čvrsta veza i odabiru se one B-stanice koje imaju najspecifičnija antitijela za određeni antigen, što se očituje najčvršćom vezom između antitijela i antigena, procesom klonalne selekcije.  $T_h$ -stanice također mogu stimulirati aktivnost B-stanica lučenjem interleukina koji će potaknuti diferencijaciju B-stanica u plazma-stanice. Nakon aktivacije, B-stanice diferenciraju u plazma-stanice koje proizvode IgM i u memorijske stanice koje nastavljaju cirkuliranje kako bi došlo do brze imunodne reakcije u slučaju ponovnog ulaska istog antigena. Humoralni imunosni odgovor događa se izvan folikula limfnog tkiva. U imunosnom odgovoru posredovanom stanicama TCR na površini  $T_k$ -

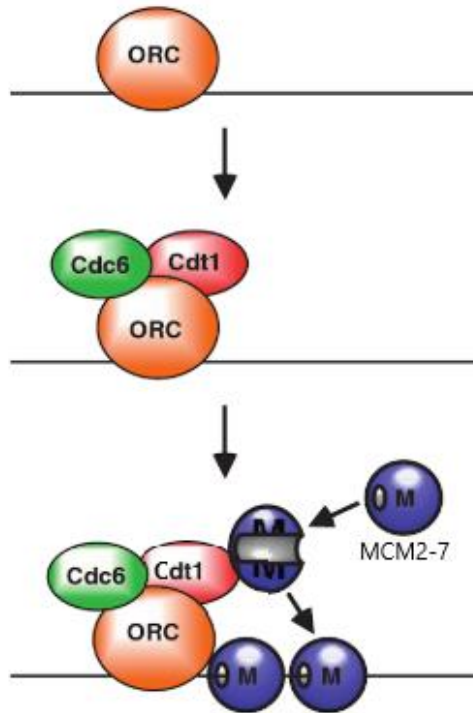
stanice mora prepoznati antigen prezentiran pomoću MHC I na površini inficirane stanice kako bi se  $T_k$ -stanica aktivirala i počela lučiti perforine i enzime za uništenje inficirane stanice. U drugom slučaju će  $T_h$ -stanica koja je prepoznala odgovarajući antigen na molekuli MHC II potaknuti diferencijaciju T-stanice u citotoksični T-limfocit koji će potaknuti raspadanje i smrt inficirane stanice (Rasko i Downes 1995).

Tijekom imunskog odgovora ovisnog o T-stanicama, u folikulima B-stanica u sekundarnom limfnom tkivu započinje formiranje GC. B-stanice od kojih će nastati GC moraju se aktivirati izvan folikula, u T-zonama, pomoću  $T_h$ -stanica i DC. Nakon formiranja GC nastaju sekundarni folikuli. GC ispunjavaju centroblasti, proliferirajuće B-stanice, iz kojih nastaju centrociti. Centroblasti prolaze klonalne ekspanzije kojima dolazi do ogromnog i naglog povećanja broja limfocita. Folikularne DC na površini nose antigen u neprocesiranom obliku, a njega će prepoznati centrociti i prezentirati ga T-stanicama. GC opstaju u tkivu oko 3 tjedna nakon imunizacije, ali i nakon tog perioda memorijske B-stanice nastavljaju proliferirati u folikulu kroz dugi period imunskih odgovora ovisnih o T-stanicama. Vjeruje se da su te stanice izvor plazma-stanica i memorijskih stanica koje su neophodne za održavanje dugotrajne proizvodnje antitijela i stanične memorije (MacLennan 1994).

## 1.5. Replikacija

Zbog visoke proliferacijske stope unutar germinativnih centara, učestale i brze diobe su uobičajena pojava. Tijekom replikacije DNA dolazi do odvajanja lanaca molekule DNA i sinteze novog lanca, komplementarnog lancu kalupu, pomoću kompleksa proteina koji tvore strukturu nazvanu replikacijska vilica. To je evolucijski visoko konzervirani proces koji obuhvaća skup složenih biokemijskih reakcija koje nastaju međudjelovanjem enzimskih kompleksa i regulacijskih proteina te su koordinirane tijekom različitih faza staničnog ciklusa kao odgovor na različite unutarnje i vanjske stanične signale. Koordinacija se postiže djelovanjem i vezanjem regulacijskih komponenata na molekulu DNA u točno određenom trenutku staničnog ciklusa (Cox 2009).

Kod eukariota replikacija započinje na više mjesta unutar molekule DNA, koja se nazivaju ishodišta replikacije, a u ljudskim stanicama može ih biti i do nekoliko desetaka tisuća. Stupanj konzerviranosti sekvencija koje čine ishodište replikacije znatno se razlikuje između različitih eukariotskih organizama. Te su sekvencije neophodne za vezanje inicijatorskih proteina koji regrutiraju nizvodne proteine i dovode do konformacijske promjene, to jest odmatanja DNA te na taj način aktiviraju ishodište replikacije. Odmatanje DNA omogućava vezanje multienzimskog kompleksa ORC (od eng. *Origin recognition complex*) u ishodištu replikacije što je temelj nastanka predreplikacijskog kompleksa kojeg čine CDT1 (od eng. *Cdc10-dependent transcript 1*), CDC6 (od eng. *Cell division cycle 6*) i heksamerni kompleks MCM (od eng. *Mini-chromosome maintenance*). Inicijacijski faktori CDT1 i CDC6 odgovorni su za pravilno postavljanje kompleksa MCM2-7 na DNA (slika 4.). Kompleks MCM2-7 sudjeluje u inicijaciji sinteze DNA u ishodištu replikacije. S obzirom na to da je nužna replikacija genoma samo jednom tijekom svake stanične diobe, svako ishodište replikacije ograničeno je na jedan inicijacijski događaj unutar staničnog ciklusa. To se postiže vremenskim odvajanjem regrutiranja kompleksa MCM od njegove aktivacije, kada inaktivni kompleks MCM postaje enzimski aktivna helikaza (Ming 2001). Helikazna aktivnost kompleksa MCM omogućava razdvajanje lanaca molekule DNA putujući ispred replikacijske vilice. Do postavljanja kompleksa MCM na DNA dolazi tijekom kasne M-faze i G1-faze staničnog ciklusa što zahtijeva hidrolizu ATP-a. Time mjesto ishodišta replikacije, koja će se dogoditi u sljedećoj S-fazi, postaje ovlašteno (Cox 2009). Kako bi došlo do aktivacije kompleksa MCM u S-fazi potrebna je aktivnost ciklina i kinaza ovisnih o ciklinu S-faze (ciklin E/A- Cdk2), kao i kinaze ovisne o Dbf4 (Devault i sur. 2009).



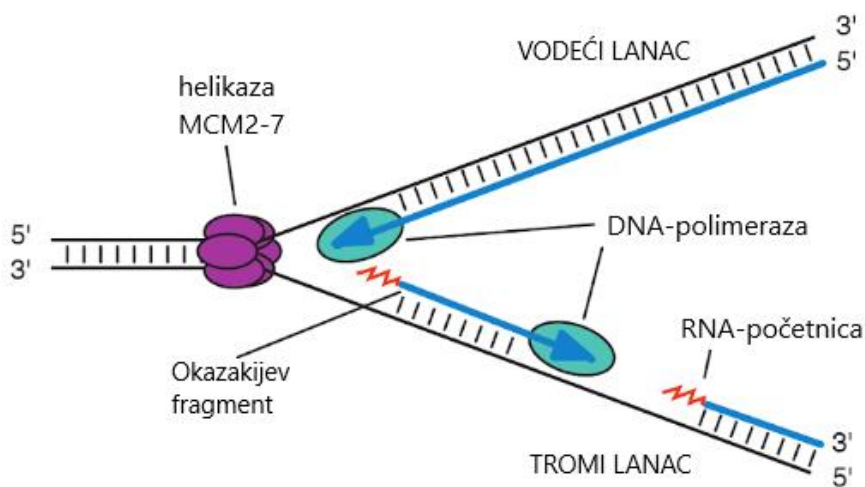
**Slika 4.** Stvaranje predreplikacijskog kompleksa (Preuzeto i prilagođeno iz Cox 2009).

Nakon aktivacije u S-fazi, kompleks MCM obavlja helikaznu aktivnost i putuje po DNA zajedno s replikacijskom vilicom. Kad kompleks MCM napusti mjesto inicijacije replikacije ono prestaje biti ovlašteno i takvo mora ostati tijekom S- i G<sub>2</sub>-faze kako ne bi došlo do ponovne replikacije DNA unutar jednog staničnog ciklusa. Postoji mehanizam koji osigurava da ishodište replikacije ostane neovlašteno do kraja staničnog ciklusa. Mehanizam se temelji na degradaciji proteina CDT1 kao i aktivaciji njegovog inhibitora, geminina. CDT1 je degradiran pred kraj G<sub>1</sub>-faze i u ranoj S-fazi. U S-, G<sub>2</sub>- i M-fazi dolazi do nakupljanja geminina koji veže CDT1 i stabilizira ga. Na taj je način CDT1 zaštićen od degradacije i nakon razgradnje geminina u M- i G<sub>1</sub>-fazi ponovo je slobodan za ovlašćivanje ishodišta replikacije.

Tijekom elongacijskog koraka MCM2-7 zajedno s pridruženim kompleksom odmata DNA u dva smjera od mjesta inicijacije, a na odmotanu jednolančanu DNA veže se RPA (od eng. *Replication protein A*). Putem interakcije s helikazom i RPA, DNA-polimeraza  $\alpha$  sjeda na kalup. Podjedinica holoenzima polimeraze  $\alpha$  pruža primaznu aktivnost i sintetizira kratke RNA-početnice

koje se produžuju u iDNA (od eng. *initiator DNA*). Strukturu početnice i DNA prepoznaje heteropentamerni proteinski kompleks RFC (od eng. *replication factor C*) koji se veže za prepoznatu strukturu i, koristeći energiju hidrolize ATP-a, otvara prsten klizeće stezaljke PCNA te ju pričvršćuje za DNA. U isto vrijeme, polimeraza  $\alpha$  se uklanja s kalupa. PCNA služi za pričvršćivanje DNA-polimeraze  $\delta$  i DNA-polimeraze  $\epsilon$  na kalup i to tako da je polimeraza  $\delta$  na tromom, a polimeraza  $\epsilon$  na vodećem lancu.

Sinteza DNA na vodećem lancu odvija se kontinuirano u 5'–3' smjeru. Na tromom lancu smjer sinteze je također 5'–3', ali s obzirom na to da se replikacijska vilica pomiče u suprotnom smjeru, sinteza je diskontinuirana u obliku Okazakijevih fragmenata. Svaki Okazakijev fragment započinje RNA-početnicom koja se uklanja prije ligacije fragmenata DNA-ligazom (slika 5.). Kada se replikacijske vilice koje dolaze iz suprotnih smjerova sretnu, dolazi do terminacije. To se uglavnom događa bez posebnih sekvencija DNA iako ponekad mogu postojati sekvencije koje djeluju kao barijera koja usporava replikacijsku vilicu i takve sekvencije mogu postati terminacijska mjesta. Prilikom terminacije replikacijska vilica se rastavlja, a većina otpuštenih proteina može se reciklirati u novu replikacijsku vilicu. To ne vrijedi za proteine MCM2-7. Oni se otpuštaju s DNA u procesu terminacije, ali se neće ponovo vezati za DNA sve do sljedeće mitoze kako bi se spriječilo više od jedne replikacije DNA u jednom staničnom ciklusu (Cox 2009).



**Slika 5.** Sinteza DNA na vodećem i tromom lancu kalupa (Preuzeto i prilagođeno iz Cox 2009).

Nakon replikacije DNA mora se kopirati i epigenetska informacija. To se postiže povezivanjem PCNA s velikim brojem enzima koji su modulatori kromatina. To su enzimi koji imaju katalitičku aktivnost ili mogu aktivirati druge enzime koji su uključeni u modifikacije kromatina kao što su DNMT1 (od eng. *DNA metiltransferase 1*), CAF1 (od eng. *chromatin assembly factor 1*), HDAC (od eng. *histone deacetylase*), HAT (od eng. *histone acetyltransferase*)... DNMT1 osigurava vjernost replikacije na razini metilacije. To je enzim koji katalizira metilaciju hemimetiliranih CpG-dinukleotida koji se pojavljuju nakon prolaska replikacijske vilice tijekom S-faze staničnog ciklusa kako bi osigurao mitotsko nasljeđivanje genomskog uzorka metilacije (Yarychivska i sur. 2018). CAF1 je jedan od histonskih pratitelja ovisnih o replikaciji čija je uloga formiranje tetramera H3-H4 i njihovo postavljanje na novorepliciranu DNA (Budhavarapu 2013). Protein p300 je histonska acetiltransferaza koja remodeliranjem kromatina regulira transkripciju gena. Jedan je od važnih kofaktora za veliki broj transkripcijskih faktora (Blobel 2000).

Epigenetičke modifikacije u obliku metilacije i demetilacije DNA, histonskih modifikacija i remodeliranja kromatina važne su zbog sposobnosti regulacije ekspresije gena bez samog mijenjanja sekvencija DNA. Polikombni proteini su grupa epigenetičkih regulacijskih proteina koji imaju ulogu u proliferaciji stanice i kritični su faktori pluripotentnosti i diferencijacije matičnih stanica kao i promijenjene ekspresije gena koja se javlja kod malignih transformacija. EZH2 (od eng. *Enhancer of zeste homolog 2*) je evolucijski konzervirani gen, identificiran kao katalitička podjedinica jednog od kompleksa polikombnih proteina. Ima ulogu histonske metiltransferaze koja trimetilira 27. lizin na histonu H3. Može funkcionirati i kao transkripcijski represor, ali i koaktivator, ovisno o različitom staničnom kontekstu. Svojom djelovanjem je uključen u ciljano utišavanje gena i različite biološke funkcije kao što su kontrola staničnog ciklusa, proliferacija, diferencijacija, itd. Pronađena je visoka ekspresija EZH2 u folikularnim T-stanicama, ali i u različitim malignim tumorima kao što su limfomi, tumori dojke, prostate i jajnika u kojima djeluje kao faktor promocije tumorskog rasta i metastaziranja. Također, pokazano je da inhibicija EZH2 malim molekularnim inhibitorom može rezultirati smanjenjem rasta tumorskih stanica i formacije tumora (Gan i sur. 2018).

Regulacijski proteini imaju ključnu ulogu u održavanju normalnih bioloških funkcija stanice. Iznimno je važna njihova prisutnost i količina u točno određenim fazama staničnog ciklusa. Zbog toga će promjena u ekspresiji tih proteina dovesti do poremećaja regulacije staničnog ciklusa i replikacije DNA. S obzirom na to da su GC folikula unutar limfnog tkiva područja brzih i čestih dioba stanica, izuzetno je važna stroga kontrola replikacije koja prethodi svakoj diobi. Ako u tim stanicama dođe do poremećene ekspresije regulacijskih proteina, a posljedično i do poremećaja regulacije staničnog ciklusa i replikacije DNA, one mogu biti ishodište specifičnih tumora kao što su folikularni limfom (FL, od eng. *follicular lymphoma*) i difuzni B-velikostanični limfom (DLBCL, od eng. *diffuse large B-cell lymphoma*).

## 1.6. Folikularni limfom

FL je drugi najčešći nehodgkinski limfom. Obuhvaća 10-20% svih limfoma u zapadnim zemljama. Prosječna dob oboljelih je 60 godina i blago je povišen broj ženskih pacijenata (Luminar i sur. 2012). Biološki, FL predstavlja tumorski ekvivalent normalne GC reakcije. Prema tome, tumorski folikuli sadrže stanice koje se mogu naći u reaktivnom GC, ali u varijabilnim i neuobičajenim omjerima. Infiltrat limfnog čvora sa folikularnim limfomom sadrži čvrsto pakirane atipične tumorske folikule koji su, za razliku od zdravog GC, nejasno odvojeni od okolnog područja T-zone. U nekim slučajevima gubi se karakteristični folikularni uzorak u ranim fazama bolesti ili tijekom progresije pa tumor raste djelomično ili pretežno difuzno. Ipak, neki tumorski folikuli ostaju primjetni omogućavajući uspješno dijagnosticiranje.

Definirajuća citogenetička oznaka za FL, koja se pojavljuje u 80%-90% slučajeva, je kromosomska translokacija  $t(14;18)(q32;q21)$ . Kao posljedica te translokacije protoonkogen *BCL2* (od eng. *B-cell lymphoma/leukemia 2*) dolazi pod promotorsku regiju gena za teški lanac imunoglobulina (*IgH*), poremećujući tako njegovu ekspresiju i rezultirajući prekomjernom ekspresijom proteina BCL2 u tumorskim folikulima. Protoonkogen *BCL2* je antiapoptotska molekula eksprimirana u mirujućim B-stanicama, u plaštenoj zoni, kao i u post-folikularnim B-stanicama, gdje promovira dugoživući folikularni prekursor i memorijske B-stanice. S druge

strane, u B-stanicama unutar GC nedostaje ekspresija BCL2 pa one umiru apoptozom, osim ako ne sretnu specifični antigen i započinu proces daljnjeg razvoja somatskim hipermutacijama. Kako se u GC događaju brze i česte diobe stanica, apoptoza je ključna za održavanje ravnoteže i pravilnog broja novonastalih i umrlih stanica. U slučaju folikularnog limfoma dolazi do konstitutivne prekomjerne ekspresije BCL2 u B-stanicama unutar GC, što dovodi do nakupljanja B-stanica koje bi u normalnim uvjetima bile uništene apoptozom. Nakupljaju se i dodatne mutacije što dovodi do razvoja FL-a. U drugoj varijanti translokacije *BCL2* dolazi u lokus imunoglobulinskog lakog lanca ( $\kappa$ ,  $\lambda$ ) što također dovodi do nepravilne i neprestane ekspresije BCL2 u B-stanicama unutar GC.

Pojava translokacije t(14;18) prvi je korak u procesu koji rezultira klonalnom deregulacijom kontrole staničnog ciklusa i apoptoze u tumorskim stanicama. Tijekom tog procesa limfomogeneze pojavljuje se puno dodatnih genetičkih ili epigenetičkih događaja koji vode do nastanka FL-a i/ili progresije. Na primjer, konstitutivna ekspresija proteina AID u B-stanicama s prekomjerno eksprimiranim BCL2 unutar GC može propagirati neprestane somatske hipermutacije i rekombinacije klasa antitijela koje rezultiraju povećanom nestabilnošću genoma. To može potaknuti pojavu drugih onkogenih događaja i, u konačnici, dovesti do maligne transformacije (Ott i Rosenwald 2008).

## 1.7. Difuzni B-velikostanični limfom

DLBCL je najčešći nehodgkinski limfom u zapadnim zemljama. Predstavlja 30-40% svih slučajeva limfoma, a pojavnost mu postepeno raste. Prosječna dob pacijenata kojima je dijagnosticiran DLBCL je 70 godina, ali u iznimnim slučajevima pojavljuje se kod djece i mladih. Jedan od glavnih simptoma kod većine pacijenata predstavlja pojava ubrzanog rasta tumorske mase u jednom ili većem broju limfnih čvorova ili pak na mjestima izvan limfnih čvorova. Prema stanicama od kojih je potekao, DLBCL se može podijeliti u dva osnovna molekularna podtipa: GCB, od B-stanica unutar GC, i ABC, od aktiviranih B-limfocita, ali u 10-15% slučajeva DLBCL se ne može klasificirati kao jedan od ta dva podtipa. Pacijenti s GCB-podtipom obično imaju bolju prognozu od onih sa ABC-podtipom. Iako je poznavanje stanice od koje je limfom potekao korisno



zbog predviđanja prognoze, GCB- i ABC-podtipovi su heterogeni te postoje podtipovi sa boljom i lošijom prognozom unutar obje grupe (Li i sur. 2018.). Kako bi se razlikovali pojedini podtipovi, razvijen je imunohistokemijski algoritam koji se temelji na imunohistokemijskom bojenju tkiva za CD10, BCL6 i MUM1 (Hans i sur. 2004).

Što se tiče stanične morfologije, postoji nekoliko varijanti u kojima se DLBCL pojavljuje. U 80% slučajeva DLBCL je sačinjen od stanica koje nalikuju centroblastima u GC. Imunoblastni tip, koji se pojavljuje u 10% slučajeva, ima više od 90% imunoblasta. Druge morfološke varijante uključuju T-stanicama bogatu/ histocitima bogatu varijantu u čijoj su pozadini reaktivni T-limfociti i histociti. U anaplastičnom tipu stanice ekspimiraju CD30, imaju pleomorfne jezgre i obilne citoplazme. Kod HIV-pozitivnih pacijenata može se pojaviti vrlo rijedak tip, a to je plazmablastičan DLBCL (Friedberg i Fisher 2008).

Postoji niz kromosomskih promjena opisanih kod DLBCL. Najčešća abnormalnost uključuje translokaciju regije 3q27 gena *BCL6*. *BCL6* je protoonkogen koji kodira transkripcijski represor ekspimiran u zrelih B-limfocitima unutar GC. Potreban je za formaciju GC i afinitetno sazrijevanje tijekom imunološkog odgovora ovisnog o T-stanicama. Također, dokazano je da *BCL6* ima ulogu u supresiji gena uključenih u aktivaciju limfocita, diferencijaciju, zastoje staničnog ciklusa i apoptozu. Spomenuta translokacija dovodi do približavanja heterolognih promotora partnerskih kromosoma s intaktnom *BCL6* kodirajućom sekvencijom. Kao posljedica dolazi do poremećaja regulacije ekspresije *BCL6* (Pasqualucci i sur. 2003).

## **2. HIPOTEZA I CILJEVI ISTRAŽIVANJA**

Hipoteza istraživanja je da se tijekom razvoja limfoma mijenja količina proteina uključenih u regulaciju staničnog ciklusa i replikaciju DNA.

Specifičan cilj istraživanja je odrediti količinu tumorskih stanica folikularnog limfoma i difuznog B-velikostaničnog limfoma, kao i netumorskih stanica u sekundarnom limfnom tkivu iz kojih ti tumori potječu, koje eksprimiraju proteine MCM2, PCNA, GMNN, DNMT1, p300, CDT1 i EZH2. Također, cilj je usporediti i utvrditi značajne razlike između dobivenih rezultata za navedene grupe uzoraka.

### **3. MATERIJALI I METODE**

#### **3.1. Materijali**

Istraživanje je provedeno na 35 uzoraka tkiva netumorskih tonzila i limfnih čvorova pacijenata s folikularnim limfomom i difuznim B-velikostaničnim limfomom. Uzorci su prikupljeni u Kliničkom zavodu za patologiju i citologiju KB Merkur kao završni dio projekta o B-limfomagenezi odobrenim od nadležnog etičkog povjerenstva.

Uzorci su fiksirani formalinom i uklopljeni u parafin, a prerezi za pripremu preparata su napravljeni mikrotomom.

#### **3.2. Imunohistokemijsko bojenje**

Za određivanje prisutnosti istraživanih proteina i količine stanica koje eksprimiraju pojedine od tih proteina korištena je metoda imunohistokemijskog bojenja. Ta se metoda bazira na interakciji specifičnog antigena i obilježenog antitijela. U istraživanju su korištena antitijela specifična za ljudske proteine MCM2, PCNA, GMNN, DNMT1, p300, CDT1 i EZH2. Pomoću otopine za razrjeđivanje DAKO, S2022 napravljena su sljedeća razrjeđenja antitijela: MCM2 (Cell Signaling) 1:500, PCNA (Cell Signaling) 1:4000, GMNN (Santa Cruz) 1:100, DNMT1 (Santa Cruz) 1:50, p300 (Santa Cruz) 1:100, CDT1 (Santa Cruz) 1:50, EZH2 (Sigma) 1:100.

Zbog načina pripreme uzoraka, fiksiranjem u formalinu i uklapanjem u parafin, očuvana je morfologija, ali je promijenjena trodimenzijska struktura tkivnih proteina što dovodi do modifikacije epitopa antigena i onemogućava reakciju s njegovim paratopom. Zbog toga je prije imunohistokemijskog bojenja bilo potrebno provesti demaskiranje epitopa.

Demaskiranje epitopa provedeno je kuhanjem deparafiniziranih i rehidriranih uzoraka u kuhu na visokoj temperaturi i pod visokim tlakom (Pascal, DakoCytomation), tijekom 2 minute na 125 °C. Prilikom kuhanja korišten je citratni pufer, pH 6.1 za otopine antitijela za MCM2, PCNA, DNMT1 i EZH2 te Tris/EDTA, pH 9.0 za GMNN, p300 i CDT1. Preparati su zatim ohlađeni u puferu na sobnoj temperaturi.

Bojenje uzoraka napravljeno je pomoću seta kemikalija EnVision™ FLEX, High pH (Link) i razrijeđenim otopinama antitijela za proteine MCM2, PCNA, GMNN, DNMT1, p300, CDT1 i EZH2 u uređaju Autostainer LINK 48 (Dako). Izvedeno je prema standardnom protokolu koji uključuje inkubaciju preparata u reagensima FLEX Peroxidase Block 5 minuta, FLEX /HRP 20 minuta i FLEX DAB+ Sub-Chromo 10 minuta.

Nakon završetka bojenja preparati su isprani vodom i kontrastirani hematoksilinom u kojem su inkubirani 3 minute. Zatim su isprani vodom i destiliranom vodom, a nakon toga su inkubirani dvaputa po 1 minutu u apsolutnom etanolu i ksilenu. Na preparate su stavljena pokrovnostakla pomoću sredstva za poklapanje.

### **3.3. Analiza imunohistokemijskog bojenja**

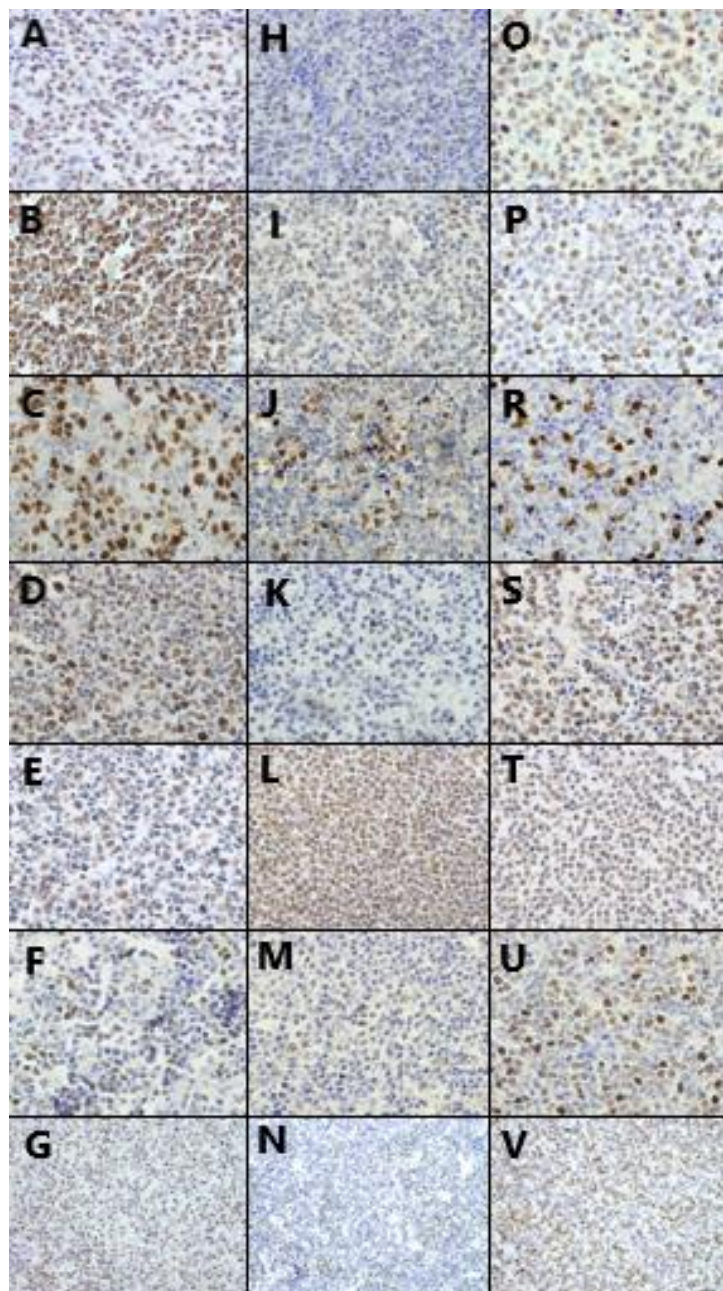
Rezultati imunohistokemijskog bojenja su analizirani gledanjem preparata pod svjetlosnim mikroskopom. Određena je količina stanica koje eksprimiraju određeni protein u germinativnom centru tonzile ili tumorskom tkivu folikularnog limfoma, odnosno difuznog B-velikostaničnog limfoma. Rezultati su prikazani kao postotak obojenih stanica specifičnog dijela analiziranog tkiva.

### **3.4. Statistička obrada**

Dobiveni imunohistokemijski rezultati obrađeni su u programu SPSS Statistics (SPSS Inc., SAD). Pomoću neparametrijskog Mann-Whitney U testa utvrđene su razlike između ispitivanih grupa uzoraka: tonzila– grupa T, folikularni limfom– grupa FL, difuzni B-velikostanični limfom s ishodištem u GC– grupa DLBCL GCB, difuzni B-velikostanični limfom s ishodištem izvan GC– DLBCL non-GCB. Kao pokazatelj statističke značajnosti uzeta je p vrijednost manja od 0,05.

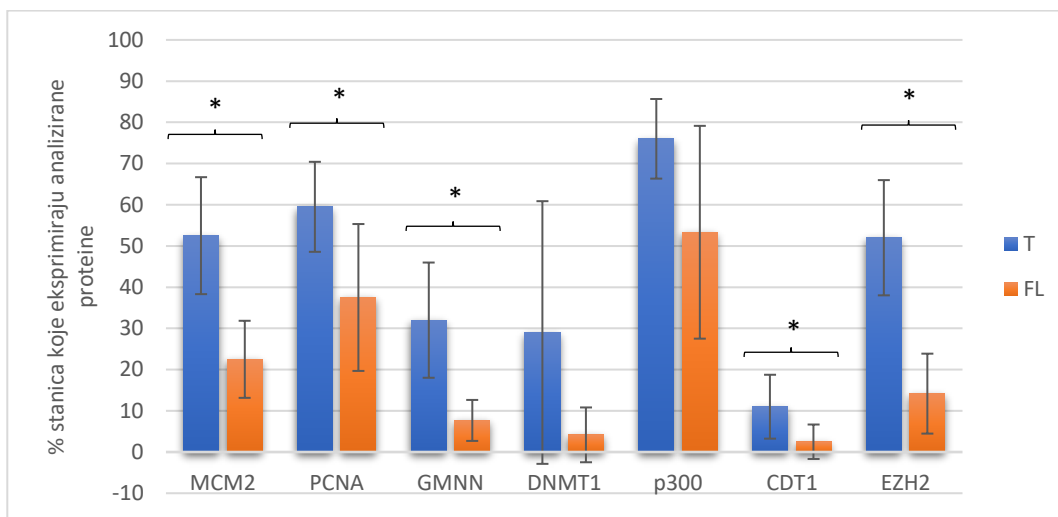
## 4. REZULTATI

Imunohistokemijsko bojenje omogućilo je jasnu vizualizaciju stanica koje ekspimiraju određeni protein u germinativnom centru tonzile ili tumorskom tkivu folikularnog limfoma, odnosno difuznog B-velikostaničnog limfoma, pomoću svjetlosnog mikroskopa (slika 6.). Količine stanica koje ekspimiraju proteine MCM2, PCNA, GMNN, DNMT1, p300, CDT1 i EZH2 za svaki pojedini uzorak određene su u postotcima (%). Statistički su utvrđene značajne razlike za pojedine grupe uzoraka.



**Slika 6.** Prikaz imunohistokemijskog bojenja stanica germinativnog centra tonzile za A) MCM2, B) PCNA, C) GMNN, D) DNMT1, E) p300, F) CDT1, G) EZH2; stanica tumorskog tkiva folikularnog limfoma za H) MCM2, I) PCNA, J) GMNN, K) DNMT1, L) p300, M) CDT1, N) EZH2 i stanica tumorskog tkiva difuznog B-velikostaničnog limfoma za O) MCM2, P) PCNA, R) GMNN, S) DNMT1, T) p300, U) CDT1, V) EZH2. Smeđi signali prikazuju ekspresiju navedenih proteina u stanicama.

Rezultati usporedbe utvrđene količine stanica netumorskih tonzila (grupa T) i tumorskih stanica folikularnog limfoma (grupa FL) prikazani su na slici 7.

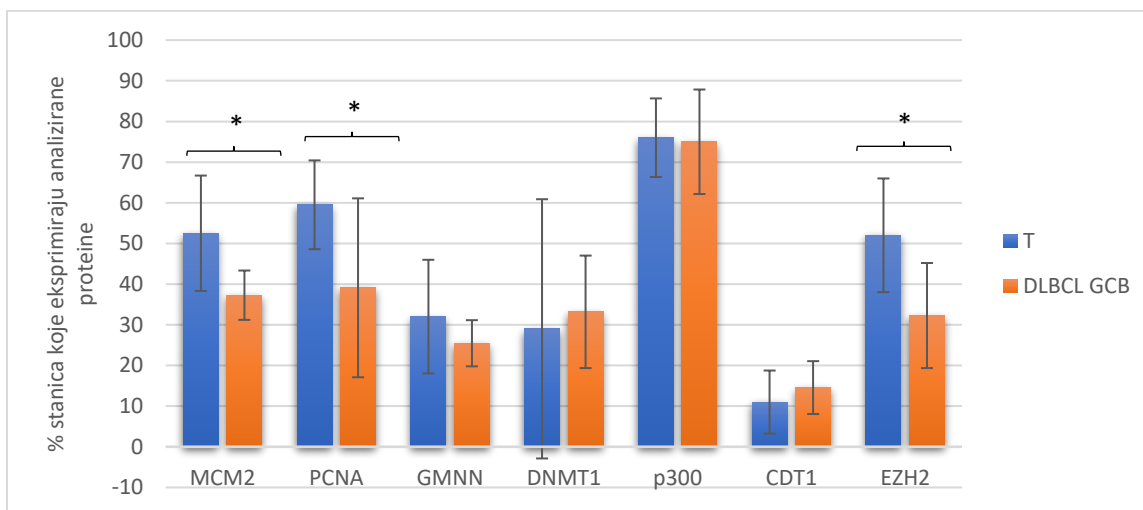


**Slika 7.** Broj stanica koje ekspimiraju analizirane proteine u germinativnom centru tonzile i tumorskim stanicama folikularnog limfoma s označenim statistički značajnim razlikama (\*) između navedenih grupa uzoraka.

Statistički je značajno različita količina stanica germinativnog centra tonzile i tumorskih stanica folikularnog limfoma koje ekspimiraju MCM2 ( $p = 0.003$ ), PCNA ( $p = 0.016$ ), GMNN ( $p = 0.001$ ), CDT1 ( $p = 0.022$ ) i EZH2 ( $p = 0.042$ ) i za sve je navedene proteine veća u netumorskim stanicama, tj. stanicama tonzile.



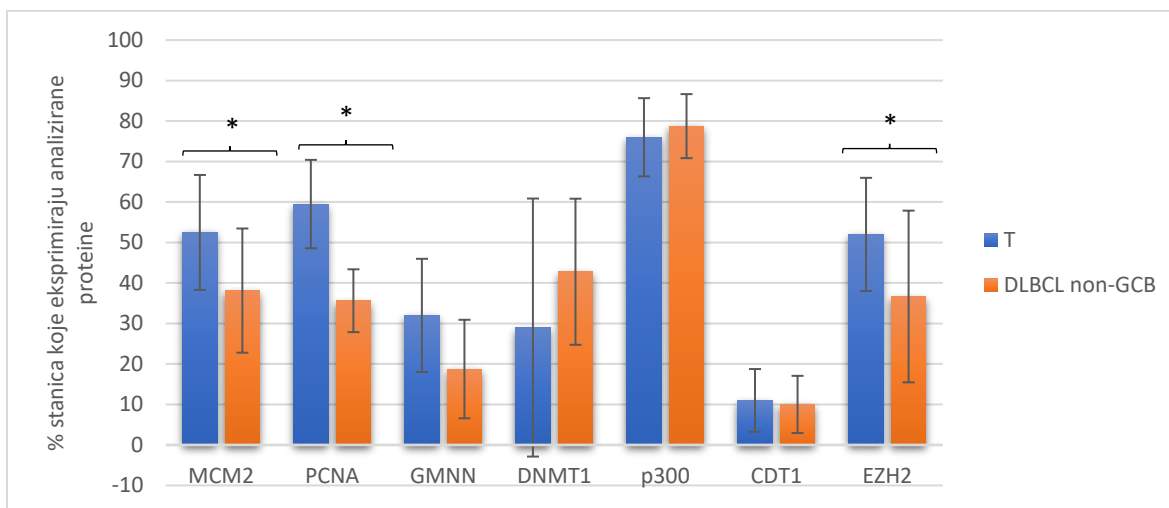
Rezultati usporedbe utvrđene količine stanica netumorskih tonzila (grupa T) i tumorskih stanica difuznog B-velikostaničnog limfoma s ishodištem u GC (grupa DLBCL GCB) prikazani su na slici 8.



**Slika 8.** Broj stanica koje ekspiriraju analizirane proteine u germinativnom centru tonzile i tumorskim stanicama difuznog B-velikostaničnog limfoma s ishodištem u GC s označenim statistički značajnim razlikama (\*) između navedenih grupa uzoraka.

Statistički je značajno različita količina stanica germinativnog centra tonzile i tumorskih stanica difuznog B-velikostaničnog limfoma s ishodištem u GC koje ekspiriraju MCM2 ( $p = 0.019$ ), PCNA ( $p = 0.002$ ) i EZH2 ( $p = 0.049$ ) i za sve je navedene proteine veća kod netumorskih stanica sekundarnog limfnog tkiva, tj. tonzile.

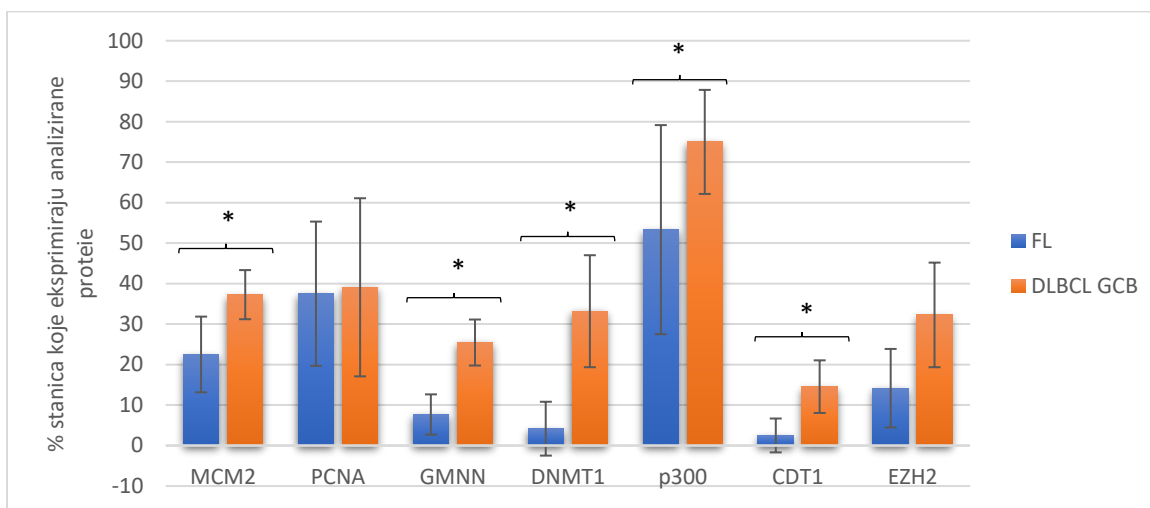
Rezultati usporedbe utvrđene količine stanica netumorskih tonzila (grupa T) i tumorskih stanica difuznog B-velikostaničnog limfoma s ishodištem izvan GC (grupa DLBCL non-GCB) prikazani su na slici 9.



**Slika 9.** Broj stanica koje ekspimiraju analizirane proteine u germinativnom centru tonzile i tumorskim stanicama difuznog B-velikostaničnog limfoma s ishodištem izvan GC s označenim statistički značajnim razlikama (\*) između navedenih grupa uzoraka.

Statistički je značajno različita količina stanica germinativnog centra tonzile i tumorskih stanica difuznog B-velikostaničnog limfoma s ishodištem izvan GC koje ekspimiraju MCM2 ( $p = 0.009$ ), PCNA ( $p = 0.007$ ) i EZH2 ( $p = 0.015$ ) i za sve je navedene proteine veća kod netumorskih stanica sekundarnog limfnog tkiva, tj. tonzile.

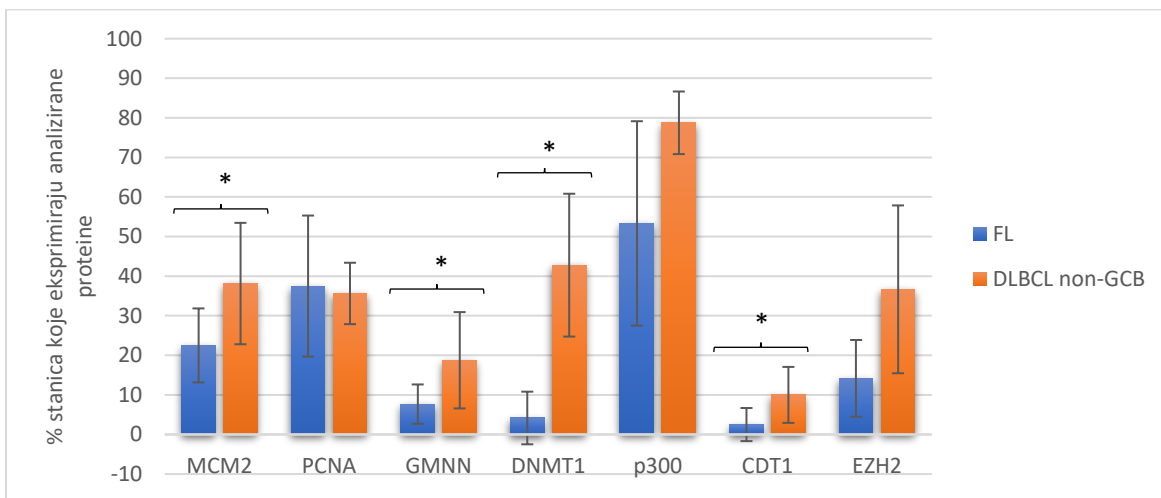
Rezultati usporedbe utvrđene količine tumorskih stanica folikularnog limfoma (grupa FL) i tumorskih stanica difuznog B-velikostaničnog limfoma s ishodištem u GC (grupa DLBCL GCB) prikazani su u tablici na slici 10.



**Slika 10.** Broj stanica koje ekspimiraju analizirane proteine u tumorskim stanicama folikularnog limfoma i difuznog B-velikostaničnog limfoma s ishodištem u GC s označenim statistički značajnim razlikama (\*) između navedenih grupa uzoraka.

Statistički je značajno različita količina tumorskih stanica folikularnog limfoma i difuznog B-velikostaničnog limfoma s ishodištem u GC koje ekspimiraju MCM2 ( $p = 0.011$ ), GMNN ( $p = 0.015$ ), DNMT1 ( $p = 0.001$ ), p300 ( $p = 0.04$ ) i CDT1 ( $p = 0.012$ ) i za sve je navedene proteine veća kod tumorskih stanica difuznog B-velikostaničnog limfoma s ishodištem u GC.

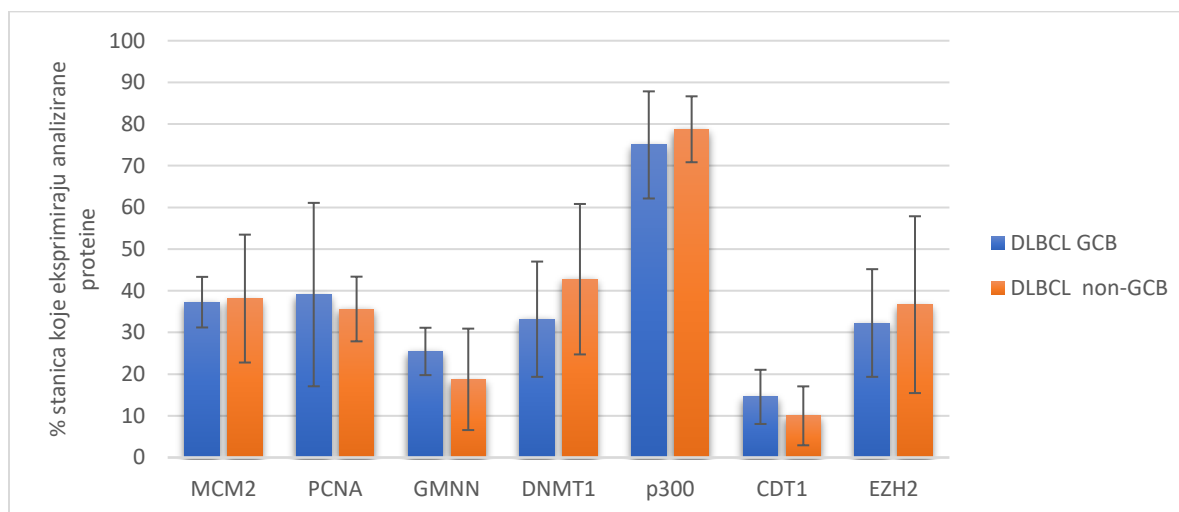
Rezultati usporedbe utvrđene količine tumorskih stanica folikularnog limfoma (grupa FL) i tumorskih stanica difuznog B-velikostaničnog limfoma s ishodištem izvan GC (grupa DLBCL non-GCB) prikazani su na slici 11.



**Slika 11.** Broj stanica koje ekspimiraju analizirane proteine u tumorskim stanicama folikularnog limfoma i difuznog B-velikostaničnog limfoma s ishodištem izvan GC s označenim statistički značajnim razlikama (\*) između navedenih grupa uzoraka.

Statistički je značajno različita količina tumorskih stanica folikularnog limfoma i difuznog B-velikostaničnog limfoma s ishodištem izvan GC koje ekspimiraju MCM2 ( $p = 0.022$ ), GMNN ( $p = 0.004$ ), DNMT1 ( $p = 0.002$ ) i CDT1 ( $p = 0.003$ ) i za sve je navedene proteine veća kod tumorskih stanica difuznog B-velikostaničnog limfoma s ishodištem izvan GC.

Rezultati usporedbe utvrđene količine tumorskih stanica difuznog B-velikostaničnog limfoma s ishodištem u GC (grupa DLBCL GCB) i tumorskih stanica difuznog B-velikostaničnog limfoma s ishodištem izvan GC (grupa DLBCL non-GCB) prikazani su na slici 12.



**Slika 12.** Broj stanica koje ekspimiraju analizirane proteine u tumorskim stanicama difuznog B-velikostaničnog limfoma s ishodištem u GC i difuznog B-velikostaničnog limfoma s ishodištem izvan GC.

Količine stanica koje ekspimiraju analizirane proteine u grupama DLBCL GCB i DLBCL non-GCB statistički se ne razlikuju.

## 5. RASPRAVA

Usporedba količine netumorskih stanica tonzila i tumorskih stanica u FL-u i DLBCL-u koje ekspresiraju proteine uključene u kontrolu staničnog ciklusa i replikacije pokazala je višu razinu ekspresije proteina MCM2, PCNA i EZH2 u netumorskim stanicama tonzila. Protein MCM2 jedan je od inicijatora eukariotske replikacije. Heksamerni kompleks kojeg formiraju proteini MCM ključna je komponenta predreplikacijskog kompleksa i ima ulogu u formiranju replikacijske vilice te regrutiranju drugih proteina uključenih u proces replikacije. Važan je i u kontroli staničnog ciklusa jer osigurava da se replikacija DNA inicira samo jednom tijekom svakog staničnog ciklusa. Dokazano je da proteini MCM imaju ulogu na kraju mnogih signalnih putova uključenih u staničnu proliferaciju. Antitijela za detekciju proteina MCM pokazala su se korisnima za definiranje proliferativnih odjeljaka tumorskih, ali i netumorskih tkiva. Proteini MCM koriste se kao markeri za tumorski probir, preživljenje i prognozu (Obermann i sur. 2005).

U tumorima kao što su FL i DLBCL, u kojima dolazi do preslagivanja koje uključuje protoonkogene kao što su *BCL2* i *BCL6*, ali i niza drugih genetskih promjena što dovodi do nepravilne regulacije staničnog ciklusa i apoptoze te izuzetno visoke proliferativne sposobnosti tumorskih stanica, očekuje se visoka razina ekspresije proliferacijskog markera MCM2. Rezultati koji pokazuju višu razinu ekspresije proteina MCM2 u netumorskim stanicama tonzila nego u tumorskim stanicama FL-a i DLBCL-a mogu se objasniti događajima u tonzili tijekom imunskog odgovora. Tonzile su zbog svog položaja u tijelu stalna meta nadolazećih stranih antigena te su zbog svog oblika, velikog broja kripta koje omogućavaju nakupljanje bakterija i pojavu infekcija, podložne čestim upalnim procesima i u stalnoj potrebi za imunskim odgovorom. Posljedično, u tonzilama se formiraju GC, područja brzo proliferirajućih centroblasta pa se zbog toga u tim stanicama očekuje visoka ekspresija regulacijskih proteina staničnog ciklusa i replikacije kao što je protein MCM2. Replikacije koje prethode svakoj diobi stanica u netumorskom tkivu tonzila strogo su regulirane za razliku od nekontroliranih diobi stanica tumorskog tkiva pa je i ekspresija regulacijskog proteina MCM2 u brzo proliferirajućim netumorskim stanicama viša.

PCNA je član obitelji proteina klizeće stezaljke DNA i zbog toga je važan protein u procesu replikacije. Velik broj proteina koji sudjeluju u replikaciji DNA, popravku DNA i kontroli

staničnog ciklusa vežu se za homotrimerni prsten PCNA, umjesto direktno za DNA, što olakšava brzo procesiranje DNA. Ekspresija proteina PCNA prihvaćeni je marker za staničnu proliferaciju. Pronađena je ekspresija PCNA u visokoj koncentraciji tijekom S-faze staničnog ciklusa u jezgrama proliferirajućih stanica te u manjoj koncentraciji tijekom G1-, G2- i M-faze (Klemi i sur. 1992). U istraživanju ekspresije PCNA u nehodgkinskim limfomima, detekcijom PCNA imunohistokemijskom metodom pokazana je korelacija sa proliferativnom aktivnošću nehodgkinskih limfoma (Rabenhorst i sur. 1996). Zbog visoke proliferacijske stope, u stanicama FL-a i DLBCL-a očekuje se visoka razina ekspresije PCNA. S obzirom na to da PCNA, osim uloge u samom procesu replikacije, ima važnu ulogu u pravilnom kopiranju epigenetske informacije nakon završetka replikacije DNA, ali i popravku DNA i kontroli staničnog ciklusa, koja je u proliferirajućim stanicama tumorskog tkiva narušena, to bi moglo biti objašnjenje dobivenih rezultata koji pokazuju višu razinu ekspresije PCNA u netumorskim stanicama tonzila gdje su procesi replikacije i staničnog ciklusa visoko kontrolirani.

Protein EZH2 je katalitička podjedinica kompleksa polikombnog proteina, posreduje transkripcijsku represiju histonskom metiltransferaznom aktivnošću. Ekspresija EZH2 povećana je u stanicama zdravih germinativnih centara, ali je također primjećena njegova uključenost u limfomagenezu. Istraživanja njegovog regulacijskog programa, specifičnog za GC, pokazala je da se među genima pod njegovim enzimskim utjecajem nalazi nekoliko tumorskih supresora ključnih za kontrolu staničnog ciklusa. Sukladno tome, utišavanje EZH2 pomoću siRNA u stanicama DLBCL-a rezultira naglim zastojem staničnog ciklusa na prijelazu G1- u S-fazu i pojačanom ekspresijom gena za tumorske supresore pod njegovim utjecajem. Na razini DNA, promotori koje veže EZH2 su hipometilirani u B-stanicama unutar GC-a, ali mnogi od njih su neprirodno hipermetilirani u DLBCL-u, što ukazuje na poremećaj normalnog epigenetičkog procesiranja u tim stanicama. Prema tome, EZH2 je uključen u regulaciju specifičnog epigenetičkog programa u GC-u, koji podrazumijeva utišavanje antiproliferacijskih gena što ukazuje na njegovu izravnu povezanost s proliferacijom stanica i potencijalni doprinos malignoj transformaciji B-stanica germativnog centra u DLBCL-u. Zbog toga je povećana ekspresija EZH2 koristan marker u detektiranju limfoma s ishodištem u stanicama germinativnog centra (Velichutina 2010). Rezultati ovog istraživanja pokazuju višu razinu ekspresije EZH2 u netumorskim stanicama tonzila u odnosu na tumorske stanice FL-a i DLBCL-a. Kao što je već navedeno, u tonzilama dolazi do čestih

upalnih procesa i pojave imunosnog odgovora, a posljedično i do formiranja GC-a. Protein EZH2 neophodan je za formiranje GC-a, ali i za proliferaciju centroblasta unutar GC-a, što objašnjava njegovu visoku razinu ekspresije u stanicama tonzila.

Usporedba između FL i DLBCL ukazuje na višu razinu ekspresije proteina MCM2, DNMT1, CDT1 i GMNN u tumorskim stanicama DLBCL-a. Kod nehodgkinskih limfoma očekivana je visoka ekspresija replikacijskih regulatora zbog visoke proliferacije i neprestanih dioba stanica. CDT1 je zajedno s MCM2 ključan inicijator replikacije jer sudjeluje u stvaranju predreplikacijskog kompleksa, a pod kontrolom je geminina koji ga stabilizira, onemogućava njegovu razgradnju te sudjeluje u kontroli staničnog ciklusa. DNMT1 je enzim koji osigurava vjernost replikacije na razini metilacije i važan je faktor u kontroli pravilnog kopiranja epigenetičke informacije. Deregulacija DNMT1 povezana je s patogeneozom u različitim tipovima tumora. Dokazana je visoka ekspresija DNMT1 u stanicama DLBCL-a, a u korelaciji je i ekspresija ostalih gena uključenih u kontrolu staničnog ciklusa i replikaciju (Loo i sur. 2018). DLBCL je agresivniji i invazivniji limfom od indolentnog FL-a, s manjom kontrolom staničnog ciklusa i apoptoze stanica te većom proliferacijskom stopom (Lossos i Gascoyne 2011). Veća proliferacija stanica, a zbog toga i potreba za većom količinom proteina neophodnih za proces replikacije, mogla bi objasniti dobivene rezultate koji pokazuju višu ekspresiju proteina MCM2, DNMT1, CDT1 i GMNN u stanicama DLBCL-a.

Usporedba između tumorskih stanica DLBCL s ishodištem u GC i tumorskih stanica DLBCL s ishodištem izvan GC, a to je u većini slučajeva ABC-podtip DLBCL-a, s ishodištem u aktiviranim B-limfocitima, nije pokazala statistički značajne razlike. Kromosomska preslagivanja relevantna za DLBCL usmjerena su na gene *MYC*, *BCL2* i *BCL6* s većom učestalošću u DLBCL s ishodištem izvan GC, što ovaj podtip čini invazivnijim i predviđa mu lošiju prognozu. Protein MYC je transkripcijski faktor koji regulira više od 15 % svih staničnih gena koji promoviraju proliferaciju kroz metaboličke i angiogene mehanizme pa je njegova prekomjerna ekspresija, do koje dolazi rearanžmanima u DLBCL-u, zaslužna za visoku proliferacijsku stopu tumorskih stanica, zajedno s ostalim genetskim promjenama koje se događaju i pogoduju limfomagenezi (Thieblemont i Brière 2013). Ti podaci ukazuju na očekivano višu ekspresiju replikacijskih i regulatornih proteina u stanicama DLBCL-a s ishodištem izvan GC. Unatoč tome, svi podtipovi



DLBCL-a su izrazito heterogeni i podložni različitim genetskim promjenama koje posljedično mogu dovesti i do promjene ekspresije različitih gena u tumorskim stanicama.

Rezultati ovog istraživanja pokazali su razlike u količini proteina koji sudjeluju u replikaciji i kontroli staničnog ciklusa u tumorskim stanicama FL-a, DLBCL-a te netumorskim stanicama tonzila. Iako je istraživanje provedeno na malom broju uzoraka, dobiveni rezultati poklapaju se s rezultatima drugih autora i poznatim činjenicama. Razumijevanje uključenosti navedenih proteina u razvoj limfoma može doprinijeti boljem razumijevanju samog mehanizma nastanka i progresije tih bolesti, ali i pomoći u razvoju specifičnih markera korisnih u njihovom dijagnosticiranju i predviđanju prognoze. Zbog toga je važno i korisno provođenje daljnjih istraživanja na tim proteinima kako bi se još detaljnije upoznale njihove funkcije.

## 6. ZAKLJUČCI

- Tijekom razvoja limfoma mijenja se količina proteina uključenih u regulaciju staničnog ciklusa i replikaciju DNA.
- Usporedba količine netumorskih stanica tonzila i tumorskih stanica folikularnog limfoma i difuznog B-velikostaničnog limfoma, koje ekspimiraju istraživane proteine, pokazala je višu razinu ekspresije proteina MCM2, PCNA i EZH2 u netumorskim stanicama tonzila.
- Usporedba količine tumorskih stanica folikularnog limfoma i difuznog B-velikostaničnog limfoma, koje ekspimiraju istraživane proteine, pokazala je višu razinu ekspresije proteina MCM2, DNMT1, CDT1 i GMNN u tumorskim stanicama difuznog B-velikostaničnog limfoma.
- Usporedba količine tumorskih stanica podtipova difuznog B-velikostaničnog limfoma s ishodištem u germinativnom centru i s ishodištem izvan germinativnog centra nije pokazala statistički značajne razlike.

## 7. LITERATURA

1. Allen C. D., Cyster J. G. 2008. Follicular dendritic cell networks of primary follicles and germinal centers: phenotype and function. *Seminars in immunology*. 20(1), 14-25.
2. Blobel G.A. 2000. CREB-binding protein and p300: molecular integrators of hematopoietic transcription. *Blood*. 95, 745-755.
3. Breitfeld D., Ohl L., Kremmer E., Ellwart J., Sallusto F., Lipp M., Förster R. 2000. Follicular B helper T cells express CXC chemokine receptor 5, localize to B cell follicles, and support immunoglobulin production. *The Journal of experimental medicine*. 192(11), 1545-52.
4. Budhavarapu V.N., Chavez M., Tyler J. K. 2013. How is epigenetic information maintained through DNA replication?. *Epigenetics & chromatin*. 6(1), 32.
5. Cox L.S. 2009. Molecular themes in DNA replication, *RSC, Cambridge*.
6. Cueni L.N., Detmar M. 2008. The lymphatic system in health and disease. *Lymphatic research and biology*. 6(3-4), 109-22.
7. Devault A., Gueydon E., Schwob E. 2008. Interplay between S-cyclin-dependent kinase and Dbf4-dependent kinase in controlling DNA replication through phosphorylation of yeast Mcm4 N-terminal domain. *Molecular biology of the cell*. 19(5), 2267-77.
8. Feederle R., Schepers A. 2017. Antibodies specific for nucleic acid modifications. *RNA biology*. 14(9), 1089-1098.
9. Friedberg J. W., Fisher R. I. 2008. Diffuse large B-cell lymphoma. *Hematology/oncology clinics of North America*. 22(5), 941-52.

10. Galloway J.L., Zon L.I. 2003. Ontogeny of hematopoiesis: examining the emergence of hematopoietic cells in the vertebrate embryo. *Current topics in developmental biology*. 53, 139-58.
11. Gan L., Yang Y., Li Q., Feng Y., Liu T., Guo W. 2018. Epigenetic regulation of cancer progression by EZH2: from biological insights to therapeutic potential. *Biomarker research*. 6, 10.
12. Hans C.P., Weisenburger D.D., Greiner T.C., Gascoyne R.D., Delabie J., Ott G., Müller-Hermelink H.K., Campo E., Braziel R.M., Jaffe E.S., Pan Z., Farinha P., Smith L.M., Falini B., Banham A.H., Rosenwald A., Staudt L.M., Connors J.M., Armitage J.O., Chan W.C. 2004. Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray. *Blood*. 103(1), 275-82.
13. Honjo T., Reth M., Radbruch A., Alt F. 2014. Molecular biology of B cells. 2nd edition. *Academic Press*.
14. Jagannathan-Bogdan M., Zon, L.I. 2013. Hematopoiesis. *Development*. 140(12), 2463-7.
15. Janeway C.A. Jr, Travers P., Walport M., Shlomchik M.J. 2001. Immunobiology: the immune system in health and disease. 5th edition. *New York: Garland Science*.
16. Kerfoot S. M. Yaari G., Patel J. R., Johnson K. L., Gonzalez, D. G., Kleinstein S. H., Haberman A. M. 2011. Germinal center B cell and T follicular helper cell development initiates in the interfollicular zone. *Immunity*. 34(6), 947-60.
17. Klemi P. J. Alanen K., Jalkanen S., Joensuu H. 1992. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) as a prognostic factor in non-Hodgkin's lymphoma. *British journal of cancer*, 66(4), 739-43.

18. Li S., Young K.H., Medeiros L.J. 2018. Diffuse large B-cell lymphoma. *Pathology*. 50(1):74-87.
19. Loo S.K., Ab Hamid S.S., Musa M., Wong K.K. 2018. DNMT1 is associated with cell cycle and DNA replication gene sets in diffuse large B-cell lymphoma. *Pathology Research and Practice*. 214(1),134-143.
20. Lossos I. S., Gascoyne R. D. 2011. Transformation of follicular lymphoma. Best practice & research. *Clinical haematology*, 24(2), 147-63.
21. Luminar, S., Bellei M., Biasoli I., Federico M. 2012. Follicular lymphoma - treatment and prognostic factors. *Revista brasileira de hematologia e hemoterapia*. 34(1), 54-9.
22. MacLennan I.C. 1994. Germinal centers. *Annual Review of Immunology*. 12,117-39.
23. Mak T.W., Jett B. D., Saunders M. E. 2008. Primer to the immune response. *Academic Press*.
24. Ming L., Bik K.T. 2001. Initiating DNA synthesis: from recruiting to activating the MCM complex. *Journal of Cell Science*. 114, 1447-1454.
25. Obermann E.C., Went P., Zimpfer A., Tzankov A., Wild P.J., Stoehr R., Pileri S.A., Dirnhofer S. 2005. Expression of minichromosome maintenance protein 2 as a marker for proliferation and prognosis in diffuse large B-cell lymphoma: a tissue microarray and clinico-pathological analysis. *BMC Cancer*. 5, 162.
26. Orkin S.H., Zon L.I. 2008. Hematopoiesis: an evolving paradigm for stem cell biology. *Cell*. 132, 631-644.
27. Ott G., Rosenwald A. 2008. Molecular pathogenesis of follicular lymphoma. *Haematologica*. 93, 1773-1776.

28. Pasqualucci L., Migliazza A., Basso K., Houldsworth J., Chaganti R.S.K., Dalla-Favera R. 2003. Mutations of the BCL6 proto-oncogene disrupt its negative autoregulation in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*. 101,2914-2923.
29. Rabenhorst S.H., Burini R.C., Schmitt F.C. 1996. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in non-Hodgkin's lymphomas: correlation with working formulation and Kiel classification in formalin-fixed paraffin-embedded material. *Pathology*. 28(1),12-6.
30. Rasko I., Downes C.S. 1995. Genes in Medicine: Molecular biology and human genetic disorders. *Chapman & Hall*.
31. Steinman R.M. 2006. Linking innate to adaptive immunity through dendritic cells. *Novartis Foundation Symposium*. 279,101-9
32. Thieblemont C., Brière J. 2013. MYC, BCL2, BCL6 in DLBCL: impact for clinics in the future?. *Blood*. 121,2165-2166.
33. Vagić D. 2003. Anatomija i imunologija tonzila. *Medix*. 9, 97-100.
34. Yarychkivska O., Tavana O., Gu W., Bestor T.H. 2018. Independent functions of DNMT1 and USP7 at replication foci. *Epigenetics & Chromatin*. 11, 9
35. Velichutina I., Shaknovich R., Geng H., Johnson N. A., Gascoyne R. D., Melnick A. M., Elemento O. 2010. EZH2-mediated epigenetic silencing in germinal center B cells contributes to proliferation and lymphomagenesis. *Blood* 116(24), 5247-55.

## 8. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 19. siječnja 1995. godine u Zagrebu, gdje sam pohađala osnovnu školu Kustošija. 2009. godine upisala sam gimnaziju Lucijana Vranjanina koju sam, kao i osnovnu školu, završila s odličnim uspjehom. U rujnu 2013. godine započela sam svoje visoko obrazovanje na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, gdje sam upisala preddiplomski studij biologije. U rujnu 2016. godine stekla sam zvanje sveučilišnog prvostupnika biologije (univ. bacc. biol.) kada sam završila preddiplomski studij. U rujnu iste godine upisala sam diplomski studij molekularne biologije s ciljem stjecanja zvanja magistra molekularne biologije. Tijekom studiranja sudjelovala sam u terenskim nastavama i vježbama koje su mi omogućile praktičnu primjenu znanja i iskustava usvojenih u teoretskom obliku na fakultetu, kao i stjecanje novih. Aktivno se služim engleskim jezikom, a pasivno poznajem talijanski jezik.