

Sveučilište u Zagrebu

Medicinski fakultet

Ivana Milošević

**IMUNOHISTOKEMIJSKA IZRAŽENOST PROTEINA BORIS I STAM-2 U TUMORIMA
ZAMETNIH STANICA TESTISA**



Zagreb, 2019.

Ovaj rad izrađen je u Kliničkom zavodu za patologiju „Ljudevit Jurak“, u Kliničkom bolničkom centru Sestre milosrdnice u Zagrebu te na Zavodu za patologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod vodstvom prof. dr. sc. Bože Krušlina i predan je na ocjenu u akademskoj godini 2018./2019.

POPIS KRATICA

ABC- kompleks avidina i biotina (*engl. avidin-biotin complex*)

AFP- α - fetoprotein (*engl. alpha-fetoprotein*)

BORIS- *engl. Brother of the Regulator of Imprinted Sites*

CD30- diferencijacijski biljeg 30 (*engl. cluster of differentiation 30*)

COPII- obložni bjelančevinski kompleks II (*engl. coat protein II*)

CTCF- *engl. CCCTC-binding factor*

CTCFL- *engl. CCCTC-binding factor-like*

CTGF- obitelj gena raka testisa (*engl. cancer testis gene family*)

ERES- izlazna mjesta endoplazmatskog retikuluma (*engl. endoplasmatic reticulum exit sites*)

ESCRT - endosomski razvrstavajući kompleks nužan za transport (*engl. endosomal sorting complex required for transport*)

GCNIS- in situ novotvorina zametnih stanica (*engl. germ cell neoplasia in situ*)

GIST- gastrointestinalni stromalni tumor (*engl. gastrointestinal stromal tumor*)

GM-CSF- čimbenik poticanja kolonija granulocita/makrofaga (*engl. granulocyte macrophage colony-stimulating factor*)

Hbp- protein koji veže Hrs (*engl. Hrs-binding protein*)

hCG- humani korionski gonadotropin (*engl. human chorionic gonadotropin*)

H-E- bojenje hemalaun-eozin

Hrs- supstrat za tirozin kinazu reguliranu hepatocitnim čimbenikom rasta (*engl. Hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate*)

hTERT- humana telomerazna reverzna transkriptaza (*engl. human telomerase reverse transcriptase*)

IB- intenzitet bojanja

IIB- imunohistokemijski indeks bojanja

IL-2- interleukin 2 (*engl. interleukin 2*)

LDH- laktat-dehidrogenaza (*engl. lactate dehydrogenase*)

LSAB- označeni streptavidin-biotin (*engl. labeled streptavidin biotin*)

MGCT- miješani tumori zametnih stanica (*engl. mixed germ cell tumours*)

miRNA- mikro RNA (*engl. micro RNA*)

MSIP- mikrovalna streptavidin imunoperoksidaza (*engl. Microwave Streptavidin ImmunoPeroxidase*)

NANOG- *engl. Homeobox protein NANOG*

OCT- *engl. octamer-binding transcription factor*

PRS- postotak reaktivnih stanica

SOX- *engl. SOX gene family*

STAM-1- Molekula koja prilagođuje prijenos podražaja 1 (*engl. Signal-transducing adaptor molecule 1*)

STAM-2- Molekula koja prilagođuje prijenos podražaja 2 (*engl. Signal-transducing adaptor molecule 2*)

TGCT- tumori zametnih stanica testisa (*engl. testicular germ cell tumours*)

Vps- molekule koje razvrstavaju bjelančevine u vakuoli (*engl. Vacuolar protein sorting*)

WHO- Svjetska zdravstvena organizacija (*engl. World Health Organisation*)

ZF- cinkovi prsti (*engl. zinc-finger*)

SADRŽAJ

SAŽETAK

SUMMARY

1. UVOD	1
2. HIPOTEZA	4
3. OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI.....	4
3.1. Opći cilj	4
3.2. Specifični ciljevi.....	4
4. MATERIJALI I METODE	6
4.1. Materijali	6
4.2. Metode.....	6
4.2.1. Histološka analiza.....	6
4.2.2. Imunohistokemijska analiza	7
4.2.3. Statistička analiza	8
5. REZULTATI.....	9
6. RASPRAVA.....	20
7. ZAKLJUČCI.....	23
8. ZAHVALE	24
9. POPIS LITERATURE	25
10. ŽIVOTOPIS.....	29

SAŽETAK

Ivana Milošević

IMUNOHISTOKEMIJSKA IZRAŽENOST PROTEINA BORIS I STAM-2 U TUMORIMA ZAMETNIH STANICA TESTISA

Tumori zametnih stanica testisa su najčešći tumori mladih muškaraca u periodu od puberteta do 40 godina. U Republici Hrvatskoj i Republici Sloveniji se bilježi najveći porast incidencije TGCT-a od svih zemalja Europe. Naglasak ove studije je na skupini seminoma i neseminoma adolescenata i mlade odrasle dobi. U ovom istraživanju po prvi put je analizirana imunohistokemijska izraženost BORIS-a i STAM-2 u TGCT-ima, na uzorku od 61 pacijenta. Ova dva proteina sudjeluju u unutarstaničnoj signalizaciji te se smatra da su povezani s aktivacijom protoonkogena. Utvrđena je pozitivna reakcija na BORIS u 100% analiziranih uzoraka, neovisno o histološkoj građi, dok je reakcija na STAM-2 bila slaba ili je nije bilo. Uočena je razlika u izraženosti STAM-2 u čistim seminomima i seminomskoj komponenti MGCT-a u odnosu na ostale komponente MGCT-a. Iako rezultati ovog istraživanja zahtijevaju daljnje potvrde, ukazuju na potencijalno značenje određivanja ekspresije BORIS-a i STAM-2 u TGCT-ima te njihovom eventualnom doprinosu poboljšanju dijagnostike ovih tumora.

Ključne riječi: tumori zametnih stanica testisa, BORIS, STAM-2, imunohistokemija

SUMMARY

Ivana Milošević

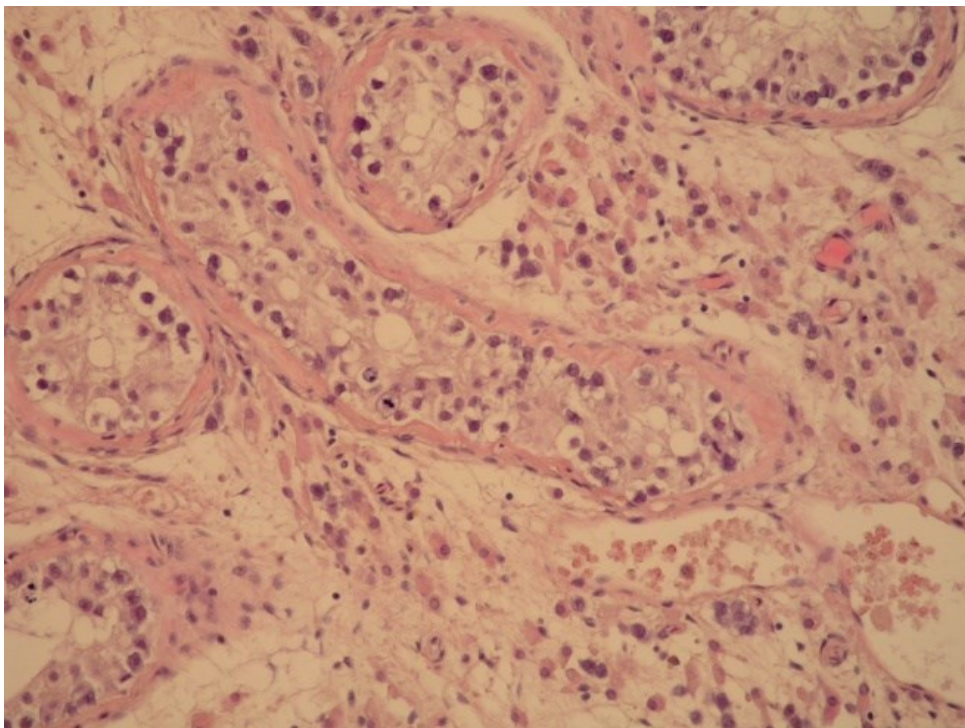
IMMUNOHISTOCHEMICAL EXPRESSION OF BORIS AND STAM-2 IN TESTICULAR GERM CELL TUMOURS

Testicular germ cell tumours are the most common tumours in young males between puberty and the age of 40. Of all European countries the highest increase of incidence is registered in Republic of Croatia and Republic of Slovenia. The aim of this study was to analyse seminomatous and nonseminomatous tumours of adolescents and younger males. This study was the first to analyse the immunohistochemical expression of BORIS and STAM-2 in TGCTs, in 61 samples. These two proteins play a role in intracellular signalisation and are considered to be involved in activation of protooncogenes. All analysed samples were BORIS-positive, regardless of histological type, whereas the reaction to STAM-2 was weak or absent. There was a difference in the expression of STAM-2 in pure seminomatous tumours and seminomatous component of MGCTs in comparison with other components of MGCTs. Although this study requires further confirmation, it shows the potential significance of determining BORIS and STAM-2 expression and their possible contribution in the improvement of diagnosing TGCTs.

Key words: testicular germ cell tumours, BORIS, STAM-2, immunohistochemistry

1. UVOD

Tumori zametnih stanica testisa (engl. testicular germ cell tumours, TGCT) su najčešći tumori mladih muškaraca u periodu od puberteta do 40 godina te čine više od 98% tumora testisa (1). TGCT čine oko 1% svih tumora muškog spola (2). Ukupna incidencija je 1,5/100 000, najveća je kod muškaraca bijele rase (preko 12/100 000 u Norveškoj i Švicarskoj), a najmanja u populacijama Afrike i Azije (0,5/100 000) (1,3,4). Posljednjih 40 godina bilježi se porast incidencije (preko 50 % u razvijenim zemljama svijeta) (1,2). U Republici Hrvatskoj i Republici Sloveniji bilježi se najveći porast incidencije TGCT-a od svih zemalja Europe (Registar za rak Republike Hrvatske, Bilten 38, 2015). Većini TGCT-a prethodi intratubularna neoplazija zametnih stanica (Slika 1), tj. inačica *carcinoma in situ* (CIS) za karcinome drugih sijela, a koja se po najnovijoj WHO klasifikaciji tumora testisa iz 2016. godine naziva in situ novotvorina zametnih stanica (engl. germ cell neoplasia in situ, GCNIS) (Litchfield et al., 2015; Reuter, 2005; Ulbright T.M., Amin M.B., Balzer B., 2016).



Slika 1. Intratubularna neoplazija zametnih stanica testisa, HEx200

Tumori zametnih stanica testisa, obzirom na epidemiologiju, histologiju, kliničku sliku te kromosomske abnormalnosti dijele se u tri skupine: teratomi i *yolk sac* tumori neonatalne i dojenačke dobi, seminomi i neseminomi adolescenata i mlađe odrasle dobi te spermatocitni tumori starije dobi (6). U ovom istraživanju naglasak je na seminomima i neseminomima adolescenata i odraslih muškaraca koji čine više od 90% svih TGCT-a (5,7,8). Više od 50% ove skupine čine tumori sastavljeni isključivo od seminomske komponente (tzv. čisti seminomi), dok neseminomi mogu biti sastavljeni od jedne komponente ili, češće, od nekoliko komponenti, a to su seminomska i teratomska komponenta, komponenta *yolk sac* tumora, koriokarcinoma i embrionalnog karcinoma (1,2,9). Postoji nekoliko dokazanih genetskih i okolišnih rizičnih čimbenika od kojih je glavni postojanje tumora u kontralateralnom testisu (10,11). Pozitivna obiteljska anamneza srodnika u prvom koljenu povećava rizik nastanka tumora 6 do 10 puta, učestalija je obostrana pojava bolesti te se kod tih pacijenata tumori pojavljuju u prosjeku 2 do 3 godine ranije (5,12). Kriptorhizam, najvažniji od ostalih rizičnih čimbenika, četverostruko povećava rizik nastanka TGCT-a, neovisno o kirurškoj korekciji. Ostali rizični čimbenici uključuju gonadalnu disgenezu, sindrom androgene neosjetljivosti, izloženost dietilstilbestrolu in utero te izloženost kloriranim ugljikovodicima (5,13,14). U dijagnostici TGCT-ova se koriste serumski markeri: AFP, hCG, LDH i trenutno najosjetljiviji test-kombinacija miRNA i AFP/hCG, a u imunohistokemijskoj analizi kod postavljanja patohistološke dijagnoze i markeri: OCT3/4, SOX2, SOX17, CD30, NANOG i neki drugi (6,15,16). Pozitivna imunohistokemijska reakcija pojedinih markera uvjetovana je promjenama ekspresije tijekom tumorigeneze. Smatra se da seminomi nastaju progresijom GCNIS-a u intratubularni i kasnije infiltrativni seminom. Neseminomski tumori nastaju kada se stanice GCNIS-a ili seminoma reprogramiraju u stanicu embrionalnog karcinoma koja je pluripotentna stanica te je neoplastični ekvivalent humanih matičnih stanica. Iz takve tumorske matične stanice embrionalnog karcinoma nastaju neseminomske komponente miješanih tumora zametnih stanica (engl. mixed germ cell tumours, MGCT) (17).

Svi tumori zametnih stanica dobro reagiraju na kemoterapiju cisplatinom, osim teratoma. Uz visoku kemosenzitivnost, seminomi su i visoko radiosenzitivni (10). S obzirom na dobar odgovor na terapiju, postotak izlječenja TGCT-a je oko 95%, što je više od postotka izlječenja drugih solidnih tumora (9). Međutim, postoje pacijenti koji imaju tumor rezistentan na cisplatinu, a kod kojih je stopa dugogodišnjeg preživljenja samo 10-15% (2,10). Uz navedeno, pojavljuju se i kasne nuspojave kao što su metabolički sindrom, neplodnost, sekundarne zloćudne novotvorine te kardiovaskularne bolesti (2,18). Iz svega navedenog proizlazi važnost daljnjeg istraživanja patogeneze te mogućnosti dijagnostike i liječenja TGCT-a.

U ovom istraživanju ispitivana je imunohistokemijska izraženost dva proteina, STAM-2 i BORIS.

BORIS (engl. Brother of the Regulator of Imprinted Sites) pripada obitelji gena raka testisa (engl. cancer testis gene family, CTGF) (19). Ti geni su normalno izraženi u zametnim stanicama, a prisutna je njihova aberantna ekspresija i u stanicama različitih drugih tipova tumora (20). *BORIS* je gen paralogan *CTCF-u* (engl. CCCTC-binding factor) s kojim dijeli egzone koji kodiraju domenu vezanja za DNA 11 ZF (engl. 11-zinc-finger), ali im se razlikuju N i C terminalni krajevi (21,22). Produkt *BORISA-a* je protein homologan multifunkcionalnom transkripcijskom regulatoru *CTCF-u* te se stoga naziva i *CTCFL* (engl. CCCTC-binding factor-like) (21,23). *CTCF* je normalno prisutan u svim stanicama osim primarnih spermatoocita dok je *BORIS* normalno prisutan isključivo u tim stanicama (22). Moguća je ekspresija *BORIS-a* i u drugim vrstama stanica, no samo u slučaju njegove abnormalne aktivacije do koje dolazi putem demetilacije DNA, isključenja *CTCF-a* te nedostatka funkcionalnog tumor-supresora p53 (19,21,22). Takvom aktivacijom *BORIS-a* dolazi do inhibicije tumor-supresora, kao što su *CTCF* i p130, te reaktivacije nekolicine onkogeni kao npr. humane telomerazne reverzne transkriptaze (engl. human telomerase reverse transcriptase, hTERT) što dovodi do inhibicije apoptoze (21). Ekspresija *BORIS-a* dosad nije istraživana u tumorima testisa, ali je dokazana u mnogim drugim tumorima kao što su karcinomi pločastih stanica glave i vrata, karcinom dojke, pluća, bubrega, mokraćnog mjehura, prostate, jajnika, endometrija, vrata maternice, debelog crijeva, melanom i tumorske stanice bijele krvne loze (20,21,23,24).

Molekula koja prilagođuje prijenos podražaja 2 (engl. Signal-transducing adaptor molecule 2, STAM-2) je produkt ubikvitarno eksprimiranog gena *STAM-2*. Prisutan je na ranim endosomima te zajedno sa *STAM-1* pripada *STAM* obitelji proteina. *STAM-1*, *STAM-2* i supstrat za tirozin kinazu reguliranu hepatocitnim čimbenikom rasta (engl. Hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate, Hrs) su molekule koje razvrstavaju bjelančevine u vakuoli (engl. Vacuolar protein sorting, Vps) te čine endosomski razvrstavajući kompleks nužan za transport (engl. endosomal sorting complex required for transport, ESCRT-0) čija je uloga usmjeravanje monoubikvitiniranih endosomalnih proteina prema lizosomalnoj razgradnji (25–27). Osim navedene funkcije, *STAM-2* sudjeluje i u: prijenosu proteina od endoplazmatskog retikuluma do Golgijevog aparata preko interakcije s obložnim bjelančevinskim kompleksom II (engl. coat protein II, COPII) i proteinima izlaznih mjesta endoplazmatskog retikuluma (engl. endoplasmatic reticulum exit sites, ERES), morfogenezi Golgijevog aparata, regulaciji egzocitoze i unutarstaničnoj signalizaciji. Također dokazana je prisutnost *STAM-2* tijekom embriogeneze miša u raznim tkivima, uključujući i tkivo testisa (Curlin et al., 2012; Rismanchi, Puertollano, & Blackstone, 2009). Razni citokini i čimbenici rasta imaju ulogu u regulaciji funkcija *STAM-2*. Kao odgovor na stimulaciju interleukinom 2 (engl. interleukin 2, IL-2) i čimbenikom poticanja kolonija granulocita/makrofaga (engl. granulocyte macrophage colony-stimulating factor, GM-CSF) dolazi do aktivacije Janus kinaza 2 i 3 te fosforilacije tirozinskih ostataka *STAM-2* što dovodi do indukcije protoonkogeni *c-myc* i *c-fos* (26,27,30). S druge strane, Hrs ima

ulogu u onkogenezi tako što regulira degradaciju tumorsupresorskog proteina E-kadherina te je izrazito eksprimiran u različitim karcinomima, poput karcinoma želuca i debelog crijeva. Povezanost STAM-2 i Hrs-a nije samo u zajedničkom djelovanju u sklopu ESCRT-0 kompleksa već i u tome što je Hrs neophodan za vezanje STAM-2 za rane endosome. Iz tog razloga se STAM-2 još naziva i Hbp (engl. Hrs-binding protein) (25,31). Nedavna istraživanja pokazuju ekspresiju STAM-2 u stanicama gastrointestinalnog stromalnog tumora (25).

Izraženost STAM-2, kao i izraženost BORIS-a, dosad nije određivana u tumorima testisa.

2. HIPOTEZA

Izraženost proteina STAM-2 i BORIS-a slabija je u neseminomskim komponentama tumora zametnih stanica testisa u odnosu na seminome.

3. OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI

3.1. Opći cilj

Ustanoviti izraženost proteina STAM-2 i BORIS u različitim komponentama tumora zametnih stanica testisa.

3.2. Specifični ciljevi

1. Ustanoviti imunohistokemijsku izraženost proteina STAM-2 i BORIS u čistim seminomima
2. Ustanoviti imunohistokemijsku izraženost proteina STAM-2 i BORIS u seminomskoj komponenti miješanih tumora zametnih stanica testisa

3. Ustanoviti imunohistokemijsku izraženost proteina STAM-2 i BORIS u teratomskoj komponenti, komponenti embrionalnog karcinoma, *yolk sac* tumora i koriokarcinoma
4. Usporediti izraženost STAM-2 i BORIS s tipom tumora, veličinom i stadijem

4. MATERIJALI I METODE

4.1. Materijali

Za ovo retrospektivno istraživanje korišteni su uzorci tumora testisa iz arhivskog materijala Kliničkog zavoda za patologiju „Ljudevit Jurak“, 51 bolesnika kojima je u periodu od 2000. do 2014. godine u Kliničkom bolničkom centru Sestre milosrdnice učinjena orhidektomija zbog dijagnoze i liječenja tumora testisa. Podaci o bolesnicima prikupljeni su iz arhive navedenog Zavoda kao i Klinike za urologiju KBC Sestre milosrdnice. Uključeno je i 10 pacijenta čije su biopsije primljene na konzultaciju iz drugih ustanova te nisu imali podatke o TNM stadiju. U istraživanju nisu korišteni osobni podaci koji bi otkrili identitet ili ugrozili privatnost bolesnika. Klinički podaci o bolesnicima, podaci o patohistološkom nalazu i podaci o praćenju bolesnika dostupni su kod voditelja istraživanja, te u arhivi bolesnika KBC Sestre milosrdnice. Svakom bolesniku pridružen je jedinstveni broj kojim je bio uključen u istraživanje, a pravi identitet ispitanika, radi zaštite osobnih podataka bolesnika, je poznat samo istraživačima. Kako smo raspolagali ograničenim brojem protutijela, imunohistokemijska ekspresija BORIS-analizirana je na 56 uzoraka, dok je ekspresija STAM-2 analizirana na 52 uzorka.

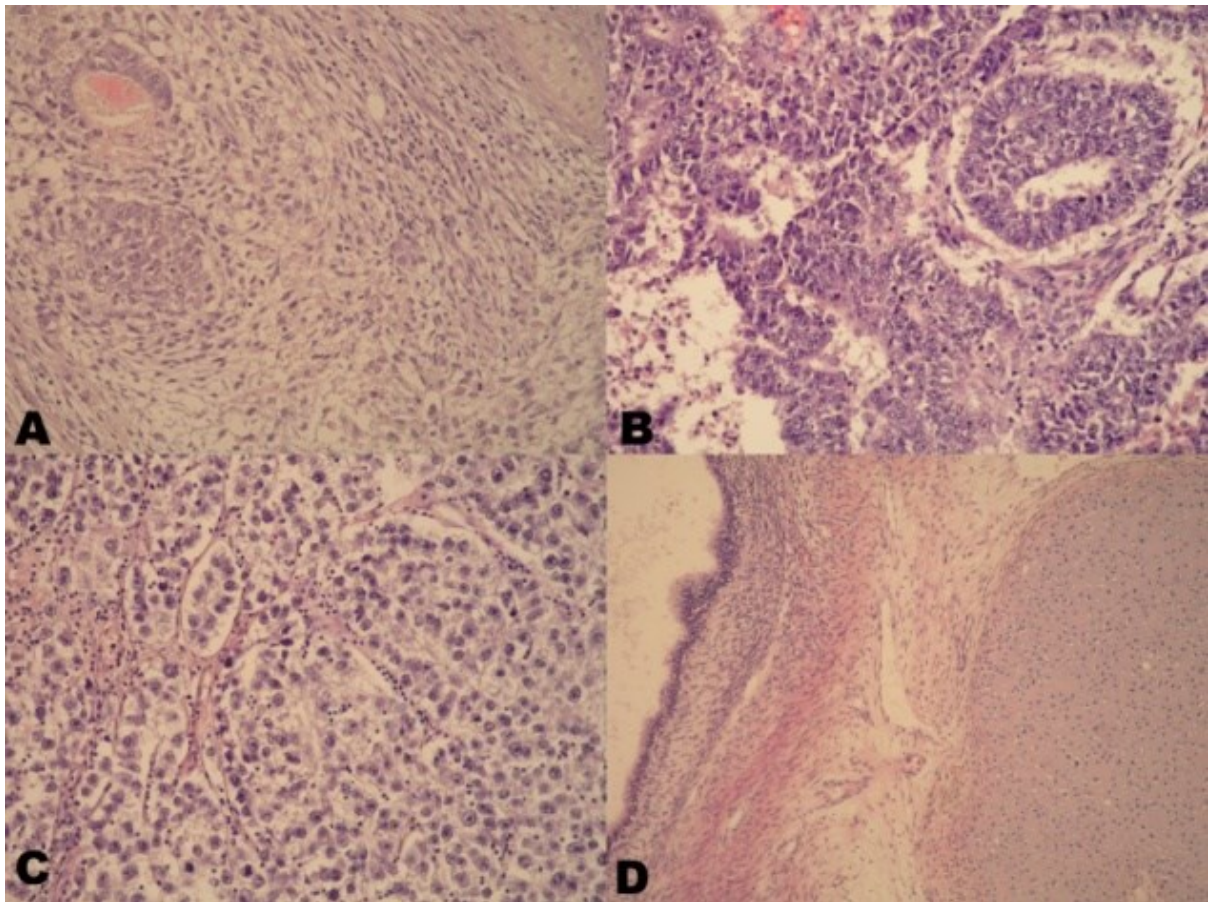
Za istraživanje su dobivene dozvole Etičkog povjerenstva KBC-a Sestre milosrdnice te Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta u Zagrebu.

4.2. Metode

Materijal je obrađen standardnom histološkom obradom koja uključuje fiksaciju tkiva u 10% pufiranom formalinu, dehidriranje u uzlaznom nizu alkohola, uklapanje u parafinske blokove, rezanje na debljinu 5 μ m, deparafiniziranje u ksilolu i bojenje standardnom metodom hemalaun-eozin (H-E).

4.2.1. Histološka analiza

Pregledavani su svi uzorci tumora na malim povećanjima (x40 i x100) HE prereza te su označene pojedine komponente tumora i na taj način se odredio materijal koji je bio izdvojen za tkivnu mikropostrojbu („microarray tissue“). Izgled pojedinih komponenti MGCT-a prikazan je na slici 2. Materijal su pregledavala dva istraživača (IM, AM), uz superviziju mentora. Eventualne razlike rješavane su zajedničkim konsenzusom.



Slika 2. Miješani tumor zametnih stanica testisa, HEx200; A) yolk-sac komponenta; B) komponenta embrionalnog karcinoma; C) seminom; D) teratomska komponenta

4.2.2. Imunohistokemijska analiza

Za imunohistokemijsku analizu koristilo se zečje poliklonalno protutijelo BORIS (razrjeđenje 1:50, Santa Cruz biotechnology) i zečje poliklonalno protutijelo STAM-2 (razrjeđenje 1:100, Abcam, Cambridge, UK). Imunohistokemijska analiza za navedena protutijela učinjena je indirektnom ABC tehnikom, LSAB metodom kao vizualizacijskim sistemom na Dako TechMate TM automatiziranom stroju za imunohistokemijsko bojenje uz upotrebu streptavidin imunoperoxidaze MSIP (engl. Microwave Streptavidin ImmunoPeroxidase) protokola prema preporuci proizvođača. Korištene su odgovarajuće pozitivne kontrole. Za BORIS je kao pozitivna kontrola korišten karcinom dojke, a za STAM-2 normalno crijevo. Nakon imunohistokemijskog bojanja materijal se u cijelosti analizirao, a reakcija je očitavana na 1000 stanica pod velikim vidnim povećanjem mikroskopa ($\times 400$), u mjestu najjače reakcije (tzv. "hot spot").

Imunohistokemijska reakcija na oba protutijela određivana je semikvantitativno uzimajući u obzir intenzitet reakcije kako slijedi: „0“ nema reakcije, „1“ slaba reakcija, „2“ umjerena reakcija, „3“ jaka reakcija.

Postotak imunoreaktivnih stanica određen je kako slijedi: „0“ nema reaktivnih stanica; „1“ <10 % pozitivnih stanica; „2“ 10 – 50 % pozitivnih stanica; „3“ >50 % pozitivnih stanica.

Imunohistokemijski indeks bojanja (IIB) dobiven je kao umnožak intenziteta bojanja (IB) i postotka reaktivnih stanica (PRS): $IIB=IB \times PRS$, a iznosi od 0 do 9. IIB 0 predstavlja odsustvo reakcije, IIB 1-4 predstavlja nisku izraženost, IIB 5-9 predstavlja visoku izraženost.

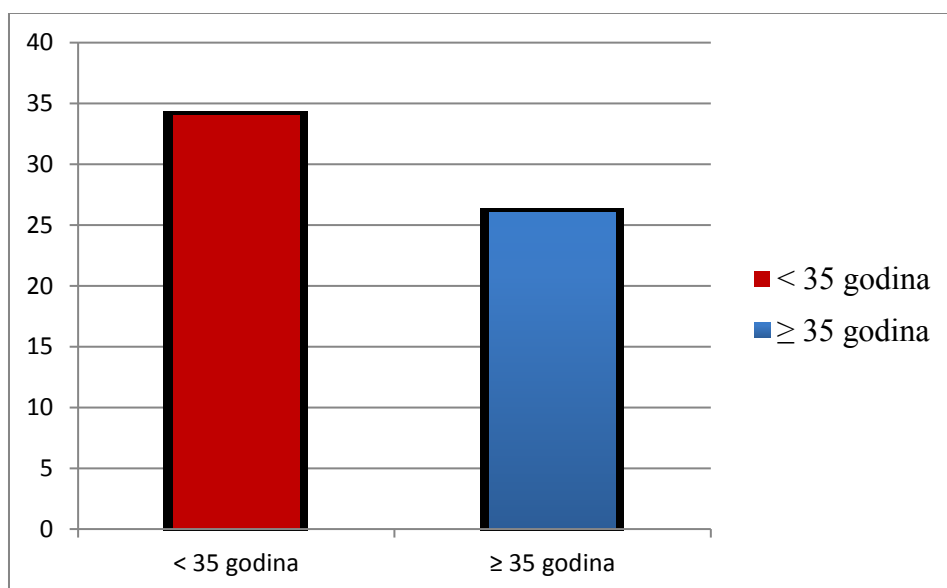
Imunohistokemijsku reakciju očitavala su dva istraživača (IM, AM), uz superviziju mentora te su sva neslaganja raspravljena i određena konsenzusom.

4.2.3. Statistička analiza

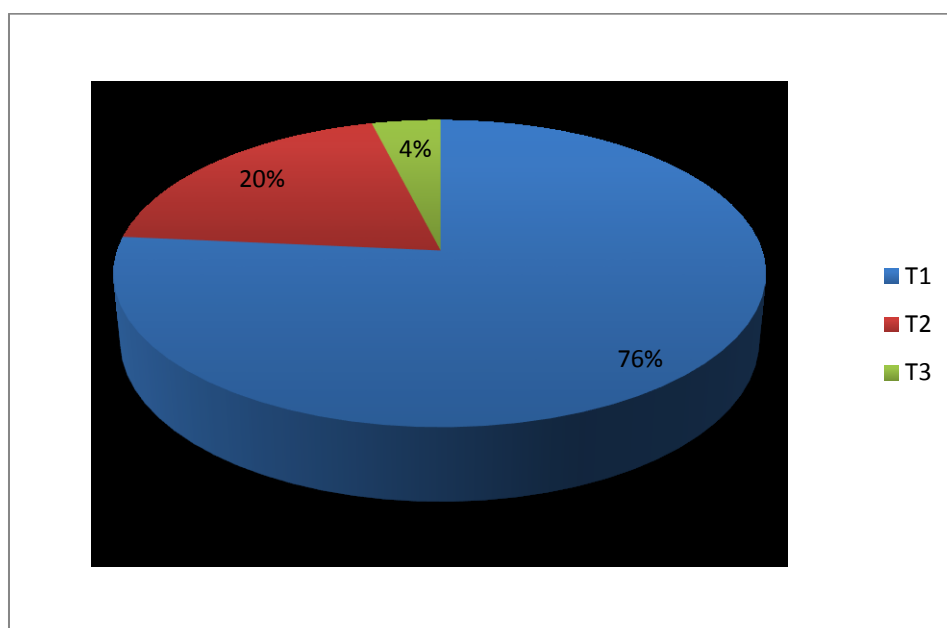
Podaci su prikazani tablično i grafički. Obzirom na veličinu ispitivanog uzorka u statističkoj analizi su korišteni neparametrijski statistički testovi. Razlike između kategorijskih varijabli ispitivane su χ^2 testom. Povezanost bojenja pojedinih seminomskih komponenti, odnosno povezanost između BORIS i STAM-2 intenziteta bojanja procijenjena je pomoću Kendal tau_b koeficijenta korelacije. Apsolutna vrijednost koeficijenta $\geq 0,600$ uzeta je kao mjera jake korelacije. U analizi i grafičkim prikazima korištena je programska podrška IBM SPSS Statistics, verzija 21.0 (www.spss.com). Sve P vrijednosti manje od 0,05 smatrane su statistički značajnima.

5. REZULTATI

Ukupno su analizirani uzorci tumora 61 pacijenata. Za 60 pacijenata je bila poznata dob. Dobni raspon bio je od 19 do 60 godina (srednja vrijednost=34). U skupini od 19 do 35 godina bila su 34 tumora, a u skupini od 35 do 60 godina 26 tumora (Slika 3). Od ukupno 51 pacijenta za koji je bio poznat T stadij, 39 tumora bilo je stadija T1, 10 je bilo stadija T2, a 2 su bila stadija T3 (Slika 4).

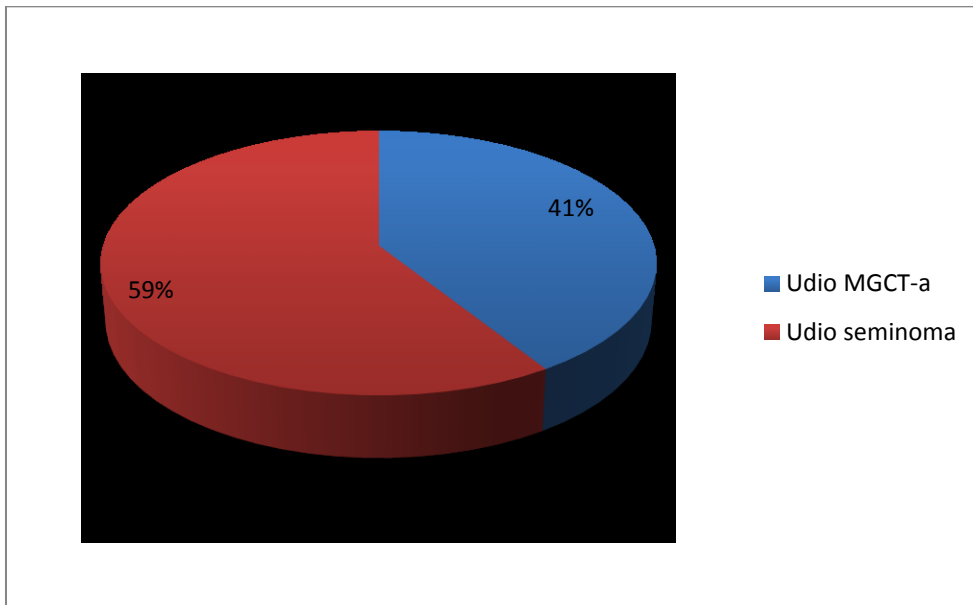


Slika 3. Broj tumora u dobnoj skupini < 35 i ≥35

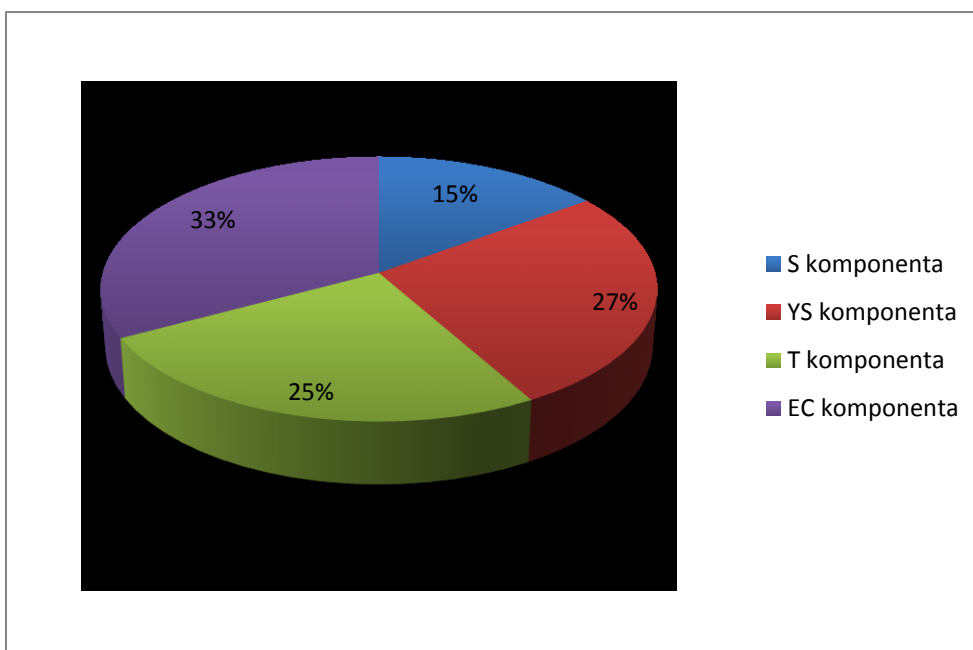


Slika 4. Udio T1, T2 i T3 stadija

Od ukupno 61 uzorka, čistih seminoma bilo je 36, a MGCT-a bilo je 25 (Slika 5). Od 25 MGCT-a seminomska komponenta nađena je u 10, *yolk sac* komponenta u 18, teratomska komponenta u 17 te komponenta embrionalnog karcinoma u 22 uzorka (Slika 6).

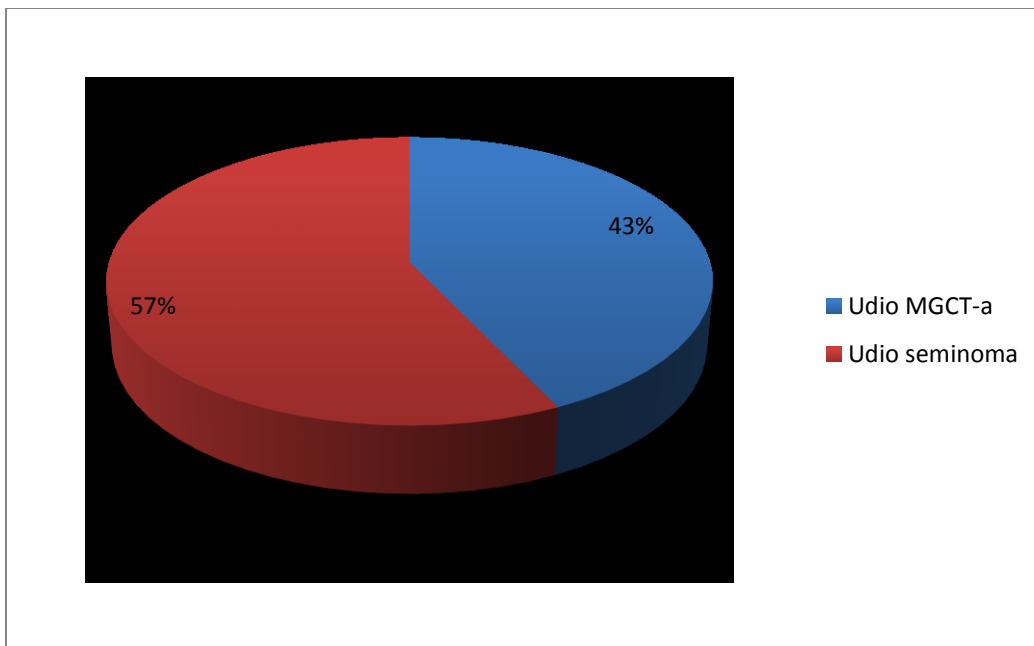


Slika 5. Udio seminoma i MGCT-a u ukupnom broju TGCT-a

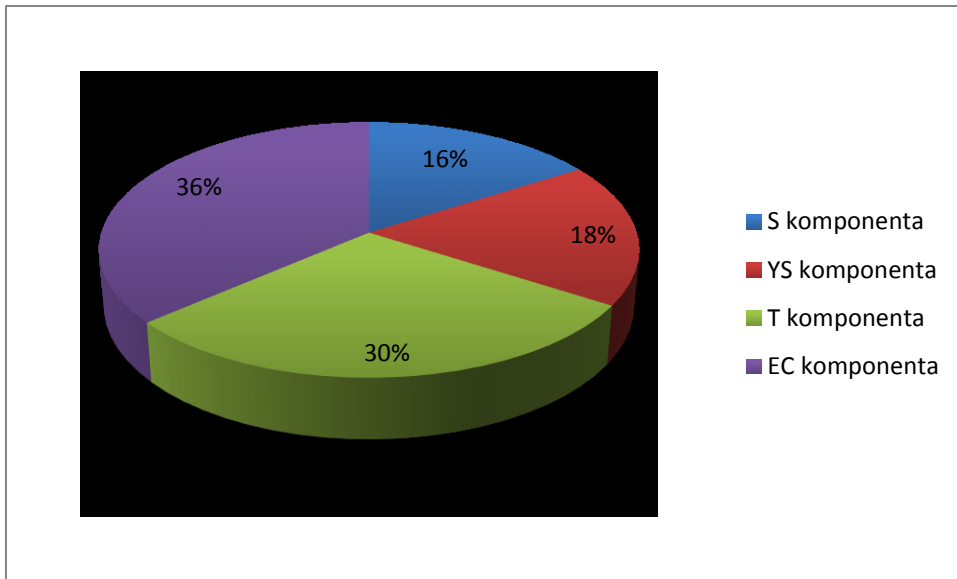


Slika 6. Udio pojedine komponente MGCT-a u ukupnom broju TGCT-a

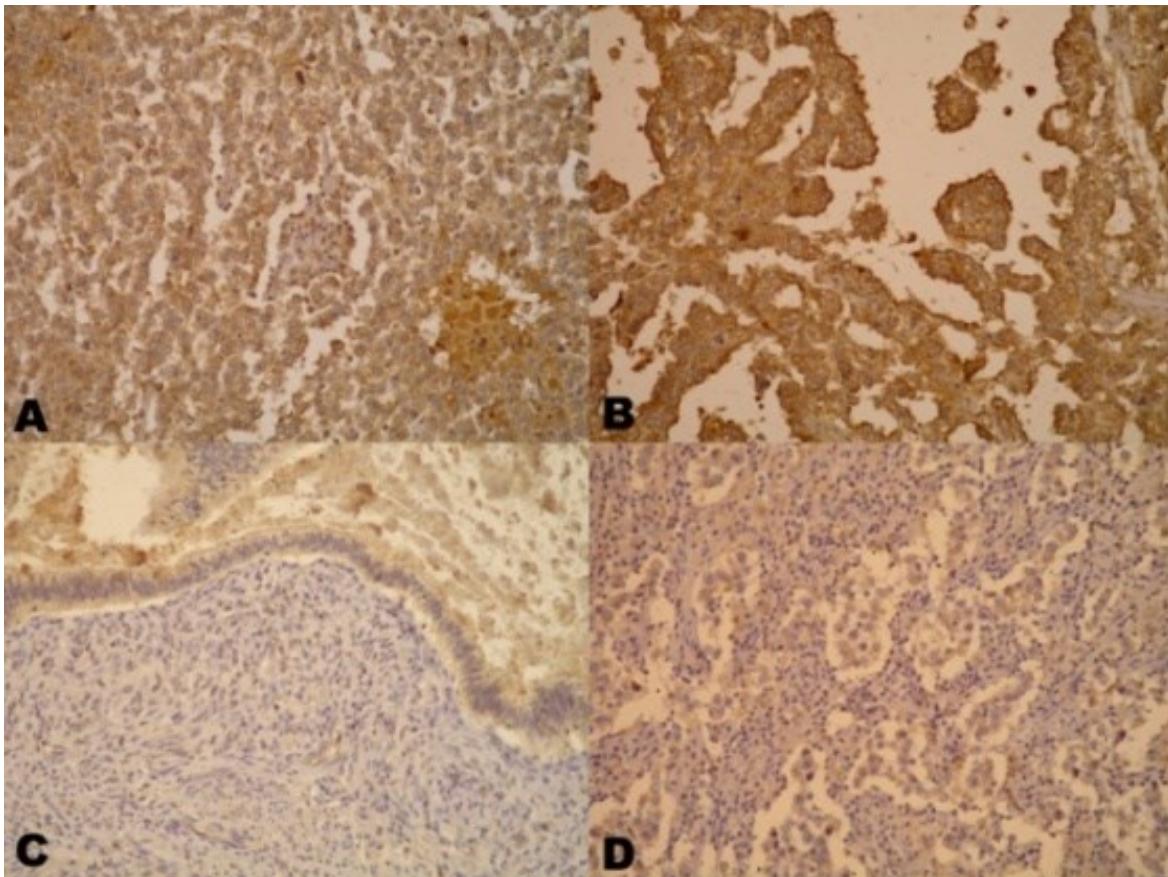
Analizirana je imunohistokemijska izraženost BORIS-a u 56 tumora zametnih stanica testisa. U toj skupini bilo je 32 seminoma i 24 MGCT-a (Slika 7). U 24 MGCT-a seminomska komponenta je bila prisutna u 7 uzoraka, teratomska komponenta u 13 uzoraka, *yolk sac* komponenta u 8 uzoraka te komponenta embrionalnog karcinoma u 16 uzoraka (Slika 8) Analizom imunohistokemijskog bojanja ustanovljena je ekspresija BORIS-a u svim uzorcima, i seminoma i MGCT-a (Slika 9). U skupini seminoma izraženost BORIS-a bila je visoka u 81,3% slučajeva dok je u seminomskoj komponenti MGCT-a bila visoka u 42,8% slučajeva. U komponentama embrionalnog karcinoma i *yolk sac* tumora nađena je visoka izraženost BORIS-a u 75% slučajeva. Teratomska komponenta je također u većem postotku pokazala visoku izraženost (61,5%). U preostalom postotku različitih komponenti MGCT-a izraženost BORIS-a bila je niska. Rezultati imunohistokemijske analize sumirani su u tablici 1.



Slika 7. Udio seminoma i MGCT-a u 56 uzoraka TGCT-a bojanih protutijelom BORIS



Slika 8. Udio pojedine komponente MGCT-a u 56 uzoraka TGCT-a bojanih protutijelom BORIS

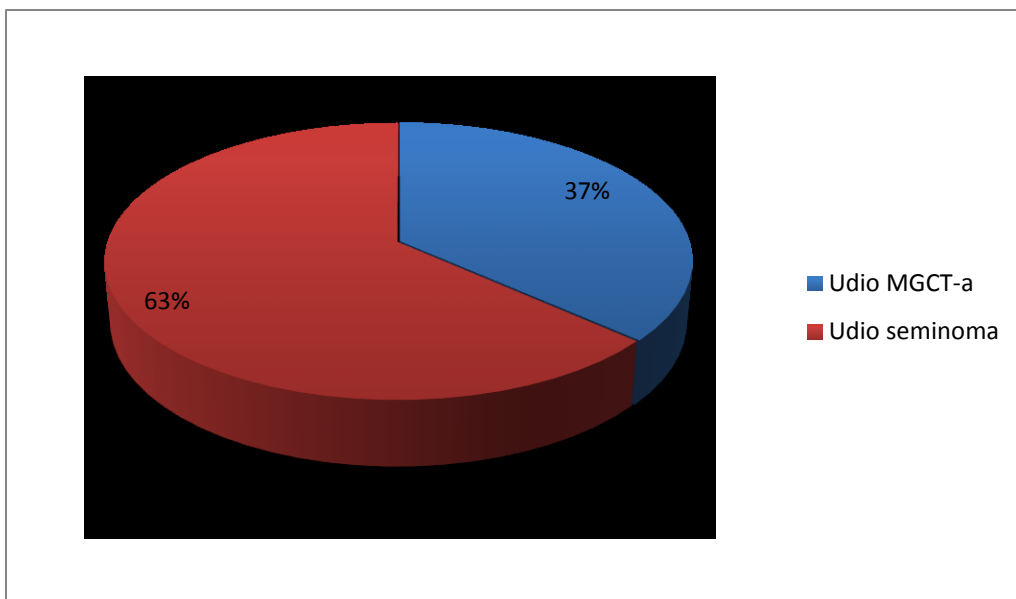


Slika 9. Imunohistokemijska reakcija različitih komponenti s BORIS-om, x200; A) i B) jako izražena reakcija u seminomu (A) i embrionalnom karcinomu (B); C) i D) slabo izražena reakcija u teratomu (C) i seminomu (D)

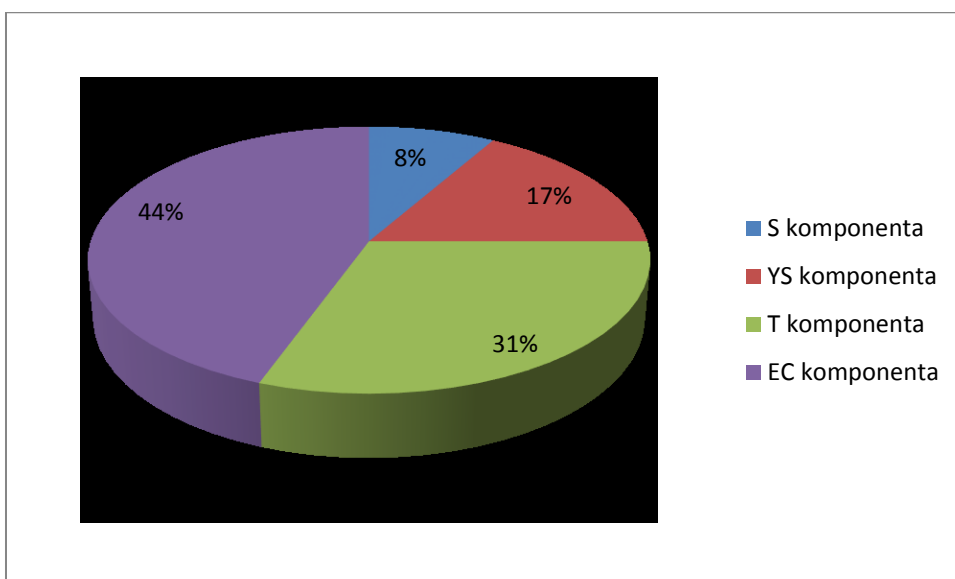
Tablica 1. Imunohistokemijski indeks bojanja 56 uzoraka TGCT-a protutijelom BORIS.

ISI	Seminoma % (N=32)	MGCT-S % (N=7)	MGCT-YS % (N=8)	MGCT-T % (N=13)	MGCT-EC % (N=16)
0	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
1	18,8 (6)	57,1 (4)	25,0 (2)	38,5 (5)	25,0 (4)
2	81,3 (26)	42,8 (3)	75,0 (6)	61,5 (8)	75,0 (12)

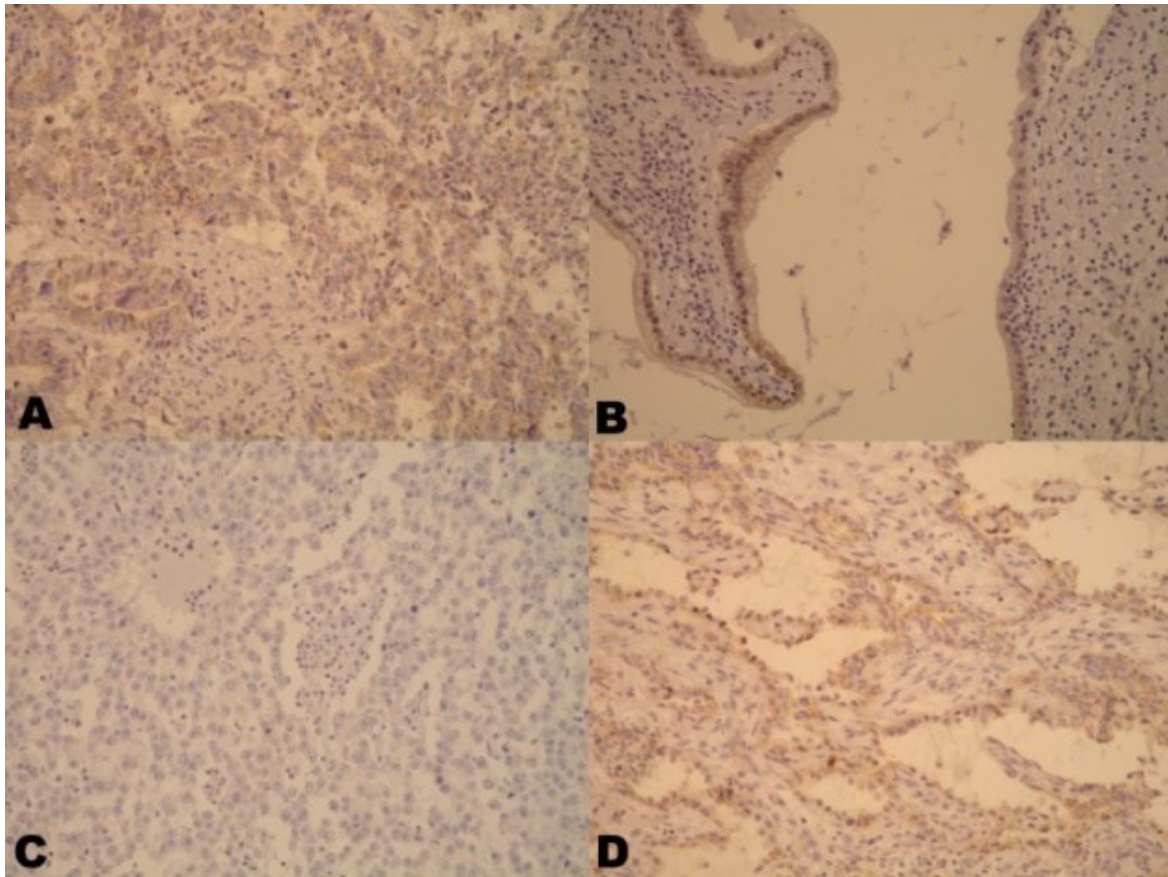
Analizirana je imunohistokemijska izraženost STAM-2 u 52 tumora zametnih stanica testisa. U toj skupini bilo je 33 seminoma i 19 MGCT-a (Slika 10). U 19 MGCT-a seminomska komponenta je bila prisutna u 3 uzoraka, teratomska komponenta u 11 uzoraka, *yolk sac* komponenta u 6 uzoraka te komponenta embrionalnog karcinoma u 16 uzoraka (Slika 11). Analizom imunohistokemijskog bojanja ustanovljena je skupina tumora u obje istraživane grupe koja nije pokazivala izraženost STAM-2, a reakcija je u preostalim tumorima pretežno bila slaba, bez obzira na različite komponente tumora (Slika 12). U skupini seminoma 27,3% uzoraka je imalo nisku izraženost STAM-2 dok visoke izraženosti nije bilo. U seminomskoj komponenti MGCT-a nije bilo izraženosti STAM-2. Niska izraženost STAM-2 pronađena je u 33,3% *yolk sac* komponente, 36,4% teratomske i 62,5% komponente embrionalnog karcinoma. Visoka izraženost STAM-2 pronađena je u 27,3% teratomske komponente i 16,7% *yolk sac* te 6,3% komponente embrionalnog karcinoma. Rezultati imunohistokemijske analize sumirani su u tablici 2.



Slika 10. Udio seminoma i MGCT-a u 52 uzorka TGCT-a bojana protutijelom STAM-2



Slika 11. Udio pojedine komponente MGCT-a u 52 uzorka TGCT-a bojana protutijelom STAM-2

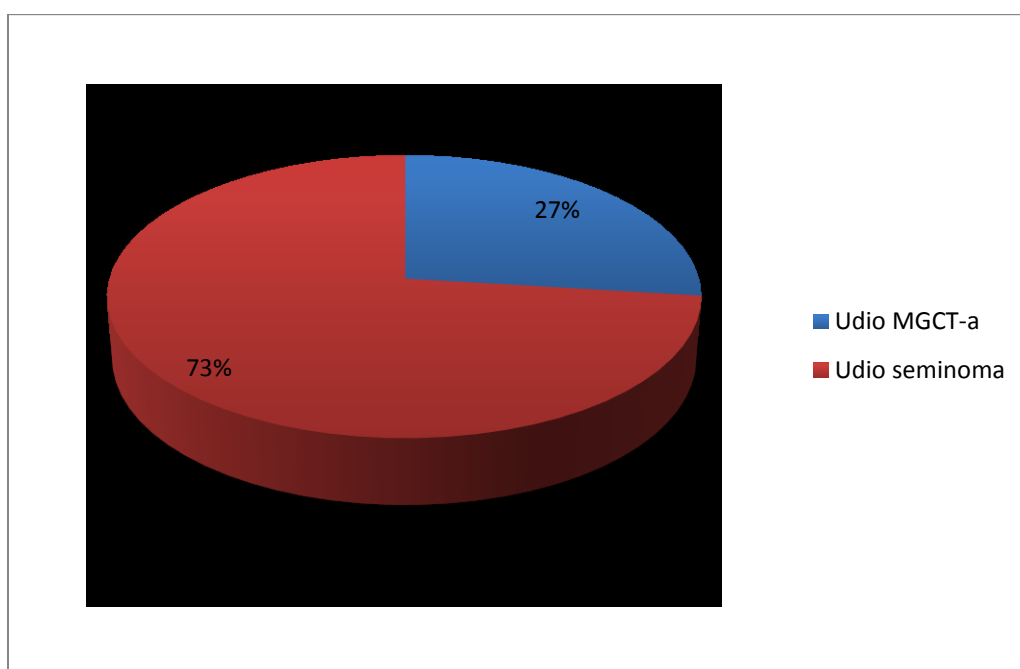


Slika 12. Imunohistokemijska reakcija različitih komponenti sa STAM-2, x200; A), B) i D) slabo izražena reakcija u embrionalnom karcinomu (A), teratomu (B) i yolk sac tumoru (D); C) negativna reakcija u seminomu

Tablica 2. Imunohistokemijski indeks bojanja 52 uzorka TGCT-a protutijelom STAM-2.

ISI	Seminoma % (N=33)	MGCT-S % (N=3)	MGCT-YS % (N=6)	MGCT-T % (N=11)	MGCT-EC % (N=16)
0	72,7 (24)	100,0 (3)	50,0 (3)	36,4 (4)	31,3 (5)
1	27,3 (9)	0 (0)	33,3 (2)	36,4 (6)	62,5 (10)
2	0 (0)	0 (0)	16,7 (1)	27,3 (3)	6,3 (1)

Statističkom analizom rezultata dobivenih nakon imunohistokemijskog bojanja uzoraka protutijelom na BORIS i STAM-2 nađena je statistički značajna pozitivna povezanost čistih seminoma s dobnom skupinom iznad 35 godina. U skupini uzoraka bojanih BORIS-om bilo je 17 seminoma i 7 MGCT-a ($\chi^2=4.021$, $p<0,05$), a u skupini bojanoj sa STAM-2 17 seminoma i 4 MGCT-a ($\chi^2=5.934$, $p<0.02$). Udio seminoma i MGCT-a u dobnoj skupini >35 godina u ukupnom broju pacijenata (61) prikazan je na slici 13.



Slika 13. Udio seminoma i MGCT-a u dobnoj skupini >35 godina u ukupnom broju tumora zametnih stanica testisa (61)

U obje skupine uzoraka (bojanih protutijelom BORIS i protutijelom STAM-2) nije nađena statistički značajna povezanost dobi s lokalizacijom tumora, T stadijem, udjelom pojedinih komponenti MGCT-a te jačinom izraženosti BORIS-a, odnosno STAM-2.

U uzorcima bojanim protutijelom na BORIS utvrđena je statistički značajna negativna povezanost teratomske komponente i T stadija ($\tau_b = -0.572$, $p < 0.02$) što govori da je prisutnost teratomske komponente u MGCT-ima povezana s nižim T stadijem prilikom postavljanja dijagnoze.

Nađena je statistički značajna negativna korelacija izraženosti BORIS-a u *yolk sac* komponenti i seminomskoj komponenti MGCT-a ($\tau_b = -0.745$, $p < 0.05$) što govori da prisutnost seminomske komponente u MGCT-ima korelira s nižom izraženošću BORIS-a u *yolk sac* komponenti. Nije nađena statistički značajna korelacija prisutnosti seminomske komponente s izraženošću BORIS-a u drugim komponentama MGCT-a (Tablica 3). Nadalje, nije nađena statistički značajna korelacija prisutnosti ostalih komponenti MGCT-a s izraženošću BORIS-a u *yolk sac* komponenti (Tablica 4). Za prisutnost seminoma i komponenti MGCT-a te izraženosti BORIS-a u istim, osim gore navedenog, nije nađena statistički značajna korelacija.

Tablica 3. Korelacija prisutnosti seminomske komponente s izraženošću BORIS-a u pojedinim histološkim komponentama MGCT-a i čistom seminomu.

		Seminoma ISI	Yolk Sac Tumor ISI	Teratoma ISI	Carcinoma Embryonale ISI
S komponenta	Correlation Coefficient	,250	-,745	-,318	0,000
	Sig. (2-tailed)	,617	,049	,271	1,000
	N	5	8	13	16

Tablica 4. Korelacija pojedinih histoloških komponenti MGCT-a s izraženosti BORIS-a u *yolk sac* komponenti tumora.

		S komponenta	YS komponenta	T komponenta	EC komponenta
Yolk Sac Tumor ISI	Correlation Coefficient	-,745		-,218	-,333
	Sig. (2-tailed)	,049		,564	,378
	N	8	8	8	8

Nađena je statistički značajna negativna korelacija izraženosti STAM-2 u komponenti embrionalnog karcinoma i *yolk sac* komponente MGCT-a ($\tau_b = -0.552$, $p < 0.04$) što govori da prisutnost *yolk sac* komponente korelira s nižom izraženošću STAM-2 u komponenti embrionalnog karcinoma. Nije nađena statistički značajna korelacija prisutnosti *yolk sac* komponente s izraženošću STAM-2 u drugim komponentama MGCT-a (Tablica 5). Nadalje, nije nađena statistički značajna korelacija prisutnosti ostalih komponenti MGCT-a s izraženošću STAM-2 u komponenti embrionalnog karcinoma (Tablica 6). Za prisutnost čistih seminoma i komponenti MGCT-a te izraženosti STAM-2 u istim, osim gore navedenog, nije nađena statistički značajna korelacija.

Tablica 5. Korelacija prisutnosti *yolk sac* komponente s izraženosti STAM-2 u pojedinim histološkim komponentama tumora.

		Seminoma ISI	Yolk Sac Tumor ISI	Teratoma ISI	Carcinoma Embryonale ISI
YS komponenta	Correlation Coefficient			-,299	-,552
	Sig. (2-tailed)			,317	,034
	N	2	6	11	15

Tablica 6. Korelacija pojedinih histoloških komponenti tumora s izraženosti STAM-2 u komponenti embrionalnog karcinoma tumora

		S komponenta	YS komponenta	T komponenta	EC komponenta
Carcinoma Embryonale ISI	Correlation Coefficient	-,221	-,552	-,236	
	Sig. (2- tailed)	,396	,034	,366	
	N	15	15	15	15

Nije nađena statistički značajna korelacija između imunohistokemijske izraženosti BORIS-a i STAM-2.

6. RASPRAVA

Za liječenje i prognozu TGCT-a, kao i drugih tumora, bitan je patohistološki nalaz i TNM stadij proširenosti bolesti. Budući da još uvijek ne postoji idealan dijagnostički test za razlikovanje pojedinih histoloških komponenti tumora mogu se pojaviti dijagnostičke poteškoće. Kao pomoć u rutinskoj patohistološkoj dijagnostici TGCT-a koriste se imunohistokemijski markeri kao što su OCT3/4, SOX2 i SOX17. OCT3/4 je prisutan u seminomu i embrionalnom karcinomu, SOX2 samo u embrionalnom karcinomu a SOX17 samo u seminomu. Za diferencijaciju seminoma i embrionalnog karcinoma jedan od najkorisnijih markera je CD30 koji je pozitivan u embrionalnom karcinomu, a negativan u seminomu. Od serumskih markera u primjeni su AFP koji je prisutan u *yolk sac* tumoru, hCG prisutan u koriokarcinomu i LDH koji je prisutan u seminomima i neseminomima (16). U određenom postotku pacijenata problem u dijagnozi i praćenju bolesti je nepostojanje korisnih serumskih markera za seminom i embrionalni karcinom. Taj problem je uvelike umanjen otkrićem miRNA u serumu. Kombiniranim testom AFP/hCG i miRNA povećana je osjetljivost na 98%, neovisno o dobi pacijenta i histološkom tipu tumora.

S obzirom na vrijednost imunohistokemijskog bojanja u rutinskoj patohistološkoj dijagnostici u ovom istraživanju analizirana je imunohistokemijska izraženost BORIS-a i STAM-2. Izraženost BORIS-a u odnosu na STAM-2 bila je općenito veća s obzirom da među uzorcima bojanim protutijelom na BORIS nije bilo odsustva reakcije, dok je među uzorcima bojanim protutijelom na STAM-2 bilo odsustva reakcije u svim analiziranim skupinama, a ukoliko je bilo reakcije ona je bila slaba. U skupini seminoma i seminomskoj komponenti TGCT-a ustanovljena je znatno jača izraženost BORIS-a u odnosu na STAM-2. Od ostalih komponenti bojanih sa STAM-2 *yolk sac* komponenta u najvećem je postotku pokazala negativnu reakciju dok je u uzorcima bojanim s BORIS-om u najvećem postotku pokazala visoku izraženost. Komponenta embrionalnog karcinoma bojana na STAM-2 najvećim je dijelom pokazala nisku izraženost dok je u uzorcima bojenim na BORIS najveći postotak pokazao visoku izraženost. Izraženost STAM-2 i BORIS-a u teratomskoj komponenti bila je približno jednaka, ali je visoka izraženost BORIS-a bila značajno veća od STAM-2.

BORIS je izražen u stanicama tijekom spermatogeneze, a stanice embrionalnog karcinoma predstavljaju pluripotentnu matičnu stanicu tumora testisa koja zatim može ići smjerom diferencijacije u embrionalna i ekstraembrionalna tkiva pa je to moguće objašnjenje održane izraženosti BORIS-a u svim oblicima i komponentama TGCT-a. Izraženost BORIS-a pronađena je u različitim karcinomima, kao npr. karcinomu larinksa gdje je 43,8% tumora bilo BORIS-pozitivno te u dojci gdje je BORIS bio izražen u čak 70,7% tumora. U dosadašnjim istraživanjima ustanovljena je pozitivna korelacija izraženosti BORIS-a u stanicama laringealnog karcinoma s dobi pacijenata ≤ 59 godina, slabijom

diferencijacijom tumora te smrtnim ishodom unutar pet godina od kirurškog zahvata (24). Slično tome, nađena je pozitivna korelacija izraženosti BORIS-a u stanicama ezofagealnog karcinoma sa smrtnim ishodom unutar pet godina, neovisno o T stadiju. Uz to nađena je korelacija izraženosti BORIS-a sa zahvaćenošću limfnih čvorova u ranom stadiju ezofagealnog karcinoma (23).

U karcinomu prostate pronađena je ekspresija BORIS-a dok takve izraženosti nema u benignoj hiperplaziji. Izraženost proteina BORIS pozitivno je korelirala s Gleason-ovim zbrojem, T-stadijem i razinama androgenih receptora. Temeljem toga zaključeno je da bi izraženost BORIS-a mogla ukazivati na agresivnije ponašanje karcinoma prostate (32). U našem istraživanju takva korelacija nije dobivena.

Izraženost STAM-2 dosad nije opsežnije proučavana u različitim tumorima, ali se u nedavnom istraživanju analizirala njegova imunohistokemijska izraženost u GIST-u. Postotak STAM-2 pozitivnih stanica (88,2%) je u GIST-u bio puno viši u odnosu na naše rezultate, poglavito u odnosu na seminome i seminomsku komponentu MGCT-a. To se može povezati s činjenicom da je izraženost STAM-2 nedavno otkrivena u Cajalovim intersticijskim stanicama koje su prisutne u GIST-u, ali ih nema u TGCT-ima (25). U studiji o izraženosti STAM-2 u GIST-u nije nađena korelacija izraženosti STAM-2 s veličinom i tipom tumora te proširenošću bolesti. Međutim, nađena je statistički značajna negativna korelacija između postotka STAM-2 reaktivnih stanica (PRS) i broja mitozâ. Potonje upućuje na mogući onkosupresivni učinak STAM-2 u GIST-u (25).

U našem istraživanju nije nađena korelacija izraženosti STAM-2 i proširenosti bolesti, ali izraženost STAM-2 je padala u komponenti embrionalnog karcinoma MGCT-a s pojavom yolk sac komponente u tumoru. Prema „The Human Protein Atlas“, čiji podaci se temelje na mapi proteina u 32 humana tkiva, raspodjela izraženosti proteina STAM-2 varira u normalnim i tumorskim tkivima. Saznanja o raspodjeli pojedinih proteina (više od 20 000 različitih proteina) i njihovoj dinamici dobivena su sekvencioniranjem genoma i spoznajama koji proteini su kodirani različitim genima (33).

Pronađena je izraženost STAM-2 u stanicama karcinoma dojke, kolorektuma, jetre, prostate i pluća, ali i u nekim normalnim tkivima. U zametnim stanicama testisa pronađena je izražena reakcija na STAM-2, u svim stadijima spermatogeneze. Prema našim rezultatima izraženost STAM-2 je odsutna u većini TGCT-a ili je ona slaba. Rijetki TGCT-i imaju izraženost navedenog protutijela koja je jakog intenziteta i/ili se nalazi u više od polovice stanica.

Zasad nisu u potpunosti razjašnjeni patogenetski mehanizmi nastanka TGCT-a. U posljednje vrijeme naglasak je na ulozi epigenetskih modifikacija za koje je u *in vitro* modelima dokazano da igraju ulogu u regulaciji gena tijekom embrionalnog razvitka te također u malignoj transformaciji. Od navedenih, posebno se ističe niska razina metilacije promotora (11). Moguća povezanost BORIS-a i tumora

zametnih stanica je u činjenici da je on normalno prisutan u primarnim spermatocitama i ima ulogu u spermatogenezi, a dokazana je i njegova izraženost u stanicama različitih tumora što se dovodi u vezu s činjenicom da aktivacija *BORIS*-a uzrokuje inhibiciju tumor-supresora te reaktivaciju onkogeni. Nadalje, u TGCT-ima kao jedan od mehanizama patogeneze navodi se hipometilacija DNA, a dokazano je da do abnormalne aktivacije *BORIS*-a dolazi putem demetilacije DNA. Do aktivacije *BORIS*-a također dolazi zbog nedostatka funkcionalnog tumor-supresora p53, a poznato je da utišavanje p53 može dovesti do potpune neosjetljivosti tumora na cisplatinu (11).

STAM-2 smo u TGCT-ima istraživali zbog njegove uloge u unutarstaničnoj signalizaciji i zato što fosforilirani oblik STAM-2 dovodi do indukcije protoonkogeni *c-myc* i *c-fos*. Osim toga, dokazana je njegova prisutnost u tkivu testisa tijekom embrionalnog razvoja miša.

7. ZAKLJUČCI

Kako je pozitivna reakcija na BORIS bila prisutna u 100% analiziranih uzoraka, neovisno o histološkoj građi, zaključujemo da bi se to protutijelo moglo koristiti kao dijagnostički marker za TGCT-e.

Utvrđena je negativna korelacija izraženosti BORIS-a u *yolk sac* tumoru i prisutnosti seminomske komponente MGCT-a te negativna korelacija izraženosti STAM-2 u embrionalnom karcinomu i prisutnosti *yolk sac* komponente MGCT-a. Iako nije u potpunosti jasno značenje ovih negativnih korelacija moguća je potencijalna vrijednost u dijagnostičkom diferenciranju pojedinih komponenti MGCT-a.

S obzirom na potencijalno značenje rezultata ove studije valjalo bi provesti daljnja istraživanja na većem broju uzoraka, uz upotrebu sofisticiranijih metoda i uz kliničko praćenje učinka liječenja da bi se bolje razjasnila važnost određivanja ekspresije BORIS-a i STAM-2 u patogenezi, dijagnostici i liječenju TGCT-a.

8. ZAHVALE

Zahvaljujem se svom mentoru prof.dr.sc. Boži Krušlinu na predloženoj temi, stručnom vodstvu, savjetima i ohrabrenjima, a dr.sc. Moniki Ulamec na izuzetnoj strpljivosti tijekom svih izazova ovog istraživanja te izdvojenom vremenu za sve korisne i praktične savjete.

Zahvaljujem se i doc.dr.sc. Milanu Miloševiću na pomoći oko statistike i objašnjenjima kada nešto nije bilo jasno. Hvala dragoj prijateljici, dr. Ani Mesić, koautorici rada, koja mi ga je nesebično prepustila za prijavu diplomskog rada.

Posebno hvala mojoj obitelji i prijateljima koji su bili uz mene kroz dobra i loša razdoblja, ohrabivali me, podržavali i poticali da nikad ne odustanem od ostvarenja svog sna, bez obzira na brojne prepreke koje su se našle na putu.

9. POPIS LITERATURE

1. Trabert B, Chen J, Devesa SS, Bray F, McGlynn KA. International patterns and trends in testicular cancer incidence, overall and by histologic subtype, 1973-2007. *Andrology* [Internet]. 2015 Jan [cited 2016 Apr 15];3(1):4–12. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25331326>
2. Litchfield K, Shipley J, Turnbull C. Common variants identified in genome-wide association studies of testicular germ cell tumour: An update, biological insights and clinical application. *Andrology*. 2015;3:34–46.
3. Shanmugalingam T, Soultati A, Chowdhury S, Rudman S, Van Hemelrijck M. Global incidence and outcome of testicular cancer. *Clin Epidemiol* [Internet]. 2013 [cited 2016 Apr 15];5:417–27. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24204171>
4. Znaor A, Lortet-Tieulent J, Laversanne M, Jemal A, Bray F. International testicular cancer incidence trends: generational transitions in 38 countries 1900-1990. *Cancer Causes Control* [Internet]. 2015 Jan [cited 2016 Apr 15];26(1):151–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25388800>
5. Reuter VE. Origins and molecular biology of testicular germ cell tumors. *Mod Pathol* [Internet]. 2005;18 Suppl 2:S51-60. Available from: <http://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/elink.fcgi?dbfrom=pubmed&id=15761466&retmode=ref&cmd=prlinks%5Cnpapers3://publication/doi/10.1038/modpathol.3800309>
6. Looijenga LHJ, Stoop H, Biermann K. Testicular cancer: biology and biomarkers. *Virchows Arch* [Internet]. 2014;464:301–13. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24487784>
7. Oosterhuis JW, Looijenga LHJ. Testicular germ-cell tumours in a broader perspective. *Nat Rev Cancer* [Internet]. 2005 Mar [cited 2016 Apr 15];5(3):210–22. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15738984>
8. Stang a., Trabert B, Wentzensen N, Cook MB, Rusner C, Oosterhuis JW, et al. Gonadal and extragonadal germ cell tumours in the United States, 1973-2007. *Int J Androl*. 2012;35(4):616–25.
9. Looijenga LH, Oosterhuis JW. Pathogenesis of testicular germ cell tumours. *Rev Reprod*. 1999;4:90–100.
10. Ehrlich Y, Margel D, Lubin MA, Baniel J. Advances in the treatment of testicular cancer. *Transl Androl Urol* [Internet]. 2015 Jun [cited 2016 Apr 15];4(3):381–90. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26816836>

11. Gonzalez-Exposito R, Merino M, Aguayo C. Molecular biology of testicular germ cell tumors. *Clin Transl Oncol* [Internet]. 2015 Oct 19 [cited 2016 Apr 15]; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26482724>
12. Greene MH, Mai PL, Loud JT, Pathak A, Peters JA, Mirabello L, et al. Familial testicular germ cell tumors (FTGCT) - overview of a multidisciplinary etiologic study. *Andrology* [Internet]. 2015 Jan [cited 2016 Apr 15];3(1):47–58. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25303766>
13. Strohsnitter WC, Noller KL, Hoover RN, Robboy SJ, Palmer JR, Titus-Ernstoff L, et al. Cancer risk in men exposed in utero to diethylstilbestrol. *J Natl Cancer Inst* [Internet]. 2001 Apr 4 [cited 2016 Apr 15];93(7):545–51. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11287449>
14. McGlynn KA, Trabert B. Adolescent and adult risk factors for testicular cancer. *Nat Rev Urol* [Internet]. 2012 Jun [cited 2016 Apr 15];9(6):339–49. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22508459>
15. Berney DM, Shamash J, Pieroni K, Oliver RT. Loss of CD30 expression in metastatic embryonal carcinoma: the effects of chemotherapy? *Histopathology* [Internet]. 2001 Oct [cited 2016 Apr 15];39(4):382–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11683938>
16. Fosså A, Fosså SD. Serum lactate dehydrogenase and human choriogonadotrophin in seminoma. *Br J Urol* [Internet]. 1989 Apr [cited 2016 Apr 15];63(4):408–15. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2653557>
17. Miyai K, Yamamoto S, Iwaya K, Asano T, Tamai S, Tsuda H, et al. Allelotyping analysis suggesting a consecutive progression from intratubular germ cell neoplasia to seminoma and then to embryonal carcinoma of the adult testis. *Hum Pathol* [Internet]. 2013 Oct [cited 2016 Apr 15];44(10):2312–22. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23938161>
18. Feldman DR. Update in germ cell tumours. *Curr Opin Oncol* [Internet]. 2015;1. Available from: <http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=00001622-900000000-99449>
19. D'Arcy V, Pore N, Docquier F, Abdullaev ZK, Chernukhin I, Kita G-X, et al. BORIS, a paralogue of the transcription factor, CTCF, is aberrantly expressed in breast tumours. *Br J Cancer*. 2008;98(January):571–9.
20. Link P a., Zhang W, Odunsi K, Karpf AR. BORIS/CTCFL mRNA isoform expression and epigenetic regulation in epithelial ovarian cancer. *Cancer Immun*. 2013;13(January):1–9.

21. Martin-Kleiner I. BORIS in human cancers - A review. *Eur J Cancer* [Internet]. 2012;48(6):929–35. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejca.2011.09.009>
22. Loukinov DI, Pugacheva E, Vatolin S, Pack SD, Moon H, Chernukhin I, et al. BORIS, a novel male germ-line-specific protein associated with epigenetic reprogramming events, shares the same 11-zinc-finger domain with CTCF, the insulator protein involved in reading imprinting marks in the soma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99:6806–11.
23. Okabayashi K, Fujita T, Miyazaki J, Okada T, Iwata T, Hirao N, et al. Cancer-testis antigen BORIS is a novel prognostic marker for patients with esophageal cancer. *Cancer Sci*. 2012;103(9):1617–24.
24. Novak Kujundžić R, Grbeša I, Ivkić M, Krušlin B, Konjevoda P, Gall Trošelj K. Possible prognostic value of BORIS transcript variants ratio in laryngeal squamous cell carcinomas - a pilot study. *Pathol Oncol Res* [Internet]. 2014 Jul [cited 2016 Apr 20];20(3):687–95. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24563233>
25. Džombeta T, Kapuralin K, Ulamec M, Tomas D, Gajović S, Krušlin B. Immunohistochemical expression of STAM2 in gastrointestinal stromal tumors. *Anticancer Res* [Internet]. 2014 May [cited 2016 Apr 15];34(5):2291–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24778033>
26. Kapuralin K, Van Ginneken C, Curlin M, Timmermans J-P, Gajovic S. Neurons and a subset of interstitial cells of Cajal in the enteric nervous system highly express Stam2 gene. *Anat Rec (Hoboken)* [Internet]. 2012 Jan [cited 2016 Apr 20];295(1):113–20. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22140097>
27. Kobayashi H, Tanaka N, Asao H, Miura S, Kyuuma M, Semura K, et al. Hrs, a mammalian master molecule in vesicular transport and protein sorting, suppresses the degradation of ESCRT proteins signal transducing adaptor molecule 1 and 2. *J Biol Chem*. 2005;280(11):10468–77.
28. Rismanchi N, Puertollano R, Blackstone C. STAM adaptor proteins interact with COPII complexes and function in ER-to-Golgi trafficking. *Traffic*. 2009;10:201–17.
29. Curlin M, Kapuralin K, Muro AF, Baralle FE, Chowdhury K, Gajović S. Stam2 expression pattern during embryo development. *Gene Expr Patterns* [Internet]. [cited 2016 Apr 20];12(1–2):68–76. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22143071>
30. Stuible M, Abella J V., Feldhammer M, Nossov M, Sangwan V, Blagoev B, et al. PTP1B targets the endosomal sorting machinery: Dephosphorylation of regulatory sites on the endosomal sorting complex required for transport component STAM2. *J Biol Chem*.

2010;285:23899–907.

31. Bache KG, Raiborg C, Mehlum A, Stenmark H. STAM and Hrs are subunits of a multivalent ubiquitin-binding complex on early endosomes. *J Biol Chem*. 2003;278(14):12513–21.
32. Cheema Z, Hari-Gupta Y, Kita G-X, Farrar D, Seddon I, Corr J, et al. Expression of the cancer-testis antigen BORIS correlates with prostate cancer. *Prostate* [Internet]. 2014 Feb [cited 2016 Apr 15];74(2):164–76. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24123052>
33. Uhlén M, Fagerberg L, Hallström BM, Lindskog C, Oksvold P, Mardinoglu A, et al. Proteomics. Tissue-based map of the human proteome. *Science* [Internet]. 2015 Jan 23 [cited 2016 Apr 15];347(6220):1260419. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25613900>

12. ŽIVOTOPIS

IVANA MILOŠEVIĆ

Rođena sam u Jajcu, BiH, 1992. godine. Opću gimnaziju sam pohađala u Glamoču, BiH, nakon čega sam upisala studij medicine u Zagrebu. Do sada sam demonstrirala na Zavodu za histologiju i embriologiju dvije godine te sam članica udruge studenata medicine CroMSIC u sklopu koje sam sudjelovala u više različitih akcija i projekata. Također sam sudjelovala na dvodnevnoj edukaciji iz prve pomoći i zbrinjavanja traume koju organizira Studentska ekipa prve pomoći (StEPP) te položila tečaj neposrednog održavanja života (ILS) u sklopu predmeta Temelji liječničkog umijeća. Ovaj studentski znanstveni rad priznat je kao ekvivalent za diplomski rad, nagrađen je Dekanovom nagradom 2016. godine te nagradom „Sergej Saltykow“ za studentski znanstveni rad iz područja patologije. Predstavljen je na Simpoziju studenata bioloških usmjerenja na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu 2017. godine, Pannonia Congress of pathology u Osijeku 2016. godine te Europskom kongresu patologa u Beogradu 2015. godine. Odradila sam stručnu praksu u trajanju od mjesec dana na odjelu urologije u Sveučilišnoj bolnici u Hamburgu 2018. godine.