

Izraženost DVL2 i DVL3 proteina u difuznim karcinomima želuca

Perković, Marija

Master's thesis / Diplomski rad

2018

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:105:598969>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-14**



Repository / Repozitorij:

[Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

MEDICINSKI FAKULTET

Marija Perković

**Izraženost DVL2 i DVL3 proteina u difuznim
karcinomima želuca**

DIPLOMSKI RAD



Zagreb, 2018

Ovaj diplomski rad izrađen je na Zavodu za biologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom izv.prof.dr.sc. Tamare Nikuševa-Martić i predan je na ocjenu u akademskoj godini 2017./2018.

SADRŽAJ

| | |
|---|----|
| Sažetak | 0 |
| Summary | 0 |
| 1. UVOD | 1 |
| 1.1. WNT SIGNALNI PUT I PROTEINI OBITELJI DISHEVELLED | 1 |
| 1.2. KARCINOM ŽELUCA..... | 3 |
| 2. HIPOTEZA | 5 |
| 3. OPĆI CILJEVI RADA..... | 5 |
| 4. MATERIJALI I METODE | 6 |
| 4.1. UZORCI TKIVA | 6 |
| 4.2. IMUNOHISTOKEMIJSKA ANALIZA | 6 |
| 4.2.1. Priprema za imunohistokemiju | 6 |
| 4.2.2. Imunohistokemijska obrada | 7 |
| 4.3. EVALUACIJA IMUNOHISTOKEMIJSKOG BOJENJA | 8 |
| 4.4. STATISTIČKE METODE | 8 |
| 5. REZULTATI..... | 9 |
| 5.1. EKSPRESIJA DVL2 PROTEINA | 12 |
| 5.2. EKSPRESIJA DVL3 PROTEINA | 14 |
| 5.3. USPOREDBA EKSPRESIJE DVL2 I DVL3 U TUMORSKOM TKIVU I ZDRAVOM TKIVU ŽELUCA | 15 |
| 6. RASPRAVA..... | 17 |
| 7. ZAKLJUČAK | 19 |
| 8. ZAHVALE | 20 |
| 9. POPIS LITERATURE | 21 |
| 10. ŽIVOTOPIS | 25 |

Popis kratica:

APC - Protein adenomatozne polipoze kolona

CamKII- Kalcij/kalmodulin-ovisna kinaza II

CDH1 - kadherin 1

cGMP - Ciklički gvanozin monofosfat

CK1 - Kazein kinaza 1

CREB - cAMP response element binding

Daam1 - Dishevelled associated activator of morphogenesis 1

DAB - Diaminobenzidin tetrahidroklorid

DAG - Diacilglicerol

Dvl - Dishevelled protein

Fz - Frizzled

GSK3 β - Glikogen sintetaza kinaza 3 β

GTP - Gvanozin trifosfat

HDGC - Hereditary diffuse gastric carcinoma

IARC - Međunarodna agencija za istraživanje raka (engl. International Agency for Research on Cancer)

IP3 - Inozitol-1,4,5-trisfosfat

JNK - C-Jun N-terminalna kinaza

LEF/TCF - Lymphoid enhancer factor/ T cell factor

LRP5/6 - Low-density lipoprotein receptor related protein

NFAT - Nuklearni faktor aktiviranih T-stanica

NF κ B - Nuklearni faktor κ B

PCP - Proces polariteta stanica (engl. planar cell polarity)

PDE6 - Fosfodiesteraza 6

PIP2 - Fosfatidil-inozitol-bifosfat

PKC - Protein kinaza C

PLC - Fosfolipaza C

RhoA - Član A obitelji ras homolognih gena (engl. Ras homolog gene family, member A)

ROCK - Rho-associated coiled-coil containing protein kinase

Wg - Wingless

Sažetak

Izraženost DVL2 i DVL3 proteina u difuznim karcinomima želuca

Marija Perković

Karcinom želuca jedan je od najčešćih tumora na svjetskoj razini, a praćen je visokom razinom smrtnosti. Prema Laurenovoj klasifikaciji iz 1965. godine postoje dva glavna histološka tipa adenokarcinoma želuca, intestinalni i difuzni tip. Genetska podloga ovih karcinoma još uvijek je nedovoljno istražena, a posebno mutacije koje dovode do nastanka difuznog tipa karcinoma želuca. Wnt signalni put uključen je u razvoj različitih vrsta tumora, kao i proteini obitelji Dishevelled koji su njegovi nizvodno smješteni medijatori. Cilj ovog rada bio je analizirati izraženost DVL2 i DVL3 proteina u difuznim karcinomima želuca, s pretpostavkom kako bi oni mogli imati važnu ulogu u razvoju te vrste karcinoma. Ekspresija DVL2 proteina analizirana je u 41 kontrolnom uzorku zdravog tkiva želuca te u 49 uzoraka difuznih karcinoma želuca. Ekspresija DVL3 proteina analizirana je u 49 kontrolnih uzoraka zdravog tkiva želuca te u 50 uzoraka difuznih karcinoma želuca. Uzorci su prikupljeni iz arhive Kliničkog zavoda za patologiju i citologiju KBC-a Zagreb. Nakon imunohistokemijskog bojenja, u kojem su korištena primarna poliklonska protutijela DVL2 i DVL3, rezultati su analizirani semikvantitativnom metodom uz bodovanje postotka pozitivnih tumorskih stanica i intenziteta bojenja. Ekspresija DVL2 proteina u tumorskom tkivu bila je statistički značajno jača u odnosu na zdravo tkivo želuca ($p=0.0066$). Nasuprot tomu, ekspresija DVL3 proteina nije pokazala statistički značajno jaču ekspresiju u tumorskom tkivu u usporedbi sa zdravim tkivom želuca ($p=0.1308$). Ekspresija DVL3 proteina statistički je značajno veća u odnosu na DVL2 protein u tumorskom tkivu ($p=0.0022$), kao i u zdravom tkivu želuca ($p<0.0001$). Dobiveni rezultati ukazuju da bi DVL2 mogao imati važnu ulogu u razvoju ove vrste karcinoma. Potrebne su daljnje studije koje bi tu ulogu razjasnile i proučile mogućnost korištenja DVL2 proteina kao tumorskog markera u dijagnostici ili kao ciljne molekule za djelovanje terapije u difuznim karcinomima želuca.

Ključne riječi: difuzni karcinom želuca, Wnt signalni put, Dishevelled proteini, DVL2, DVL3, genske promjene

Summary

DVL2 and DVL3 protein expression in diffuse gastric carcinomas

Marija Perković

Gastric cancer is one of the most common cancers worldwide, accompanied with high death rate. According to Lauren classification, introduced in 1965, the gastric cancer is classified into two major histological subtypes, intestinal and diffuse type. There is insufficient information concerning genetic abnormalities involved in the pathogenesis of these carcinomas, in particular diffuse type adenocarcinoma. The Wnt signaling pathway and its central mediators, called Dishevelled proteins, play an important role in the development of numerous tumor types. The aim of this study was to analyze DVL2 and DVL3 protein expression in diffuse gastric carcinomas, that we assumed could have potential role in their development. DVL2 expression was analyzed in 41 sample of healthy stomach tissue, as well as in 49 samples of diffuse gastric carcinomas. DVL3 expression was analyzed in 49 samples of healthy stomach tissue, as well as in 50 samples of diffuse gastric carcinomas. The samples were collected from the archives of the Department of Pathology and Cytology of the Zagreb University Hospital Center. After immunohistochemical staining with primary polyclonal antibodies DVL2 and DVL3, the results were analyzed with semiquantitative method which combined the percentage of positive cells and staining intensity. DVL2 protein expression was higher in tumor tissue compared to healthy stomach tissue ($p=0.0066$). However, DVL3 protein expression was not statistically significantly higher in tumor tissue compared to healthy stomach tissue ($p=0.1308$). DVL3 expression compared to DVL2 expression was statistically significantly higher in tumor tissue ($p=0.0022$), as well as in healthy stomach tissue ($p<0.0001$). The results indicate that DVL2 might have an important role in development of these type of carcinomas. The further studies are required to clarify this role and to define the possibility of using DVL2 as tumor marker or as target molecule for diffuse gastric carcinoma therapy.

Keywords: diffuse gastric carcinoma, Wnt signaling pathway, Dishevelled proteins, DVL2, DVL3, genetic abnormalities

1. UVOD

1.1. WNT SIGNALNI PUT I PROTEINI OBITELJI DISHEVELLED

Wnt obitelj signalnih proteina uključena je u brojne procese tijekom embriogeneze, kao i u homeostazu odraslih tkiva. [1] Wnt proteini ime su dobili kombinacijom wingless (wg) gena za polarnost segmenta u vinske mušice (*Drosophila melanogaster*) i mišjeg *Int1* protoonkogena. Oni su se u istraživanju Rijsewijka i suradnika pokazali kao međusobno homologni te se njihovi proteinski produkti smatraju pripadnicima velike, evolucijski očuvane obitelji ekstracelularnih signalnih molekula. [2,3] Postoje najmanje tri međusobno različita Wnt signalna puta, a to su kanonski ili Wnt/ β -katenin put te nekanonski Wnt/PCP (engl. planar cell polarity) i Wnt/ Ca^{2+} signalni put. [4] Wnt/ β -katenin signalni put aktivira se vezanjem Wnt liganda za transmembranski Frizzled (Fz) receptor te za njegov koreceptor LRP5 ili LRP6 (engl. low-density lipoprotein receptor related protein). [5,6] Nakon formiranja Wnt-Fz-LRP5/6 kompleksa, za njega se veže Dishevelled (DVL) protein što u konačnici dovodi do fosforilacije LRP5/6 koreceptora pomoću fosfokinaza GSK3 β (engl. Glycogen synthase kinase 3 β) i CK1 (engl. Casein kinase 1). Fosforilacijom aktiviran LRP5/6 koreceptor na sebe veže AXIN, koji se također može vezati i za DVL. [6] Tim vezanjem AXIN se uklanja iz destruktivnog kompleksa što omogućuje nakupljanje β -katenina u citoplazmi i naposljetku njegov prijenos u jezgru. U jezgri se β -katenin veže za LEF/TCF (engl. lymphoid enhancer factor/ T cell factor) obitelj transkripcijskih faktora, čime se aktivira ekspresija ciljnih gena. Ukoliko Wnt signal izostane formira se destruktivni kompleks (sadrži AXIN, APC (engl. adenomatous polyposis coli), CK1 i GSK3 β) koji fosforilira β -katenin nakon čega on podliježe ubikvitinaciji i proteasomalnoj degradaciji. [5, 6] Različiti Wnt proteini imaju tendenciju aktivirati različite signalne putove. Tako se Wnt1, Wnt3 i Wnt8 povezuju s kanonskim Wnt/ β -katenin putem, dok se Wnt5a i Wnt11 nazivaju „nekanonskim“ Wnt proteinima. [7] Wnt5a može također aktivirati ili inhibirati Wnt/ β -katenin put, ovisno o vrsti prisutnog receptora. [8] Smatra se da se nekanonski Wnt signal prenosi putem Fz receptora, ali neovisno o LRP5/6 koreceptoru. [9]

Wnt/PCP put započinje vezanjem nekanonskih (Wnt5a, Wnt11) Wnt proteina za Fz receptor te posljedično i DVL proteina. Nizvodno od DVL proteina nastaju dva odvojena, paralelna signalna puta. Prvi put pomoću Daam1 (engl. Dishevelled associated activator of morphogenesis 1) molekule stvara DVL-RhoA (engl. Ras homolog gene family, member A)

kompleks koji aktivira ROCK (engl. Rho-associated kinase). U drugom signalnom putu DVL aktivira Rac1 GTPazu koja zatim stimulira aktivnost JNK (engl. c-Jun N-terminal kinase). [9,10,11] Wnt/PCP put važan je korak za normalnu morfogenezu embrija, a njegova neodgovarajuća signalizacija povezana je s metastaziranjem tumorskih stanica. [10]

Signalizacija Wnt/ Ca^{2+} signalnog puta također započinje vezanjem Wnt proteina za Fz receptor te posredovanjem DVL proteina dolazi do aktivacije enzima fosfolipaze C (PLC) koji se nalazi na staničnoj membrani. PLC cijepa membranski fosfolipid PIP_2 (fosfatidilinozitol-bifosfat), a krajnji produkti te reakcije su IP_3 (inozitol 1,4,5-trisfosfat) i DAG (diacilglicerol). IP_3 se na membrani endoplazmatskog retikuluma veže za specifične kalcijске kanale i otvara ih, čime dolazi do porasta citoplazmatske koncentracije Ca^{2+} . Oslobođeni kalcijevi ioni aktiviraju kalcij/kalmodulin-ovisnu kinazu II (CamKII) i kalcineurin te uz pomoć DAG i protein kinazu C (PKC) koji zatim potiču translokaciju transkripcijskih faktora NFAT (nuklearnog faktora aktiviranih T-stanica), $NF\kappa B$ (nuklearnog faktora κB) i CREB (engl. cAMP response element binding) iz citoplazme u jezgru čime se ostvaruje transkripcija ciljnih regulacijskih gena. [9,12,13] Također, smatra se da DVL aktivirajući fosfodiesterazu 6 (PDE6) uz pomoć kalcija dovodi do smanjenja koncentracije cikličkog gvanozin monofosfata (cGMP). [14]

Iz navedenoga može se zaključiti da je Dishevelled ključan protein za prijenos Wnt signala u stanici. Dishevelled (dsh) protein otkriven je u vinskoj mušici (*Drosophila melanogaster*). [15] U vinskoj mušici izražen je samo jedan dsh gen, dok u ljudi postoje tri homologna gena DVL1, DVL2 i DVL3. DVL1 smješten je na lokusu 1p36, a njegov protein sadrži 695 aminokiselina. DVL2 nalazi se na 17p13.1 lokusu i stvara protein građen od 695 aminokiselina, a DVL3, čiji protein sadrži 716 aminokiselina, smješten je na lokusu 3q27. [16, 17] Svi Dishevelled proteini sadrže tri evolucijski očuvane domene: aminoterminalnu DIX (Disheveled, Axin) domenu, središnju PDZ (Postsynaptic density 95, Discs Large, Zonula occludens-1) domenu te karboksiterminalnu DEP (Dvl, Egl-10, Pleckstrin) domenu. [18,19,20]

Osim uloge Wnt signalizacije u brojnim biološkim procesima važnima za razvoj embrionalnih tkiva, njena narušena regulacija povezana je s razvojem neoplazmi. [21,22] Pojačana ekspresija DVL proteina, medijatora Wnt signalnog puta, također je zapažena u različitim vrstama raka. U istraživanju karcinoma pluća nemalih stanica (non small cell lung cancer – NSCLC) nađena je pojačana ekspresija DVL1, DVL2 i DVL3 proteina, koja je bila statistički značajno jača u adenokarcinomima nego u karcinomima pločastih stanica. [23] DVL1 i DVL3 povezani su s lošijom prognozom u tih pacijenata. [24] Povećana izraženost DVL1 gena

nađena je u tumorima dojke, [25] kao i u tumorima prostate [26] te karcinomu pločastih stanica vrata maternice [27] DVL2 pojačano je izražen u ljudskim gliomima visokog stupnja [28] i hepatocelularnim karcinomima. [29]

1.2. KARCINOM ŽELUCA

Prema podacima Međunarodne agencije za istraživanje raka (engl. International Agency for Research on Cancer, IARC) i njenog GLOBOCAN izvješća o rasprostranjenosti raka, koje je obuhvatilo 184 zemlje diljem svijeta, u 2012. godini 14.1 milijun ljudi obolio je od neke zloćudne novotvorine, a umrlo je 8,2 milijuna. Najčešći rak u oba spola je rak pluća (13%), zatim rak dojke (12%), kolorektalni rak (9.7%), rak prostate (7.8%) te se na petom mjestu po učestalosti, sa 951 594 novodijagnosticirana slučaja, nalazi rak želuca (6.8%). Kao uzrok smrti od zloćudnih novotvorina rak želuca nalazi se na trećem mjestu s udjelom od 8.8%. [30] U Republici Hrvatskoj je, prema podacima za 2015. godinu, šesto najčešće sijelo raka u muškaraca s 520 novih slučajeva, a u žena deveto sa 371 novoboljelom osobom. [31] Postoji nekoliko rizičnih čimbenika za razvoj karcinoma želuca. Čimbenici rizika u prehrani su povećani unos soli, nedostatan unos svježeg voća i povrća te povećan unos crvenog, dimljenog i prerađenog mesa. Pušenje, povećan unos alkohola, infekcija bakterijom *Helicobacter Pylori*, krvna grupa A, pozitivna anamneza karcinoma želuca u obitelji, muški spol te nizak socioekonomski status također povećavaju rizik. [32,33] Važan cilj u smanjenju incidencije karcinoma želuca trebao bi biti osvješćivanje populacije kako već promjenama životnih navika bitno doprinose očuvanju svoga zdravlja i sprječavanju razvoja karcinoma.

Prema klasifikaciji Svjetske zdravstvene organizacije iz 2010. godine postoji pet kategorija adenokarcinoma: tubularni, papilarni, mucinozni, slabo kohezivni (uključuje adenokarcinom tipa stanica prstena pečatnjaka to jest difuzni tip prema Laurenovoj klasifikaciji) i miješani tip adenokarcinoma. [34] Jedna od najraširenijih klasifikacija karcinoma želuca je Laurenova koja razlikuje dva glavna tipa, intestinalni i difuzni tip. [35] Tumorske stanice intestinalnog tipa dovoljno su diferencirane da mogu graditi prepoznatljive žlijezde. U difuznom tipu prisutne su karakteristične tumorske stanice nazvane „stanice prstena pečatnjaka“ (engl. signet ring cells) koje imaju svijetlu citoplazmu punu sluzi s jezgrom potisnutom na periferiju, a nalaze se raspršene pojedinačno ili u obliku nespecifičnih nakupina. On je slabije ograničen i difuzno zahvaća želučanu stijenku te može dovesti do njezinog difuznog zadebljanja stvarajući tako makroskopski oblik koji se naziva plastični linitis (lat. linitis plastica). [36]

Iako se većina tumora želuca pojavljuje sporadično, oko 10% njih učestalo se javlja u određenim obiteljima. Smatra se da je 1-3% tih tumora povezano s nasljednim mutacijama. [37] Prvi je otkriven hereditarni difuzni karcinom želuca (engl. hereditary diffuse gastric carcinoma - HDGC), autosomno dominantni poremećaj uzrokovan mutacijom tumorsupresorskog gena CDH1 (engl. cadherin 1) koji kodira za E-kadherin. [38] Obitelji s HDGC-om također imaju povećan rizik za razvoj lobularnog karcinoma dojke. U 80% muških i ženskih nosioca mutacije razvit će se HDGC, a oko 60% ženskih nositeljica oboljeti će od lobularnog karcinoma dojke [39] Klinički kriteriji za HDGC su: dva ili više srodnika s karcinomom želuca u prvom ili drugom koljenu (od kojih je jedan mlađi od 50 godina), tri ili više srodnika s karcinomom želuca u prvom ili drugom koljenu neovisno o dobi, difuzni karcinom želuca u osobe mlađe od 40 godine bez prethodne obiteljske anamneze te osobna ili obiteljska anamneza difuznog karcinoma želuca i lobularnog karcinoma dojke (od kojih se jedan pojavio prije 50 godine života). Zbog kratkog petogodišnjeg preživljenja razvijene bolesti, osobama koje su nositelji CDH1 mutacije preporuča se profilaktička gastrektomija, a u onih koji odbiju kirurški zahvat preporučene su endoskopske kontrole s manjim uspjehom. [39] Samo oko 40% pacijenata koji ispunjavaju kliničke kriterije za HDGC ima CDH1 mutaciju. [40] Mutacija alfa-E-katenin gena (CTNNA1) također se povezuje s HDGC. [41] Mehanizam razvoja bolesti u čak 60% pacijenata koji ispunjavaju kliničke kriterije za HDGC još uvijek je nedovoljno istražena, zbog čega su mogućnosti za njihovo genetsko savjetovanje, računanje rizika i pravovremenu intervenciju izrazito smanjene. Također, velika smrtnost od karcinoma želuca nastaje poglavito kao posljedica kasne dijagnoze i ograničenih terapijskih mogućnosti. Te činjenice ukazuju na potrebu za daljnjim utvrđivanjem novih mutacija, uključenih u razvoj difuznog karcinoma želuca, koje bi mogle biti okosnica ranije dijagnostike i ciljane terapije.

2. HIPOTEZA

Tkiva difuznih karcinoma želuca imaju jaču izraženost DVL2 i DVL3 proteina, medijatora Wnt signalnog puta, nego zdrava tkiva želuca.

3. OPĆI CILJEVI RADA

Cilj istraživanja bio je dokazati postojanje razlike u izraženosti proteina DVL2 i DVL3, komponenti Wnt-signalnog puta, u difuznim karcinomima želuca i u normalnom tkivu, što bi ukazivalo na moguću povezanost poremećenog prijenosa signala tim putem i nastanka difuznog karcinoma želuca. Također je cilj bio utvrditi postoji li međusobna razlika izraženosti DVL2 i DVL3 u kontrolnom tkivu i tkivu karcinoma želuca te time utvrditi predstavlja li jača izraženost jednog od njih važniju ulogu u nastanku tih karcinoma.

4. MATERIJALI I METODE

4.1. UZORCI TKIVA

Uzorci difuznih karcinoma želuca i zdravog tkiva želuca dobivenog endoskopskim biopsijama prikupljeni su iz arhive Kliničkog zavoda za patologiju i citologiju KBC-a Zagreb. Uzorci tkiva uzeti su prije započinjanja specifičnog onkološkog liječenja. Tijekom uzimanja uzoraka zabilježeni su demografski podatci (spol i dob) te klinički i patološki parametri (lokalizacija uzetog tkiva za biopsiju i TNM klasifikacija).

Istraživanje je dobilo suglasnost Etičkog povjerenstva KBC „Rebro“ i Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb broj: EP- 380-59-10106-15-46/3 25. rujna 2015.

4.2. IMUNOHISTOKEMIJSKA ANALIZA

Uzorci pohranjeni u parafinskom bloku analizirani su imunohistokemijskim metodama. Imunohistokemijska analiza korištena je da bi se ustanovile razine ekspresije i stanična lokalizacija proteina DVL2 i DVL3. Parafinski uklopljeni rezovi uzoraka debljine 4- μ m postavljeni su na silanizirana predmetna stakla (DakoCytomation, Denmark). Rezovi su imunohistokemijski bojani metodom biotin–avidin– streptavidin peroksidazom iz hrena (engl. horseradish; DAKO No.K0679). Korištena su primarna poliklonska protutijela DVL2 (engl. rabbit polyclonal anti-human DVL2; Santa Cruz Biotechnology, USA, dilution 1:500), DVL3 (engl. rabbit polyclonal anti-human DVL3; Santa Cruz Biotechnology, USA, dilution 1:100).

4.2.1. Priprema za imunohistokemiju

Prije imunohistokemijskog bojanja potrebno je deparafinirati i rehidrirati tkivo što se postiže provođenjem uzoraka kroz niz ksilola u trajanju od 4 puta po 10 minuta, apsolutni alkohol jedanput u trajanju od 5 minuta, 96%-tni alkohol jedanput u trajanju od 5 minuta, 70%-tni alkohol jedanput u trajanju od 2 minute te njihovim ispiranjem u destiliranoj vodi 2 puta. Deparafinizirani i rehidrirani rezovi uzoraka zagrijavani su u otopini za otkrivanje antigena (Dako Target Retrieval Solution, Dako Corporation, USA) u mikrovalnoj pećnici 20 minuta na 600 W zbog demaskiranja epitopa. Zatim su preparati ostavljeni da se polako hlade 25 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon toga uzorci su isprani 2 puta po 3 minute TBS (engl.

tris-buffered saline) puferom. Kako bi se blokiralo djelovanje endogene peroksidaze preparati su tretirani otopinom 3%-tnog H_2O_2 10 minuta u mraku. Slijedi ispiranje u TBS puferu 2 puta po 3 minute.

4.2.2. Imunohistokemijska obrada

Uzorci su nakon opisane pripreme tretirani optimalno razrijeđenim primarnim protutijelom (DVL2 i DVL3) preko noći na temperaturi od $4^{\circ}C$. Nakon inkubacije uzorci su 2 puta po 3 minute ispirani u TBS puferu. Za detekciju primarnog protutijela koristili smo Dako REAL Envision detection system (DakoCytomation, Carpinteria, USA). Preparate smo nakapali sekundarnim protutijelom koje se sastoji od otopine za povezivanje (biotinylated link universal, DAKO, K0690) i Streptavidina-HRP (DAKO, K0690) 30 min. Nakon toga je slijedilo ispiranje u TBS puferu 2 puta po 3 minute. Na kraju smo cijeli proces vizualizirali, u trajanju od 10 minuta, supstrat-kromogen otopinom u kojoj kao supstrat služe koncentrirani Tris-HCl pufer i 0,8%-tna otopina vodikovog peroksida, a kao kromogen 3,3'-diaminobenzidin tetrahidroklorid (DAB). Navedena otopina se ispire vodovodnom, a zatim i destiliranom vodom. Primjena ovog supstrat-kromogen kompleksa rezultira nastajanjem netopivog smeđeg precipitata na antigenskom mjestu.

Zatim slijedi kontrastiranje hemalaunom. Uzorci se 1 minutu boje u hemalaunu te se onda isperu 5 minuta u vodovodnoj vodi i nakon toga jedanput u destiliranoj vodi. Zatim slijedi proces dehidriranja provođenjem kroz uzlazni niz etilnog alkohola. Uzorci se provedu kroz 70%-tni EtOH (nekoliko urona), 96%-tni EtOH (nekoliko urona), 100%-tni EtOH (prvo 1 minutu, zatim 2 minute) i ksilol (2 puta po 5 minuta) u kojem se preparati izbistre. Obrada završava poklapanjem pokrovnim stakalcem i medijem za pokrivanje koji se koristi u rutinskoj histološkoj dijagnostici. Negativna kontrola tijekom eksperimenta bio je uzorak koji nismo inkubirali s primarnim antitijelom tijekom imunohistokemije.

4.3. EVALUACIJA IMUNOHISTOKEMIJSKOG BOJENJA

Za analizu preparata korišten je binokularni svjetlosni mikroskop "Nikon Alphaphot". Rezovi su analizirani semikvantitativnom metodom. Postotak pozitivnih tumorskih stanica bodovao se kako slijedi: 0 bodova (nema pozitivnih stanica), 1 bod (< 10% tumorskih stanica), 2 boda (10-50% tumorskih stanica), 3 boda (>50% tumorskih stanica). [42] Intenzitet bojenja bodovao se na idući način: 0 bodova (nema pozitivnih stanica), 1 bod (slab intenzitet), 2 boda (umjeren intenzitet), 3 boda (jak intenzitet). [29] Konačan broj bodova izračunao se kao umnožak postotka pozitivnih stanica i intenziteta bojenja, a dobivena vrijednost nalazila se u rasponu od 0 do 9. [29]

4.4. STATISTIČKE METODE

Za statističku obradu podataka korišten je SPSS softver version 22. Normalna distribucija varijabli ispitana je Kolmogorov-Smirnov i Shapiro-Wilk testom. Usporedba varijabli (intenzitet x postotak obojenja) DVL2 I DVL3 između grupa (kontrola vs. tumor) napravljena je uporabom Mann Whitney testa za neparametrijske odnosno nenormalno distribuirane varijable (intenzitet x postotak obojenja). Kao značajna razlika priznata je razina stupnja vjerojatnosti $p < 0.05$.

5. REZULTATI

U ovom radu 49 uzoraka difuznih karcinoma želuca i 41 uzorak kontrolnog zdravog tkiva želuca analiziran je kako bi se utvrdila izraženost DVL2 proteina.

Ovo istraživanje obuhvatilo je 23 žene (47%) i 26 (53%) muškaraca. Ukupna prosječna starosna dob pri postavljanju dijagnoze iznosila je 62,9 godina. Prosječna starosna dob za žene iznosila je 60,1 godinu, a za muškarce 65,3 godine. U više od 90% uzoraka primarni tumor bio je u T3 (zahvaćanje subseroze) ili višem stadiju prema TNM klasifikaciji, sa širenjem u limfne čvorove.

Tablica 1. Klinički i patološki parametri analiziranih pacijenata

| REDNI BROJ PACIJENTA | SPOL I DOB | LOKALIZACIJA | TNM |
|----------------------|------------|-------------------|----------|
| 1. | Ž 79 | antrum | T3N1M1 |
| 2. | M 75 | mala krivina | T3N1M0 |
| 3. | M 58 | antrum | T3N1M0 |
| 4. | M 71 | antrum | T3N1M0 |
| 5. | Ž 58 | mala krivina | T3N3aMx |
| 6. | M 59 | velika krivina | T4bN2M1 |
| 7. | M 54 | stražnja stijenka | T3N1Mx |
| 8. | M 73 | mala krivina | T4aN3aMx |
| 9. | M 69 | mala krivina | T3N3bMx |
| 10. | Ž 51 | velika krivina | T4bN3aM1 |
| 11. | Ž 73 | /* | T3N1M0 |
| 12. | Ž 59 | velika krivina | T1bN0M0 |
| 13. | Ž 65 | korpus | T1bN3aM0 |
| 14. | Ž 69 | mala krivina | T3N3bM0 |

| | | | |
|-----|------|------------------------|----------|
| 15. | Ž 58 | antrum | T4N1M0 |
| 16. | M 77 | /* | T3N0Mx |
| 17. | Ž 44 | mala krivina | T3N0M0 |
| 18. | Ž 66 | pilorus | T4aN0M0 |
| 19. | Ž /* | /* | /* |
| 20. | M 74 | kardija/mala krivina | T4aN2M0 |
| 21. | Ž 46 | mala krivina | T4bN3aM1 |
| 22. | Ž 82 | mala krivina | T3N2Mx |
| 23. | M 36 | antrum | T3N3M0 |
| 24. | Ž 50 | mala krivina | T4aN0M0 |
| 25. | Ž 69 | mala krivina | T3N3bM1 |
| 26. | M 48 | antrum | T3N0M0 |
| 27. | M 68 | mala krivina | T3N2M0 |
| 28. | M 73 | velika krivina | T4bN2M1 |
| 29. | Ž 71 | antrum | T3N3Mx |
| 30. | M 67 | pilorus | T4aN1M0 |
| 31. | Ž 77 | kardija/velika krivina | T4bN3bM0 |
| 32. | M 58 | antrum | T3N1M0 |
| 33. | Ž 70 | mala krivina | T3N1M0 |
| 34. | M 77 | antrum | T3N3bM0 |
| 35. | M 49 | mala krivina | T3N3aM0 |
| 36. | Ž 48 | pilorus | T4aN0M0 |
| 37. | Ž 62 | pilorus | T4aN0M0 |
| 38. | Ž 36 | korpus | T4aN3bMx |

| | | | |
|-----|------|---------------------|----------|
| 39. | M 48 | antrum | T1aN0M0 |
| 40. | M 71 | antrum | T3N2M0 |
| 41. | M 72 | kardija | T1aN0M0 |
| 42. | Ž 49 | velika krivina | T4aN3aM1 |
| 43. | M 81 | antrum | T4aN3bM1 |
| 44. | M 80 | bataljak želuca | T4bN1Mx |
| 45. | Ž 41 | antrum | T3N1Mx |
| 46. | M 56 | mala krivina | T4aN2M0 |
| 47. | M 63 | mala/velika krivina | T3N2M0 |
| 48. | M 69 | mala/velika krivina | T4aN2Mx |
| 49. | M 72 | mala krivina | T3N2M0 |

*/- podaci su nepoznati

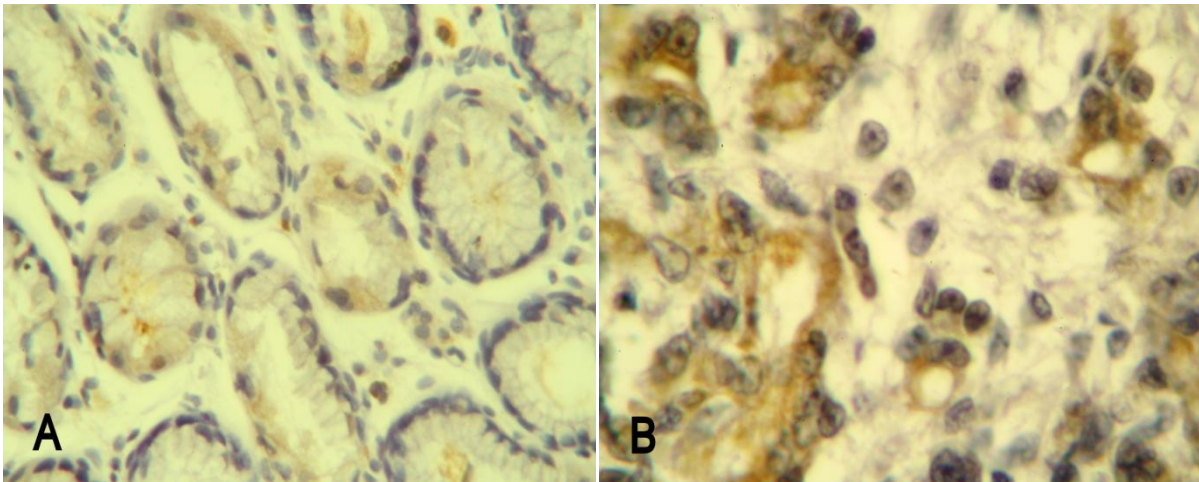
50 uzoraka difuznih karcinoma želuca i 49 uzoraka kontrolnog zdravog tkiva želuca analizirano je kako bi se utvrdila izraženost DVL3 proteina. Za analizu su također korišteni uzorci tumorskog tkiva pacijenata iz *Tablice 1* uz jedan dodatni uzorak pacijenta sa sljedećim karakteristikama:

| | | | |
|-----|------|--------|--------|
| 50. | M 55 | antrum | T2N0M0 |
|-----|------|--------|--------|

Imunohistokemijskom analizom ekspresija DVL2 i DVL3 proteina u zdravom tkivu želuca nađena je u citoplazmi žljezdanih stanica. U tumorskom tkivu ekspresija je također bila citoplazmatska, a ponekad se mogla učiti i u jezgri.

5.1. EKSPRESIJA DVL2 PROTEINA

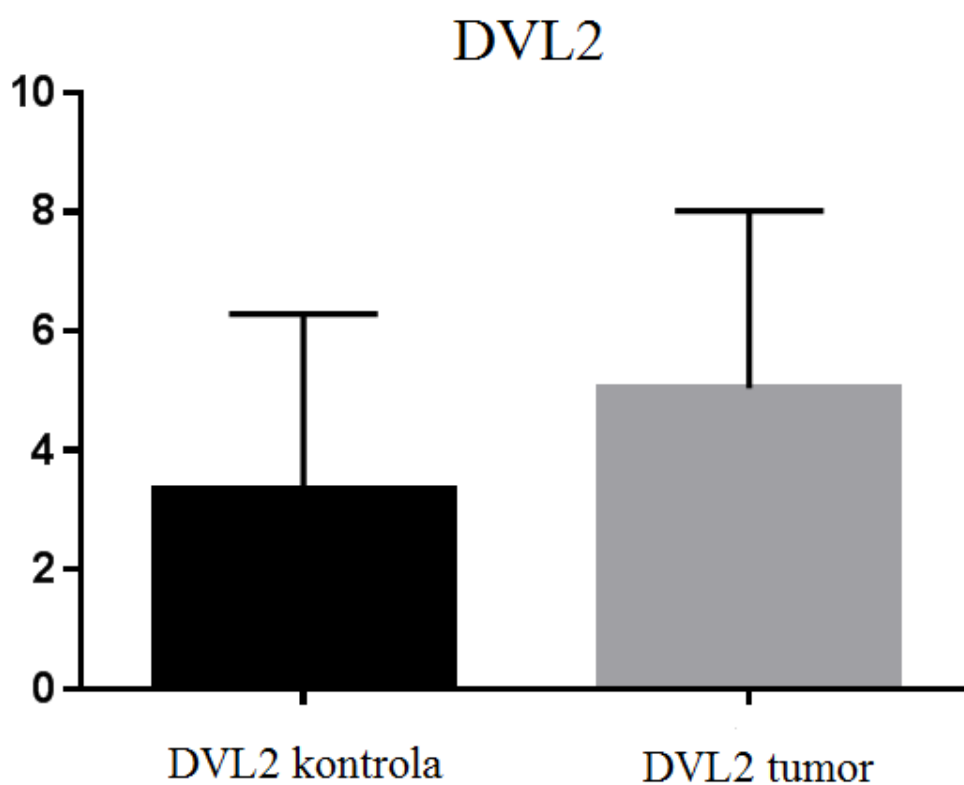
Mann - Whitney test pokazao je statistički značajnu razliku između ekspresije DVL2 u tumorskom tkivu u odnosu na zdravo tkivo želuca ($p=0.0066$). Količina ekspresije DVL2 proteina bila je viša u tumorskom tkivu u usporedbi sa zdravim tkivom želuca (Slika 1 i 2, Tablica 2).



Slika 1. Ekspresija proteina DVL2 u zdravom tkivu želuca (x200) (A) i difuznom karcinomu želuca (x400) (B)

Tablica 2. Srednja vrijednost, standardna devijacija i standardna greška ekspresije DVL2 u kontrolnom i tumorskom tkivu.

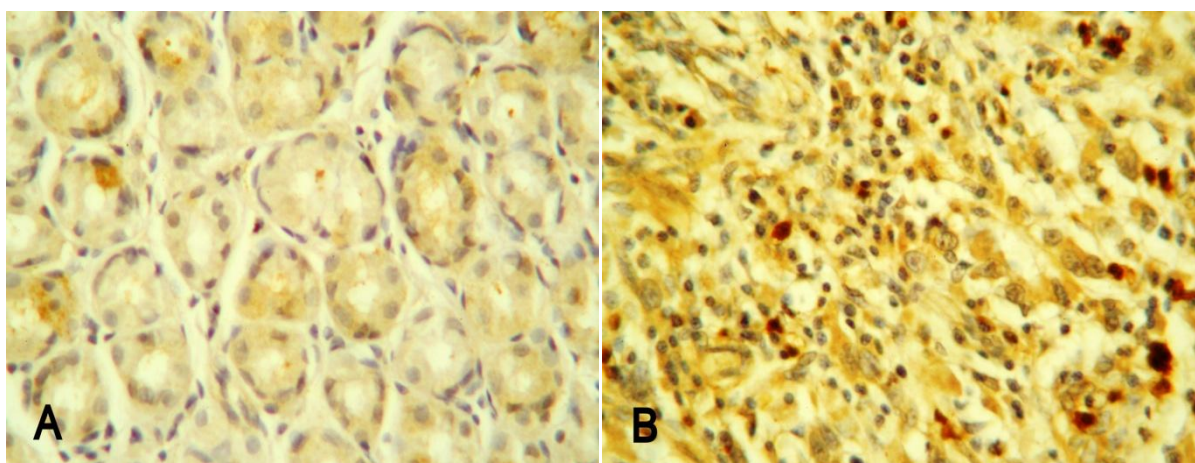
| SKUPINA | SREDNJA VRIJEDNOST | STANDARDNA DEVIJACIJA | STANDARDNA GREŠKA |
|-----------------|--------------------|-----------------------|-------------------|
| Kontrola | 3.317 | 2.970 | 0.464 |
| Tumor | 5.041 | 2.979 | 0.426 |



Slika 2. Grafički prikaz ekspresije DVL2 proteina u zdravom tkivu želuca i tumorskom tkivu

5.2. EKSPRESIJA DVL3 PROTEINA

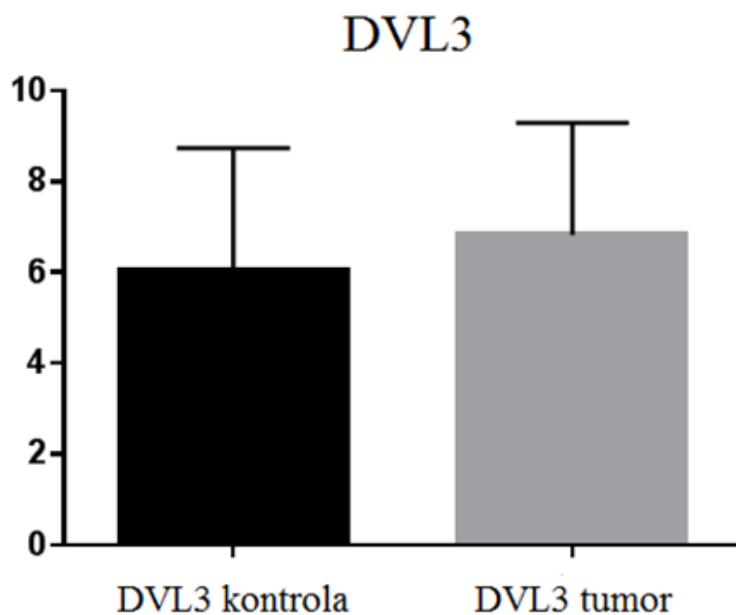
Mann - Whitney test nije pokazao statistički značajnu razliku između ekspresije DVL3 u tumorskom tkivu u odnosu na zdravo tkivo želuca ($p=0.1308$). Količina ekspresije DVL3 proteina bila je podjednaka u tumorskom tkivu i zdravom tkivu želuca (Slika 3 i 4, Tablica 3).



Slika 3. Ekspresija proteina DVL3 u zdravom tkivu želuca (x200) (A) i difuznom karcinomu želuca (x200) (B)

Tablica 3. Srednja vrijednost, standardna devijacija i standardna greška ekspresije DVL3 u kontrolnom i tumorskom tkivu.

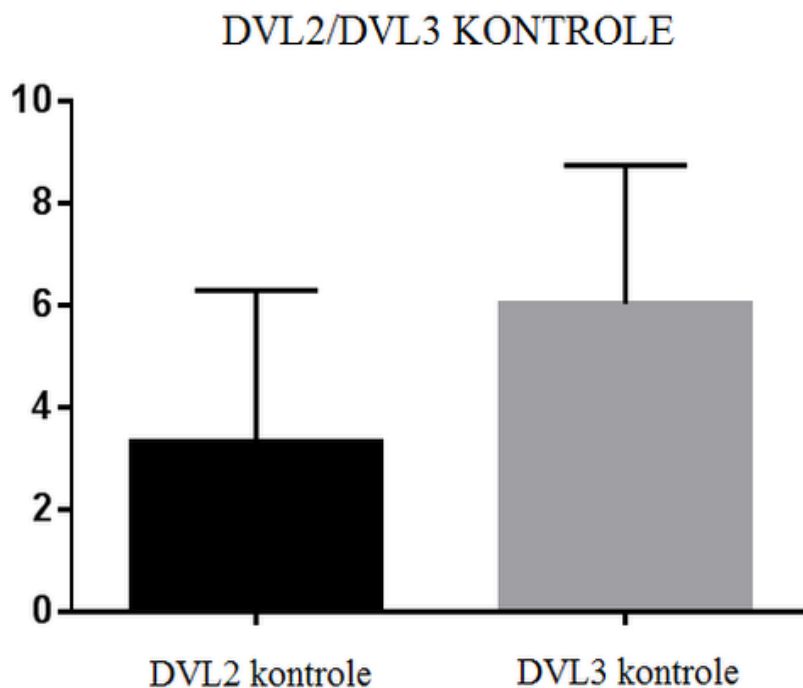
| SKUPINA | SREDNJA VRIJEDNOST | STANDARDNA DEVIJACIJA | STANDARDNA GREŠKA |
|-----------------|--------------------|-----------------------|-------------------|
| Kontrola | 6.020 | 2.719 | 0.389 |
| Tumor | 6.820 | 2.472 | 0.350 |



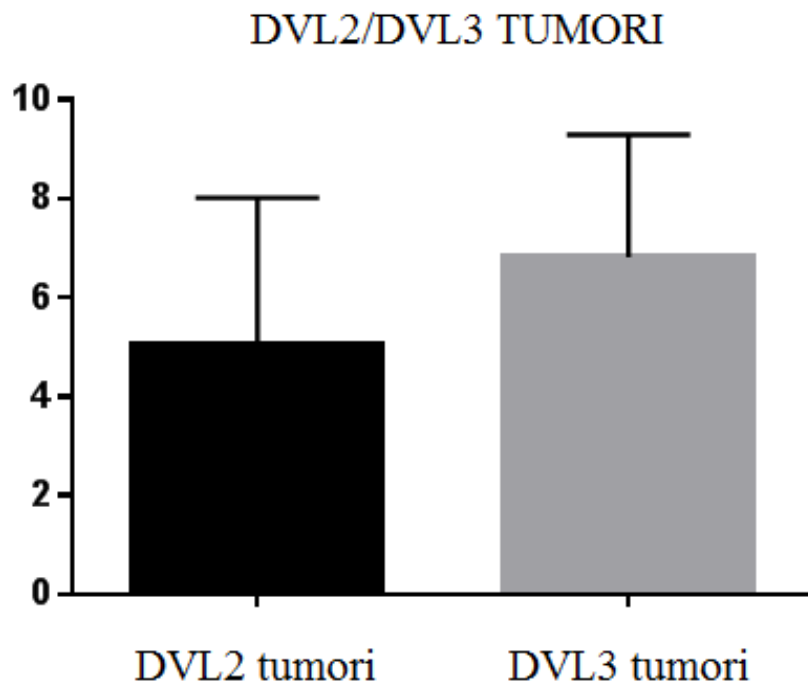
Slika 4. Grafički prikaz ekspresije DVL3 proteina u zdravom tkivu želuca i tumorskom tkivu

5.3. USPOREDBA EKSPRESIJE DVL2 I DVL3 U TUMORSKOM TKIVU I ZDRAVOM TKIVU ŽELUCA

Ekspresija DVL3 proteina statistički je značajno veća u odnosu na DVL2 protein u tumorskom tkivu ($p=0.0022$), kao i u zdravom tkivu želuca ($p<0.0001$) (Slika 5 i 6).



Slika 5. Grafički prikaz ekspresije DVL2 i DVL3 proteina u zdravom tkivu želuca



Slika 6. Grafički prikaz ekspresije DVL2 i DVL3 proteina u tumorskom tkivu

6. RASPRAVA

Cilj ovog rada bio je otkrivanje mogućeg mehanizma koji pridonosi razvoju difuznih karcinoma želuca. Iako se na svjetskoj razini po učestalosti nalazi na petom mjestu, po uzroku smrti od zloćudnih novotvorina rak želuca nalazi se na trećem mjestu. [29] Ta visoka smrtnost poglavito je posljedica kasnog otkrivanja tumora i ograničenih terapijskih mogućnosti s malim postotkom petogodišnjeg preživljenja. Zbog toga se javlja interes za otkrivanjem molekularnih mehanizama koji dovode do razvoja karcinoma želuca kao mogućim tumorskim markerima u ranijoj dijagnostici ovih tumora ili ciljnim molekulama na koje bi djelovala imunološka terapija. Jedan od signalnih putova koji je predmet intenzivnog proučavanja, upravo zbog njegove uloge u razvoju različitih tumora, je Wnt signalni put. Njegova poremećena regulacija zabilježena je u velikom broju tumora. [21,22] U ovom radu analizirana je izraženost proteina obitelji Dishevelled koji su važni sudionici signalnog puta Wnt. Prema dosadašnjim spoznajama postoji pojačana ekspresija Dishevelled proteina u karcinomu pluća nemalih stanica, tumorima dojke, tumorima prostate, karcinomu pločastih stanica vrata maternice, gliomima visokog stupnja te hepatocelularnom karcinomu. [23-28]. Na temelju tih spoznaja pretpostavili smo da bi se pojačana ekspresija DVL2 i DVL3 proteina mogla naći i difuznim karcinomima želuca. Ekspresija DVL2 proteina potvrdila je našu hipotezu. Imunohistokemijskom analizom nađena je statistički značajno jača ekspresija DVL2 proteina u tumorskom tkivu u odnosu na zdravo tkivo želuca ($p < 0.05$). Na temelju toga mogli bismo pretpostaviti kako bi aktivacija Wnt signalnog puta i nizvodno smještenog DVL2 proteina mogla imati ulogu u nastanku ove vrste karcinoma. U istraživanju Pulvirentija i suradnika, 2011. godine, osim pojačane ekspresije DVL2 proteina u ljudskim gliomima, otkriveno je kako je u manjku DVL2 proteina inhibiran nastanak tumora nakon intrakranijalne injekcije stanica glioblastoma u imunodeficientnog miša. [28] Nasuprot DVL2, nije nađena statistički značajno jača ekspresija DVL3 proteina u tumorskom tkivu u usporedbi sa zdravim tkivom želuca. ($p > 0.05$) Ta činjenica opovrgava našu hipotezu o ulozi DVL3 proteina u karcinogenezi difuznog karcinoma želuca. Istraživanje koje je proveo Wei sa suradnicima, 2008. godine, pokazalo da DVL1 i DVL3 imaju različit utjecaj na razinu β -katenina u karcinomu pluća nemalih stanica. [23] Nađena je povezanost između pojačane ekspresije DVL1 proteina i β -katenina, a nije nađena statistički značajna povezanost između pojačane ekspresije DVL3 proteina i β -katenina u primarnom tumoru. To bi moglo ukazivati da je DVL3 medijator Wnt puta neovisnog o β -kateninu. Usporedbom razine ekspresije DVL2 i

DVL3 proteina u tumorskom i zdravom tkivu otkriveno je da je statistički značajno veća ekspresija DVL3 proteina u odnosu na DVL2 kako u tumorima tako i u zdravom tkivu želuca. S obzirom da je tumor u preko 90% analiziranih pacijenata bio dijagnosticiran u kasnom stadiju nije bilo moguće povezati ekspresiju Dishevelled proteina s TNM statusom tumora. U istraživanju karcinoma pluća nemalih stanica nađena je pozitivna povezanost između ekspresije DVL1 i DVL2 proteina te višeg TNM stadija tumora (III.-IV. u odnosu na I.-II.). [23] Prema istraživanju koje je proveo Zhang sa suradnicima, 2017. godine, pojačana ekspresija DVL2 proteina povezana je s višim patohistološkim stadijem tumora, prisutnim metastazama, invazijom vena i lošijom prognozom. Pacijenti s višom ekspresijom imali su niže stope preživljavanja. [29] Do sada ne postoji opsežno istraživanje izraženosti Dishevelled proteina u difuznim karcinomima želuca, zbog čega bi naši rezultati mogli biti podloga za njihovo daljnje proučavanje.

7. ZAKLJUČAK

U ovome istraživanju smo analizom ekspresije proteina DVL2 i DVL3 u difuznim karcinomima želuca, došli do zaključka da je ekspresija DVL2 proteina u tumorskom tkivu statistički značajno jača u odnosu na zdravo tkivo želuca. Nasuprot tomu, ekspresija DVL3 proteina nije pokazala statistički značajno jaču ekspresiju u tumorskom tkivu u usporedbi sa zdravim tkivom želuca. Dobiveni rezultati ukazuju da bi DVL2 mogao imati važnu ulogu u razvoju ove vrste karcinoma. Potrebne su daljnje studije koje bi tu ulogu razjasnile i proučile mogućnost korištenja DVL2 proteina kao tumorskog markera u dijagnostici ili kao ciljne molekule za djelovanje terapije u difuznim karcinomima želuca.

8. ZAHVALE

Zahvaljujem svojoj mentorici, izv.prof.dr.sc. Tamari Nikuševa-Martić, na pruženoj prilici, razumijevanju, podršci i iznimno ugodnoj suradnji koja mi predstavlja neprocjenjivo iskustvo. Zahvaljujem i svim djelatnicima Zavoda za biologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu koji su mi stvorili ugodno radno okruženje i uvijek bili spremni pomoći. Posebno bih se zahvalila i mag. biol. mol. Valentini Karin na nesebičnom dijeljenju znanja i susretljivosti. Zahvaljujem svom dečku te najbližim prijateljima koji su mi davali podršku i uljepšali studiranje.

Na kraju, posebno zahvaljujem svojoj obitelji, na beskrajnoj ljubavi, razumijevanju te ohrabrivanju tijekom cijelog studiranja.

9. POPIS LITERATURE

- [1] Logan CY, Nusse R. The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2004; 20:781–810.
- [2] van Amerongen R, Nusse R. Towards an integrated view of wnt signaling in development. *Development.* 2009; 136(19):3205-14.
- [3] Giles RH, van Es JH, Clevers H. Caught up in a Wnt storm: Wnt signaling in cancer. *Biochim Biophys Acta.* 2003; 1653:1-24.
- [4] Miller JR. The Wnts. *Genome Biol.* 2002; 3:Reviews3001.
- [5] MacDonald BT, Tamai K, He X. Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Dev Cell.* 2009; 17:9-26.
- [6] Kafka A, Bašić-Kinda S, Pećina-Šlaus N. The cellular story of dishevelleds. *Croat Med J.* 2014; 55:459-467.
- [7] Kuhl M, Sheldahl LC, Park M, Miller JR, Moon RT. The Wnt/Ca²⁺ pathway: a new vertebrate Wnt signaling pathway takes shape. *Trends Genet.* 2000; 3:279–283.
- [8] Mikels AJ, Nusse R. Purified Wnt5a Protein Activates or Inhibits β -Catenin–TCF Signaling Depending on Receptor Context. *PLoS Biology.* 2006; 4:e115.
- [9] Komiya Y, Habas R.. Wnt signal transduction pathways. *Organogenesis.* 2008; 4:68-75.
- [10] Wang, Y. Wnt/Planar cell polarity signaling: A new paradigm for cancer therapy. *Mol. Cancer Ther.* 2009; 8:2103–2109.
- [11] Wallingford JB, Habas R. The developmental biology of Dishevelled: an enigmatic protein governing cell fate and cell polarity. *Development.* 2005; 132:4421–4436.
- [12] De A. Wnt/Ca²⁺ signaling pathway: a brief overview. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai).* 2011; 43(10):745-56.
- [13] Sheldahl LC, Slusarski DC, Pandur P, Miller JR, Kuhl M, Moon RT. Dishevelled activates Ca²⁺ flux, PKC, and CamKII in vertebrate embryos. *J Cell Biol.* 2003; 161:769–777.

- [14] Wang H, Lee Y, Malbon CC. PDE6 is an effector for the Wnt/Ca²⁺/cGMP-signalling pathway in development. *Biochem Soc Trans.* 2004; 32(Pt 5):792-796.
- [15] Klingensmith J, Nusse R, Perrimon N. The *Drosophila* segment polarity gene *dishevelled* encodes a novel protein required for response to the wingless signal. *Genes Dev.* 1994; 8:118–130
- [16] Pizzuti A, Amati F, Calabrese G, Mari A, Colosimo A, Silani V, et al. cDNA characterization and chromosomal mapping of two human homologs of the *Drosophila* *dishevelled* polarity gene. *Hum Mol Genet.* 1996; 5:953–8.
- [17] Semënov MV, Snyder M. Human *dishevelled* genes constitute a DHR-containing multigene family. *Genomics.* 1997; 42:302–10.
- [18] Strovel ET, Sussman DJ. Transient overexpression of murine *dishevelled* genes results in apoptotic cell death. *Exp Cell Res.* 1999; 253:637–648.
- [19] Lee YN, Gao Y, Wang H. Differential mediation of the Wnt canonical pathway by mammalian *Dishevelleds*-1, -2, and -3. *Cell Signal.* 2008; 20(2):443-452.
- [20] Wong HC, Mao J, Nguyen JT, et al. Structural basis of the recognition of the *Dishevelled* DEP domain in the Wnt signaling pathway. *Nat Struct Biol.* 2000; 7(12):1178-1184.
- [21] Polakis P. Wnt Signaling in Cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2012; 4(5):a008052.
- [22] Tai D, Wells K, Arcaroli J, et al. Targeting the WNT Signaling Pathway in Cancer Therapeutics. *Oncologist.* 2015; 20(10):1189-1198.
- [23] Wei Q, Zhao Y, Yang Z-Q, Dong Q-Z, Dong X-J, Han Y, et al. *Dishevelled* family proteins are expressed in non-small cell lung cancer and function differentially on tumor progression. *Lung Cancer.* 2008; 62:181–92.
- [24] Zhao Y, Yang Z-Q, Wang Y, Miao Y, Liu Y, Dai S-D, et al. *Dishevelled*-1 and *Dishevelled*-3 affect cell invasion mainly through canonical and noncanonical Wnt pathway, respectively, and associate with poor prognosis in nonsmall cell lung cancer. *Mol Carcinog.* 2010; 49:760–70.

- [25] Nagahata T, Shimada T, Harada A, Nagai H, Onda M, Yokoyama S, et al. Amplification, up-regulation and over-expression of DVL-1, the human counterpart of the *Drosophila* disheveled gene, in primary breast cancers. *Cancer Sci.* 2003; 94:515–18.
- [26] Mizutani K, Miyamoto S, Nagahata T, Konishi N, Emi M, Onda M. Upregulation and overexpression of DVL1, the human counterpart of the *Drosophila* dishevelled gene, in prostate cancer. *Tumori.* 2005; 91:546–51.
- [27] Okino K, Nagai H, Hatta M, Nagahata T, Yoneyama K, Ohta Y, et al. Upregulation and overproduction of DVL-1, the human counterpart of the *Drosophila* dishevelled gene, in cervical squamous cell carcinoma. *Oncol Rep* 2003; 10:1219e23.
- [28] Pulvirenti T, Van Der Heijden M, Droms LA, Huse JT, Tabar V, Hall A. Dishevelled 2 signaling promotes self-renewal and tumorigenicity in human gliomas. *Cancer Res.* 2011; 71:7280–90.
- [29] Zhang C, Li C, Chen X, Zhou Y, Yin B, Ni R, Zhang Y, Liu J. Overexpression of dishevelled 2 is involved in tumor metastasis and is associated with poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *Clin Transl Oncol.* 2017; 19(12):1507-1517.
- [30] WHO, International Agency for research on Cancer, GLOBOCAN 2012: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012. (pristupljeno 20.04.2018.). Dostupno na: <http://gco.iarc.fr/today/home>
- [31] Hrvatski zavod za javno zdravstvo, Registar za rak Republike Hrvatske. Incidencija raka u Hrvatskoj 2015., Bilten 40, Zagreb, 2018.
- [32] Yusefi AR, Bagheri Lankarani K, Bastani P, Radinmanesh, Kavosi Z. Risk Factors for Gastric Cancer: A Systematic Review. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2018; 19(3):591-603.
- [33] World Cancer Research Fund / American Institute for Cancer Research. Food, Nutrition, Physical Activity, and the Prevention of Cancer: a Global Perspective. Washington DC: AICR, 2007.
- [34] World Health Organization Classification of Tumours: WHO Classification of Tumours of the Digestive System. Lyon, France: IARC Press; 2010

- [35] Lauren P. The two histological main types of gastric carcinoma: diffuse and so-called intestinal-type carcinoma. An attempt at a histo-clinical classification. *Acta Pathol Microbiol Scand.* 1965; 64:31–49.
- [36] Fletcher CDM. *Diagnostic Histopathology of Tumors*, 4. izd. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2013; str. 396-400.
- [37] Oliveira C, Pinheiro H, Figueiredo J, Seruca R, Carneiro F. Familial gastric cancer: genetic susceptibility, pathology, and implications for management. *Lancet Oncol.* 2015; 16:e60–e70.
- [38] Guilford P, Hopkins J, Harraway J, et al. E-cadherin germline mutations in familial gastric cancer. *Nature* 1998; 392:402–05.
- [39] Fitzgerald RC, Hardwick R, Huntsman D, et al. Hereditary diffuse gastric cancer: updated consensus guidelines for clinical management and directions for future research. *J Med Genet* 2010; 47:436–44.
- [40] Oliveira C, Senz J, Kaurah P, Pinheiro H, Sanges R, Haegert A, Corso G, Schouten J, Fitzgerald R, Vogelsang H, et al. Germline CDH1 deletions in hereditary diffuse gastric cancer families. *Hum Mol Genet.* 2009; 18:1545–1555.
- [41] Majewski IJ, Kluijt I, Cats A, et al. An alpha-E-catenin (CTNNA1) mutation in hereditary diffuse gastric cancer. *J Pathol* 2013; 229:621–29.
- [42] Kardum V, Karin V, Glibo M, Skrtic A, Nikuseva Martić T, Ibisević N, Skenderić F, Vranic S, Serman L. Methylation-associated silencing of SFRP1 gene in high-grade serous ovarian carcinomas. *Ann Diagn Pathol.* 2017; 31:45-49.

10. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 28.07.1994. godine u Zagrebu. Pohađala sam Osnovnu školu Matka Laginje u Zagrebu, a srednjoškolsko obrazovanje stekla sam u II. gimnaziji, također u Zagrebu, koju završavam s odličnim uspjehom. Od 2005. do 2011. godine pohađam tečaj francuskog jezika u školi stranih jezika SOVA te kasnije Alliance Française. Tijekom osnovne i srednje škole članica sam pjevačkih zborova Bim-Bam-Bom i Zlatne note. U isto vrijeme rekreativno se bavim sportovima (košarka, atletika, odbojka). Nakon položene državne mature i prijemnog ispita, 2012. godine upisujem Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu. Tijekom cijelog studiranja imala sam status redovnog studenta. Od 2016. do 2018. godine, u laboratoriju na Katedri za biologiju Medicinskog fakulteta, radila sam na projektu istraživanja difuznih karcinoma želuca, a dobivene rezultate koristila sam za izradu svog diplomskog rada. Položila sam BLS i ILS tečajeve, službene tečajeve ERC-a. Tijekom studija radila sam i studentske poslove vezane uz promidžbu proizvoda. Na drugoj godini studija bila sam članica košarkaške sekcije Medicinskog fakulteta. Studij sam završila 2018. godine u redovnom roku. Dobro se snalazim na osobnom računalu, aktivno se koristim engleskim jezikom, a pasivno njemačkim i francuskim.