

Replikacija DNA u tkivu zahvaćenom folikularnim limfomom

Bašić Palković, Pamela

Master's thesis / Diplomski rad

2015

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:217:338604>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-17**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Pamela Bašić Palković

Replikacija DNA u tkivu zahvaćenom folikularnim limfomom

DNA replication in follicular lymphoma tissue

Diplomski rad

Zagreb, 2015.

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

Zahvaljujem mentorici doc. dr. sc. Petri Korać na pomoći, savjetima i strpljenju pri izradi ovog rada. Veliko hvala i ostalim djelatnicima Zavoda za molekularnu biologiju, Prirodoslovno-matematičkog fakulteta.

Zahvaljujem i Suzani Hančić, bacc.med.lab.diag. za njeno sudjelovanje.

Zahvaljujem i svim kolegama i kolegicama koje sam upoznala tijekom svog studiranja i koji su doprinijeli tome da to vrijeme smatram najljepšim dijelom svoga života.

Najviše zahvaljujem svojoj obitelji na svemu što su učinili za mene.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

REPLIKACIJA DNA U TKIVU ZAHVAĆENOM FOLIKULARNIM LIMFOMOM

Pamela Bašić Palković

Rooseveltov trg 6
HR-10000 Zagreb, Hrvatska

Folikularni limfom predstavlja B–staničnu neoplazmu građenu od stanica porijeklom iz folikularnih centara (germinativnih centara) limfnog čvora koje ekspimiraju BCL6, CD10 i najčešće BCL2. Translokacija t(14;18)(q32;q21), koja dovodi do pojačane ekspresije antiapoptotskog proteina BCL2, predstavlja karakterističnu genetičku promjenu folikularnog limfoma. Folikularni limfom jedini je limfom koji ima graduse - stupnjeve progresije. Jedan od potencijalnih putova razvoja viših stupnjeva progresije (postoje 3 stupnja) narušeni je proces replikacije i ponovne uspostave kromatina nakon replikacije. Cilj ovog istraživanja bio je analizirati količinu transkripta gena ključnih za proces replikacije i ponovnu uspostavu kromatina u tumorskom i netumorskom dijelu tkiva zahvaćenog folikularnim limfomom. Korišteno je 10 uzoraka limfnih čvorova zahvaćenih folikularnim limfomom gradusa 2 i 3. Tumorski i netumorski dijelovi tkiva zahvaćenog folikularnim limfomom izdvojeni su laserskom mikrodisekcijom, izolirana je RNA i reverznom transkripcijom pripremljena za analizu transkripta gena *DNMT1*, *PCNA*, *MCM2*, *MCM7*, *CDT1*, *EZH2*, *GMNN* i *p300* lančanom reakcijom polimerazom u stvarnom vremenu. Dobiveni rezultati nisu pokazali značajne razlike u ekspresiji analiziranih gena između skupina tumorskog i netumorskog tkiva zahvaćenog folikularnim limfomom.

36 stranica, 10 slika, 5 tablica, 18 literaturna navoda, jezik izvornika: hrvatski

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici.

Ključne riječi: limfni čvor, *DNMT1*, *PCNA*, *MCM2*, laserska mikrodisekcija, Q–RTPCR

Voditelj: dr.sc. Petra Korać, doc.

Ocjenitelji:

Rad prihvaćen:

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Division of Biology

Master Thesis

DNA REPLICATION IN FOLLICULAR LYMPHOMA TISSUE

Pamela Bašić Palković

Roosevelt sq. 6
HR-10000 Zagreb, Croatia

Follicular lymphoma is a B–cell neoplasm composed of cells originating from follicular centres (germinal centres) of lymph node that express BCL6, CD10 and, usually, BCL2. The translocation t(14;18)(q32;q21), which leads to enhanced expression of antiapoptotic BCL2 protein, is the characteristic type of genetic alteration in follicular lymphoma. Follicular lymphoma is the only lymphoma that has grades - stages of progression. One of the potential developmental pathways of higher stages of progression (there are 3 stages) might include the process of replication and the reassembly of chromatin structure after replication. Aim of this research was to analyze the transcript levels of genes which are important for the process of replication and the re–establishment of chromatin in tumor and non–tumor part of tissue affected with the neoplasm. Ten samples of lymph nodes with follicular lymphoma grade 2 and 3 were used. Tumor and non–tumor part of the tissue were selected and gathered using laser–microdissection technology, RNA was isolated and reversely transcribed into cDNA for QPCR analysis of *DNMT1*, *PCNA*, *MCM2*, *MCM7*, *CDT1*, *EZH2*, *GMNN* and *p300* transcripts. The results showed no significant differences in the expression of the analyzed genes between groups of tumor and, surrounding, non–tumor tissue of affected lymph nodes.

36 pages, 10 figures, 5 tables, 18 references, original in: Croatian

Thesis deposited in the Central Biological Library.

Key words: lymph node, DNMT1, PCNA, MCM2, laser–microdissection technology, Q–RTPCR

Supervisor: dr.sc. Petra Korać, Asst. Prof.

Reviewers:

Thesis accepted:

Popis kratica

APC- antigen prezentirajuće stanice, od eng. *antigen presenting cells*

DC- dendritičke stanice, od eng. *dendritic cells*

DLBCL- difuzni B-velikostanični limfom, od eng. *diffuse large B-cell lymphoma*

FDC- folikularne dendritičke stanice, od eng. *follicular dendritic cells*

FL- folikularni limfom, od eng. *follicular lymphoma*

GC- germinativni centar, od eng. *germinal center*

ne-Hodgkinov limfom, NHL, od eng. *non-Hodgkin's lymphoma*

T-stanični receptor, TCR, od eng. *T-cell receptor*

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Limfni sustav.....	1
1.2. Razvoj i progresija B–staničnih limfoma	3
1.3. Folikularni limfom.....	4
1.4. Replikacija DNA.....	6
2. HIPOTEZA I CILJEVI ISTRAŽIVANJA	11
3. MATERIJALI I METODE	12
3.1. Materijali.....	12
3.2. Metode.....	12
3.2.1. Priprema uzoraka za lasersku mikrodisekciju.....	12
3.2.2. Laserska mikrodisekcija.....	13
3.2.3. Izolacija RNA.....	14
3.2.4. Reverzna transkripcija.....	15
3.2.5. Lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu.....	15
3.2.6. Statistička analiza.....	17
4. REZULTATI	18
4.1. Laserska mikrodisekcija.....	18
4.2. Izolacija RNA i reverzna transkripcija.....	19
4.3. Lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu.....	20
5. RASPRAVA	23
6. ZAKLJUČAK	26
7. LITERATURA	27
8. ŽIVOTOPIS	29

1. UVOD

1.1. Limfni sustav

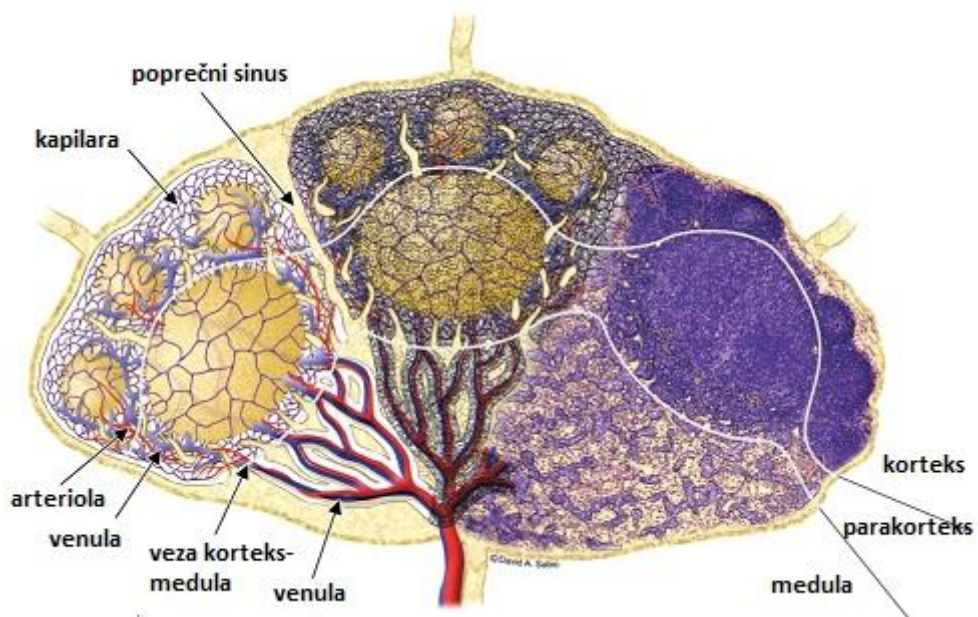
Limfni sustav je dio imunološkog sustava ljudskog organizma. Čine ga limfne žile, limfni čvorovi i limfni organi koji se većinom sastoje od limfnog tkiva. Primarni limfni organi su timus i koštana srž, a sekundarni su slezena i limfni čvorovi. U limfni sustav se također ubrajaju i nakupine limfnog tkiva koje se formiraju u sluznici probavnog i dišnog sustava. Sekundarna limfna tkiva, posebno limfni čvorovi i tonzile, imaju ključnu ulogu u sazrijevanju i diferencijaciji B–limfocita (Guyton, 2006).

Limfni čvorovi su organizirane nakupine limfnog tkiva. Mogu biti ovalnog, okruglog, graholikog ili bubrežastog oblika. Male su strukture promjera od nekoliko milimetara do više od centrimetra, smještene duž limfnih žila. Nalaze se u abdomenu, pazusima, preponama i vratu gdje su prisutni u najvećem broju. Limfni čvorovi imaju ulogu biološkog filtra limfe. Osim te uloge značajni su u obrani organizma od infekcija i drugih supstanci stranih organizmu (Wittlinger, 2004).

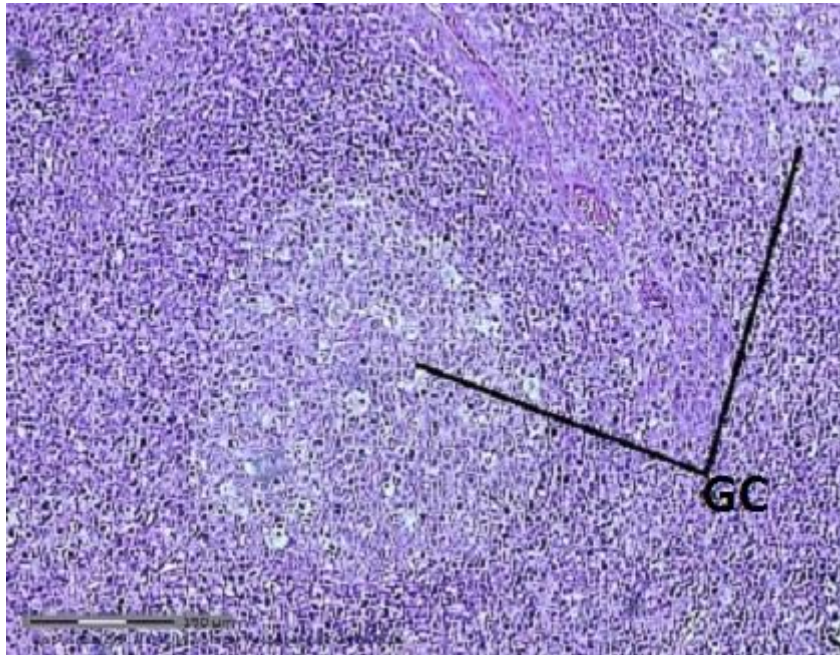
Limfni čvorovi sastoje se od korteksa, parakorteksa i medule. Korteks čine sekundarni limfni čvorići i difuzno limfno tkivo koje sadrži B–limfocite. Parakorteks čini difuzno limfno tkivo koje sadrži T–limfocite. Medula se neposredno nastavlja na parakorteks u obliku razgranatih i međusobno povezanih medularnih tračaka. Medulu čini difuzno limfno tkivo koje sadrži B–limfocite (Slika 1). Osim B– i T–limfocita, u limfnim čvorovima prisutne su druge stanice od kojih možda najznačajniju ulogu imaju antigen prezentirajuće stanice (APC od eng. *antigen presenting cells*). Kod upala, antigen prezentirajuće stanice stupaju u interakciju s B– ili T–limfocitima, te izlažući strani antigen induciraju primarni imuni odgovor. Nastali reaktivni limfociti prolaze klonalnu ekspanziju, proizvode nove limfocite i plazma stanice koje počinju stvarati antitijela. Reaktivni B–limfociti rastu unutar primarnog folikula formirajući karakteristične germinativne centre (GC od eng. *germinal center*) i prerastaju u sekundarne folikule (Slika 2). Germinativni centri sekundarnih folikula sadrže dva tipa stanica: tamnije centroblaste i svjetlije centrocite. Reaktivni T–limfociti nalaze se unutar parakorteksa, ali ne formiraju strukture analogne germinativnim centrima. Antigen prezentirajuće stanice koje predstavljaju antigen B–stanicama nazivaju se folikularne dendritičke stanice (FDC, od eng. *follicular dendritic cells*). Folikularne dendritičke stanice jasno se razlikuju od dendritičkih

stanica koje predstavljaju antigen T–stanicama. Porijeklo FDC nije još u potpunosti poznato. Pretpostavlja se da se mogu razviti *in situ* od prethodno postojećih retikularnih stanica, ali i da mogu biti i hematopoetskog porijekla (Willard-Mack, 2006).

Fukcije limfnih čvorova su : filtriranje limfe fagocitozom stranih stanica i njihovih fragmenata (zadržavanje malignih stanica koje metastaziraju), bakterija, virusa, egzogenih pigmenata, toksina i antigena ; diferencijacija B–limfocita i proizvodnja antitijela ; recirkulacija limfocita sa smještanjem B–limfocita i T–limfocita u određene zone (Šamija i sur. ,2006).



Slika 1. Građa limfnog čvora (preuzeto iz Willard-Mack, 2006).

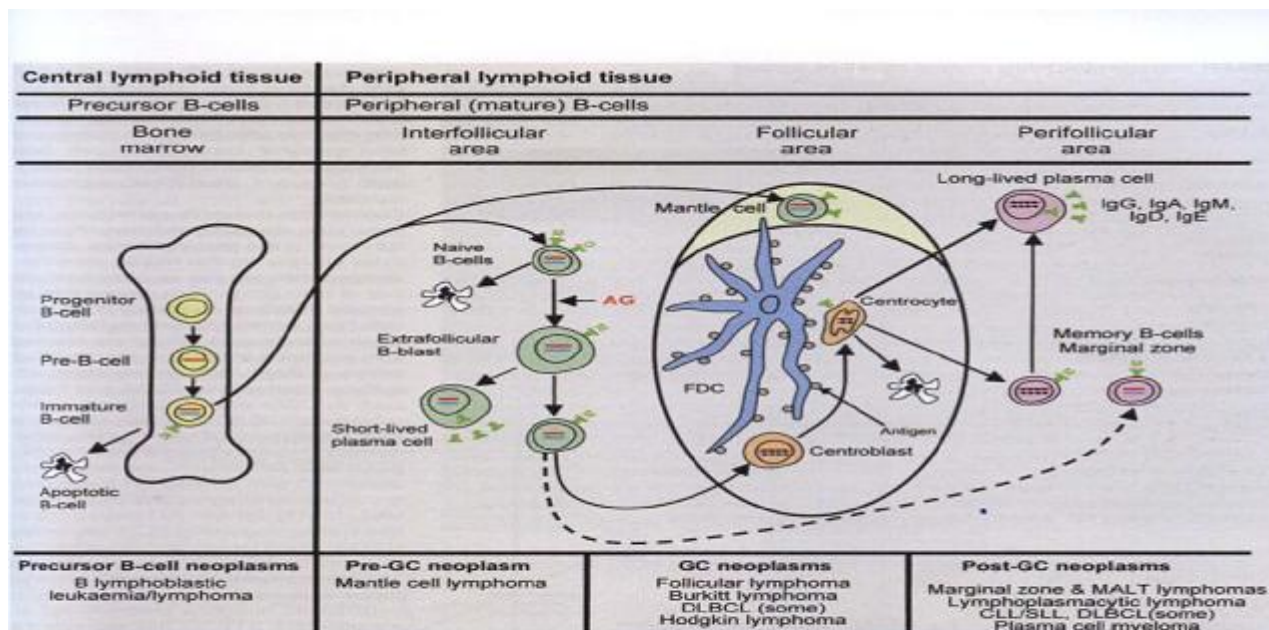


Slika 2. Sekundarni folikul limfnog čvora s germinativnim centrima (GC).

1.2. Razvoj i progresija B–staničnih limfoma

Uzrok nastanka većine limfoma je nepoznat. Neposredni događaji koji promijene normalnu stanicu u malignu nisu još u potpunosti jasni, ali se zna da su promjene gena uključenih u stanični rast, razvoj i smrt stanice odgovorni za taj proces. U stanicama normalno postoji ravnoteža između rasta i smrti. Promjene gena koji reguliraju te procese dovode do gubitka nadzora nad staničnom diobom te dolazi do nekontroliranog umnažanja biološki promijenjenih stanica. Svaka promjena na genima ne uzrokuje odmah nastanak tumora. To je višestupanjski proces, a smatra se da je za nastanak tumora potrebno 6-7 takvih neovisnih događaja (Šamija i sur., 2006).

Limfomi se dijele u dvije glavne skupine: Hodgkinov i ne–Hodgkinov limfom. Ne–Hodgkinovi limfomi mogu nastati iz T– ili B–stanica. Većina NHL-a (ne–Hodgkinov limfom, od eng. *non–Hodgkin's lymphoma*) su B–limfomi (80-85%)(Slika 3) (Willard-Mack, 2006).



Slika 3. Diferencijacije B–stanica i nastanak B–neoplazmi (preuzeto iz Swerdlow i sur. , 2008).

Kod ne–Hodgkinovog limfoma postoje dvije osnovne skupine međusobno različite po znakovima i simptomima, tijekom bolesti i odgovoru na liječenje. Jedna skupina su indolentni limfomi koje karakterizira niski stupanj malignosti, sporiji rast i napredovanje zbog čega bolesnik simptome primjećuje obično kad je bolest već uznapredovala. Od indolentnih limfoma najčešći je folikularni limfoma (FL, od eng. *follicular lymphoma*). Drugu skupinu predstavljaju agresivni limfomi s visokim stupnjem malignosti koji brzo napreduju pa ako se ne liječe brzo završavaju smrtnim ishodom (Grossbard, 2002).

1.3. Folikularni limfom

Folikularni limfom jedan je od limfoma koji nastaju iz razvojnih stadija B–limfocita germinativnog centra, a predstavlja neoplazmu građenu od mješavine malih i velikih stanica (centrocita i centrioblasta), nasumično raspoređenih, odnosno stanica germinativnog centra folikula koje

ekspimiraju biljege BCL6 i CD10, u gotovo svim slučajevima BCL2, ali najčešće ne ekspimiraju CD5 i CD3 (Swerdlow et al. , 2008).

Folikularni limfom čini 20%-30% svih limfoma s najvećom incidencijom u SAD-u i Zapadnoj Europi. U Istočnoj Europi, Aziji i zemljama u razvoju učestalost pojave folikularnog limfoma znatno je niža. Javlja se u starijoj životnoj dobi, a češće obolijevaju muškarci (Swerdlow et al. , 2008).

Folikularni limfom pretežno zahvaća limfne čvorove, ali može zahvatiti i slezenu, koštanu srž, perifernu krv. Primarno može zahvatiti ekстранodalna mjesta, uključujući kožu, gastrointestinalni trakt, osobito dvanaesnik, dojke i testise (Swerdlow et al. , 2008).

Folikularni limfom je limfom koji ima graduse, tj. stupnjeve progresije. Postoje tri stupnja - prva dva spadaju u indolentne, a treći u agresivne limfome. Gradus (stupanj) se određuje metodom brojanja velikih transformiranih stanica - centroblasta. Gradus 3 dalje se može podijeliti prema udjelu centrocita u uzorku. U gradusu 3A prisutnost centrocita se još može uočiti što nije moguće u gradusu 3B gdje u cjelosti prevladavaju velike stanice, centroblasti. U trenutku postavljanja dijagnoze, kod većine pacijenata dijagnosticira se folikularni limfom gradusa 1 ili 2, a kod manjeg broja pacijenata folikularni limfom gradusa 3, pri čemu se vrlo rijetko pojavljuje 3B. Kako nastaje koji gradus još uvijek nije u potpunosti poznato. Kod folikularnog limfoma gradusa 1 ili 2 protein BCL2 ekspimiran je u oko 85-90% slučajeva, dok je u folikularnom limfomu gradusa 3 ekspimiran u oko 50% slučajeva. U uznapredovalom stadiju, najčešće je utvrđen gradus 3B kod kojeg može izostati ekspresija CD10. Kod 25-35% pacijenata folikularni limfom ima sposobnost transformacije u agresivniji oblik limfoma, najčešće u difuzni B-velikostanični limfom (DLBCL, od eng. *diffuse large B-cell lymphoma*), što ima za posljedicu brzu progresiju bolesti i smrtni ishod. Ova transformacija uključuje dodatne genetičke abnormalnosti poput inaktivacije TP53 i p16 i aktivacije/translokacije gena *MYC* (Swerdlow et al. , 2008).

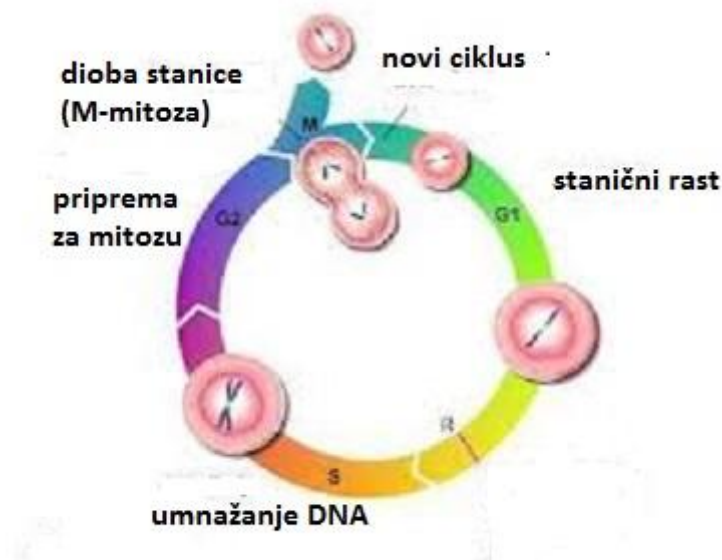
Genetički mehanizmi koji uzrokuju abnormalnu funkciju gena uključuju kromosomske translokacije, amplifikacije gena, somatsku mutaciju i deleciju gena. Kromosomske translokacije najčešće nastaju aberantnim rearanžmanom imunoglobulinskog gena (Ig) što dovodi do nepravilne ekspresije gena na recipročnim mjestima loma koji reguliraju različite stanične funkcije uključujući regulaciju transkripcije gena, stanični ciklus, apoptozu i tumorsku progresiju. Translokacija

t(14;18)(q32;q21), koja dovodi do pojačane ekspresije antiapoptotskog proteina BCL2, smatra se ishodišnom promjenom nastanka folikularnog limfoma (Lasan Trčić i sur. , 2013).

Osim gena uključenih u regulaciju staničnog ciklusa, važnu ulogu u nakupljanju mutacija i nastanku folikularnog limfoma imaju i oni geni koji kodiraju proteine uključene u proces replikacije i ponovne uspostave kromatina (Cox, 2009).

1.4.Replikacija DNA

Replikacija DNA je proces koji prethodi svakoj staničnoj diobi, a događa se samo jednom po staničnom ciklusu, u S fazi interfaze staničnog ciklusa. S faza i mitoza odvojene su G1 i G2 fazama, a svaka faza staničnog ciklusa regulirana je djelovanjem kinaza (enzima koji fosforiliraju proteine), fosfataza (enzima koji uklanjaju fosfatne skupine iz proteina) i proteaza (enzima koji degradiraju proteine) (Slika 4) (Cox, 2009).



Slika 4. Shematski prikaz staničnog ciklusa.

Replikacija DNA je evolucijski očuvan proces koji se događa u prokariotskim i eukariotskim stanicama. Vrijeme trajanja ovog procesa varira od vrste do vrste, može trajati od nekoliko minuta do nekoliko sati. Bazira se na građi DNA koju čine dva međusobno komplementarna i antiparalelna lanca. Razdvajanjem dvaju roditeljskih lanaca (koji služe kao kalupi) i sintezom dvaju novih, komplementarnih lanaca nastaju dvije kopije molekule DNA, od kojih svaka sadrži po jedan lanac roditeljske DNA (Cooper, 2004).

Za replikaciju DNA važno je postojanje prereplikacijskog kompleksa (pre-RC) kojeg čine ORC (od eng. *origin recognition complex*), CDC6 (od eng. *cell division cycle 6*), CDT1 (od eng. *Cdc10-dependent transcript 1*) i MCM2-7 (od eng. *mini-chromosome maintenance complex2-7*). Do početka S faze staničnog ciklusa prereplikacijski inicijacijski kompleks je u inaktivnom stanju djelovanjem određenih molekula poput geminina kao inhibitora CDT1. Geminin se stvara u S, G2 i M fazi, a razgrađuje se u kasnoj M i G1 fazi staničnog ciklusa. Razgradnjom geminina CDT1 postaje slobodan za označavanje ishodišta replikacije. Osim MCM2-7 kompleksa, u proces replikacije uključeni su i kompleks primaze/polimeraze α , protein RPA koji veže jednolančanu DNA (od eng. *replication protein A*), protein RFC (od eng. *replication factor C*), PCNA (od eng. *proliferating cell nuclear antigen*) i odgovarajuće DNA polimeraze. Ovi kompleksi zajedno čine eukariotski replikosom koji se aktivira ulaskom u S fazu staničnog ciklusa. Poznato je da DNA stvara kompleks s histonima i drugim proteinima. Prije replikacije nukleosomi i drugi proteini se moraju ukloniti, ali se oni nakon završene replikacije vraćaju na stari i moraju se na isti način vezati i na novonastali lanac (Cox, 2009).

Replikacija DNA započinje na određenom mjestu u strukturi DNA koje se naziva ishodište replikacije i označava se s *ori* (od eng. *origin*). Eukariotski ih kromosomi mogu imati više tisuća. Molekula DNA ili dio te molekule, koji se replicira iz određenog ishodišta, naziva se *replikon*. Ishodište replikacije prepoznaje se po prisutnosti konsenzus sekvence i po vezanju inicijatorskih proteina (IP, od eng. *Initiator Proteins*), koji odmataju DNA i regrutiraju dodatne proteine. Aktivacija ishodišta replikacije započinje s vezanjem IP na specifičnu sekvencu što uzrokuje odmatanje DNA koja dovodi do formiranja stabilnog prereplikacijskog kompleksa (pre-RC) i sastavljanja multienzimskog kompleksa koji je neophodan za replikaciju DNA (Cox, 2009).

Prije udvostručavanja DNA, djelovanjem enzima topoizomeraza i helikaza odmotava se dvostruka zavojnica. Glavna replikativna helikaza je heksamerni kompleks MCM2-7, odgovoran za nastanak

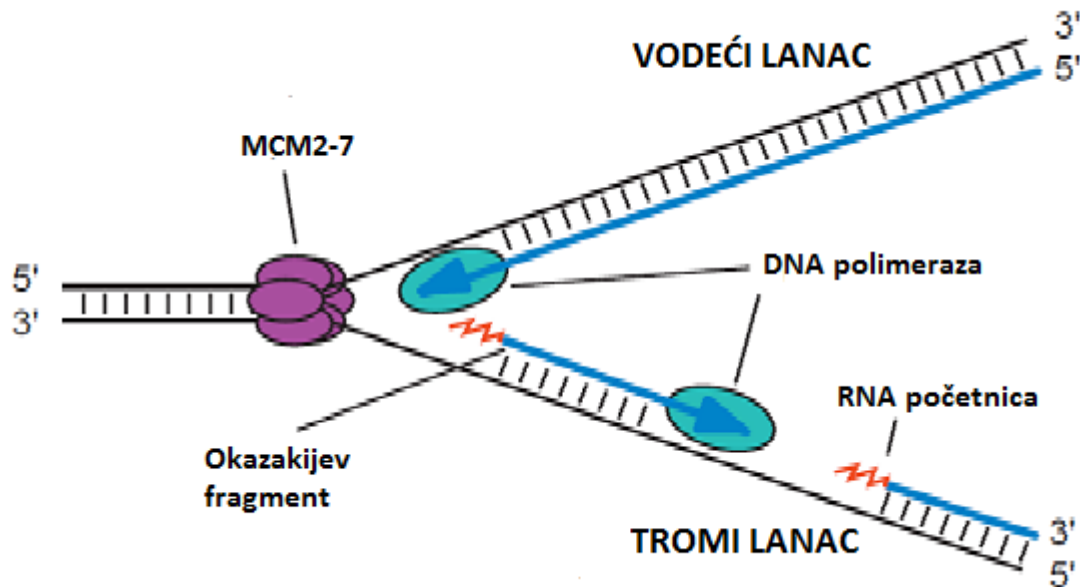
replikacijskih rašlji. Kompleks MCM2–7 veže se na DNA tijekom M i G1 faze staničnog ciklusa označavajući mjesta ishodišta replikacije. Aktivacija ovog kompleksa događa se u S fazi staničnog ciklusa u trenutku inicijacije mjesta ishodišta replikacije, djelovanjem ciklina i kinaza ovisnih o ciklinu S faze. Nakon inicijacije replikacije, kompleks MCM2–7 napušta ishodište replikacije i kreće se po DNA u smjeru nastajanja vodećeg lanca (Cox, 2009).

Replikacija je obično dvosmjerna, tj. od ishodišta replikacije u suprotnim smjerovima kreću dvije replikacijske rašlje (područje sinteze DNA). U replikacijskim se rašljama jedan lanac DNA (vodeći lanac) sintetizira kontinuirano u smjeru kretanja rašlji (od 5'–kraja prema 3'–kraju) pomoću enzima DNA polimeraze, koji katalizira polimerizaciju nukleotida prema načelu komplementarnog sparivanja baza. Drugi lanac DNA (tromi lanac) replicira se diskontinuirano i suprotno od kretanja replikacijskih rašlji. Najprije nastaju kratki ulomci DNA, Okazakijevi fragmenti, koji se sintetiziraju unatrag s obzirom na smjer kretanja replikacijskih rašlji. Sinteza svakoga fragmenta započinje sintezom početnice (kratki ulomak RNA) i nastavlja se djelovanjem DNA polimeraza (Slika 5). Početnice se potom uklanjaju pomoću enzima nukleaza i polimeraza, a Okazakijevi se fragmenti djelovanjem enzima DNA ligaze spajaju (Cooper, 2004).

Tijekom elongacije replikacijskih rašlji važnu ulogu ima PCNA koji stvara prsten kojim veže DNA polimerazu ϵ (vodeći lanac), odnosno DNA polimerazu δ (tromi lanac) na DNA kalup, a ima i ulogu platforme za enzime koji dodaju modifikacije na novonastale lance (Cox, 2009).

Susret dvije replikacijske rašlje iz suprotnih smjerova označava terminaciju replikacije, iako na određenim dijelovima sekvence mogu postojati tzv. replikacijske barijere, koje onda predstavljaju mjesto terminacije. Terminacijom replikacije MCM2–7 kompleks se uklanja s DNA i ne veže se do sljedeće mitoze (Cox, 2009).

Pogreške nastale ugradnjom nepravilnih nukleotida u DNA tijekom replikacije odmah se popravljaju djelovanjem DNA polimeraza. One pogreške koje nastanu naknadno (npr. zračenjem ili kemijskim reakcijama), također se mogu popraviti složenim enzimskim mehanizmima, u kojima završne korake kataliziraju DNA polimeraze i DNA ligaze. Popravkom DNA osigurava se precizno prenošenje genetičke informacije (Cooper, 2004).



Slika 5. Replikacija DNA (preuzeto iz Cooper, 2004).

Poznato je da replikaciju DNA prati epigenetičko označavanje (metilacija DNA, depozicija novih histona i njihovo označavanje) pa PCNA predstavlja vezu između replikacije DNA i epigenetičkog označavanja i nasljeđivanja (Allis et al., 2007).

U eukariota, proces uključuje kopiranje epigenetičke informacije u pogledu kemijskih modifikacija DNA i kromatina, a u kojem sudjeluju enzimi poput DNMT1 (od eng. *DNA methyltransferase 1*), HDAC (od eng. *histone deacetylase*), HAT (od eng. *histone acetyltransferase*) i drugi. DNMT1 je metiltransferaza koja održava uzorak metilacije DNA. Replikacijom DNA, visokim afinitetom DNMT1 za hemimetiliranu DNA te povezanosti DNMT1 s replikacijskom rašljom pomoću PCNA omogućava se pouzdano nasljeđivanje metilacijskog uzorka. Održavanje metilacijskog uzorka ključno je za kromosomsku stabilnost te mutacije u DNMT1 imaju za posljedicu prekid normalne diferencijacije stanica i potencijalno razvoj stanica s abnormalnim epigenetičkim programom kojim mogu postići potencijal za klonalnu ekspanziju (Shaknovich et al., 2013).

Važnu ulogu u epigenetičkoj regulaciji ima histonska transferaza acetila (HAT) koja acetilira lizin histona H3 i H4, odnosno protein p300 koji djeluje kao transkripcijski koaktivator i sudjeluje u aktivaciji transkripcije gena. Također, važnu ulogu u epigenetičkoj regulaciji ima i EZH2 (od eng. *enhancer of zeste homolog 2*). EZH2 je metiltransferaza koja trimetilira 27. lizin histona H3 što predstavlja epigenetičku oznaku represije transkripcije gena. Narušavanje normalne funkcije ovih enzima ima za posljedicu nastanak i razvoj tumorskih stanica (Allis et al., 2007).

2. HIPOTEZA I CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Hipoteza ovog istraživanja je da narušavanjem procesa replikacije promjenom količine ključnih proteina koji je vode, dolazi do nakupljanja pogrešaka koje omogućavaju nastanak, adaptaciju na postojeći mikrookoliš i progresiju neoplazmi.

Opći cilj ovog istraživanja bio je analizirati količinu transkripta gena ključnih za proces replikacije i ponovnu uspostavu kromatina u tumorskom i netumorskom dijelu limfnih čvorova zahvaćenih folikularnim limfomom.

Specifični ciljevi bili su:

- izdvojiti tumorske i netumorske dijelove limfnih čvorova zahvaćenih folikularnim limfomom,
- izolirati RNA iz svih uzoraka,
- napraviti reverznu transkripciju izoliranih RNA,
- odrediti razine ekspresije gena *DNMT1*, *PCNA*, *MCM2*, *MCM7*, *CDT1*, *EZH2*, *GMNN* i *p300* lančanom reakcijom polimerazom u stvarnom vremenu,
- usporediti količine transkripata istraživanih gena u tumorskim i netumorskim dijelovima tkiva zahvaćenog folikularnim limfomom.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

Ovo istraživanje uključivalo je 10 uzoraka limfnih čvorova zahvaćenih folikularnim limfomom, od kojih je 7 uzoraka bilo od pacijenata s dijagnozom folikularnog limfoma gradusa 2, dok su preostali uzorci bili od pacijenata s dijagnozom folikularnog limfoma gradusa 3. U istraživanje je bilo uključeno 5 žena i 5 muškaraca, dobi između 44 i 78 godina. Korišteni su prerezi smrznutog tkiva obojeni hemalaunom i eozinom. Uzorci su dobiveni iz Kliničkog zavoda za patologiju i citologiju KB Merkur u Zagrebu, te je njihovo korištenje u istraživačke svrhe odobreno od strane nadležnog etičkog povjerenstva bolnice u sklopu većeg projekta.

3.2. Metode

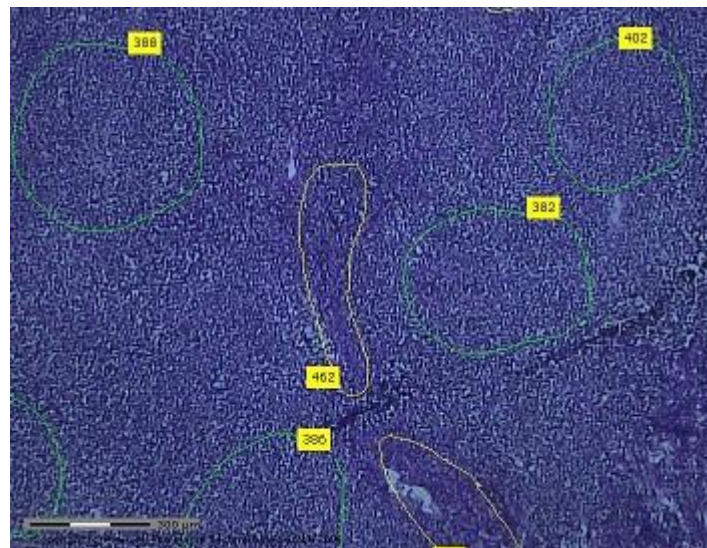
3.2.1. Priprema uzoraka za lasersku mikrodisekciju

Membrane za lasersku mikrodisekciju (PEN MembraneSlides, 1 mm, Carl Zeiss, Njemačka) su 4 sata inkubirane na 180°C kako bi se inaktivirale RNaze te su 30 min bile izložene UV zračenju kako bi polimer postao adhezivniji.

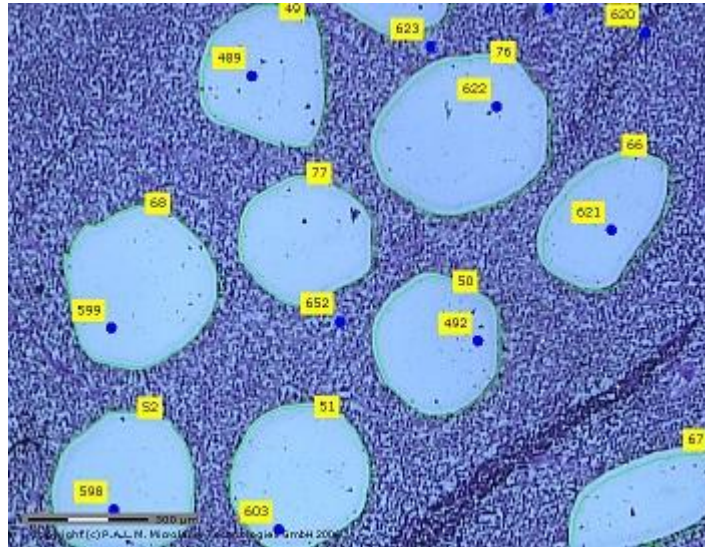
Prerezi smrznutog tkiva prebačeni su na membrane i nakon fiksacije u 70%-tnom etanolu obojeni hemalaunom i eozinom. To je klasični način pripreme preparata za analizu tkivnih struktura. Hemalaun plavo boji jezgru, a eozin crveno boji citoplazmu. Bojenje hemalaunom i eozinom napravljeno je prema standardnom protokolu tako da su membrane sa uzorcima prvo stavljene u hladnu vodu očišćenu od RNaza na 2 minute, potom su uronjene u hematoksilin na 2 min, opet su isprane u vodi, pa uronjene u eozin na 10 sekundi i na kraju ponovno isprane u vodi. Uzorci su nakon toga dehidrirani provođenjem kroz seriju otopina etanola rastuće koncentracije (70%, 85%, 100%). Nakon sušenja uzorci su pohranjeni na -80 °C.

3.2.2. Laserska mikrodisekcija

Laserska mikrodisekcija je postupak izolacije specifičnih dijelova tkiva ili stanica od interesa. Korišten je laserski mikrodisektor PALM Microbeam s programom PALM RoboSoftware i LMPC tehnologijom (Carl Zeiss , Njemačka). Uzorci se analiziraju pod mikroskopom te se tkiva/stanice od interesa obilježavaju (Slika 6). Nakon toga se epruvetice s adhezivnim čepom (AdhesiveCap opaque 500 µl, Carl Zeiss Microscopy, Njemačka) namještaju točno iznad uzorka. Obilježeni dijelovi uzorka se režu i skupljaju u adhezivni čep epruvetice katapultiranjem UV laserskim pulsom (Slika 7).



Slika 6. Prikaz obilježenog tkivnog prereza
folikularnog limfoma.



Slika 7. Prikaz tkivnog prereza folikularnog limfoma nakon sakupljanja obilježenih dijelova.

U ovom istraživanju postupkom laserske mikrodisekcije izdvojeni su tumorski i netumorski dijelovi uzoraka limfnih čvorova zahvaćenih folikularnim limfomom.

3.2.3. Izolacija RNA

Prema protokolu dobivenom u setu kemikalija za izolaciju RNA (QIAGEN RNeasy Micro, Qiagen, Njemačka) prilagođenom izolaciji RNA iz malih količina materijala, iz svih prikupljenih uzoraka izolirana je RNA te je izmjerena njena koncentracija pomoću uređaja NanoVue (GE Healthcare Life Sciences, SAD).

3.2.4. Reverzna transkripcija

Reverzna transkripcija prilagođena malim količinama materijala odnosno uzorcima dobivenim laserskom mikrodisekcijom izvedena je prema standardnom protokolu tako da su pripremljene dvije reakcijske smjese.

Omjer komponenti za prvu reakcijsku smjesu za 1 uzorak bio je 1 μ l nasumičnih heksamera (Random hexameres, TaKaRa, Japan), 1 μ l 10 mM dNTP (TaKaRa) i 8 μ l RNA. Prva reakcijska smjesa stavljena je 5 min na 65°C, nakon čega su epruvete s uzorcima stavljene na led 5 min.

Omjer komponenti za drugu reakcijsku smjesu za 1 uzorak bio je 0,5 μ l reverzne transkriptaze (PrimeScript Rtase, TaKaRa), 0,5 μ l inhibitora Rnaza (Recombinant RNase Inhibitor, TaKaRa), 4 μ l pufera (5x PrimeScript Buffer, TaKaRa) i 5 μ l vode očišćene od RNaza.

U svaku epruvetu s drugom reakcijskom smjesom dodano je 10 μ l prve reakcijske smjese. Uzorci se stavljeni 60 min na 42°C, a zatim 15 min na 70°C.

Postupkom reverzne transkripcije izolirana RNA prevedena je u cDNA. Dobivena cDNA pohranjena je na -20°C.

3.2.5. Lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu

Lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu (RT-QPCR, od eng. *real-time quantitative polymerase chain reaction*) je metoda koja se temelji na mjerenju fluorescencije koja je direktno proporcionalna količini umnoženog produkta u reakciji. Uređaj prati reakciju umnažanja te kada ona dosegne svoju eksponencijalnu fazu, uređaj zabilježi vrijednost ciklusa ili CT (od eng. *Cycle Threshold*). Na osnovi toga može se zaključiti da je ekspresija određenog gena viša ili da je veća koncentracija cDNA onog gena čija reakcija ranije dosegne eksponencijalnu fazu. Vrijednost CT zatim se koristi kako bi se kvantificirala ekspresija ispitivanih gena.

U ovom istraživanju, pomoću lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu, napravljena je relativna kvantifikacija transkripata gena *DNMT1*, *PCNA*, *MCM2*, *MCM7*, *CDT1*, *EZH2*, *GMNN* i *p300* svih tumorskih (TT) i netumorskih (NT) dijelova 10 uzoraka tkiva zahvaćenog folikularnim limfomom. Za svaki uzorak napravljene su dvije tehničke replike. Za endogenu kontrolu odabran je održavajući gen *TBP* (od eng. *TATA-binding protein*) jer relativna kvantifikacija zahtjeva simultano mjerenje ekspresije održavajućeg ili kontrolnog gena da bi se normalizirala vrijednost ekspresije ispitivanih gena. Pomoću dobivene vrijednosti CT gena *TBP* i vrijednosti CT gena od interesa određena je vrijednost Δ CT gena od interesa u svim uzorcima, u tumorskim i netumorskim dijelovima tkiva zahvaćenog folikularnim limfomom. Vrijednost $\Delta\Delta$ CT određena je na temelju dobivenih vrijednosti Δ CT gena od interesa čime je određen odnos između skupina tumorskih i netumorskih dijelova tkiva. Potom je pomoću vrijednosti $\Delta\Delta$ CT izračunat faktor promjene ekspresije gena (od eng. *fold change*), odnosno koliko je puta različita razina ekspresije gena od interesa između skupina.

Za svaku probu napravljena je i negativna kontrola (NTC od eng. *no template control*) kako bi se mogla pratiti pouzdanost metode. Korištene su hibridizirajuće probe (TaqMan Probes, Applied Biosystems, California, USA) (tablica 1).

Tablica 1. TaqMan probe.

DNMT1 HS00945875_M1
PCNA HS 00696862_M1
MCM2 HS 01091564_M 1
MCM7 HS 00428518_M 1
geminin HS 04276835_M 1
CDT1 HS00368864_M1
EZH2 HS00544833_M1
p300 HS 00914223_M1
TBP HS 00427620_M1

PCR reakcija je napravljena prema standardnom protokolu tako da je pripremljena prva reakcijska smjesa. Omjer komponenti za prvu reakcijsku smjesu za 1 uzorak bio je 10 μ l reakcijske smjese s polimerazom (TaqMan Gene Expression MasterMix, Applied Biosystems), 1 μ l specifičnih početnica i proba (TaqMan, Applied Biosystems) i 8 μ l vode. Po 19 μ l prve reakcijske smjese dodano je u pločice s 96 jažica. U određene jažice dodano je po 1 μ l cDNA, tj. po 1 μ l vode u jažice koje predstavljaju negativnu kontrolu. Ekspresija istraživanih gena analizirana je na uređaju Applied Biosystems 7500 Fast Real-time PCR, a uvjeti reakcije bili su 50°C 2 min, 95°C 10 min, 95°C 15 sec i 60°C 1 min na kraju.

3.2.6. Statistička analiza

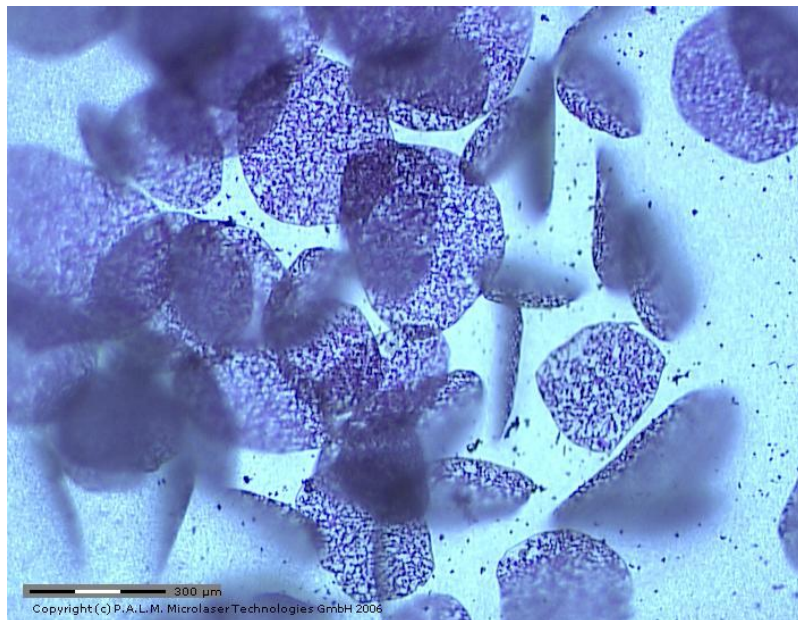
Za statističku analizu korišten je informatički program SPSS Statistics 17 (SPSS Inc., SAD).

Za usporedbu razine ekspresije istraživanih gena između tumorskog i netumorskog dijela tkiva zahvaćenog folikularnim limfomom korišten je neparametrijski Mann-Whitney U test. Statistički značajnom smatrala se vrijednost manja od 0,05.

4. REZULTATI

4.1. Laserska mikrodisekcija

Tijekom laserske mikrodisekcije na većini uzoraka bili su jasno vidljivi tumorski i netumorski dijelovi limfnog čvora (Slike 8 i 9). Ovisno o gradusu bilo je moguće jasno uočiti folikule te primjetiti veliku zastupljenost tumorskog tkiva u odnosu na male netumorske dijelove. Uspješno je sakupljeno po svakom uzorku dovoljno materijala za daljni tijek istraživanja.



Slika 8. Prikaz tumorskih dijelova tkivnog prereza folikularnog limfoma izdvojenih laserskom mikrodisekcijom.



Slika 9. Prikaz netumorskih dijelova tkivnog prereza folikularnog limfoma izdvojenih laserskom mikrodisekcijom.

4.2. Izolacija RNA i reverzna transkripcija

Iz dobivenih uzoraka nakon laserske mikrodisekcije izolirana je RNA, a potom je napravljena reverzna transkripcija. Preostali dio uzorka iskorišten je za spektrofotometrijsko mjerenje koncentracije RNA. Svaki uzorak mjeren je dvaput te je određena njegova srednja vrijednost (tablica 2).

Tablica 2. Srednja vrijednost konc.RNA tumorskog i netumorskog tkiva zahvaćenog FL-om.

	Raspon konc.(RNA) – µg/ml	Srednja vrijednost konc. RNA (µg/ml)
tumorsko tkivo(TT)	0,009 – 0,236	0,0725
netumorsko tkivo (NT)	0,007 – 0,145	0,0260

4.3. Lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu

Lančanom reakcijom polimerazom u stvarnom vremenu dobivena je vrijednost ΔCT gena od interesa u uzorcima s tumorskim i netumorskim dijelovima tkiva zahvaćenog folikularnim limfomom te je izračunata vrijednost $\Delta\Delta CT$ skupina tumorskog i netumorskog tkiva zahvaćenog folikularnim limfomom (tablice 3 i 4).

Tablica 3. Prosječne vrijednosti ΔCT istraživanih gena u uzorcima tumorskog tkiva (TT) i netumorskog tkiva (NT).

ΔCT	<u>DNMT1</u>	<u>PCNA</u>	<u>MCM2</u>	<u>MCM7</u>
TT	-1,487718158	1,697697851	-0,886232482	-2,33076032
NT	-1,221121364	1,273850123	-0,487448798	-2,02285862
ΔCT	<u>GMNN</u>	<u>CDT1</u>	<u>EZH2</u>	<u>p300</u>
TT	1,815149095	1,653282483	-0,773044162	-1,092764219
NT	2,218887965	1,892622524	-0,37352562	-1,076617771

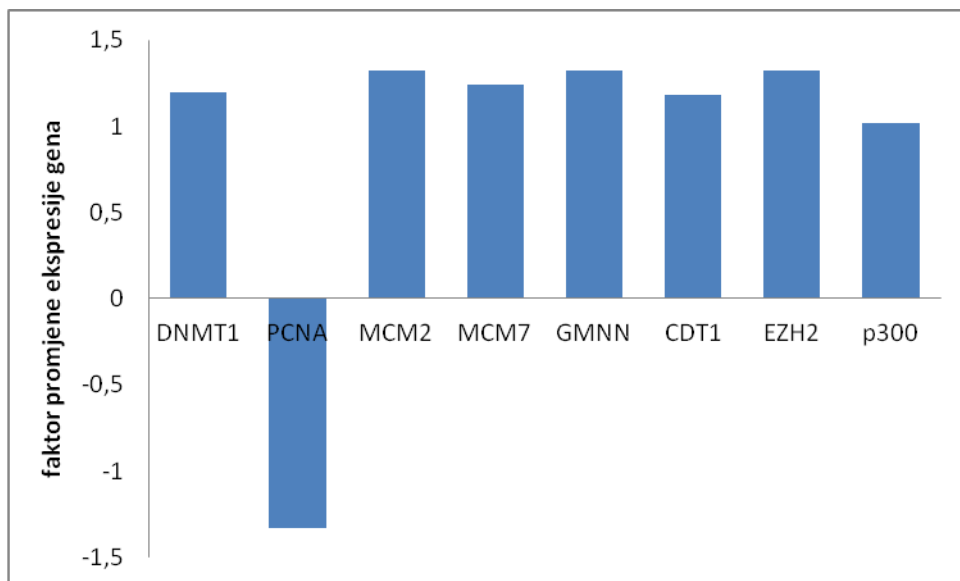
Tablica 4. Vrijednost $\Delta\Delta CT$ skupina tumorskog (TT) i netumorskog(NT) dijela tkiva zahvaćenog FL-om.

$\Delta\Delta CT$	<u>DNMT1</u>	<u>PCNA</u>	<u>MCM2</u>	<u>MCM7</u>
TT-NT	-0,266596794	0,423847728	-0,398783684	-0,3079017
$\Delta\Delta CT$	<u>GMNN</u>	<u>CDT1</u>	<u>EZH2</u>	<u>p300</u>
TT-NT	-0,40373887	-0,23934004	-0,399518543	-0,016146448

Vrijednost faktora promjene ekspresije gena ($2^{-\Delta\Delta CT}$) izračunata je kako bi se odredila razlika u ekspresiji gena od interesa između skupina tumorskog i netumorskog tkiva zahvaćenog folikularnim limfomom. Uočava se povećana razina ekspresije DNMT, MCM2, MCM7, GMNN, CDT1, EZH2 i p300 te nešto manja razina ekspresije PCNA u tumorskom tkivu u odnosu na netumorsko tkivo (tablica 5, slika 10).

Tablica 5. Vrijednosti faktora promjene ekspresije gena ($2^{-\Delta\Delta CT}$) između skupina tumorskog i netumorskog tkiva zahvaćenog FL-om.

	Srednja vrijednosti $2^{-\Delta\Delta CT}$
<u>DNMT1</u>	1,20
<u>PCNA</u>	0,75
<u>MCM2</u>	1,32
<u>MCM7</u>	1,24
<u>GMNN</u>	1,32
<u>CDT1</u>	1,18
<u>EZH2</u>	1,32
<u>p300</u>	1,02



Slika 10. Grafički prikaz vrijednosti faktora promjene ekspresije gena ($2^{-\Delta\Delta CT}$) skupina tumorskog i netumorskog tkiva zahvaćenog folikularnim limfomom.

Statistička obrada podataka nije pokazala značajne razlike u ekspresiji analiziranih gena između skupina tumorskog i netumorskog tkiva zahvaćenog folikularnim limfomom.

5. RASPRAVA

Na temelju dobivenih rezultata ovog istraživanja, između skupina tumorskog i netumorskog tkiva zahvaćenog folikularnim limfomom nije uočena značajna razlika u ekspresiji analiziranih gena *DNMT1*, *PCNA*, *MCM2*, *MCM7*, *CDT1*, *EZH2*, *GMNN* i *p300*, uključenih u proces replikacije i ponovne uspostave kromatina. Međutim, postoje istraživanja u kojima se uočava povećana ekspresija navedenih gena, najčešće u folikularnim (germinativnim) centrima limfnih čvorova zahvaćenih tumorom. Na primjer, zapaženo je da pojačana ekspresija MDM2 prisutna u germinativnim centrima limfnih čvorova zahvaćenih folikularnim limfomom raste tijekom njegove progresije pa čak i tijekom njegove transformacije u DLBCL, ali ne kao jedina promjena, već u kombinaciji s drugim genetičkim promjenama (Moller et al., 2002).

Novija istraživanja ukazuju na važnost mutacija koje se mogu dogoditi u navedenim genima i na taj način potaknuti limfomagenezu (Shaknovich et al.,2013). Postoji sve veći broj dokaza da narušavanje epigenetičkih mehanizama ima ključnu ulogu u nastanku B–limfoma (Shaknovich et al.,2013). Narušavanje metilacije DNA uzrokovano mutacijama u *DNMT1* i genima za ostale metiltransferaze, ima za posljedicu prekid normalne diferencijacije stanica te razvoj stanica s abnormalnim epigenetičkim programom. DNA metiltransferaze u razvoju tumora imaju ulogu u inicijaciji i održavanju utišanog stanja gena kroz metilaciju DNA ali i kroz neke druge mehanizme (Shaknovich et al.,2013).

Dok se kod zdravih stanica uočava globalna hipermetilacija i nemetiliranost promotora tumorsupresorskih gena, kod tumorskih stanica opaža se globalna hipometilacija i hipermetilacija promotora tumorsupresorskih gena. Globalna hipometilacija uključuje sekvence ponavljajuće DNA, povećanu stopu mutacija na razini cijelog genoma i povećanu učestalost mitotske rekombinacije. Hipermetilacija promotora tumorsupresorskih gena uzrokuje njihovo utišavanje. Abnormalni metilacijski obrasci daju prednost preživljavanju tumorskih stanica i u konačnici agresivniju i kemorezistentniju bolest (Shaknovich et al.,2013).

Također je uočeno da somatske mutacije u genima za *EZH2* i *HAT*, kao i onima za *CBP* i *p300* narušavaju strukturu kromatina i funkciju ostalih proteina te direktno utječu na proliferaciju stanica i nastanak B–limfoma (Shaknovich i Melnick,2011).

Dobiveni rezultati potvrđuju prijašnje teorije, koje se baziraju na tumačenju da su glavni pokretači limfomageneze mutacije tumorsupresorskih gena i onkogeni, a ne promjena regulacije njihove transkripcije i posljedično promjena njihove količine u stanici.

Brojna istraživanja pokazuju da narušena ekspresija *p53* tumorsupresorskog gena ima za posljedicu nastanak B–limfoma, poput folikularnog i difuznog B–velikostaničnog limfoma (Levine i Vosburgh, 2008). Jedan od najčešće mutiranih gena u ljudskim novotvorinama (>50% svih tumora) upravo je *p53*. Genski produkt je nuklearni fosfoprotein s funkcijom transkripcijskog faktora koji inducira ekspresiju gena uključenih u zaustavljanje staničnog ciklusa u G1 fazi ili gena uključenih u apoptozu te predstavlja tzv. glavnog čuvara genoma. Utišavanjem ovog tumorsupresorskog gena omogućen je nastanak tumora (Qayum i Ashraf, 2006).

Smatra se da translokacija $t(14;18)(q32;q21)$ koja uzrokuje pojačanu ekspresiju antiapoptotskog proteina BCL2, predstavlja primarni događaj u patogenezi folikularnog limfoma, ali sama nije dovoljna za nastanak bolesti (Kridel et al., 2012). Osim mehanizma pojačane ekspresije BCL2, u nastanak limfoma mogu biti uključene i druge promjene s učinkom smanjenja razine apoptoze stanica, ali i aktivacija BCL6 kao alternativnog mehanizma povećanja preživljenja stanica. Dodatne citogenetičke promjene folikularnog limfoma izrazito su heterogene. Heterogenost i nalaz rastućeg broja genetičkih promjena s porastom histološkog stupnja folikularnog limfoma upućuje na postojanje različitih putova klonalne evolucije (Hoglund et al., 2004).

Budući je do aktivacije tumora potrebno 6-7 neovisnih događaja jer je u pitanju višestupanjski proces, pretpostavlja se da važnu ulogu u tim događajima imaju geni uključeni u regulaciju staničnog ciklusa, regulaciju transkripcije te međustaničnu interakciju što bi predstavljalo osnovu patogenetičkih mehanizama u nastanku folikularnog limfoma (Kridel et al., 2012).

Za ovo istraživanje odobren je relativno mali broj dostupnih uzoraka s različitim gradusima folikularnog limfoma, te je dobivena mala količina materijala laserskom mikrodisekcijom zbog čega su napravljene prilagodbe eksperimentalnih postupaka.

Dobiveni rezultati morali bi se provjeriti na većem broju uzoraka svakog od 3 gradusa folikularnog limfoma zasebno.

Na osnovi dosadašnjih studija uočava se veliki napredak u razumijevanju mehanizama ključnih za proces nastanka B–limfoma te u razvoju adekvatnih terapija usmjerenih protiv tumorskih stanica. Istraživanje poput ovog moglo bi doprinijeti razumijevanju mreža tumorigeneze na koje se može djelovati terapijskim postupcima.

6. ZAKLJUČAK

- Analiza ovog istraživanja pokazala je da između skupina tumorskog i netumorskog tkiva zahvaćenog folikularnim limfomom nema značajne razlike u ekspresiji gena *DNMT1*, *PCNA*, *MCM2*, *MCM7*, *CDT1*, *EZH2*, *GMNN* i *p300*.

- Narušena ravnoteža ekspresije gena uključenih u replikaciju i ponovnu uspostavu kromatina nije uzrok razvoja i/ili progresije folikularnog limfoma.

7. LITERATURA

1. Allis et al. (2007). Epigenetics, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York
2. Carbone A. et al. (2014). The role of Inflammation in Lymphoma. In: Agarwal B. B. , editors. Inflammation and Cancer, Department of Experimental Therapeutics, University of Texas, Houston, 816:315-333
3. Cox S. L. (2009). Molecular Themes in DNA Replication, Department of Biochemistry, University of Oxford, Oxford
4. Copper G.M., Hausman R.E. (2004).: Stanica Molekularni pristup (ur. Hrvatskog izdanja G. Lauc), Medicinska naklada, Zagreb
5. Guyton, C.A., Hall J.E. (2006). Medicinska fiziologija, 11. izdanje, Medicinska naklada, Zagreb
6. Grossbard M. L. (2002). Malignant Lymphoma, Columbia University of Physicians and Surgeons, New York
7. Hoglund M. et al. (2004). Identification of cytogenetic subgroups and karyotypic pathways of clonal evolution in follicular lymphomas, Genes Chromosomes Cancer, 39:195-204
8. Kridel R. et al. (2012). Pathogenesis of follicular lymphoma, The Journal of Clinical Investigation, 122:3424-3431
9. Lasan Trčić R. i sur. (2013). Citogenetske karakteristike limfoma, Paediatr Croat., 57:226-232
10. Levine A. J., Vosburgh E. (2008). *p53* mutations in lymphomas, Blood Journal, 112:2997-2998
11. Moller M. B. Et al. (2002). Frequent alteration of MDM2 and p53 in the molecular progression of recurring non- Hodgins lymphoma, Histopathology, 41:322-330
12. Qayum I., Ashraf M. (2006). DNA Methyltransferase 1 (*DNMT1*) gene activity in human lymphomas correlates with aberrant *p53* gene expression, J Ayub Med Coll Abbottabad, 18 (1)
13. Shaknovich R., Melnick A. (2011). Epigenetics and B-cell Lymphoma, Curr Opin Hematol., 18:293-299
14. Shaknovich R. et al. (2013). Aberration in DNA methylation in B-cell lymphomas has a complex origin and increases with disease severity, PLOS Genetics, 9:e1003137
15. Swerdlow H.S. et al. (2008). WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues, 4-th Edition, International Agency for Research on Cancer, Lyon

16. Šamija M. i sur. (2006). Klinička onkologija, Medicinska naklada, Zagreb
17. Willard-Mack C. L. (2006). Normal Structure, Function and Histology of Lymph Nodes, Toxicologic Pathology, New York, 34:409-424
18. Wittlinger H, Wittlinger G. (2004).Textbook of Dr. Vodders Manual Lymph Drainage, 7-th Edition, Thieme Stuttgart, New York

8. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 6. srpnja 1987. u Subotici, gdje sam završila Osnovnu školu "Miloš Crnjanski" i Gimnaziju "Svetozar Marković", društveno–jezični smjer. Godine 2007. upisala sam preddiplomski studij molekularne biologije na Prirodoslovno–matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, a 2012. upisala sam diplomski studij molekularne biologije. Tijekom studiranja sudjelovala sam u događajima koji su imali za cilj promicanje znanosti poput Noći biologije i Festivala znanosti. Također sam bila dio ekipe Udruge studenata biologije koja se bavila pisanjem članaka i uređivanjem studentskog časopisa "In vivo" . Od 2011. aktivna sam članica Hrvatskog katoličkog liječničkog društva te sam sudjelovala u nekoliko projekata Sekcije mladih.

