

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Jelena D. Dobričić

**UČESTALOST I TIPOVI MUTACIJA U
GENIMA BRCA U PORODICAMA SA
POZITIVNOM ISTORIJOM ZA KARCINOM
DOJKE I/ILI JAJNIKA U SRBIJI**

doktorska disertacija

Beograd, 2012

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Jelena D. Dobričić

**FREQUENCY AND TYPES OF
MUTATIONS IN BRCA GENES IN
FAMILIES WITH POSITIVE HISTORY OF
BREAST/OVARIAN CANCER IN SERBIA**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2012

INFORMACIJE O MENTORIMA I ČLANOVIMA KOMISIJE

Mentor:

prof dr Marina Stamenković-Radak, Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet

Komentor:

viši naučni saradnik dr Mirjana Branković-Magić, Institut za onkologiju i radiologiju Srbije

Član komisije:

naučni savetnik dr Siniša Radulović, Institut za onkologiju i radiologiju Srbije

Datum odbrane: _____

ZAHVALNICA

Doktorska disertacija urađena je u Laboratoriji za molekularnu genetiku Odeljenja za eksperimentalnu onkologiju Instituta za onkologiju i radiologiju Srbije.

Zahvaljujem se:

- mentoru dr Marini Stamenković-Radak, komentoru dr Mirjani Branković-Magić i članu komisije dr Siniši Raduloviću;
- šefu Laboratorije za molekularnu genetiku dr Radmili Janković i svim bivšim i sadašnjim članovima laboratorije: dr Emini Mališić, Kseniji Jakovljević, Ani Krivokući, Filipu Stojanoviću, Gordani Kukić, dr Mileni Čavić i Marijani Topalović;
- dr Zvonku Magiću i svim članovima njegove laboratorije Odeljenja za molekularnu medicinu Instituta za medicinska istraživanja VMA;
- dr Tatjani Srdić-Rajić, dr Zakiju Abu Rabiju i Lani Filipović i ostalim kolegama sa Odeljenja za eksperimentalnu onkologiju IORS-a;
- prijateljima i članovima porodice.

UČESTALOST I TIPOVI MUTACIJA U GENIMA BRCA U PORODICAMA SA POZITIVNOM ISTORIJOM ZA KARCINOM DOJKE I/ILI JAJNIKA U SRBIJI

REZIME

Uvod: Proteinski produkti gena BRCA1 i BRCA2 uključeni su u važne ćelijske procese, kao što su kontrola ćelijskog ciklusa i popravka oštećenja DNK. Mutacije u jednom od ovih gena predstavljaju korak bliže gubitku kontrole nad genomskom stabilnošću i ćelijskom deobom, pa osobe koje naslede mutacije u ovim genima češće oboljevaju od karcinoma dojke i/ili jajnika. Geni BRCA su veliki, mutacije su raspoređene duž celih gena bez grupisanja, što dodatno otežava njihovu detekciju. Spektar mutacija u genima BRCA različit je u različitim etničkim grupama. U nekim populacijama sa visokom učestalošću zastupljene su mutacije koje su u drugim populacijama retke. U isto vreme, veliki deo mutacija u genima BRCA detektovane su samo jednom, pa se može reći da većina porodica pod rizikom ima svoju sopstvenu porodičnu mutaciju. Mutacija 5382insC u 20. egzonu gena BRCA1 karakteristična je za slovenske populacije i njena učestalost opada od istoka ka zapadu Evrope. Oko 6-7% svih karcinoma dojke i oko 10% svih karcinoma jajnika je nasledno, povezano sa mutacijama germinativnih ćelija u genima BRCA1 i BRCA2. Nosioci mutacija u genima BRCA nose 5 do 8 puta veći životni rizik za oboljevanje od karcinoma dojke i 10 do 20 puta veći životni rizik za karcinom jajnika.

Cilj istraživanja je bio da se otkriju najučestalije mutacije u genima BRCA1/2 u našoj populaciji i utvrdi koje se od njih mogu smatrati osnivačkim mutacijama, kako bi se ubrzalo, pojednostavilo i pojeftinilo BRCA testiranje. Da bi se ovaj cilj ostvario, bilo je neophodno utvrditi tipove i učestalosti mutacija u genima BRCA1 i BRCA2 kod osoba sa pozitivnom porodičnom istorijom za karcinom dojke i/ili jajnika u Srbiji. Osim toga, u sistematskom uzorku karcinoma dojke bilo je potrebno utvrditi učestalost mutacije 5382insC u genu BRCA1 kao potencijalne osnivačke mutacije u našoj populaciji. U ispitivanoj grupi osoba koje su testirane na prisustvo mutacija u genima BRCA1/2 procenjavana je i efikasnost predviđanja BRCAPRO programa.

Materijal i metode: Analizirano je 85 uzoraka periferne krvi osoba sa povećanim rizikom za karcinom dojke i/ili jajnika koje potiču iz 69 porodica. Takođe, analiziran je i sistematski uzorak karcinoma dojke koji se sastoji od 257 uzoraka krvi obolelih. Prisustvo mutacija u genima BRCA analizirano je automatskim sekvenciranjem, dok je prisustvo mutacije 5382insC u genu BRCA1 u sistematskom uzorku određivano PCR-om specifičnim za alel. Za statističku obradu podataka korišćeni su testovi neparametrijske statistike: χ^2 test i Fišerov test.

Rezultati: Učestalost oštećujućih mutacija u uzorku porodica sa naslednim karcinomom dojke i/ili jajnika iznosi 10,59% (9/85). Sve detektovane oštećujuće mutacije su po tipu *frameshift* mutacije. Detektovane su i 3 nove porodično-specifične mutacije (1 u genu BRCA1 i 2 u genu BRCA2). Učestalost mutacije 5382insC u genu BRCA1 u sistematskom uzorku karcinoma dojke je 0,39% (1/257). Podizanjem granice BRCAPRO verovatnoće na 40% moguće je uočiti razliku između benignih polimorfizama i oštećujućih mutacija. Nije bilo moguće subgrupisanje neklasifikovanih varijanti na osnovu vrednosti BRCAPRO verovatnoće. BRCAPRO verovatnoća, sem sa srodnicima prvog i drugog stepena srodstva, koreliše i sa brojem obolelih srodnika u široj porodici. U odnosu na anatomsku lokalizaciju, BRCAPRO verovatnoća koreliše sa brojem srodnika obolelih od karcinoma dojke, ali ne i od karcinoma jajnika.

Zaključak: Učestalost mutacija u genima BRCA1/2 kod ispitanika pod rizikom za nastanak naslednog karcinoma dojke i/ili jajnika u Srbiji slična je učestalostima dobijenim u drugim populacijama. Osim već poznatih mutacija u genima BRCA1/2 pokazane su i nove porodično-specifične mutacije. Nisu detektovane mutacije koje bi se mogle okarakterisati kao osnivačke mutacije za našu populaciju. BRCAPRO program se pokazao kao koristan pri odabiru osoba za BRCA testiranje, ali pri odabiru kandidata za testiranje, usled nedostataka BRCAPRO programa, treba analizirati i rodoslov. Podizanje granice BRCAPRO verovatnoće prilikom odabira ispitanika za BRCA testiranje sa 10% na 40% moglo bi da poveća efikasnost BRCA testiranja.

Ključne reči: geni BRCA, kontrola ćelijskog ciklusa, popravka oštećenja DNK, kancerogeneza, karcinom dojke, karcinom jajnika, nasledni karcinom dojke i/ili jajnika, genetičko testiranje

Naučna oblast: Molekularna biologija

Uža naučna oblast: Molekularna genetika

UDK broj: 575.1:616-006.6 (043.3)

FREQUENCY AND TYPES OF MUTATIONS IN BRCA GENES IN FAMILIES WITH POSITIVE HISTORY OF BREAST/OVARIAN CANCER IN SERBIA

SUMMARY

Background: Protein products of BRCA1 and BRCA2 genes are included in important cellular processes, such as cell cycle control and DNA repair. Mutations in one of these genes is a step towards losing control over genomic stability and cell division, and individuals who inherit mutations in these genes develop breast and/or ovarian cancer more frequently. BRCA genes are large, mutations are scattered throughout whole genes without clustering, which makes mutation detection even more difficult. The spectrum of BRCA mutations is different for each ethnic group. Mutations that are highly frequent in some populations are rare in other populations. At the same time, large proportion of BRCA mutations have been detected only once, and it can be said that majority of families under risk have their own family mutation. Mutation 5382insC in BRCA1 exon 20 is characteristic for Slavic populations and its frequency decreases from east to west of Europe. About 6-7% of all breast cancer cases and about 10% of all ovarian cancer cases are hereditary, associated to germ line mutations in BRCA1 and BRCA2 genes. BRCA mutation carriers have 5 to 8 times higher lifetime risk for breast cancer and 10 to 20 times higher lifetime risk for ovarian cancer.

Aim of this study was to identify the most frequent BRCA1/2 mutations in our population and to find out which of them may be regarded as founder mutations, in order to make BRCA testing faster, easier and less expensive. In order to achieve this goal, it was necessary to identify types and frequencies of BRCA1/2 mutations in individuals with positive family history of breast and/or ovarian cancer in Serbia. In addition, it was necessary to identify the frequency of BRCA1 mutation 5382insC in breast cancer consecutive sample, as possible founder mutation in our population. In analysed group of

individuals tested for the presence of BRCA1/2 mutations the efficiency of BRCAPRO software prediction was assessed.

Material and methods: Eighty five peripheral blood samples from high risk individuals for breast and/or ovarian cancer from 69 families was analyzed. In addition, consecutive sample that included 257 blood samples from breast cancer patients was analyzed. The presence of BRCA gene mutations was analyzed by automatic sequencing, while the presence of 5382insC mutation in BRCA1 gene was determined by allele-specific PCR. For statistic analyses, non-parametric tests were used: χ^2 test and Fisher test.

Results: The frequency of deleterious mutations in sample of families with hereditary breast and/or ovarian cancer is 10.59% (9/85). All detected deleterious mutations are frameshift mutations. Three novel family-specific mutations have been detected (one in BRCA1 and two in BRCA2 gene). The frequency of BRCA1 mutation 5382insC in breast cancer consecutive sample is 0.39% (1/257). By raising the threshold of BRCAPRO probability to 40% it is possible to observe the difference between benign polymorphisms and deleterious mutations. Subgrouping of unclassified variants according to the value of BRCAPRO probability was not possible. BRCAPRO probability, in addition to the first and second degree relatives, correlates also with the number of more distant relatives who developed cancer. In relation to anatomic localisation, BRCAPRO probability correlates with the number of relatives who developed breast cancer, but not with the number of those who developed ovarian cancer.

Conclusion: The frequency of BRCA1/2 mutations in probands under risk for hereditary breast and/or ovarian cancer in Serbia is similar to those determined in other populations. In addition to already known BRCA1/2 mutations, new family-specific mutations have been detected. Mutation that could be qualified as founder mutations for our population have not been detected. BRCAPRO software has been shown to be useful in selection of probands for BRCA testing, but in this selection, due to BRCAPRO limitations, the pedigree should be analysed too. Raising the threshold for BRCAPRO probability in proband selection for BRCA testing from 10% to 40% could raise the efficiency of BRCA testing.

Keywords: BRCA genes, cell cycle control, DNA repair, carcinogenesis, breast cancer, ovarian cancer, hereditary breast/ovarian cancer, genetic testing

Academic Expertise: Molecular Biology

Field of Academic Expertise: Molecular Genetics

UDK number: 575.1:616-006.6 (043.3)

SADRŽAJ

UVOD	1
GENI BRCA	1
STRUKTURA GENA I PROTEINA BRCA	1
FUNKCIJA PROTEINA BRCA	3
Signaliziranje prisustva oštećenja DNK	4
BRCA1 i kontrola ćelijskog ciklusa	6
G1/S kontrolna tačka	7
Kontrolna tačka u S fazi	7
G2/M kontrolna tačka	8
Kontrolna tačka M faze	9
BRCA2 i kontrola ćelijskog ciklusa	10
Održavanje genomske stabilnosti	11
Putevi popravke oštećenja DNK	11
Nehomologo spajanje krajeva - NHEJ	12
Homologom rekombinacijom posredovana popravka dvolančanih prekida DNK	15
Uloga BRCA1 i BRCA2 u popravci oštećenja DNK	18
Ostale uloge proteina BRCA u ćeliji	20
Modifikacija hromatina	20
Prepoznavanje oštećenja DNK	20
Ubikvitinacija proteina	22
Ostale uloge gena BRCA	23
MUTACIJE U GENIMA BRCA	23
Osnivačke (<i>founder</i>) mutacije	24
KARCINOM DOJKE	25
Epidemiologija karcinoma dojke	25
Histologija karcinoma dojke	26
Faktori rizika za karcinom dojke	26
KARCINOM DOJKE KOD MUŠKARACA	27
Epidemiologija karcinoma dojke kod muškaraca	27
Histologija karcinoma dojke kod muškaraca	28
Faktori rizika za karcinom dojke kod muškaraca	28
KARCINOM JAJNIKA	30
Epidemiologija karcinoma jajnika	30
Histologija karcinoma jajnika	30
Faktori rizika za karcinom jajnika	30
NASLEDNI KARCINOM DOJKE I JAJNIKA	31

Histologija karcinoma povezanih sa mutacijama	
u genima BRCA	33
Karcinom dojke	34
Karcinom jajnika	34
GENETIČKO TESTIRANJE	34
CILJ ISTRAŽIVANJA	38
MATERIJAL	39
METODE	42
IZOLACIJA MONONUKLEARNIH ĆELIJA IZ PERIFERNE KRVI	42
IZOLACIJA DNK NA APARATU	
<i>ABI Prism™ 6100 Nucleic Acid PrepStation</i>	42
SPEKTROFOTOMETRIJSKO ODREĐIVANJE	
KONCENTRACIJE DNK	43
LANČANA REAKCIJA POLIMERAZE	
(<i>Polymerase Chain Reaction - PCR</i>)	44
ELEKTROFOREZA NA AGAROZNOM GELU	48
PRIPREMA UZORAKA ZA AUTOMATSKO DNK SEKVENCIRANJE ...	49
Prečišćavanje PCR produkata	49
Prečišćavanje korišćenjem <i>QIAquick PCR Purification Kit-a</i>	49
Prečišćavanje korišćenjem Exo I i SAP enzima	50
Reakcija obeležavanja DNK pre sekvenciranja	
(<i>Cycle sequencing</i> reakcija)	50
Precipitacija	52
Etanol/EDTA precipitacija	52
Prečišćavanje korišćenjem	
<i>BigDye X Terminator Purification Kit-a</i>	52
SEKVENCIRANJE DNK	52
ANALIZA SEKVENCI	53
PCR SPECIFIČAN ZA ALEL	54
STATISTIČKA OBRADA PODATAKA	57
REZULTATI	58
Analiza uzoraka sa porodičnom istorijom	
za karcinom dojke i/ili jajnika	58
Analiza sistematskog uzorka karcinoma dojke	62
Analiza upotrebe BRCAPRO programa u ispitivanoj grupi	63
Upoređivanje BRCAPRO verovatnoće u odnosu na	
prisustvo/odsustvo mutacija	63
Upoređivanje BRCAPRO verovatnoće u odnosu na	
broj obolelih srodnika u porodici	67

DISKUSIJA	70
MOGUĆI EFEKAT DETEKTOVANIH MUTACIJA	71
<i>Frameshift</i> mutacije u genu BRCA1	71
<i>Frameshift</i> mutacije u genu BRCA2	75
<i>Nonsense</i> mutacija u genu BRCA2	79
<i>Missense</i> mutacije u genima BRCA	80
<i>Missense</i> mutacije u genu BRCA1	81
<i>Missense</i> mutacije u genu BRCA2	83
ANALIZA UPOTREBE BRCAPRO PROGRAMA	
U ISPITIVANOJ GRUPI	84
Korelacija u odnosu na detektovane mutacije	85
Korelacija u odnosu na broj obolelih srodnika u porodici	89
ANALOGIJA SA HISTOLOGIJOM	91
Mutacije u genu BRCA1	91
Mutacije u genu BRCA2	95
UČESTALOST MUTACIJA U RAZLIČITIM GRUPAMA	
TESTIRANIH OSOBA	100
UČESTALOST MUTACIJA U SISTEMATSKIM UZORCIMA	102
SAVETOVANJE NAKON DOBIJANJA REZULTATA	
GENETIČKOG TESTIRANJA	104
ZAKLJUČCI	106
LITERATURA	107
BIOGRAFIJA AUTORA	135

UVOD

GENI BRCA

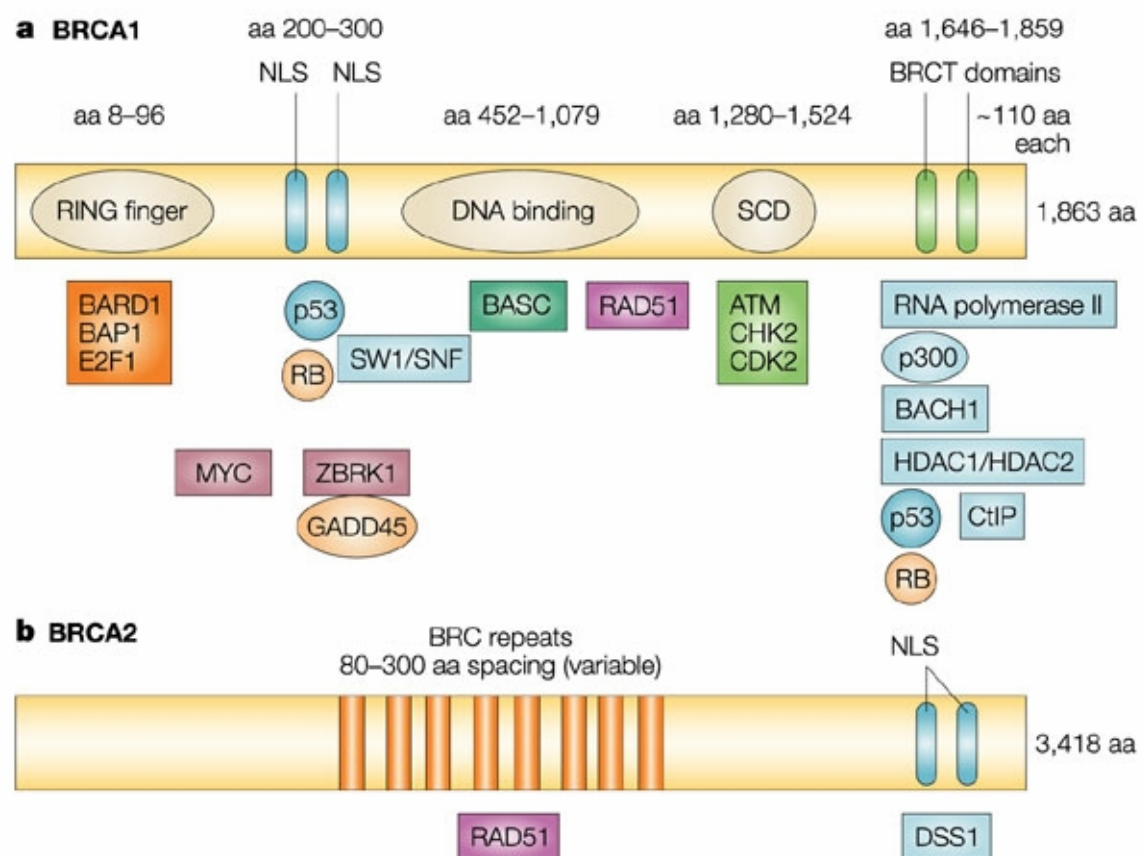
STRUKTURA GENA I PROTEINA BRCA

BRCA1 (engl. *breast cancer susceptibility gene 1* - BRCA1) je bio prvi gen za koji je otkrivena povezanost sa povećanim rizikom za oboljevanje od karcinoma dojke i jajnika. Genetičkom analizom vezanosti (engl. *genetic linkage analysis*) prvo je bio lociran na hromozomu 17 analizom 23 porodice sa ranim karcinomom dojke (Hall et al., 1990), a zatim je kloniran 1994. godine (Miki et al., 1994).

Gen BRCA1 je lociran na 17q21 (Miki et al., 1994), zauzima 80 kb genomske DNK (Ramus and Gayther, 2009). Sekvenca gena BRCA1 podeljena je u 24 egzona, od kojih su 22 kodirajuća. Transkript od 7,8 kb kodira proteinski produkt od 1863 amino kiseline (Miki et al., 1994) i 220 kDa (Scully et al., 1996).

Protein BRCA1 ima četiri glavne strukturne karakteristike koje su važne za njegovu funkciju (Slika 1a):

- na N-kraju visoko konzerviran RING domen, koji obuhvata amino kiseline 24-64 (Meza et al., 1999), kodiran egzonomima 2-5 (Thakur et al., 1997). Ovaj domen omogućava različite protein-protein interakcije (Saurin et al., 1996);
- dva signala za lokalizaciju u jedru (engl. *nuclear localization signals* – NLSs), između amino kiselina 503-508 i 606-615, od kojih je prvi neophodan za lokalizaciju u jedru (Chen et al., 1996a);
- DNK-vezujući domen, između amino kiselina 452 i 1079 (Paull et al., 2001). BRCA1 se vezuje za DNK nezavisno od sekvence i sa većom verovatnoćom vezivanja za delove molekula DNK koji se granaju (Paull et al., 2001);
- dva BRCA1 C-terminalna (engl. *BRCA1 C-terminal domain* - BRCT) domena (Koonin et al., 1996) obuhvataju amino kiseline 1642-1736 i 1756-1855 (*UniProt database*, P38398, <http://www.uniprot.org/uniprot/P38398>). Ovi domeni sadrže kisele amino kiseline i smatra se da imaju funkciju u aktivaciji transkripcije (Monteiro et al., 1996).



Nature Reviews | Cancer

Slika 1. Struktura proteina, važni funkcionalni domeni i proteini sa kojima interaguju. a - BRCA1; b - BRCA2. (Slika preuzeta iz Narod and Foulkes., 2004)

Drugi gen povezan sa naslednim karcinomom dojke, **BRCA2** (engl. *breast cancer susceptibility gene 2* - BRCA2, takođe poznat i kao FANCD1), kloniran je 1995. godine (Wooster et al., 1995). Gen BRCA2 je lociran na 13q12, obuhvata oko 70 kb genomske sekvence i podeljen je na 27 egzona od kojih je 26 kodirajućih. Transkript od 11,4 kb kodira proteinski produkt od 3418 amino kiselina (Teng et al., 2008) i 384 kDa (Thorslund and West, 2007).

Protein BRCA2 je veoma veliki i sadrži brojne prepoznatljive motive (Slika 1b), od kojih su najkarakterističniji:

- BRC motivi - humani protein BRCA2 sadrži osam BRC motiva koji predstavljaju ponavljajuću sekvencu od oko 70 amino kiselina, sa centralnim delom od 25 amino

kiselina (Thorslund and West, 2007). Ovi ponovci nalaze se između amino kiselina 1009 i 2083 (Chen et al., 1999);

- domen za vezivanje za jednolančanu DNK (engl. *ssDNA-binding region*), koji je, pored BRC motiva, značajan za odvođenje RAD51 proteina do dvolančanih prekida DNK (Yang et al., 2002);
- signali za premeštanje proteina iz citoplazme u jedro (engl. *nuclear localization signals* - NLSs). Protein BRCA2 ima dva ovakva signala smeštena u okviru poslednjih 156 amino kiselina (Spain et al., 1999).

U ćelijama koje se ne dele nivo transkripata i proteina BRCA1 je ili nizak ili nedetektabilan. Nakon što ove ćelije prime signal za deobu, nivo proteina BRCA1 raste u kasnoj G1 fazi, dostiže svoj maksimum neposredno pre početka sinteze DNK i ostaje na tom nivou tokom S i velikog dela M faze ćelijskog ciklusa (Chen et al., 1996; Jin et al., 1997; Tibbetts et al., 2000). Ekspresioni profil proteina BRCA2 je identičan ekspresionom profilu proteina BRCA1 (Vaughn et al., 1996).

FUNKCIJA PROTEINA BRCA

Ćelija i njen genetički materijal stalno su izloženi uticajima različitih faktora. Oštećenja DNK mogu da nastanu tokom normalnih ćelijskih procesa, kao što je replikacija DNK, pod uticajem unutrašnjih faktora, kao što su slobodni radikali, ili pod uticajem spoljašnjih agenasa, kao što su ultravioletno (UV) i jonizujuće zračenje (engl. *ionizing radiation* – IR) (Huen et al., 2010). Da bi obezbedile genomsku stabilnost, ćelije su razvile sposobnost da detektuju oštećenje DNK, zaustave ćelijski ciklus i iniciraju popravku tog oštećenja. Ukoliko do popravke oštećenja ne dođe, ćelija aktivira programiranu ćelijsku smrt (apoptozu). Međutim, ukoliko ćelija sa oštećenom DNK ne uđe u apoptozu već nastavi sa deobom, mutacije se prenose na ćerke ćelije i mogu da utiču na njihov fenotip. Nakupljanje mutacija (genomska nestabilnost) postepeno može dovesti do gubitka kontrole nad deobom i apoptozom što vodi kancerogenezi (malignoj transformaciji ćelije).

Genomska nestabilnost je glavna odlika tumorskih ćelija i ona doprinosi kancerogenezi. Da bi izbegle kancerogenezu, ćelije su razvile mehanizme zaštite genoma, koji uključuju regulaciju kontrolnih tačaka ćelijskog ciklusa i popravku

oštećenja DNK. Danas se zna da postoji povezanost (engl. *crosstalk*) između ova dva procesa da bi se obezbedilo da se ćelijski ciklus zaustavi neposredno nakon što je oštećenje DNK detektovano (Huen et al., 2010). Ovo omogućava proteinima koji učestvuju u popravci oštećenja DNK da poprave oštećenje pre nego što ćelija nastavi sa replikacijom DNK i deobom ćelije (Huen et al., 2010).

Nakon što dođe do oštećenja DNK, potrebno je da se signal (informacija) o tome da je do oštećenja došlo prenese među odgovarajućim molekulima (engl. *signalling*), da se ćelijski ciklus zaustavi, da se zavisno od tipa oštećenja odabere odgovarajući put popravke nastalog oštećenja, da se hromatin remodeluje kako bi proteini koji su uključeni u popravku oštećenja mogli da priđu oštećenju da bi se izvršila popravka. Proteini BRCA1 i BRCA2 učestvuju u gotovo svim navedenim događajima koji su potrebni da bi se nastalo oštećenje DNK popravilo. BRCA1 je jedan od proteina uključenih u popravku oštećenja DNK, regulaciju ćelijskog ciklusa, apoptoze i transkripcije, kao i u remodelovanju hromatina, replikaciji i ubikvitinaciji nekih proteina. BRCA2 je uključen u homologu rekombinaciju i popravku oštećenja DNK, kao i u regulaciju kontrolne tačke M faze ćelijskog ciklusa.

Signaliziranje prisustva oštećenja DNK

Nakon oštećenja DNK u ćeliji se aktiviraju signalni putevi odgovora na oštećenje, koji dovode do zaustavljanja ćelijskog ciklusa, popravke oštećenja DNK i u nekim slučajevima (kada oštećenje ne može da bude popravljeno) do aktivacije programirane ćelijske smrti (Gatei et al., 2001). Na samom vrhu ili blizu vrha signalnog puta odgovora na oštećenje DNK nalaze se članovi familije PIKK (*phosphoinositide kinase-related kinase* - PIKK) kinaza, koja uključuje kinaze ATM (engl. *ataxia telangiectasia mutated* - ATM) i ATR (engl. *ATM and Rad3 related* - ATR). Ovi proteini imaju važnu ulogu u signaliziranju prisustva oštećenja DNK fosforilacijom različitih efektorih proteina (pregledno u Khanna et al., 2001), od kojih je jedan BRCA1 (Tibbetts et al., 2000), što dovodi do zaustavljanja ćelijskog ciklusa i aktiviranja popravke oštećenja.

ATM i ATR signaliziraju prisustvo oštećenja DNK i fosforilišu BRCA1 u odgovoru na različite stimulse. Osim što imaju zajednička mesta fosforilacije na BRCA1, ATM i ATR fosforilišu i potpuno različite amino kiselinske ostatke BRCA1 *in vivo* (Gatei et al., 2001). Nakon dejstva jonizujućeg zračenja (engl. *ionizing radiation* -

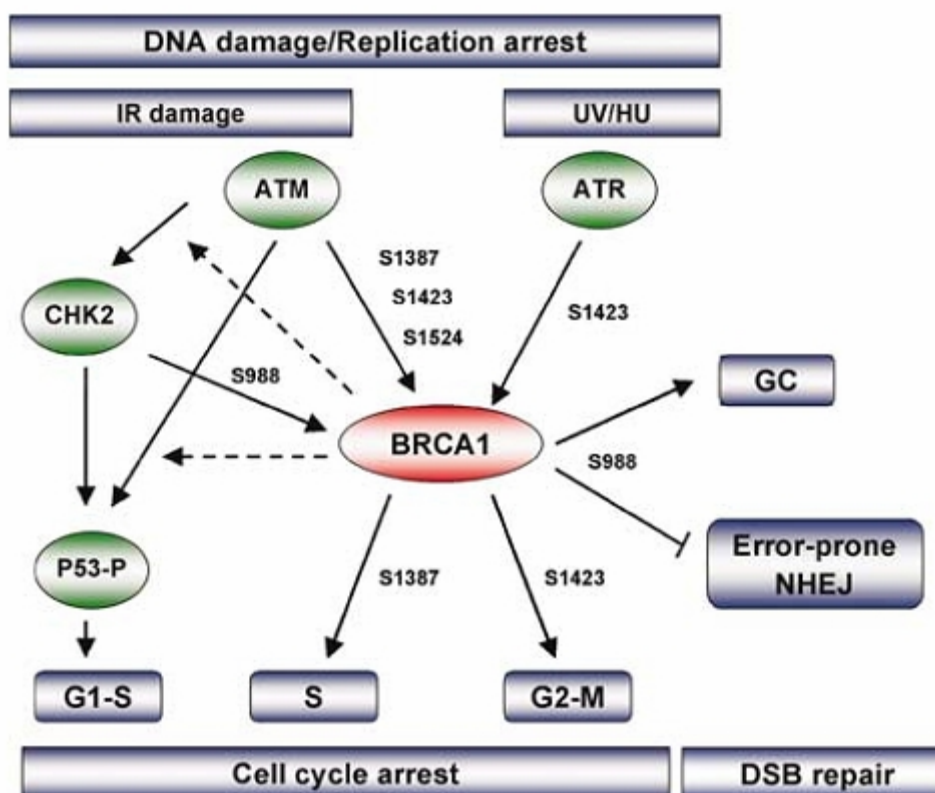
IR) BRCA1 biva fosforilisan od strane ATM, dok je nakon dejstva UV i hidroksiuree (HU) ATR taj koji fosforiliše BRCA1 (Chen, 2000; Tibbetts et al., 2000). Ovo je u skladu sa činjenicom da je priroda oštećenja DNK nakon dejstva ove dve vrste oštećujućih agenasa različita: IR izaziva jednolančane ili dvolančane prekide, što je praćeno popravkom oštećenja ligacijom ili rekombinacijom, dok UV izaziva ciklobutan-pirimidinske dimere i 6-4 fotoprodukte, koji se popravljaju isecanjem nukleotida (Gatei et al., 2001). Tako, ATM odgovara na dvolančane prekide DNK (Matsuoka et al., 1998; Brown et al., 1999; Suzuki et al., 1999), dok ATR odgovara na UV fotoprodukte (dimere timina) ili zaustavljanje replikacione viljuške (Stiff et al., 2006).

U odsustvu oštećenja, BRCA1 je tokom S i G2 faza ćelijskog ciklusa lokalizovan u diskretnim jedarnim fokusima koji su nazvani „BRCA1 jedarne tačke“ (Scully et al., 1996; Jin et al., 1997; Scully et al., 1997a). Protein BRCA1 postoji u ćeliji u vidu grupe različito fosforilisanih proteina i fosforilacija svakog serinskog ostatka zavisna je od faze ćelijskog ciklusa. Paralelno sa porastom ekspresije, proteini BRCA1 bivaju hiperfosforilisani (Chen et al., 1996). Tokom S faze fosforilacija proteina BRCA1 dostiže maksimum. Zatim, BRCA1 ostaje hiperfosforilisan tokom M faze i biva parcijalno defosforilisan ubrzo nakon završetka M faze, odnosno u ranoj G1 fazi ćelijskog ciklusa (Chen et al., 1996; Ruffner et al., 1999).

Kada se ćelije u S fazi izlože jonizujućem zračenju (IR), ultravioletnom (UV) svetlu ili hidroksiurei (HU), inhibitoru replikacije DNK, BRCA1 jedarni fokusi se raspršuju i BRCA1 se premešta u nove fokuse (Scully et al., 1997a). Osim toga, oštećenje DNK indukuje i povećanu fosforilaciju ovog proteina i to posredstvom kinaza aktiviranih oštećenjem DNK, kao što su ATM, ATR i hCDS1/CHK2 (engl. *human CDS1 kinase* - hCDS1 ili CHK2) (Cortez et al., 1999; Chen, 2000; Lee et al., 2000; Tibbetts et al., 2000).

Nakon delovanja IR ATM fosforiliše BRCA1 na nekoliko serinskih ostataka (Ser1387, Ser1423, Ser1457, Ser1524) (Cortez et al., 1999; Gatei et al., 2000; Gatei et al., 2001), što dovodi do različitih ishoda: u slučaju fosforilacije na Ser1387 dolazi do zastoja ćelijskog ciklusa u S fazi, dok nakon fosforilacije Ser1423 dolazi do G2/M zastoja (Xu et al., 2001; Xu et al., 2002) (Slika 2). ATM takođe može da fosforiliše CHK2 i time ga aktivira (Matsuoka et al., 1998; Brown et al., 1999). CHK2 zatim kolokalizuje sa BRCA1 i fosforiliše ga na Ser988 (Lee et al., 2000) što uvodi ćeliju u popravku oštećenja DNK.

ATR *in vitro* fosforiliše BRCA1 na šest različitih ostataka (Ser1143, Ser1280, Ser1387, Thr1394, Ser1423, Ser1457) (Tibbetts et al., 2000). Nakon delovanja UV zračenja ili HU aktivira se ATR koji fosforiliše BRCA1 na Ser1423 (Tibbetts et al., 2000; Gatei et al., 2001; Okada and Ouchi, 2003) i uvodi ćeliju u G2/M zastoj (Slika 2).



Slika 2. Uloga BRCA1 u signaliziranju prisustva oštećenja DNK. Oštećenje DNK izazvano različitim uticajima aktivira protein kinaze ATM i ATR koje fosforilišu protein BRCA1 na različitim pozicijama, što za posledicu ima zaustavljanje ćelijskog ciklusa u različitim fazama i aktiviranje popravke oštećenja DNK. (Slika preuzeta iz Gudmundsdottir and Ashworth, 2006)

BRCA1 i kontrola ćelijskog ciklusa

Kada nastane oštećenje DNK, ćelija mora da zaustavi ćelijski ciklus i odloži ćelijsku deobu da bi popravila nastalo oštećenje, kako se ono ne bi prenelo na sledeću generaciju ćelija. Ćelija zaustavlja ćelijski ciklus aktiviranjem kontrolnih tačaka ćelijskog ciklusa, koje se nalaze na prelazu iz G1 u S fazu, unutar S faze, kao i na

prelazu iz G2 u M fazu ćelijskog ciklusa. Osim toga, postoje i kontrolne tačke unutar M faze ćelijskog ciklusa (npr. kontrola stvaranja deobnog vretena, engl. *spindle assembly checkpoint*) koji obezbeđuju pravilnu raspodelu sestrinskih hromatida.

BRCA1 je uključen u kontrolu ćelijskog ciklusa i izaziva zastoje u nekoliko faza. Nakon oštećenja DNK fosforilacija BRCA1 utiče na aktivaciju kontrolnih tačaka ćelijskog ciklusa kroz promenu ekspresije specifičnih nizvodnih ciljnih gena.

G1/S kontrolna tačka

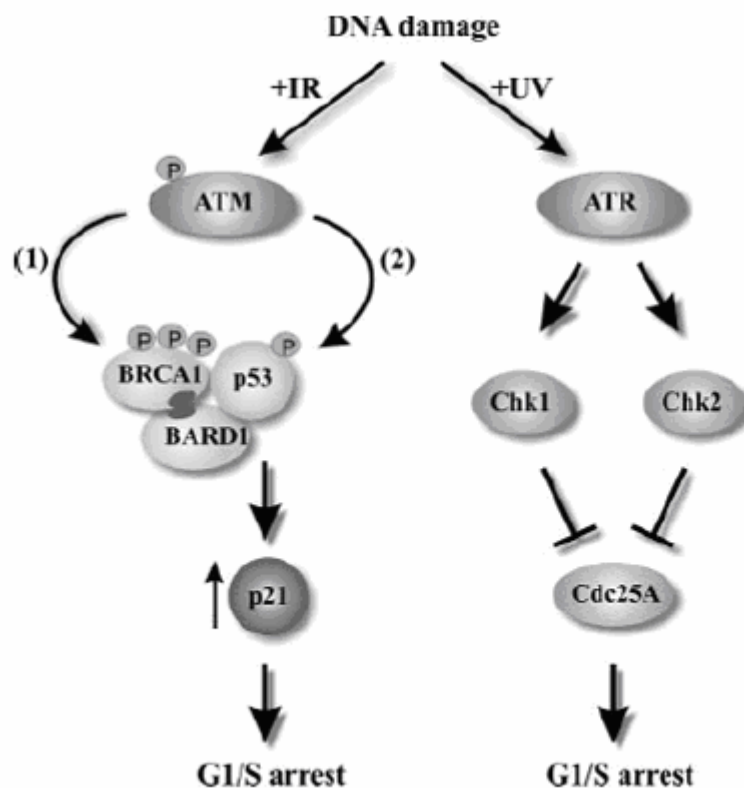
Kao što je već rečeno, nakon delovanja jonizujućeg zračenja (IR) kao odgovor na oštećenje DNK aktivira se ATM, koji fosforiliše BRCA1 na Ser1387, Ser1423 i Ser1427 (Gatei et al., 2001). Tako fosforilisan, BRCA1 u kompleksu sa BARD1 ima ulogu adaptera koji omogućava da, nakon oštećenja DNK indukovanih IR, ATM fosforiliše p53 na Ser15, dok je nakon delovanja UV ATR taj koji fosforiliše p53 na istoj poziciji (Fabbro et al., 2004). Tako fosforilisan, p53 indukuje transkripciju p21, koji inhibira CDK2-ciklinE kompleks, što dovodi do G1-S zastoja ćelijskog ciklusa (Foray et al., 2003; Fabbro et al., 2004) (Slika 3).

Nakon delovanja UV zračenja aktivira se signalni put zaustavljanja ćelijskog ciklusa u G1/S fazi nezavisan od BRCA1. Naime, nakon oštećenja DNK izazvanih UV zračenjem aktivira se ATR koji fosforiliše CHK1 i CHK2 kinaze (Liu et al., 2000). Ove kinaze su time aktivirane i fosforilišu fosfatazu CDC25A, koja je time obeležena za degradaciju i tako sprečena da defosforiliše, odnosno aktivira CDK2, što dovodi do zaustavljanja ćelijskog ciklusa u G1/S fazi (Xiao et al., 2003) (Slika 3).

Postojanje dva signalna puta ukazuje na činjenicu da različiti tipovi oštećenja aktiviraju različite signalne puteve koji dovode do zaustavljanja ćelijskog ciklusa i aktiviranja različitih tipova popravki oštećenja DNK.

Kontrolna tačka u S fazi

Nakon nastanka oštećenja usled delovanja IR, ATM fosforiliše BRCA1 na Ser1387, BRCA1 zatim stimuliše transkripciju p27, koji aktivira kontrolnu tačku u S fazi i time indukuje zastoje u S fazi ćelijskog ciklusa (Xu et al., 2002).



Slika 3. Uloga BRCA1 u zaustavljanju ćelijskog ciklusa u G1/S fazi. Nakon delovanja IR ATM fosforiliše BRCA1 na više pozicija, koji posredstvom p53 indukuje transkripciju p21 koji zaustavlja ćeliju u G1/S fazi ćelijskog ciklusa. Nakon delovanja UV, ATR posredstvom CHK1 i CHK2 zaustavlja ćelijski ciklus u G1/S fazi, nezavisno od BRCA1. (Slika preuzeta iz Fabbro et al., 2004)

G2/M kontrolna tačka

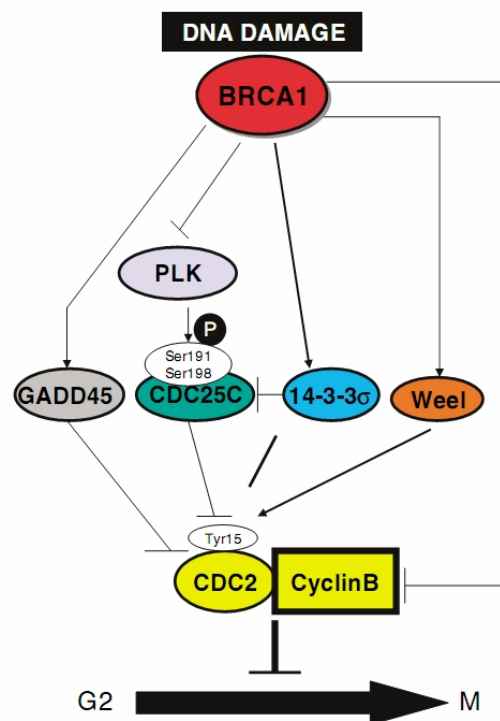
Prelaz iz G2 u M fazu ćelijskog ciklusa regulisan je preko kompleksa CDC2-ciklin B, koji uvodi ćeliju u mitozu (Slika 4). Fosforilacijom CDC2 ova kinaza se inaktivira i ćelija se zaustavlja pre ulaska u mitozu. CDC25C uklanja ovu fosforilaciju i time aktivira kompleks CDC2-ciklin B i inicira mitozu. Oštećenje DNK aktivira CHK1 (i/ili CHK2) kinazu koja fosforiliše CDC25C na Ser216 (Matsuoka et al., 1998), što dovodi do inhibicije ove fosfataze i omogućava njeno vezivanje za 14-3-3 σ što vodi njenom izbacivanju iz jedra (Peng et al., 1997). Time je CDC25C sprečen da aktivira kompleks CDC2-ciklin B koji bi uveo ćeliju u mitozu, što dovodi do zaustavljanja ćelijskog ciklusa na prelazu G2 u M fazu.

BRCA1 je uključen i u kontrolu ove kontrolne tačke na nekoliko nivoa. Naime, nakon IR ATM fosforiliše BRCA1 na Ser1423 i time inicira G2/M zastoje ćelijskog ciklusa (Xu et al., 2001). S jedne strane, BRCA1 aktivira CHK1 kinazu (Yarden et al., 2002) i reguliše transkripciju gena koji na različite načine inhibiraju CDC2-ciklin B kinazni kompleks. Tako, BRCA1 stimuliše transkripciju GADD45, koji razdvaja CDC2-ciklin B kompleks vezujući se za CDC2 (Zhan et al., 1999). Osim toga, BRCA1 stimuliše i transkripciju WEE1 kinaze (Yarden et al., 2002), kao i transkripciju 14-3-3 σ , koji se vezuje za fosforilisani CDC25C i izdvaja ga iz nukleusa u citoplazmu nakon oštećenja DNK i time ga sprečava da aktivira CDC2-ciklin B kinazni kompleks (Hermeking et al., 1997; Lopez-Girona et al., 1999; Yarden et al., 2002). S druge strane, nakon oštećenja DNK BRCA1 inhibira transkripciju ciklina B (MacLachlan et al., 2000; Yarden et al., 2002). Osim toga, BRCA1, nakon oštećenja DNK jonizujućim zračenjem, inhibira i transkripciju PLK, kinaze koja fosforiliše i time aktivira CDC25C (Roshak et al., 2000), koja defosforiliše CDC2 i time aktivira CDC2-ciklin B kompleks, omogućavajući ulazak u mitozu (Ree et al., 2003) (Slika 4).

Sve ove uloge BRCA1 u regulaciji transkripcije kao rezultat imaju inhibiciju kinazne aktivnosti CDC2-ciklin B kompleksa i sprečavanje ulaska ćelije u mitozu.

Kontrolna tačka M faze

BRCA1 je uključen i u kontrolnu tačku stvaranja deobnog vretena (engl. *spindle assembly checkpoint*), koja se aktivira ukoliko ne dođe do pravilnog formiranja deobnog vretena. Mehanizam kojim BRCA1 podstiče ovaj zastoje nije u potpunosti poznat, ali se pretpostavlja da je to posredstvom asocijacije i naknadne aktivacije MEKK3 kinaze (engl. *mitogen-activated protein kinase (MAPK) kinase kinase 3* - MEKK3), uzvodnog regulatora JNK i p38 MAPK signalnih puteva, nakon oštećenja mikrotubula (Gilmore et al., 2004). Osim toga, nađeno je da se BRCA1 vezuje za centrozome direktnom interakcijom sa γ -tubulinom, što ukazuje na moguću ulogu BRCA1 u pravilnoj raspodeli sestrinskih hromatida tokom anafaze mitoze (Hsu and White, 1998).



Slika 4. G2/M kontrolna tačka. BRCA1 aktivira transkripciju GADD45, 14-3-3 σ i WEE1 koji različitim mehanizmima dovode do zaustavljanja ćelijskog ciklusa u G2-M fazi. BRCA1 inhibira transkripciju ciklina B i PLK koji uvode ćeliju u mitozu. (Slika preuzeta iz Mullan et al., 2006 i modifikovana)

BRCA2 i kontrola ćelijskog ciklusa

Uloga BRCA2 u kontroli raspodele hromozoma tokom mitoze mogla bi da objasni brojne hromozomske aberacije koje se javljaju u ćelijama sa mutiranim genom BRCA2. Nekoliko studija je i potvrdilo ulogu BRCA2 u progresiji kroz mitozu (Futamura et al., 2000; Marmorstein et al., 2001; Daniels et al., 2004). Naime, protein hBUBR1, kao deo strukture kinetohora, ima ulogu u kontroli vezivanja hromozoma za mitotsko vreteno i time nadgleda preciznu raspodelu hromozoma tokom mitoze, učestvujući u kontrolnoj tački stvaranja deobnog vretena (Cahill et al., 1998; Chan et al., 1998; Jablonski et al., 1998). Nađeno je da BRCA2 interaguje sa hBUBR1 (Futamura et al., 2000), što ukazuje na ulogu BRCA2 u ovoj kontrolnoj tački. Nakon oštećenja mikrotubula deobnog vretena, nivoi iRNK za BRCA2 i hBUBR1 rastu, proteini BRCA2 i hBUBR1 menjaju svoju lokalizaciju i interaguju (Futamura et al.,

2000). Osim toga, hBUBR1 fosforiliše BRCA2 protein (Futamura et al., 2000), ali je još uvek nepoznat značaj ove fosforilacije.

Dakle, hBUBR1 kontroliše pravilnu raspodelu hromozoma fosforilacijom nizvodnih ciljnih proteina. Jedan od ciljnih proteina je i protein BRCA2 i gubitak njegove funkcije (mutacijom u genu BRCA2) može da blokira signalni put proteina hBUBR1, dovodeći do nemogućnosti aktiviranja kontrolne tačke u M fazi i samim tim i do genomske nestabilnosti, što vodi kancerogenezi (Futamura et al., 2000).

Održavanje genomske stabilnosti

Putevi popravke oštećenja DNK

Tačna popravka oštećenja DNK je ključna za održavanje integriteta genoma. Tokom evolucije ćelije su za različite tipove oštećenja DNK razvile nekoliko različitih načina popravke (pregledno u Hoeijmakers, 2001). Postoje putevi koji služe za popravku pojedinačnih oštećenih ili pogrešno sparenih baza i jednolančanih prekida (engl. *single-strand breaks* - SSBs), i posebni mehanizmi za popravku dvolančanih prekida (engl. *double-strand breaks* - DSBs) koji mogu da imaju daleko ozbiljnije posledice. Oštećenja koja zahvataju samo jedan od lanaca DNK, gde neoštećeni komplementarni lanac može da se iskoristi kao matrica za popravku drugog, ispravljaju se isecanjem baze (engl. *base-excision repair* - BER), isecanjem nukleotida (engl. *nucleotide-excision repair* - NER) ili popravkom pogrešno sparenih baza (engl. *mismatch repair* - MMR). Iako su prvenstveno namenjeni popravci različitih vrsta oštećenja DNK, ovi putevi se i delimično preklapaju.

Dvolančani prekidi DNK predstavljaju ozbiljnu pretnju genomskoj stabilnosti ćelije kao i njenom preživljavanju. Ova vrsta prekida predstavlja veći problem za ćeliju od jednolančanih, jer komplementarni lanac nije dostupan kao matrica da bi se oštećenje popravilo. Dvolančani prekidi mogu da nastanu kao posledica delovanja jonizujućeg ili UV zračenja, različitih hemijskih supstanci i slobodnih radikala, kao i usled zaustavljanja replikacione viljuške nakon nailaska na jednolančani prekid DNK (Hoeijmakers, 2001; Shrivastav et al., 2008). Takođe, dvolančani prekidi mogu nastati i

usled dejstva nukleaza tokom normalnih procesa u ćeliji, kao što je npr. V(D)J rekombinacija, kao i u toku mejoze.

Nakon nastanka dvolančanog prekida i njegove detekcije, uključuju se signalni putevi zaustavljanja ćelijskog ciklusa i aktiviranja proteina uključenih u njihovu popravku. Nepopravljanje ili pogrešno popravljjanje dvolančanih prekida, ukoliko ne dovede do ćelijske smrti, može da dovede do veoma različitih genomskih promena, kao što su veće ili manje delecije, translokacije, fuzije hromozoma, gubitak heterozigotnosti, kao i gubitak celog hromozoma. Sve ove promene povećavaju nestabilnost genoma i karakteristične su za ćelije kancera.

Postoje dva osnovna puta popravke dvolančanih prekida DNK: **nehomologo spajanje krajeva** (engl. *non-homologous end-joining* - **NHEJ**) i **popravka oštećenja posredovana homologom rekombinacijom** (engl. *homologous recombination mediated repair* - **HR**). Nepravilno funkcionisanje ovih puteva dovodi do genomske nestabilnosti i potpomaže kancerogenezu (Shrivastav et al., 2008). Postoje brojni proteini koji regulišu NHEJ i HR i oni podrazumevaju remodelovanje hromatina (fosforilacijom H2AX histona) da bi se omogućio pristup proteinima uključenim u popravku oštećenja, regulaciju ekspresije i fosforilacije proteina uključenih u popravku dvolančanih prekida, kao i njihovo nakupljanje na mestima oštećenja (Paull et al., 2000).

Nehomologo spajanje krajeva - NHEJ

NHEJ je aktivan u svim fazama ćelijskog ciklusa (Lieber et al., 2003; Rothkamm et al., 2003), ali je dominantan mehanizam za popravku dvolančanih prekida tokom G₀, G₁ i rane S faze ćelijskog ciklusa, kada sestrinska hromatida nije dostupna za popravku HR-om (Lieber et al., 2003). Tokom kasne S i G₂ faze ćelijskog ciklusa, HR je predominantan tip popravke dvolančanih prekida kao precizniji, ali NHEJ i dalje ostaje aktivan i u ovim fazama ćelijskog ciklusa (Lieber et al., 2003; Rothkamm et al., 2003).

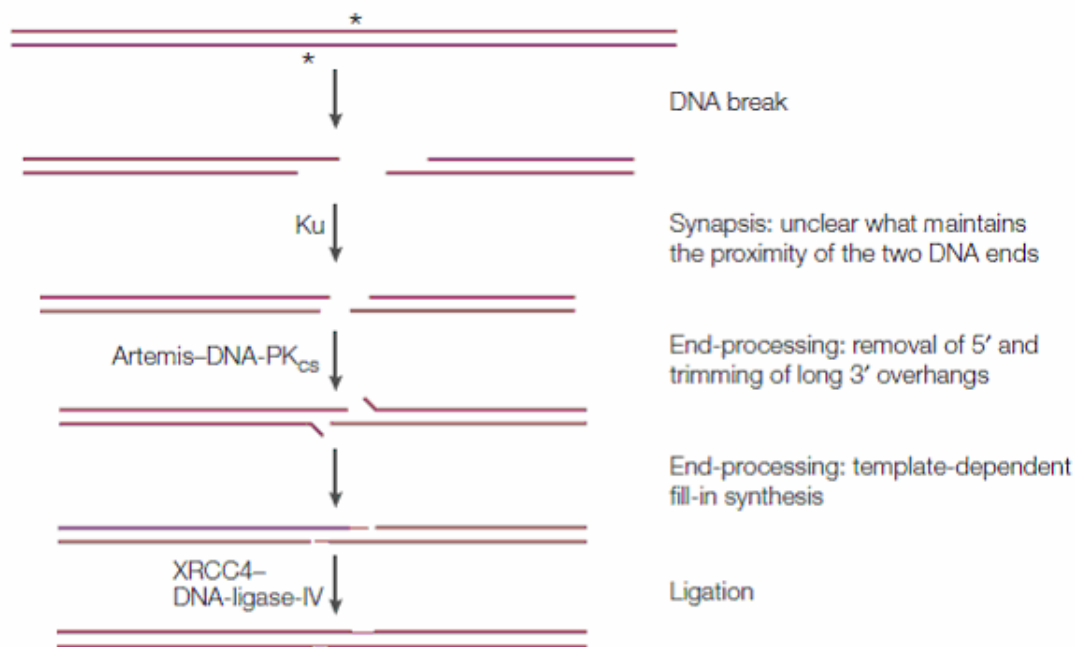
Prvi protein koji se vezuje za krajeve dvolančanog prekida DNK je Ku (Mimori and Hardin, 1986). Ku je heterodimer koji se sastoji od subjedinića Ku70 i Ku80. Protein Ku ima prstenast oblik, čiji je otvor taman toliki da dvolančana DNK može da prođe kroz njega (Walker et al., 2001). Ovo omogućava kontakt između proteina Ku i

šećerno-fosfatnog niza na DNK molekulu na način nezavisan od sekvence (Mimori and Hardin, 1986; Walker et al., 2001). Sledeći protein koji se vezuje za prekinute krajeve DNK je katalitička subjedinica DNK-zavisne protein kinaze, DNA-PKcs (engl. *DNA-dependent protein kinase catalytic subunit* - DNA-PKcs). Ova serin/treonin kinaza se vezuje na mestu grananja DNK molekula (na mestu prelaska dvolančanog u dva jednolančana DNK molekula) i biva aktivirana jednolančanim krajevima DNK (Hammarsten et al., 2000). Takođe, DNK-PKcs biva i dodatno aktivirana proteinom Ku (Yaneva et al., 1997).

Nakon vezivanja proteina Ku i DNA-PKcs za prekid DNK, sledeći protein koji se vezuje za DNA-PKcs-Ku kompleks je Artemis (Slika 5). U odsustvu DNA-PKcs, Artemis ima 5' i 3' egzonukleaznu aktivnost (Ma et al., 2002). Međutim, kada se Artemis veže za DNA-PKcs (što se događa i *in vitro* i *in vivo*), DNA-PKcs fosforiliše Artemis, čime Artemis stiče i 5' i 3' endonukleaznu aktivnost (Ma et al., 2002). Na 5' krajevima Artemis odseca viškove stvarajući tupe krajeve, tj. dvolančane krajeve bez jednolančanih viškova (Ma et al., 2002). Na 3' krajevima, nasuprot tome, višak se odseca tako da ostaje 4 ili 5 nukleotida jednolančanog viška (Ma et al., 2002). Ovo se naziva **obradom krajeva DNK** (engl. *DNA end-processing*). Zatim, polimeraza μ dodaje nukleotide na prekinute krajeve (Gu et al., 2007). Osim ove polimeraze, u ovom procesu može da učestvuje i polimeraza λ (Lee et al., 2004). Poslednji korak u ponovnom spajanju prekinutih krajeva DNK je **ligacija** lanaca DNK i taj korak obavlja DNK ligaza IV u kompleksu sa proteinom XRCC4 (Critchlow et al., 1997; Grawunder et al., 1997) (Slika 5).

Osim prethodno spomenutog puta NHEJ-a, za koji nije potrebna komplementarnost krajeva koji se spajaju, smatra se da postoji još jedan alternativni put NHEJ-a. Da bi ponovo povezao prekinute krajeve ovaj tip NHEJ-a koristi mikrohomologiju i zato se ovaj tip popravke dvolančanih prekida DNK naziva **mikrohomologijom posredovano spajanje krajeva** (engl. *microhomology-mediated end joining* - **MMEJ**). MMEJ je nezavisan od Ku ili RAD52 proteina, ali je zavisian od MRE11, RAD50 i RAD1 proteina (Ma et al., 2003). U MMEJ je uključen MRE11-RAD50-NBS1 (MRN) kompleks (Petrini, 1999; Ma et al., 2003; Zhang et al., 2004). MRE11 ima 3'-5' egzonukleaznu, kao i endonukleaznu aktivnost; ove aktivnosti su povećane kada je MRE11 u kompleksu sa RAD50 (Paull and Gellert, 1998). Osim toga,

MRE11 protein posreduje komplementarno spajanje jednolančanih molekula *in vitro* (de Jager et al., 2001). U toku MMEJ-a MRE11-RAD50-NBS1 kompleks svojom egzozukleaznom aktivnošću obrađuje dvolančane prekide i formira jednolančane delove sa mikrohomologijom. Zatim ovaj kompleks posreduje u spajanju jedne ili nekoliko komplementarnih baza ovih jednolančanih delova prekinutih krajeva (de Jager et al., 2001), nespareni 3' viškovi nizvodno od mesta mikrohomologije uklanjaju se posredstvom RAD1-RAD10 endonukleaznog kompleksa, dok ostatak nesparenih baza popunjava DNK polimeraza i lanci se povezuju ligazama (Moore and Haber, 1996; Ma et al., 2003). Ovakva popravka oštećenja za rezultat ima gubitak ili inserciju nekoliko nukleotida (Moore and Haber., 1996; Ma et al., 2003), ali može da dovede i do delecije i nekoliko stotina nukleotida (Boulton and Jackson, 1996; Yu and Gabriel, 2003).



Slika 5. Nehomologo spajanje krajeva (NHEJ). Za dvolančani prekid DNK prvo se vezuje protein Ku, zatim DNA-PKcs i Artemis. Krajevi DNK se obrađuju, polimeraza popunjava nedostajuće nukleotide a ligaza spaja krajeve. (Slika preuzeta iz Lieber et al., 2003)

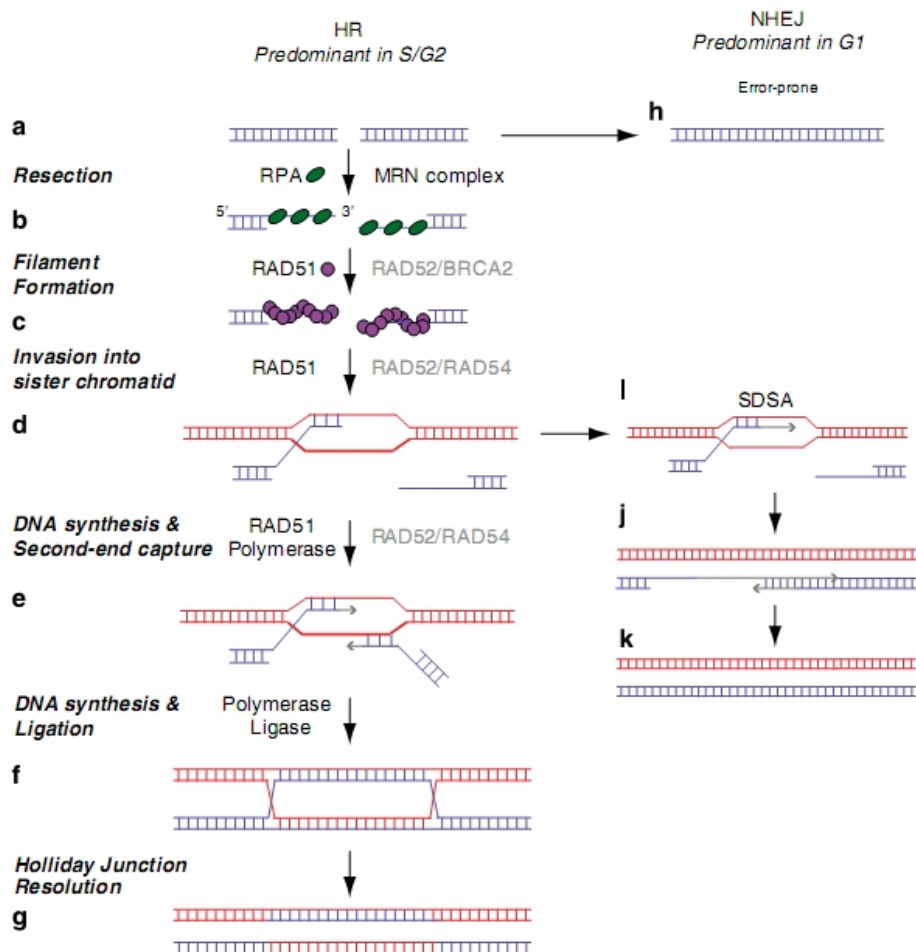
Homologom rekombinacijom posredovana popravka dvolančanih prekida DNK

Kao što je već rečeno, NHEJ je aktivan u svim fazama ćelijskog ciklusa, dok je popravka dvolančanih prekida posredovana homologom rekombinacijom (HR) predominantna u kasnoj S/G2 fazi ćelijskog ciklusa (Rothkam et al., 2003). Ovo je u skladu sa činjenicom da HR-posredovana popravka oštećenja DNK predominantno koristi sekvencu sa sestrinske hromatide kao matricu da bi se dosledno povratila originalna sekvenca DNK (Zhuang et al., 2006). U diploidnim organizmima, tokom G1 faze ćelijskog ciklusa jedina dostupna matrica za HR je homologi hromozom. Upotreba HR-a u takvim uslovima dovela bi do gubitka heterozigotnosti (Stark and Jasin, 2003). Kako replikacija napreduje, sestrinske hromatide postaju dostupne, tako da sa progresijom S faze HR sve više postaje put izbora za popravku dvolančanih prekida, pa je HR najaktivniji u kasnoj S i G2 fazama ćelijskog ciklusa (Rothkam et al., 2003).

Korišćenjem identične sestrinske hromatide kao matrice tokom HR-posredovane popravke oštećenja DNK minimalizuju se greške, pa se za ovaj put popravke oštećenja DNK generalno smatra da nije sklon greškama (engl. *error-free*).

HR započinje intenzivnom obradom 5' i 3' krajeva dvolančanog prekida DNK, koja je regulisana MRN kompleksom (Slika 6a). Rezultujući 3' jednolančani krajevi, dugi oko 30 nukleotida, bivaju prekriveni proteinom RPA (engl. *replication protein A* – RPA) (proteinom koji ima afinitet za vezivanje za jednolančanu DNK) (Slika 6b), koji uklanja sekundarne strukture DNK i sprečava njihovo ponovno formiranje. Zatim proteini RPA bivaju zamenjeni proteinom RAD51, čiji se helikoidan polimer, sačinjen od stotina monomera, obavija oko jednolančanih krajeva DNK i formira nukleoproteinske filamente (Slika 6c).

Nakon formiranja dva nukleoproteinska lanca (po jedan na svakom kraju dvolančanog prekida), dolazi do razdvajanja lanaca sestrinskog dupleksa i jedan od nukleoproteinskih lanaca komplementarno se vezuje za homologu sekvencu sestrinske hromatide. RAD51 katalizuje traženje homologije i razmenu lanaca DNK (Sung, 1994). Nakon ovog koraka, popravka oštećenja može da se nastavi na dva načina: **popravkom dvolančanih prekida DNK** (engl. *double-strand break repair* - **DSBR**) ili **putem hibridizacije lanaca zavisne od sinteze** (engl. *synthesis-dependent strand annealing* - **SDSA**) (Slika 6d).



Slika 6. Homologom rekombinacijom posredovana popravka dvolančanih prekida DNK. **a** - U G2/S fazi ćelijskog ciklusa dvolančani prekidi popravljaju se posredstvom homologe rekombinacije (HR). **b** - Nakon vezivanja proteina MRN kompleksa za dvolančane krajeve, dolazi do obrade krajeva, formiraju se jednolančani krajevi za koje se vezuje protein RPA. **c** - RPA zamenjuje RAD51, **d** - **DSBR** - dolazi do vezivanja za sestrinsku hromatidu. **e** – vezivanje i za drugi lanac sestrinske hromatide, **f** - sinteza DNK i ligacija, **g** - razrešavanje dvostruke Holidejeve strukture. **i** - **SDSA** - sinteza DNK, **j** - razdvajanje od sestrinske hromatide i nastavak popravke sintezom DNK, **k** - popravka bez razmene lanaca. (Slika preuzeta iz Thorslund and West, 2007)

Naime, i drugi nukleoproteinski lanac može komplementarno da se veže za drugi homologi lanac na sestrinskoj hromatidi (West, 2003) (Slika 6e), produkujući dvostruku Holidejevu strukturu (Schwacha and Kleckner, 1995). Slobodni 3' krajevi nukleoproteinskih filamenata koriste se kao prajmeri za sintezu DNK, dok se homologe

sekvence sestrinske hromatide koriste kao matrica za sintezu DNK, čime se tačno popravljaju oštećeni krajevi DNK (Slika 6f). Nakon sinteze DNK, dvostruka Holidejeva struktura razrešava se sa ili bez razmene delova sekvenci sestrinskih hromatida (engl. *crossingover*) i dovršava DNK ligazama. Ovaj put popravke dvolančanih prekida naziva se **popravka dvolančanih prekida** (engl. *double-strand break repair* - **DSBR**). Kada se pri ovoj vrsti popravke dvolančanih prekida koriste sekvence koje nisu savršeno homologe (npr. sekvence sa homologog hromozoma), dolazi do nrecipročne razmene lokusa, sa donorskog (neoštećenog) na recipijentni (oštećeni) lokus, što može da rezultuje gubitkom heterozigotnosti (gubitak jednog od alela), i ovaj put popravke naziva se **genska konverzija** (engl. *gene conversion* - **GC**).

U drugom putu popravke dvolančanih prekida DNK, drugi nukleoproteinski filament se ne vezuje za drugi homologi lanac sestrinske hromatide, već se 3' kraj prvog nukleoproteinskog filameta koristi kao prajmer a homologa sekvenca sestrinske hromatide kao matrica za sintezu DNK (Slika 6i). Nakon sinteze DNK, novosintetisani lanac se premešta sa sestrinske hromatide i „vraća“, komplementarno se vezuje za drugi nukleoproteinski filament na drugom kraju dvolančanog prekida (Slika 6j). Preostali jednolančani delovi se popunjavaju DNK polimerazama i povezuju DNK ligazama, dajući produkte bez razmene delova homologih sekvenci (bez *crossingover*-a). Ovaj put popravke dvolančanih prekida DNK naziva se **hibridizacija lanaca zavisna od sinteze** (engl. *synthesis-dependent strand annealing* - **SDSA**) (pregledno u West, 2003).

Osim ova dva puta popravke dvolančanih prekida posredstvom homologe rekombinacije, postoji i put, sličan MMEJ-u, koji se naziva **hibridizacija jednog lanca** (engl. *single-strand annealing* - **SSA**), koji se koristi ukoliko se dvolančani prekid dogodi između bliskih ponavljajućih sekvenci. Krajevi dvolančanog prekida se obrađuju egzonukleazama (najverovatnije MRN kompleksom) da bi se formirali dugački jednolančani krajevi DNK, koji mogu međusobno da se komplementarno vežu, nakon čega se viškovi skraćuju posredstvom ERCC1/XPF nukleaze i DNK polimeraze popunjavaju delove sa nesprenim nukleotidima. SSA podrazumeva korišćenje homologe sekvence za popravku dvolančanih prekida, ali s obzirom da ne zahteva vezivanje za komplementarne lance sa sestrinske hromatide, ovaj put ne koristi pun repertoar HR gena (Ivanov et al., 1996), pa je samim tim nezavisan i od RAD51. Ovaj put je sklon greškama (engl. *error-prone*) s obzirom da uključuje deleciju jednog dela

sekvence i potencijalno je važan put mutageneze s obzirom da se veliki deo humanog genoma sastoji od ponavljajućih elemenata (Elliott et al., 2005). Mikrohomologiju koristi i klasični NHEJ i SSA, ali NHEJ obično koristi kraće homologije (1-4 bp) u odnosu na MMEJ (4-25 bp, optimalno 6-10 bp), dok SSA zahteva duže homologe sekvence (≥ 30 bp) (Venkitaraman, 2002; Kuhfittig-Kulle et al., 2007).

Uloga BRCA1 i BRCA2 u popravci oštećenja DNK

S obzirom na to da bilo kakva promena sekvence na mestu prekida DNK može da uništi kodirajuće ili regulatorne sekvence, putevi popravke oštećenja, a posebno oni koji su skloni greškama, moraju biti strogo regulisani. Međutim, malo se zna o genetičkim faktorima koji kontrolišu veličinu promene sekvence tokom popravki oštećenja putevima koji su skloni greškama, ili koji sprečavaju ove popravke sklone greškama u slučajevima kada je precizno spajanje krajeva moguće (Zhuang et al., 2006).

Ubrzo nakon oštećenja DNK, na mestima dvolančanih prekida DNK ATM fosforiliše histon H2AX na Ser139 (Burma et al., 2001). Na tim mestima koja su obeležena fosforilisanim histonom H2AX (označen i kao γ H2AX) stvaraju se fokusi (Rogakou et al., 1998) koji se formiraju nekoliko minuta nakon oštećenja DNK i poklapaju se sa fokusima RAD50, RAD51 i BRCA1 koji se mogu videti kasnije tokom popravke oštećenja (Paull et al., 2000). MDC1 (posrednik kontrolne tačke DNK oštećenja 1, engl. *Mediator of DNA damage checkpoint 1* – MDC1) sadrži BRCT domene, koji omogućavaju njegovu direktnu interakciju sa γ H2AX (Stucki et al., 2005) i njegovu akumulaciju na mestima oštećenja DNK. Ovim započinje formiranje fokusa indukovanih oštećenjem DNK u kojima se, između ostalih proteina, akumulira i BRCA1 (Lou et al., 2003). MDC1 je potreban za odvođenje BRCA1 do mesta oštećenja DNK, koji biva doveden do mesta oštećenja obeleženih pomoću γ H2AX pre MRN kompleksa, RAD50 i RAD51 (Paull et al., 2000).

CHK2 i BRCA1 u nukleusu interaguju u okviru nuklearnih fokusa. Nakon dejstva jonizujućeg zračenja (IR), CHK2 fosforiliše BRCA1 na Ser988, ova dva proteina se razdvajaju i jedarni fokusi nestaju (raspršuju se) (Lee et al., 2000). Ovako fosforilisan, BRCA1 inhibira MRN-zavisni (*error-prone*) MMEJ (Zhang et al., 2004) i podstiče HR i Ku-zavisni (*error-free*) NHEJ (Zhuang et al., 2006), utičući na **izbor**

preciznijih puteva popravki oštećenja DNK. Naime, vezivanjem za MRN kompleks (Zhong et al., 1999) i za dvolančanu DNK BRCA1 direktno inhibira endonukleaznu aktivnost MRN kompleksa i egzonukleaznu aktivnost samog MRE11 (Paull et al., 2001). Time BRCA1 smanjuje mogućnost nastanka grešaka nakon popravke dvolančanih prekida DNK, izbegava se nakupljanje grešaka koje mogu voditi kancerogenezi, što je sve u skladu sa ulogom BRCA1 kao tumor supresora.

Osim toga, vezivanjem za MRN kompleks **BRCA1 je uključen i u obradu krajeva DNK.** Osim MRN kompleksa i BRCA1, u obradi krajeva DNK učestvuju i CtIP (RBBP8), egzonukleaza Exo1 i helikaza BLM (engl. *Bloom syndrome protein* - BLM) (Sartori et al., 2007; Gravel et al., 2008; Nimonkar et al., 2008) (Slika 7). CtIP stimuliše obradu krajeva DNK interagujući sa MRN kompleksom i stimulišući njegovu endonukleaznu (ali ne i egzonukleaznu) aktivnost (Sartori et al., 2007). Suprimiranjem ekspresije CtIP, smanjuje se i akumulacija RPA u fokusima indukovanim oštećenjima (Chen et al., 2008). Isto tako, pokazano je i da je BRCA1 uključen u obradu krajeva DNK, jer je u fokusima indukovanim oštećenjem u BRCA1-deficijentnim ćelijama smanjena akumulacija RPA, koja ukazuje na postojanje jednolančane DNK (Chen et al., 2008). Pošto za BRCA1 nije poznato da ima nukleazne ili helikazne domene i funkcije, može se pretpostaviti da BRCA1 povezuje MRN kompleks sa CtIP i omogućava formiranje MRN-CtIP kompleksa koji obavlja ove funkcije (Huen et al., 2010).

Prvo je bilo nađeno da BRCA1 interaguje sa RAD51 (Scully et al., 1997). Međutim, kasnije je postalo jasno da zapravo **BRCA2 interaguje sa RAD51** (Wong et al., 1997) i da je ranije nađena interakcija BRCA1 i RAD51 posredovana proteinom BRCA2 (West, 2003). Naime, smatra se da je **BRCA2 potreban za transport RAD51 u jedro**, jer BRCA2 ima signale za lokalizaciju u jedru (engl. *nuclear localization signals* - NLSs), dok oni nisu identifikovani kod RAD51. Osim toga, nakon ulaska u jedro BRCA2 je potreban **i za dovođenje RAD51 do fokusa** i njegovu akumulaciju u fokusima koji se stvaraju u jedru nakon oštećenja DNK (Yuan et al., 1999).

Identifikovana je i nova komponenta, PALB2 (partner i lokalizator BRCA2, engl. *partner and localizer of BRCA2* – PALB2, takođe poznat i kao FANCN), uzvodni faktor koji je potreban za stabilno vezivanje BRCA2 za hromatin, omogućavajući time pravilno funkcionisanje BRCA2 (Xia et al., 2006). Ovo je potvrđeno rezultatima koji su pokazali da nedostatak PALB2 ukida formiranje fokusa BRCA2 indukovanih oštećenjem (Xia et al., 2007). Osim toga, nedavno je nađeno da je PALB2 faktor koji je

neophodan za međusobno vezivanje BRCA1 i BRCA2 (Sy et al., 2009; Zhang et al., 2009). Smatra se da BRCA1 potpomaže HR-posredovanu popravku oštećenja DNK kroz interakciju sa PALB2-BRCA2-RAD51 kompleksom (Sy et al., 2009).

BRCA2 je uključen i u *Fanconi anemia* signalni put ubikvitinacije u odgovoru na oštećenje DNK, jer je BRCA2 zapravo FANCD1 protein (pregledno u Kennedy and D'Andrea, 2005). Time je aktivacija *Fanconi anemia* signalnog puta u odgovoru na zastoj replikativne viljuške usled oštećenja DNK agensima koji spajaju dva DNK lanca (*cross-linking* agensi) povezana sa HR-posredovanom popravkom oštećenja.

OSTALE ULOGE PROTEINA BRCA U ĆELIJI

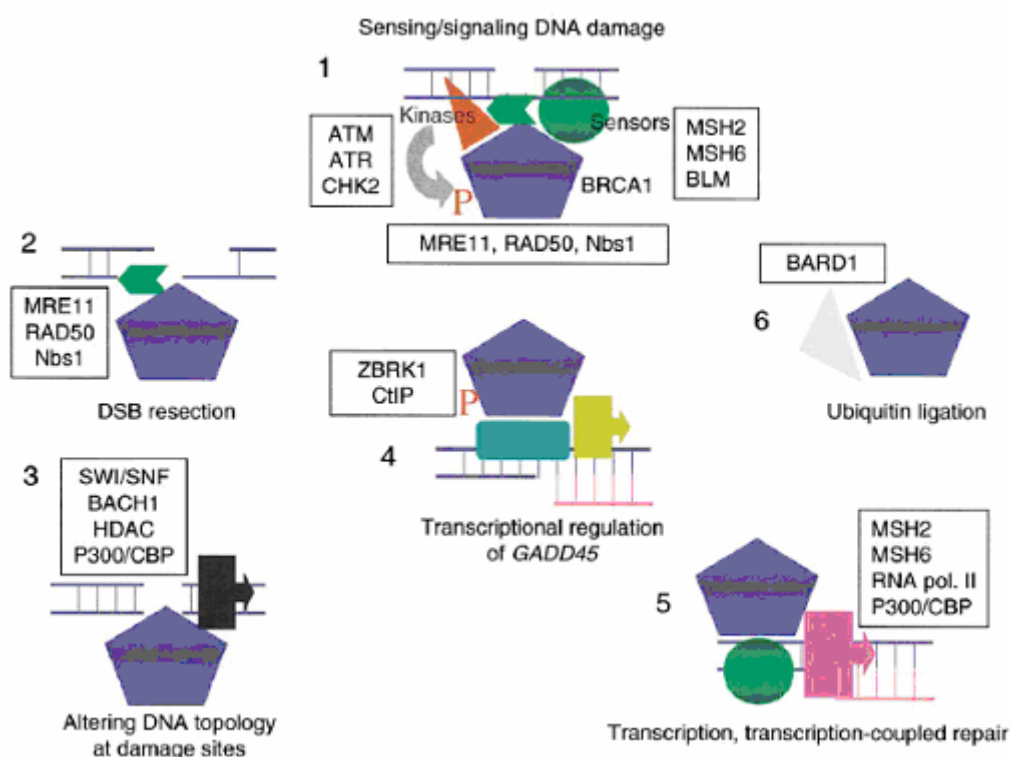
Modifikacija hromatina

BRCA1 učestvuje u modifikaciji hromatina interagujući sa enzimima koji modifikuju hromatin i strukturu DNK. BRCA1 interaguje sa SWI/SNF (Bochar et al., 2000) i drugim proteinima (Ye et al., 2001) koji remodeluju hromatin, sa histon acetilazama CBP/p300 (Pao et al., 2000) i deacetilazama HDAC1 i HDAC2 (Yarden and Brody, 1999) (Slika 7). Modifikacijom hromatina DNK u blizini oštećenja postaje pristupačnija za popravku oštećenja.

Prepoznavanje oštećenja DNK

BRCA1 interaguje sa DNK helikazama, uključujući BLM (Wang et al., 2000) i BACH1 (Cantor et al., 2001), kao deo velikog proteinskog kompleksa BASC (BRCA1-asocirani kompleks za nadzor genoma, engl. *BRCA1-associated genome surveillance complex* – BASC) (Slika 7). Ovaj kompleks sadrži najmanje 15 subjedinica: osim BRCA1, ATM i BLM, između ostalih sadrži i MRN kompleks, proteine puta za popravku nekomplementarno sparenih baza (engl. *missmatch repair*) MSH2, MSH6 i MLH, RFC (DNK replikacioni faktor C, engl. *DNA replication factor C*) i PCNA (Wang et al., 2000). Ovi proteini prepoznaju oštećenja i neuobičajene strukture DNK, kao što su dvolančani prekidi, nepravilno sparene baze, Holidejeve strukture, krstaste strukture, veze između prajmera i matrice, kao i sekvence telomernih ponovaka (Uchiumi et al., 1996; Alani et al., 1997; Bennett et al., 1999; Marsischky et al., 1999), pa mogu da funkcionišu kao senzori za ove vrste oštećenja DNK. MRN kompleks i

ATM interaguju sa dvolančanim prekidima, dok proteini *missmatch repair*-a prepoznaju neuobičajene strukture DNK nastale distorzijom heliksa nekomplementarno sparenim bazama i hemijskim promenama heliksa cisplatinom, DNK-metilirajućim agensima i dr. (Wang et al., 2000). DNK helikaza BLM prepoznaje neuobičajene dvolančane strukture DNK tokom replikacije. Mnogi od ovih proteina imaju svoju direktnu ulogu u replikaciji DNK ili u replikaciji DNK prilikom popravke oštećenja. Ovo može da ukaže na ulogu BRCA1 u koordinaciji različitih funkcija replikacije DNK koje su važne za održavanje genomske integriteta u ćeliji, kao i na potencijalnu ulogu BRCA1 u različitim putevima popravke oštećenja DNK, kao što su popravka nekomplementarno sparenih baza (engl. *missmatch repair*), popravka oštećenja isecanjem nukleotida (engl. *nucleotide excision repair* - NER), globalna genomska popravka oštećenja (engl. *global genome repair* - GGR), popravka oštećenja povezana sa transkripcijom (engl. *transcription-coupled DNA repair*).



Slika 7. Različite uloge BRCA1. 1 - Signaliziranje oštećenja, 2 - obrada krajeva oštećenja DNK, 3 - modifikacija hromatina, 4 - regulacija transkripcije, 5 - popravka oštećenja povezana sa transkripcijom, 6 - ubikvitinacija. (Slika preuzeta iz Venkitaraman, 2002)

Ubikvitinacija proteina

BRCA1 interaguje sa proteinom **BARD1** (protein asociiran sa BRCA1 RING domenom, engl. *BRCA1 associated RING domain*) (Wu et al., 1996) i *in vivo* se predominantno nalazi u kompleksu sa ovim proteinom (Yu and Baer, 2000) (Slika 7). BRCA1 i BARD1 interaguju posredstvom svojih RING domena (Wu et al., 1996; Brzovic et al., 2001) i formiraju heterodimerski kompleks koji ima E3 ubikvitin ligaznu aktivnost (Hashizume et al., 2001). Ovi proteini lokalizovani su u istim jedarnim fokusima tokom S faze (Jin et al., 1997) i nakon oštećenja DNK premeštaju se na mesta popravke tih oštećenja (Celeste et al., 2003). Asocijacija BARD1 sa BRCA1 pojačava E3 ubikvitin ligaznu aktivnost proteina BRCA1 (Hashizume et al., 2001).

Pokazano je da heterodimer BRCA1-BARD1 **kontrolira duplikaciju centrozoma** regulišući ubikvitinaciju proteina centrozoma, uključujući i γ -tubulina (Starita et al., 2004). Naime, BRCA1 ubikvitinira centrozome nakon njihovog udvajanja, time ih obeležava kao udvojene i sprečava njihovo ponovno udvajanje pre citokineze (Wong and Stearns, 2003; Ko et al., 2006). Gubitak BRCA1, dakle, dovodi do nedostatka ove kontrole duplikacije centrozoma, dovodeći do njihove amplifikacije i aneuploidije u ćerkama ćelijama nakon deobe.

Osim toga, nakon oštećenja DNK kompleks BRCA1-BARD1 ubikvitinira RNK polimerazu II, što dovodi do njene degradacije, a samim tim i do **inhibicije transkripcije** i procesovanja RNK (Kleiman et al., 2005; Starita et al., 2005). Naime, RNK polimeraza II i proteini za obradu 3' kraja transkripta koji su zaustavljeni na mestu oštećenja DNK mogu da budu meta BRCA1-BARD1 za ubikvitinaciju i degradaciju (Kleiman et al., 2005). Smatra se da se ovim procesom omogućava pristup oštećenju DNK a možda i regrutovanje faktora za popravku oštećenja DNK. Osim toga, eliminišu se prerano završeni (nekompletni) transkripti koji bi mogli da produkuju skraćene (neispravne) proteine. BRCA1 interaguje sa RNK polimerazom II (Scully et al., 1997), i to u obliku heterodimera BRCA1-BARD1 (Chiba and Parvin, 2002). Osim inhibicije transkripcije, smatra se da BRCA1 može da ima ulogu i u **aktivaciji transkripcije**, na šta ukazuje visoki sadržaj negativno naelektrisanih amino kiselina na C-terminalnom delu BRCA1 proteina (Miki et al., 1994). Eksperimentima je pokazano da u aktivaciji transkripcije učestvuje deo C-terminusa BRCA1 proteina između amino kiselina 1560 i 1863 (Monteiro et al., 1996). Postoje naznake da i BRCA2 ima ulogu u aktivaciji transkripcije, i to deo proteina koji kodira egzon 3 (Milner et al., 1997).

Ostale uloge gena BRCA

BRCA1 takođe inhibira ligand-nezavisnu aktivaciju transkripcije od strane estrogenog receptora α (ER- α), odnosno, sprečava da ER- α aktivira transkripciju kad nije aktiviran ligandom (Zheng et al., 2001). Ova inhibicija odvija se kroz fizičku interakciju N-terminusa proteina BRCA1 sa aktivacionim domenom (AF-2) ER- α (Fan et al., 2001). Inhibicija aktivnosti ER- α od strane BRCA1 zahteva i C-terminus BRCA1 koji zapravo funkcioniše kao inhibicioni domen (Fan et al., 2001). Pokazano je da na isti način BRCA1 inhibira i transkripciju aktiviranu estrogenom (kada je estrogen vezan za ER- α) (Fan et al., 1999).

BRCA1, BRCA2 i BARD1 deo su kompleksa koji se naziva **BRCC** (kompleks koji sadrži BRCA1 i BRCA2, engl. *BRCA1-BRCA2-Containing Complex*). Ovaj kompleks pokazuje **E3 ubikvitin-ligaznu aktivnost**, kojom reguliše faktore uključene u popravku oštećenja DNK (Dong et al., 2003). BRCC kompleks asocira sa RAD51 i na mestima oštećenja DNK moduliše popravku oštećenja ubikvitinacijom hromatina ili proteina uključenih u popravku (Dong et al., 2003).

BRCA1 je uključen i u **regulaciju apoptoze** nakon ćelijskog stresa. Pokazano je da BRCA1 indukuje apoptozu kroz aktivaciju signalnog puta JNK/SAPK (engl. *c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase*) (Harkin et al., 1999). Kasnije je pokazano da BRCA1 indukuje apoptozu nakon različitih tipova stresa kroz signalni put koji uključuje onkogen H-Ras, MEKK4, JNK, Fas i Fas ligand i aktivaciju kaspaze 9, nezavisno od p53 (Thangaraju et al., 2000).

MUTACIJE U GENIMA BRCA

Mutacije u genima BRCA doprinose povećanom riziku za oboljevanje od karcinoma dojke i/ili jajnika i povezane su sa naslednim oblikom ovih oboljenja. Geni BRCA su, kao što je već rečeno, veliki geni, sa po više od 20 kodirajućih regiona (BRCA1 22 kodirajuća egzona od 24, a BRCA2 26 od 27). Mutacije u genima BRCA su raspoređene duž celih gena bez grupisanja, što, osim velikog broja kodirajućih regiona, dodatno otežava njihovu detekciju. Do sada je otkriveno više od 1600 mutacija u genu BRCA1 i oko 1900 mutacija u genu BRCA2 (Lindor et al., 2008). Većina do sada detektovanih mutacija (oko 70%) su sa pomakom okvira translacije (engl.

frameshift), dok *nonsense* i *missense* mutacije doprinose sa po oko 10%. Osim mutacija koje narušavaju funkciju proteina detektovane su i brojne promene, koje, pogotovo ukoliko su *missense* tipa, mogu dodatno, nisko ili umereno, da doprinose riziku za nastanak karcinoma dojke i/ili jajnika. Osim toga, pokazano je i da veliki rearanžmani ova dva gena (delecije ili duplikacije jednog ili više egzona) takođe predstavljaju čest tip mutacija, doprinoseći sa nekoliko procenata (Puget et al., 1999; Hartmann et al., 2004; Ratajska et al., 2008), ali i preko 10% (Unger et al., 2000; Agata et al., 2006), do čak i do preko 30% svih mutacija identifikovanih u nekim populacijama (Montagna et al., 2003).

Rizik za oboljevanje od karcinoma dojke ili jajnika razlikuje se zavisno od pozicije mutacije u genu BRCA1 (Lecarpentier et al., 2011) i BRCA2 (Lubinski et al., 2004). Naime, rizik za karcinom dojke je niži za osobe koje nose mutaciju u centralnom regionu gena BRCA1 (kodoni 374-1161) ili u regionu gena BRCA2 između kodona 957 i 1827 (Lecarpentier et al., 2011). Povećan rizik za karcinom dojke imaju osobe koje nose mutaciju u genu BRCA2 između kodona 2546 i 2968 (Lecarpentier et al., 2011). Isto tako, nosioci mutacije u delu gena BRCA2 između amino kiselina 3035 i 6629, koji je nazvan region grupisanja karcinoma jajnika (engl. *ovarian cancer cluster region* – OCCR), imaju povećan rizik za karcinom jajnika (Lubinski et al., 2004) i smanjen rizik za karcinom dojke (Thompson et al., 2001).

Osnivačke (*founder*) mutacije

Spektar mutacija u genima BRCA različit je u različitim etničkim grupama. U nekim populacijama sa visokom učestalošću zastupljene su mutacije koje su u drugim populacijama retke. Ovo je obično posledica tzv. efekta osnivača (engl. *founder effect*). Naime, ove populacije su geografski i/ili reproduktivno izolovane, ili su nastale od malog broja jedinki (osnivača) i ceo genofond populacije zasniva se na genofonu osnivača. Usled toga u okviru te populacije rasla je učestalost mutacija koje su inače retke u drugim populacijama (pregledno u Ferla et al., 2007). Takva populacija je, na primer, populacija Aškenazi Jevreja, kao i populacija Poljaka, u kojima postoje po 3 najčešće, osnivačke mutacije, koje čine veliku većinu naslednih (*germ line*) mutacija u tim populacijama (Abeliovich et al., 1997; Gorski et al., 2004). Takođe, u populaciji Islanda najčešća je jedna mutacija u genu BRCA2 (Thorlacius et al., 1996). U isto

vreme, veliki deo mutacija u genima BRCA detektovane su samo jednom, pa se može reći da većina porodica pod rizikom ima svoju sopstvenu porodičnu mutaciju.

Mutacija 5382insC u 20. egzonu gena BRCA1 karakteristična je za slovenske populacije i njena učestalost opada od istoka ka zapadu Evrope. Ova mutacija nađena je sa različitim učestalošću u sistematskom uzorku karcinoma dojke u različitim populacijama. Tako je u Rusiji ova mutacija nađena sa učestalošću od 3,7% (Sokolenco et al., 2006), u Poljskoj 2,1% (Gorski et al., 2005), u Grčkoj 1,3% (Armaou et al., 2009), dok je u Nemačkoj 1% (Backe et al., 1999). Ranija preliminarna istraživanja (Papp et al., 1999), zajedno sa našim početnim istraživanjima nasledne predispozicije vezane za mutacije u genima BRCA u Srbiji pokazala su prisustvo slovenske mutacije 5382insC u 3 nezavisne porodice, što ukazuje na mogućnost da ova mutacija u genu BRCA1 može predstavljati osnivačku mutaciju kod nas.

KARCINOM DOJKE

Epidemiologija karcinoma dojke

U Srbiji od malignih bolesti svake godine oboli oko 34.000 osoba (Miljuš et al., 2011). Kod muškaraca, najčešći su maligni tumori pluća, debelog creva i prostate, a kod žena maligni tumori dojke, grlića materice, debelog creva, pluća, tela materice i jajnika (Miljuš et al., 2011).

Karcinom dojke predstavlja najčešće maligno oboljenje među ženama u svetu i drugo najčešće maligno oboljenje ukupno kod oba pola, odmah nakon karcinoma pluća (Ferlay et al., 2010). Karcinom dojke predstavlja ukupno peti uzrok smrti od malignih bolesti, dok je i dalje vodeći uzrok smrti od kancera među ženama kako u svetu (Ferlay et al., 2010), tako i u Srbiji (Miljuš et al., 2011).

U ženskoj populaciji u svetu karcinom dojke čini 22,9% svih maligniteta (GLOBOCAN 2008: <http://globocan.iarc.fr/>), dok u Srbiji čini više od četvrtine svih malignih bolesti (26,1%) (Miljuš et al., 2011). Svake godine u Srbiji se otkrije oko 3500 novih slučajeva kancera dojke (Miljuš et al., 2011). Od toga se, prema Institutskom registru za rak, oko 1400 novootkrivenih slučajeva godišnje dijagnostikuje na Institutu za onkologiju i radiologiju Srbije. Ova vrsta tumora je ujedno i vodeći uzrok smrti među

malignim tumorima kod žena u Srbiji (mortalitet iznosi 17,5%, dok je stopa mortaliteta 20,3%) (Miljuš et al., 2011).

Histologija karcinoma dojke

Dojka odrasle žene se sastoji od kanala (duktusa), koji se završavaju sekretornim alveolama, uronjenim u stromu sačinjenu od masnog i fibroznog vezivnog tkiva. Anatomske jedinice, lobusi, sadrže velike, srednje i male kanale ili duktuse. Kanceri dojke nastaju iz epitelnih ćelija koje ograničavaju ove kanale. Kanceri dojke mogu se podeliti na duktalne i lobularne, pri čemu su *duktalni* oni koji nastaju iz ćelija epitela velikih i srednjih duktusa, a *lobularni* oni koji nastaju iz ćelija epitela terminalnog duktusa lobularne jedinice.

Najčešći histološki tipovi invazivnog karcinoma dojke su duktalni i lobularni tip. Duktalni tip je kod žena zastupljen sa oko 70-75%, dok lobularni čini 5-15%, a medularni 1-7% (Li et al., 2003; Giordano et al., 2004; Honrado et al., 2004). Kod žena, tumori koji ekspiriraju receptor za estrogen (ER+) čine oko 75%, dok su tumori koji ekspiriraju receptor za progesteron (PR+) zastupljeni sa oko 65% (Giordano et al., 2004; Atchley et al., 2008; Andreson et al., 2010). Tumori koji prekomerno ekspiriraju receptor za epidermalni faktor rasta 2 HER2 (engl. *Human epidermal growth factor receptor 2* - HER2, ERBB2, Neu) nađeni su u oko 15-40% slučajeva karcinoma dojke kod žena (Bloom et al., 2001; Muir et al., 2003; Perkins and Middleton 2003).

Faktori rizika za karcinom dojke

Najznačajniji faktori rizika za karcinom dojke su:

1. *Pol.* Rak dojke se 60-100 puta češće javlja kod žena nego kod muškaraca (Anderson et al., 2010; Miljuš et al., 2011).
2. *Godine starosti.* Rizik za rak dojke se povećava sa godinama starosti. Učestalost karcinoma dojke kod žena u Srbiji postepeno se povećava sa starošću do 60. godine života, nakon čega polako počinje da opada (Miljuš et al., 2011). U našoj zemlji najveća uzrasno-specifična stopa incidence karcinoma dojke kod žena zabeležena je u starosnoj grupi od 55 do 65 godina (Miljuš et al., 2011).
3. *Porodična istorija (genetički faktori).* Genetički faktori odgovorni su za 5 do 10% slučajeva karcinoma dojke i povezani su sa mutacijama u genima BRCA1 i BRCA2.

4. *Prethodna oboljenja dojki.* Osobe sa određenim benignim promenama u dojci imaju povećani rizik za karcinom dojke u odnosu osobe opšte populacije slične starosti. Npr. hiperplazije povećavaju rizik za karcinom dojke 1,5-2 puta, dok atipična duktalna hiperplazija povećava rizik 4-5 puta. Prisustvo karcinoma *in situ*, bilo lobularnog bilo duktalnog tipa, povezano je sa 10 puta povećanim rizikom za karcinom dojke (pregledno u Mallon et al., 2000).
5. *Prethodni kacinom dojke.* Žene koje su bolovala i bile lečene od karcinoma dojke imaju povećani rizik za pojavu karcinoma u drugoj dojci.
6. *Reproduktivni faktori,* u koje spadaju dug reproduktivni period (rana menarha (pre 12. godine) i kasna menopauza (posle 50. godine)), nerađanje, kasni prvi porođaj (posle 35. godine) i nedojenje, povezani su sa umerenim povećanjem rizika (pregledno u Kelsey et al., 1993).
7. *Upotreba hormonske terapije i oralnih kontraceptiva.* Višegodišnja upotreba hormonske supstitucione terapije, kao i višegodišnja upotreba oranih kontraceptiva umereno povećava rizik za rak dojke (pregledno u Kelsey et al., 1993).
8. *Gojaznost* kod žena u postmenopauzi povezana je sa povećanim rizikom za karcinom dojke (Morimoto et al., 2002).
9. *Jonizujuće zračenje.* Izlaganje jonizujućem zračenju povezuje se sa povećanim rizikom za karcinom dojke. Ovo povećanje rizika pokazuje se nakon 10 i više godina od izlaganja, ali ne pre 30. godine života. Stepem povećanja rizika zavisi od doze i starosne dobi pri izlaganju i najveći je kada je do izlaganja došlo tokom puberteta (Carmichael et al., 2003).
10. *Način života. Alkohol.* Konzumacija alkohola povezuje se sa povećanim rizikom za karcinom dojke uz postojanje povezanosti doze i efekta. *Za pušenje* se smatra da nema ulogu u etiologiji kancera dojke (Hamajima et al., 2002).

KARCINOM DOJKE KOD MUŠKARACA

Epidemiologija karcinoma dojke kod muškaraca

Karcinom dojke kod muškaraca (engl. *male breast cancer* - MBC) je redak, predstavlja <1% svih kancera kod muškaraca i <1% svih dijagnostifikovanih kancera dojke (pregledno u Contractor et al., 2008; Jemal et al., 2010; Miao et al., 2011). U

Srbiji karcinom dojke kod muškaraca predstavlja 0,4% svih malignih oboljenja muškaraca (Miljuš et al., 2011).

Karcinom dojke kod muškaraca, osim što ima značajno nižu incidencu od karcinoma dojke kod žena, javlja se u kasnijoj životnoj dobi (Giordano et al., 2004; Ottini et al., 2010; Miao et al., 2011). Incidenca muškog karcinoma dojke raste sa starošću pacijenata i dostiže plato oko 80. godine života (Giordano et al., 2004), dok incidenca karcinoma dojke kod žena opada nakon 60. godine života i u nekim populacijama pokazuje ponovni porast nakon 70. godine života.

Histologija karcinoma dojke kod muškaraca

Karcinomi dojke kod muškaraca (MBC) razlikuju se od karcinoma dojke kod žena i po učestalosti histoloških tipova i po ekspresiji hormonskih receptora i molekularnih markera. Kod karcinoma dojke kod muškaraca dominantan je duktalni tip karcinoma: čak i više od 90% svih slučajeva je invazivnog duktalnog tipa (Giordano et al., 2004; pregledno u Contractor et al., 2008). S obzirom da muška dojka nema razvijene terminalne lobule, osim ako nije bila izložena visokim dozama endogenog i/ili egzogenog estrogena, lobularni tip tumora zastupljen je u do 1,5% invazivnih MBC (Giordano et al., 2004).

Ekspresija receptora za estrogen (ER) i progesteron (PR) je viša kod MBC u odnosu na karcinom dojke kod žena. MBC su ER+ u 80-90% slučajeva, dok su PR+ u 70-80% slučajeva (Giordano et al., 2004; pregledno u Contractor et al., 2008; Andreson et al., 2010; Korde et al., 2010). HER2 je prekomerno eksprimiran kod MBC u do 5% slučajeva (Bloom et al., 2001; Muir et al., 2003), mada je u nekim studijama ovaj procenat veći (i do 35%) (Rudlowski et al., 2004; Korde et al., 2010).

Faktori rizika za karcinom dojke kod muškaraca

1. *Porodična istorija (genetički faktori)*. Oko 20% svih MBC pacijenata imaju u porodici osobu obolelu od karcinoma dojke ili jajnika (Korde et al., 2010). Genetički faktori povezani su sa mutacijama najčešće u genu BRCA2, ređe u BRCA1, CHEK2 i drugim genima (pregledno u Johansen Taber et al., 2010).
2. *Prethodna oboljenja od kancera*. Muškarci kod kojih je dijagnostifikovan prvi primarni karcinom dojke imaju 16% povećan rizik da razviju drugi primarni kancer u poređenju sa opštom populacijom muškaraca (Satram-Hoang et al., 2007). Rizik

je povećan ne samo za drugi primarni karcinom dojke (30 puta veći rizik) (Auvinen et al., 2002), već i za melanom, različite gastrointestinalne karcinome, karcinome prostate i pankreasa (Auvinen et al., 2002; Hemminki et al., 2005; Satram-Hoang et al., 2007).

3. *Hormonalni faktori rizika.* Hormonski disbalans u smislu prekomerne količine estrogena i nedostatka testosterona povećava rizik za oboljevanje od MBC. Ovaj disbalans može da nastane egzogeno (npr. usled dugog konzumiranja antiandrogena i estrogena kod terapije karcinoma prostate) ili endogeno usled testikularnih abnormalnosti, oboljenja jetre, gojaznosti (duplira rizik za MBC), kao i u slučaju Klinefelterovog sindroma (pregledno u Johansen Taber et al., 2010; pregledno u Ottini et al., 2010). Klinefelterov sindrom (47, XXY) javlja se kod oko 1 u 1000 muškaraca, prisutan je kod 3-7% muškaraca sa karcinomom dojke. Muškarci sa ovim sindromom imaju 20-50 puta veći rizik za karcinom dojke u odnosu na opštu populaciju (Lynch et al., 1999; pregledno u Giordano, 2005; pregledno u Ottini et al., 2010). Životni rizik za oboljevanje od karcinoma dojke kod osoba sa Klinefelterovim sindromom iznosi oko 5% (Korde et al., 2010).
4. *Faktori rizika sredine i zanimanja.* Kao i kod žena, izlaganje grudnog koša *zračenju* povećava rizik za kasniji nastanak karcinoma dojke (Thomas et al., 1994; Ron et al., 2005), sa malim pozitivnim trendom sa povećanjem broja rengen snimanja grudi i bliskih delova tela i sa periodom indukcije od najmanje 20-25 godina, sa kasnijim padom rizika nakon 30 ili 40 godina nakon poslednjeg izlaganja (Thomas et al., 1994). Izlaganje (usled zanimanja, vrste posla) *toploti i elektromagnetnom polju* takođe su povezani sa povećanim rizikom za MBC (pregledno u Ottini et al., 2010).
5. *Način života.* Kao i kod žena, *alkohol* predstavlja faktor rizika za razvoj MBC, sa povećanjem od 16% za svako povećanje unosa alkohola od 10 g na dan (pregledno u Ottini et al., 2010). S druge strane, rezultati nekih istraživanja nisu potvrdila ovu povezanost (pregledno u Johansen et al., 2010). *Za pušenje* se smatra da nema ulogu u etiologiji kancera dojke kod muškaraca (Sasco et al., 1993).

KARCINOM JAJNIKA

Epidemiologija karcinoma jajnika

Karcinom jajnika je maligno oboljenje osmo po učestalosti oboljevanja u svetu (3,7%) i sedmo po mortalitetu (4,2%) (GLOBOCAN 2008: <http://globocan.iarc.fr/>).

Karcinom jajnika predstavlja maligno oboljenje šesto po učestalosti oboljevanja u Srbiji (3,4%) i sedmo po smrtnosti (4,5%) (Miljuš et al., 2011). U Srbiji se otkrije oko 400-450 novih slučajeva godišnje (Miljuš et al., 2011). Incidenca oboljevanja raste sa starošću, sa naglim porastom nakon 50. godine života, nakon čega ostaje visoka (Miljuš et al., 2011). Stopa mortaliteta takođe raste sa starošću i to naglo nakon 55. godine života, nakon čega i dalje postepeno raste (Miljuš et al., 2011).

Histologija karcinoma jajnika

Tumori jajnika mogu se podeliti na osnovu ćelija od kojih nastaju na tri osnovne grupe: epitelni, stromalni i tumori germinativnih ćelija (pregledno u Lynch et al., 2009). Tumori jajnika epitelnog tipa su predominantni i čine 90% svih tumora jajnika. Postoji nekoliko različitih histoloških podtipova epitelnih tumora jajnika podeljenih na osnovu izgleda ćelija, od kojih su najčešći serozni, mucinozni, endometrioidni i svetloćelijski (engl. *clear cell*) tumori (pregledno u Lynch et al., 2009). Preostalih 10% malignih tumora jajnika spada u stromalne i one koji potiču od germinativnih ćelija (pregledno u Lynch et al., 2009).

Faktori rizika za karcinom jajnika

1. *Porodična istorija (genetički faktori)*. Karcinom jajnika se javlja kao deo tri autozomno-dominantna porodična sindroma: nasledni karcinom dojke i jajnika (*Hereditary breast and ovarian carcinoma*, HBOC), *site-specific* karcinom jajnika i Lynch sindrom (*hereditary non-polyposis colorectal cancer*, HNPCC). Smatra se da je do 10% karcinoma jajnika povezano sa ovim porodičnim sindromima (Ramus and Gayther, 2009). Nasledni karcinomi jajnika u okviru prva dva sindroma povezani su sa mutacijama u genima BRCA1 i BRCA2. Osobe koje su prethodno obolele od karcinoma dojke i osobe koje u porodici imaju osobe obolele od karcinoma dojke i/ili jajnika imaju povećan rizik da i same obole od karcinoma jajnika (Bergfeldt et al., 2002).

2. *Endometrioza jajnika* povećava rizik za nastanak karcinoma jajnika (Modugno et al., 2004).
3. *Starost*. Incidenca karcinoma jajnika raste sa starošću.
4. *Reproduktivni faktori*. Rizik za nastanak karcinoma jajnika povezan je sa brojem ovulatornih ciklusa u reproduktivnom periodu žene (Tung et al., 2005). Faktori kojima se inhibira ovulatorni ciklus, kao što su upotreba oralnih kontraceptiva, trudnoća i laktacija, smanjuju rizik za karcinom jajnika (Tung et al., 2005). Samim tim, lekovi koji se koriste u lečenju steriliteta koji stimulišu ovulaciju povećavaju rizik za karcinom jajnika, kao i rana menarha i kasna menopauza (duži reproduktivni period povećava broj ovulatornih ciklusa), odloženo rađanje, mali broj porođaja ili nerađanje.
5. *Način života*. *Gojaznost* povećava rizik za karcinom jajnika kod premenopauzних žena, ali ne i kod žena u menopauzi (Schouten et al., 2008). *Pušenje* takođe povećava rizik za karcinom jajnika (Terry et al., 2003), dok uticaj *ishrane* i konzumiranje *alkohola* na rizik nije u potpunosti jasan.

NASLEDNI KARCINOM DOJKE I JAJNIKA

Većina karcinoma dojke javlja se slučajno, bez porodičnog nakupljanja i ovi karcinomi označeni su kao sporadični. Smatra se da je oko 6-7% svih karcinoma dojke i oko 10% svih karcinoma jajnika nasledno (Claus et al., 1996). Najčešći oblik nasledne forme ovih oboljenja je pojava karcinoma dojke i jajnika u istoj porodici (engl. *hereditary breast and ovarian cancer* – HBOC), gde u porodici postoji nakupljanje i karcinoma dojke i karcinoma jajnika. Osim ove forme, postoji i porodično nakupljanje samo karcinoma dojke ili samo karcinoma jajnika (engl. *site-specific breast/ovarian cancer*).

Nasledni tip karcinoma dojke i jajnika povezani su sa mutacijama germinativnih ćelija u genima BRCA1 i BRCA2. Mutacije u ovim genima nasleđuju se na autozomno-dominantan način i javljaju se sa učestalošću od oko 1 u 400 do 1 u 800 žena (Whittemore et al., 1997; Anglian Breast Cancer Study Group, 2000; Whittemore et al., 2004).

U porodicama sa nakupljanjem samo karcinoma dojke, bez obolelih osoba muškog pola, 65% slučajeva karcinoma dojke povezano je sa mutacijom u genu BRCA1 ili BRCA2 (BRCA1 oko 28%, BRCA2 oko 37%), dok su za ostatak od 35% odgovorne još neidentifikovane mutacije (Ford et al., 1998). U porodicama sa nakupljanjem i karcinoma dojke i karcinoma jajnika, bez obolelih osoba muškog pola, većina slučajeva karcinoma povezana je sa mutacijama u genu BRCA1 (80%), dok je 15% povezano sa mutacijama u genu BRCA2, a samo mali deo ovih slučajeva (5%) nije povezan sa mutacijama u ova dva gena (Ford et al., 1998). Nasledni karcinom jajnika povezan je sa mutacijama u genu BRCA1 u 50-70%, a sa mutacijama u genu BRCA2 15-25% (Elit, 2001). Karcinom dojke kod muškaraca je povezan sa mutacijama u genu BRCA2 u čak 4-14% slučajeva, pa čak i u oko 40% slučajeva u Islandu, gde se jedna osnivačka mutacija u genu BRCA2 (999del5) javlja sa učestalošću i do 0,6% u opštoj populaciji (Thorlacius et al., 1997). Mutacije u genu BRCA1 nađene su sa manjom učestalošću kod muškaraca obolelih od karcinoma dojke, od 0% (Friedman et al., 1997; Basham et al., 2002) do 10% (Frank et al., 2002).

Osim HBOC, dodatnih 15-20% slučajeva karcinoma dojke spadaju u tzv. familijarni (porodični) karcinom dojke, koji podrazumeva postojanje porodičnog nakupljanja karcinoma dojke i veću učestalost ovog oboljenja u porodici u odnosu na opštu populaciju. Međutim, karcinomi dojke u ovim porodicama ne pokazuju šablone nasleđivanja ili godina oboljevanja kao nasledni kanceri (Daly et al., 2010). Familijarni karcinomi mogu biti uzrokovani slučajnim nakupljanjem sporadičnih karcinoma u porodici, promenom u genima manje penetrabilnosti, zajedničkim uticajem sredine, ili kombinacijom ovih faktora (Berliner and Fay, 2007).

Životni rizik za oboljevanje od karcinoma dojke u opštoj populaciji je oko 10% (King et al., 2003). Nosioci mutacija u genima BRCA nose 5 do 8 puta (40-85%) povećani životni rizik za oboljevanje od karcinoma dojke (King et al., 2003). Životni rizik za karcinom jajnika kod nosilaca mutacija u genima BRCA je takođe povećan: 10 do 20 puta je veći u odnosu na opštu populaciju, gde je životni rizik oko 1,8% (King et al., 2003). Rizik za oboljevanje od karcinoma dojke raste sa povećanjem broja obolelih srodnika i dodatno ako srodnici oboleli u mlađem životnom dobu (Easton, 2002).

Za nosioca mutacije u genu BRCA1 rizik za oboljevanje od karcinoma dojke do 70. godine života je 46% - 69%, a za karcinom jajnika je 39% - 46% (Antoniou et al., 2003; King et al., 2003; Chen et al., 2006; Chen and Parmigiani, 2007). Do 80. godine

života rizici iznose 81-90% za karcinom dojke, odnosno 24-54% za karcinom jajnika (King et al., 2003; Risch et al., 2006). Rizik za kontralateralni karcinom dojke kod nosioca mutacije u genu BRCA1 iznosi 32% u toku 10 godina nakon dijagnoze prvog karcinoma dojke (Metcalfé et al., 2004), dok je životni rizik procenjen na oko 40% (Brose et al., 2002). Osim toga, mutacije u genu BRCA1 povezane su sa pojavom ranog karcinoma dojke (pre 40. godine života) (Loman et al., 2001).

Za nosioca mutacije u genu BRCA2 rizik do 70. godine života za karcinom dojke je 43% - 49%, a za jajnik 11% - 22% (Antoniou et al., 2003; King et al., 2003; Chen and Parmigiani, 2007), a do 80. godine života rizik za karcinom dojke je 41%, a za jajnik 8,4% (Risch et al., 2006). Rizik za kontralateralni karcinom dojke kod nosioca mutacije u genu BRCA2 je 24,5% u toku 10 godina nakon dijagnoze prvog karcinoma dojke (Metcalfé et al., 2004). Sa mutacijama u genu BRCA2 povezani su i karcinom dojke kod muškaraca, kao i nasledni karcinom prostate (The Breast Cancer Linkage Consortium, 1999). Životni rizik za MBC kod nosioca mutacija u genima BRCA1/2 povećan je i za nosioce mutacija u genu BRCA2 iznosi oko 7% (pregledno u Liede et al., 2004).

Osobe, nosioci mutacije u genima BRCA, koje su već imale karcinom dojke, imaju povećan rizik za oboljevanje i od karcinoma jajnika. Procenjeno je da ovaj rizik iznosi 13% za 10 godina za nosioce mutacija u genu BRCA1 i 7% za 10 godina za nosioce mutacija u genu BRCA2 (Finch et al., 2006).

Nosioci mutacija u genima BRCA imaju povećan rizik i za razvoj drugih tipova kancera. Tako nosioci mutacije u genu BRCA1 imaju povećan rizik za karcinom jajovoda, pankreasa, materice, grlića materice (pregledno u Petrucelli et al., 2010), kao i za karcinom debelog creva (Kadouri et al., 2007). Nosioci mutacije u genu BRCA2 imaju povećan rizik za karcinome jajovoda, prostate, pankreasa, želuca, žučne kese i žučnih kanala i melanoma (pregledno u Petrucelli et al., 2010).

Histologija karcinoma povezanih sa mutacijama u genima BRCA

Mutacije u genima BRCA povezane su sa naslednom predispozicijom za nastanak kancera koji potiču od epitelnog ćelija tkiva dojke i jajnika (karcinomi).

Karcinom dojke

Karcinomi povezani sa mutacijama u genu BRCA1 se po nekim histološkim karakteristikama razlikuju od sporadičnih karcinoma dojke, dok su oni povezani sa mutacijama u genu BRCA2 sličniji sporadičnim. Karcinomi povezani sa mutacijama u genu BRCA1 češće su duktalnog i medularnog tipa (Honrado et al., 2004) u odnosu na sporadične, u velikoj većini ne ekspimiraju receptor za estrogen (ER), receptor za progesteron (PR) i HER2 (ER-, PR- i HER2-) (tzv. **trostruko negativni karcinomi dojke**, engl. “*triple negative*” *breast cancers*), visokog su gradusa i visoko proliferativni i češće imaju mutaciju i u genu p53 (Lakhani et al., 2002; Robson et al., 2004; Honrado et al., 2005; pregledno u Sowter and Ashworth, 2005). S druge strane, karcinomi povezani sa mutacijama u genu BRCA2 takođe su višeg gradusa od sporadičnih karcinoma dojke, ali češće su ER+ i PR+ (Lakhani et al., 2002; Robson et al., 2004; Honrado et al., 2005a).

Karcinom jajnika

Predominantni histološki tip naslednog karcinoma jajnika je serozni tip sa zastupljenošću od 60 do preko 90% svih karcinoma jajnika povezanih sa mutacijama u genima BRCA (Rubin et al., 1996; Risch et al., 2001; Pal et al., 2005; Mæhle et al., 2008). Takođe, karcinomi jajnika povezani sa mutacijama u genima BRCA višeg su gradusa od sporadičnih i češće imaju mutacije u p53 genu (pregledno u Sowter and Ashworth, 2005).

GENETIČKO TESTIRANJE

Genetičko testiranje za naslednu predispoziciju za karcinom dojke i/ili jajnika je višestepeni proces. Ono podrazumeva prepoznavanje osoba sa povećanim rizikom, njihovo savetovanje pre izvođenja testa i davanje saglasnosti ispitanika (potpisivanje informisanog pristanka), izbor laboratorijskog testa, dobijanje rezultata, kao i savetovanje nakon dobijanja rezultata.

Prvi korak u procesu genetičkog testiranja je prepoznavanje osoba sa povećanim rizikom za nasledni karcinom dojke i/ili jajnika, odnosno osoba koje imaju povećanu

verovatnoću da nose mutacije u genima BRCA1/2. Kriterijumi za prepoznavanje osoba pod rizikom su:

- Više slučajeva karcinoma dojke sa iste strane porodičnog stabla (posebno u mlađoj životnoj dobi)
- Pojava karcinoma jajnika (sa pozitivnom porodičnom istorijom za karcinom dojke ili karcinom jajnika)
- Pojava karcinoma dojke i karcinoma jajnika kod iste osobe
- Pojava bilateralnog karcinoma dojke
- Pojava karcinoma dojke kod muškarca, sa i bez pozitivne porodične istorije
- Pojava ranog karcinoma dojke (pre 35. godine života), bez pozitivne porodične istorije
- Etničko poreklo (na primer, od Aškenazi Jevreja)
- Srodnik koji nosi mutaciju u genu BRCA1 ili BRCA2

S obzirom da se radi o nasleđenoj mutaciji, BRCA testiranje (analiza prisustva oštećujućih mutacija u genima BRCA1 i BRCA2) izvodi se iz uzorka periferne krvi ispitanika. Ukoliko u populaciji nisu poznate najčešće (osnivačke) mutacije, analiziraju se svi kodirajući regioni gena BRCA1 i BRCA2. Kada se kod ispitanika otkrije oštećujuća mutacija, ostali članovi porodice ispitanika mogu se testirati samo na prisustvo te porodične mutacije.

Rezultat analize gena BRCA1/2 na prisustvo oštećujućih mutacija može biti negativan (odsustvo oštećujućih mutacija), pozitivan (prisustvo oštećujućih mutacija) i neinformativan (prisustvo promena nepoznatog kliničkog značaja). Zavisno od rezultata testiranja, savetovanje nakon dobijanja rezultata testiranja će imati različit tok i smisao.

Rezultat BRCA testiranja može da bude **pozitivan**, odnosno da pokaže da je prisustvo oštećujuće mutacije (*frameshift*, *nonsense* ili *missense* mutacije čiji je oštećujući efekat poznat) u jednom od gena. Ispitanik čiji je rezultat testiranja pozitivan zahteva posebno genetičko savetovanje. Ukoliko je nosilac već oboleo, pozitivan rezultat ukazuje na povećani rizik za ponovno oboljevanje. Ukoliko nosilac nije oboleo, naglašava se da postojanje mutacije ne znači da će sigurno i doći do oboljevanja, što je uzrokovano nekompletnom penetrabilnošću gena BRCA1/2, koja iznosi oko 80% (Narod and Foulkes, 2004). Upravo zbog toga, nemoguće je predvideti ko će od nosioca štetnih mutacija u ovim genima oboleti, već je moguće jedino **proceniti individualni**

rizik za oboljevanje. Osim procene rizika za oboljevanje datog ispitanika, tokom savetovanja ispitanik biva informisan o metodama za smanjenje rizika i procedurama kliničkog praćenja. **Mere za smanjivanje rizika** za oboljevanje predstavljaju hirurške intervencije obostrane mastektomije i/ili ooforektomije. Obostranom mastektomijom rizik za oboljevanje od karcinoma dojke smanjuje se za oko 90% (Rebbeck et al., 2004; van Sprundel et al., 2005), dok se obostranom ooforektomijom rizik za oboljevanje od karcinoma dojke smanjuje za oko 50-60% (Rebbeck et al., 2002; Kramer et al., 2005). Bilateralna salpingo-ooforektomija (uklanjanje i jajnika i jajovoda) smanjuje rizik za karcinom jajnika za 71-96% kod nosioca mutacija u genima BRCA (Finch et al., 2006). Opcija **kliničkog praćenja** nije mera koja dovodi do smanjenja rizika za oboljevanje, već podrazumeva kliničke preglede u određenom ritmu da bi se, ukoliko dođe do oboljevanja, bolest otkrila u što ranijoj fazi, čime je i lečenje i izlečenje tih osoba brže, sigurnije i jednostavnije. Takođe, savetuje se i **testiranje ostalih krvnih srodnika ispitanika**, i to onih sa one strane porodičnog stabla sa koje je i ispitanik nasledio detektovanu mutaciju.

Negativan rezultat BRCA testiranja kod ispitanika u čijoj porodici još nije detektovana štetna mutacija u genima BRCA1 i BRCA2, a u njoj postoji izrazito porodično nakupljanje, ne oslobađa ispitanika potencijalnog povećanog rizika za oboljevanje, jer može da postoji povećani rizik za nastanak bolesti vezan za još neidentifikovanu (usled nesavršenosti korišćene tehnologije) oštećujuću mutaciju u BRCA ili u drugim genima. Moguće je takođe da je u pitanju slučajno familijarno nakupljanje, nakupljanje usled faktora sredine ili načina života. Da bi se razrešila ova situacija poželjno je testirati još nekog obolelog srodnika iz porodice ispitanika i u slučaju kada ispitanik nije oboleo i u slučaju kada je oboleo, jer ispitanik može predstavljati tzv. fenokopiju (oboleo bez prisustva mutacije) (Berliner and Fay, 2007).

Ispitanik sa negativnim rezultatom BRCA testiranja iz porodice sa već prethodno detektovanom oštećujućom porodičnom mutacijom ne nosi povećani rizik za nastanak naslednog karcinoma dojke i/ili jajnika, ali podleže riziku za oboljevanje kao i ostale osobe u opštoj populaciji.

Rezultat testiranja može biti i **neinformativan** i podrazumeva postojanje promene (najčešće *missense* mutacije) nepoznatog kliničkog značaja (nije poznato da li doprinosi povećanju rizika za oboljevanje i u kojoj meri), što zahteva poseban oprez pri tumačenju rezultata i davanju preporuka ispitaniku. Dostupne softverske analize efekta

zamene amino kiseline daju nam teorijske procene o mogućem kliničkom značaju određene mutacije. S druge strane, literaturni podaci mogu nam dati predstavu o stvarnom kliničkom efektu mutacije dajući nam podatke o riziku za oboljevanje osoba sa ovim mutacijama u poređenju sa rizikom prisutnim u opštoj populaciji. Ukoliko i dalje postoji sumnja da detektovana promena može da doprinosi povećanju rizika za oboljevanje (na osnovu softverskih analiza i/ili literaturnih podataka), osobe koje nose ove promene tretiraju se i savetuju kao da su nosioci oštećujućih promena. Predočava im se da je efekat promene koju nose još uvek nepoznat i predlažu opcije smanjenja rizika ili kliničkog praćenja, kao i osobama čiji je rezultat testiranja pozitivan.

CILJ ISTRAŽIVANJA

Do sada nema podataka o tipovima i učestalostima mutacija u genima BRCA1/2 u Srbiji. Utvrđivanjem najčešćih (osnivačkih) mutacija u našoj populaciji ubrzaće se, pojednostaviti i pojeftiniti BRCA testiranje, jer će započinjanjem testiranja na prisustvo najčešće mutacije veliki broj nosioca mutacija biti detektovan već na samom početku analize, čime će se u velikom broju slučajeva izbeći dugotrajna, mukotrpa i skupa analiza celih kodirajućih regiona gena BRCA1/2. Da bi se ovaj cilj ostvario, potrebno je:

- Utvrditi tipove i učestalosti mutacija u genima BRCA1 i BRCA2 kod osoba koje ispunjavaju kriterijume za BRCA testiranje u Srbiji.
- U sistematskom uzorku karcinoma dojke ispitati učestalost mutacije 5382insC u genu BRCA1 kao potencijalne osnivačke mutacije u našoj populaciji.
- Proceniti efikasnost predviđanja prisustva mutacija BRCAPRO programom u ispitivanoj grupi osoba koje su testirane na prisustvo mutacija u genima BRCA1/2.

MATERIJAL

ISPITANICI

Osobe koje će biti testirane odabirane su na osnovu uvida u porodičnu istoriju za karcinom dojke i jajnika, kao i na osnovu procene verovatnoće da osoba nosi mutaciju u genima BRCA1/2 BRCAPRO programom. Ukoliko je procenjena verovatnoća $\geq 10\%$ osoba je kandidat za testiranje. Pri odabiru osoba za testiranje kriterijum dobijen BRCAPRO programom (verovatnoća $\geq 10\%$) kombinuje se sa dodatnim podacima iz porodične istorije koji nisu uzeti u obzir ili bi mogli biti procenjeni ovim programom, pa se u nekim slučajevima testiraju i osobe čija je procenjena verovatnoća $< 10\%$, kada za to postoji opravdanje.

U našem uzorku verovatnoću za postojanje mutacije u genima BRCA $\geq 10\%$ imalo je 57 osoba, verovatnoću $< 10\%$ imalo je 17 osoba, dok za preostalih 11 ispitanika podatak o BRCAPRO verovatnoći nije bio dostupan.

Analizirano je 85 (6 muškaraca i 79 žena) uzoraka periferne krvi osoba sa povećanim rizikom za karcinom dojke i/ili jajnika koje potiču iz 69 porodica.

Od 85 testiranih osoba, 24 osobe nisu obolele. Od karcinoma dojke obolelo je 52 osobe, 3 osobe obolele su od karcinoma jajnika, a 5 osoba i od karcinoma dojke i od karcinoma jajnika. Detaljan broj obolelih od različitih vrsta karcinoma dat je u Tabeli 1.

Tabela 1. Vrsta oboljenja i broj obolelih osoba u našoj testiranoj grupi.

Lična istorija	Broj osoba
Zdravi	24
Karcinom dojke	21
Rani karcinom dojke (pre 35. godine života)	17
Rani karcinom dojke i bilateralni karcinom dojke	1
Bilateralni karcinom dojke	4
Bilateralni karcinom dojke i karcinom debelog creva	2
Bilateralni karcinom dojke i karcinom pluća	1
Karcinom dojke kod muškaraca	4
Karcinom dojke <i>in situ</i>	2
Karcinom jajnika	3

Karcinom dojke i karcinom jajnika	4
Rani karcinom dojke, karcinom jajnika, karcinom kolona i karcinom pluća	1
Karcinom jajovoda	1

Od 85 testiranih osoba, 18 osoba nema porodičnu istoriju za karcinom dojke ili jajnika, dok su ostali imali u porodici obolele srodnike. Detalji iz porodičnih istorija dati su u Tabeli 2.

Tabela 2. Broj osoba sa različitim oboljenjima u porodici.

Porodična istorija	Broj osoba
Bez porodične istorije	18
Karcinom dojke	26
Rani karcinom dojke	4
Bilateralni karcinom dojke	2
Karcinom dojke kod muškaraca	1
Karcinom dojke i rani karcinom dojke	4
Karcinom dojke, rani karcinom dojke i karcinom debelog creva	1
Karcinom dojke, rani karcinom dojke i bilateralni karcinom dojke	2
Karcinom dojke i bilateralni karcinom dojke	8
Karcinom dojke i karcinom dojke kod muškaraca	3
Karcinom jajnika	3
Karcinom dojke i karcinom jajnika	3
Rani karcinom dojke i karcinom jajnika	1
Karcinom jajnika i karcinom prostate	1
Karcinom jajnika, karcinom prostate i karcinom jajovoda	6
Karcinom debelog creva	2

Uzorci krvi osoba sa povećanim rizikom za oboljevanje od karcinoma dojke i/ili jajnika sakupljeni su iz različitih delova Srbije.

Sistematski uzorak karcinoma dojke sastoji se od 257 uzoraka krvi obolelih sakupljenih u Dnevnoj bolnici IORS-a. Uzorak je nasumičan, nezavisan od porodične

istorije obolelih, starosti u vreme oboljevanja i karakteristika (TNM, histološki tip) i bioloških markera tumora (ER, PR; HER2).

Svi ispitanici, kako oni u grupi osoba sa pozitivnom porodičnom istorijom, tako i oni u grupi sistematskog uzorka karcinoma dojke, potpisali su informisani pristanak odobren od strane Etičkog odbora Instituta za onkologiju i radiologiju Srbije.

METODE

IZOLACIJA MONONUKLEARNIH ĆELIJA IZ PERIFERNE KRVI

Mononuklearne ćelije iz uzoraka periferne krvi izolovane su centrifugiranjem na 400g na gustinskom gradijentu (Histopaque-1077, Sigma) i ispiranjem 2 puta fiziološkim rastvorom uz centrifugiranje na 400g. Talog izolovanih mononuklearnih ćelija čuva se na -20°C do korišćenja.

IZOLACIJA DNK NA APARATU *ABI Prism™ 6100 Nucleic Acid PrepStation*

ABI Prism™ 6100 Nucleic Acid PrepStation je sistem dizajniran za izolaciju i prečišćavanje nukleinskih kiselina (NK) iz različitih tipova bioloških uzoraka, uključujući kulture ćelija, životinjsko i biljno tkivo i punu krv. Nakon prečišćavanja, nukleinske kiseline mogu se upotrebiti na različite načine, uključujući PCR, reverznu transkripciju i DNK sekvenciranje.

Biološki materijal iz koga se izoluje NK nanosi se na ploču za izolovanje i prečišćavanje. Ova ploča ima specijalno dizajniranu membranu od staklenih vlakana, za koju će se vezati određene NK dok će se ostale komponente ćelije isprati tokom koraka prečišćavanja. Na kraju, prečišćena NK se eluira sa membrane.

Za izolaciju DNK iz uzoraka korišćen je *BloodPrep Kit*, koji može da se koristi za izolaciju DNK iz sveže ili zamrznute pune krvi ili izolovanih ćelija krvi, ćelijskih kultura i briseva, kao i za izolaciju DNK patogena iz seruma, plazme, cerebrospinalne tečnosti ili supernatanta ćelijskih kultura. Za izolaciju je potrebno 150 µl sveže ili zamrznute pune krvi, do 10⁶ ćelija iz ćelijske kulture ili materijal dobijen uzimanjem brisa.

Određena količina prethodno izolovanih mononuklearnih ćelija periferne krvi resuspenduje se u *BloodPrep DNA Purification Solution*-u koji lizira ćelije. Ova suspenzija se nanosi na ploču. Primenom vakuuma DNK se vezuje za membranu, dok ostale komponente ćelija prolaze kroz nju. Dodavanjem *BloodPrep DNA Wash Solution*-a, pufera za prečišćavanje, i primenom vakuuma u nekoliko sukcesivnih

koraka DNK se dodatno prečišćava od proteina i drugih ostataka ćelija. Na kraju, dodavanjem dva pufera za eluciju DNK se eluira sa membrane.

Ovako izolovana DNK je visoke čistoće i visokog kvaliteta (jako malo fragmentisana), u koncentraciji od oko 30-80 ng/ μ l, prosečno oko 50 ng/ μ l (iz 150 μ l pune krvi ili iz oko 10^6 izolovanih ćelija krvi). Ova koncentracija i kvalitet DNK dovoljni su za dalju primenu.

SPEKTROFOTOMETRIJSKO ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE DNK

Količina izolovane DNK meri se spektrofotometrijom na osnovu količine apsorbovane svetlosti određene talasne dužine. Kada se svetlost propusti kroz neku supstancu, u spektru svetlosti će nedostajati trake određene talasne dužine. To znači da je ta supstanca apsorbovala svetlost na tim talasnim dužinama, a ostatak je propustila nepromenjen. Na osnovu ovoga može se meriti količina neke supstance u nekom rastvaraču. ApSORPCIJA rastvarača se uzima kao nulta vrednost apSORPCIJE. Zavisno od količine supstance čiju koncentraciju merimo, rastvor će apsorbovati veću ili manju količinu svetlosti određene talasne dužine za koju znamo da biva apsorbovana od strane date supstance.

Čistoća i koncentracija izolovane DNK se proverava na spektrofotometru (*Eppendorf BioPhotometer*). ApSORBANCA se meri na 230, 260, 280 i 320 nm. Na 230 nm apsorbuju peptidi, ugljeni hidrati i fenol, na 260 nm nukleinske kiseline (purinske i pirimidinske baze), a na 280 nm proteini i fenol. Merenjem apSORBANCE na 320 nm određuje se „zamućenost“ rastvora koja ne potiče ni od NK ni od proteina (npr. od soli i drugih molekula). Čistoća izolovane DNK određena je odnosom količine DNK i proteina u uzorku, koji je dobijen izračunavanjem odnosa apSORBANCII na 260 i na 280 nm ($R=A_{260}/A_{280}$). Ta vrednost za relativno čistu DNK treba da je u intervalu 1,7-2,0.

Referenca za merenje apSORBANCE je rastvarač u kome je rastvorena DNK. U ovom slučaju to je smeša dva eluciona pufera.

Koncentracija DNK se računa po formuli:

$$C = (A_{260} \times R \times 50 \times OP) / 1000 \mu\text{g}/\mu\text{l}$$

gde je: A_{260} - apsorbanca izmerena na talasnoj dužini od 260 nm,

R - razblaženje (u ovom slučaju je $R=100$),

OP - optički put (dužina puta koju svetlost pređe pri merenju, tj. debljina kivete) (1 cm),

50 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) - molarni ekstincioni koeficijent dvolančane DNK na 260 nm i na optičkom putu od 1 cm (apsorbancu 1 ima rastvor čiste dvolančane DNK od 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ na 260 nm ako je optički put svetlosti 1 cm).

Na osnovu izračunate koncentracije DNK određuje se količina uzorka koja će se staviti u smešu za PCR reakciju.

LANČANA REAKCIJA POLIMERAZE (*Polymerase Chain Reaction* - PCR)

Lančana reakcija polimeraze (engl. *Polymerase Chain Reaction* – PCR) je metoda koja omogućava selektivnu *in vitro* amplifikaciju određenog dela DNK imitirajući proces *in vivo* replikacije DNK. Za reakciju su potrebni tzv. prajmeri, dva oligonukleotida (najčešće oko 20 nukleotida), čija je sekvenca komplementarna sekvenci koja ograničava deo DNK koji želimo da umnožimo. Osim prajmera za reakciju je potrebna DNK polimeraza, nukleotidi, genomska DNK (kao matrica čiji deo želimo da umnožimo) i odgovarajući uslovi pufera u kojem se reakcija odvija. Reakcija se odvija u sukcesivnim koracima denaturacije, hibridizacije prajmera i elongacije. Naime, tokom denaturacije raskidaju se vodonične veze između komplementarnih lanaca DNK pod uticajem visoke temperature i lanci se razdvajaju, omogućavajući korišćenje jednolančane DNK kao matrice za dalju amplifikaciju. U narednom koraku, prajmeri se komplementarno vezuju za jednolančanu matricu (hibridizuju), nakon čega DNK polimeraza u koraku elongacije sintetiše deo DNK ograničen prajmerima po principu komplementarnosti na osnovu sekvence matrice. Ova tri koraka čine jedan

ciklus PCR-a. Fragmenti DNK sintetisani u prethodnom ciklusu PCR-a služe kao matrica za DNK sintezu u sledećem ciklusu. Ponavljanjem ciklusa 20-40 puta amplifikuje se tačno određena željena sekvenca 10^6 do 10^9 puta. Nakon svakog ciklusa broj produkata se duplira, tako da u reakciji dolazi do eksponencijalnog umnožavanja željenog dela DNK. Nakon poslednjeg ciklusa sledi finalna elongacija da bi se kompletirala sinteza parcijalno sintetisanih produkata.

Za reakciju korišćen je *AmpliTaq Gold PCR Master Mix* koji sadrži deoksi nukleotide (dNTP), *AmpliTaq Gold* DNK polimerazu i pufer optimalne jonske jačine za rad polimeraze (Tabela 3).

Tabela 3. Spisak supstanci potrebnih za PCR, potrebna finalna koncentracija u reakcionoj smeši i zapremina koja je dodata u reakcionu smešu.

KOMPONENTE	FINALNO	ZAPREMINA (μ l)
<i>AmpliTaq Gold PCR Master Mix</i>	1x	10
Uzvodni prajmer	3,2 pmol (0,16 μ M)	1
Nizvodni prajmer	3,2 pmol (0,16 μ M)	1
Genomska DNK	100 ng	*
Voda		**
Ukupna zapremina		20 μ l

* Zapremina rastvora genomske DNK koja je potrebna za reakciju određuje se na osnovu izmerene koncentracije izolovane DNK

** Voda se dodaje u odgovarajućoj zapremini tako da je ukupna zapremina reakcione smeše 20 μ l

Sekvence prajmera korišćenih za amplifikaciju kodirajućih regiona gena BRCA1 i BRCA2 dati su u Tabelama 4 i 5.

Tabela 4. Sekvence prajmera korišćenih za amplifikaciju kodirajućih regiona gena BRCA1.

	Uzvodni prajmer	Nizvodni prajmer
exon 2	GAAGTTGTCATTTTATAAACCTTT	TGTCTTTTCTTCCCTAGTATGT
exon 3	AACGAACTTGAGGCCTTATG	TTGGATTTTCGTTCTCACTTA
exon 5	CTCTTAAGGGCAGTTGTGAG	ATGGTTTTATAGGAACGCTATG
exon 6	TTTCTACTGTTGCTGCATCT	TAATTTGCAAACCTTCCTGAG
exon 7	CACAACAAAGAGCATAACATAGGG	CAGAGCAAGACTCCATCTCAA
exon 8	GCTGACTGATGATGGTCAATTT	GCTGCCTACCACAAATACAAA
exon 9	CCTGCCACAGTAGATGCT	ACACCAAATCCCAAGTCGTGTG
exon 10	CCCAGCAACCATTTTCATTT	AAGGTCCCAAATGGTCTTCA
exon 11.1	GGAATTAATGAAAGAGTATGAGC	CTCACACAGGGGATCAGCATTC
exon 11.2	CAACATAACAGATGGGCTGGAAG	TCTGTGGCTCAGTAACAAATGCTC
exon 11.3	GAAAACCTATCGGAAGAAGGCAAG	CGCATGAATATGCCTGGTAGAAG
exon 11.4	AGGCTGAGGAGGAAGTCTTCTACC	TCTGTTTTTGCCTTCCCTAGAGTG
exon 11.5	AAGTGTCTAATAATGCTGAAGACCCC	CATTCCTCTTCTGCATTTCTGG
exon 11.6	GCCAGTCATTTGCTCCGTTTT	AATACTGGAGCCCACTTCATTAGTAC
exon 11.7	TCAATGTCACCTGAAAGAGAAATGG	GACGCTTTTGCTAAAAACAGCAG
exon 11.8	GTTTGTCTGAGACACCTGATGACC	GTGATGTTCTGAGATGCCTTTG
exon 11.9	CGTTGCTACCGAGTGTCTGTCTAAG	GTGCTCCCCAAAAGCATAAA
exon 12	GTCCTGCCAATGAGAAGAAA	TGTCAGCAAACCTAAGAATGT
exon 13	AATGGAAAGCTTCTCAAAGTA	ATGTTGGAGCTAGGTCCTTAC
exon 14	CTAACCTGAATTATCACTATCA	GTGTATAAATGCCTGTATGCA
exon 15	TGGCTGCCAGGAAGTATG	AACCAGAATATCTTTATGTAGGA
exon 16	AATTCTTAACAGAGACCAGAAC	AAAACCTTTCCAGAATGTTG
exon 17	GTGTAGAACGTGCAGGATTG	TCGCCTCATGTGGTTTTA
exon 18	GGCTCTTTAGCTTCTTAGGAC	GAGACCATTTTCCAGCATC
exon 19	CTGTCATTCTTCTGTGCTC	CATTGTTAAGGAAAGTGGTGC
exon 20	ATATGACGTGTCTGCTCCAC	CTGCAAAGGGGAGTGAATAC
exon 21	CTTGTCCCTGGGAAGTAGCA	GGGTTCTCCAGGCTCTTAC
exon 22	TCCCATGAGAGGTCTTGCT	GAGAAGACTTCTGAGGCTAC
exon 23	CAGAGCAAGACCCTGTCTCA	TCAAAAAGACATTTTAGCCATTCA
exon 24	ATGAATTGACACTAATCTCTGC	GTAGCCAGGACAGTAGAAGGA

Tabela 5. Sekvence prajmera korišćenih za amplifikaciju kodirajućih regiona gena BRCA2.

	Uzvodni prajmer	Nizvodni prajmer
exon 2	GTTCCAGGAGATGGGACTGA	TGGGTTTTTAGCAAGCATTTTT
exon 3	TGGTTAAAATAAGGTGGGATTTT	CCCCAGTCTACCATATTGCAT
exon 4	CCAAAGAATGCAAATTTATAATCCA	TCTACCAGGCTCTTAGCCAAA
exon 5+6	TTCCAACAATTTATATGAATGAGAATC	TCTCAGGGCAAAGGTATAACG
exon 7	TCCTTAATGATCAGGGCATTTC	CAACCTCATCTGCTCTTTCTTG
exon 8	TGTGCTTTTTGATGTCTGACAAA	AAGGCATTCCAAAATTGTTAGC
exon 9	TTGGACCTAGGTTGATTGCAG	GGGTGACAGAGCAAGACTCC
exon 10a	TGTTTCTATGAGAAAGGTTGTGAGA	TCAAAGGGCTTCTGATTTGC
exon 10b	GCAAACGCTGATGAATGTGA	TTGCCTGCTTTACTGCAAGA
exon 10c	CTTTGCCACGTATTTCTAGCC	CCTGCATTCTTCAAAGCTACA
exon 10d	GCCTCTGAAAGTGGACTGGA	AAAAACACAGAAGGAATCGTCA
exon 11a	AAGCAGTCTTCCTGCCTCAG	TGCAGCCAAGACCTCTTCTT
exon 11b	TTTGGGACAATTCTGAGGAAA	GGCAACAGCTCAACGTTTTT
exon 11c	AAAATGTCAGACAAGCTCAAAGG	TCCTCTGCAAGAACATAAACCA
exon 11d	CGAACCCATTTTCAAGAACTC	GGCTTGCTCAGTTTCTTTTGA
exon 11e	TGGATTTAGCTTCATAACAGC	AATCGATGGGGCATTCATT
exon 11f	ACACCTAGCCAAAAGGCAGA	TTGAAACGACAGAATCATGACA
exon 11g	TGAAGCTCTGCAAAAAGCTG	GCTTCTTGAGCTTTCGCAAC
exon 11h	GAATTTGATGGCAGTGATTCAA	TTCCCGCTAGCTGTATGAAAA
exon 11i	CCCAGTTGGTACTGGAAATCA	TTGCAGGACTTTTTGCTGTTT
exon 11j	CTGTGGTGCCACCTAAGCTC	TGGCTCAATACCAGAATCAAGTT
exon 11k	TCATCTCTCCGAAAAACAAGA	CCAATGCCTCGTAACAACCT
exon 11l	GGCCACCTGCATTTAGGATA	TGAGCTGGTCTGAATGTTTCG
exon 11m	TGGGATTTTGTACACAGCAA	TTCTGAAGAACCACCTTCAACA
exon 11n	GAAACCCAGAGCACTGTGTAAA	TTGTTAGCATACCAAGTCTACTGAA
exon 12	AAACTGATATTATTTGCCTTAAAACA	GGATCCACCTGAGGTCAGAA
exon 13	CATTCAGTAAAATTGTAAAGCCTA	TCATTTATAAAAACGAGACTTTTCTCA
exon 14	ATGAGGGTCTGCAACAAAGG	GGGGAAAACCATCAGGACAT
exon 15	GCCAGGGGTTGTGCTTTTTA	CACATACCTGTTTATGGGGACA
exon 16	TTTGGTAAATTCAGTTTTGGTTTG	GAAGAAAGAGGGATGAGGGAAT

exon 17	TGATCTTGAACAATGTAGTTTTTGT	TGTGCAACATTTTGACATGG
exon 18	GTTTAAACAGTGAATTCTAGAGTCA	ACATCTAAGAAATTGAGCATCCTT
exon 19	GGCAGTTCTAGAAGAATGAAAAC	CCGAAACTCCATCTCAAACAA
exon 20	TGCCTGGCCTGATAACAATTA	TTGTTGCTATTCTTTGTCTAACACC
exon 21	TGGGTGTTTTATGCTTGGTTC	TCCTGTGATGGCCAGAGAGT
exon 22	TTTGTCTGTTTAAAGCCATCT	AAAACCTGATAAAAACAAAGCATTTACA
exon 23+24	TTCTTCCATTGCATCTTTCTCA	TGCCAACTGGTAGCTCCAAC
exon 25	TTGGAAAACCTGAGCTTTCG	TTCCTTGATACTGGACTGTCAAAA
exon 26	TGGGTTTGCAATTTATAAAGCAG	CAGAATATACGATGGCCTCCA
exon 27	TGATAGGCTACGTTTTTCATTTTT	ACGATTTTTTGCCCGATACAC
exon 27 int	TTGTGGCACCAAATACGAAA	GTGGGAGCAGTCCTAGTGGA

Protokol za amplifikaciju svih egzona gena BRCA1 i BRCA2 dati su u Tabeli 6.

Tabela 6. Protokoli za amplifikaciju kodirajućih regiona gena BRCA1 i BRCA2.

	BRCA2 egzoni 9 i 14		BRCA1 egzoni 7, 19, 20, 22 i BRCA2 egzon 11a		Svi ostali egzoni gena BRCA1 i BRCA2	
Inicijalna denaturacija	96°C 5 min		96°C 5 min		96°C 5 min	
Denaturacija	94°C 30 s	40 ciklusa	94°C 30 s	20 ciklusa 20 ciklusa	94°C 30 s	40 ciklusa
Hibridizacija	58°C 45 s		65°C - 55°C 45 s*		55°C 45 s	
Elongacija	72°C 45 s		55°C 45 s		72°C 45 s	
Finalna elongacija	72°C 10 min		72°C 10 min		72°C 10 min	

* temperatura hibridizacije je niža za 0,5°C u svakom narednom ciklusu – *touchdown PCR*

ELEKTROFOREZA NA AGAROSNOM GELU

Provera uspešnosti i kvaliteta PCR-a vrši se elektroforezom na 2% agaroznom gelu sa 0,5 µg/ml etidijum bromida u 0,5xTBE (Tris, borna kiselina i EDTA) puferu.

PCR produkt meša se sa bojom i nanosi na gel. Boja se sastoji od 6 x ksilencijanola (0,25%) u 30% glicerolu u vodi. Elektroforeza se odvija 25 minuta pri jačini struje od 25 mA. Gel se nakon završetka elektroforeze izloži UV svetlu na transiluminatoru. Etidijum bromid koji je interkaliran između baza u lancu DNK molekula fluorescira na UV svetlu i tako služi za vizuelizaciju produkata PCR reakcije. Fragmenti DNK putuju različitom brzinom zavisno od svoje dužine, tako da će fragmenti iste dužine preći istu dužinu puta i na gelu će se videti kao jedna jasna traka, dok će kraći fragmenti putovati brže kroz gel i na gelu će se videti kao niža traka u odnosu na onu koju daju duži fragmenti DNK.

PRIPREMA UZORAKA ZA AUTOMATSKO DNK SEKVENCIRANJE

Prilikom pripreme uzoraka za sekvenciranje prvo je potrebno prečistiti PCR produkt, obeležiti ga fluorescentnim bojama i prečistiti ga nakon obeležavanja. Nakon ovih koraka uzorak je spreman za sekvenciranje.

Prečišćavanje PCR produkata

Pre dalje pripreme uzoraka za sekvenciranje, produkti PCR reakcije moraju da se prečiste od preostalih prajmera, neugrađenih nukleotida, polimeraze, soli itd. Prečišćavanje može da se izvrši upotrebom *QIAquick PCR Purification Kit*-a ili korišćenjem enzima *Exonuclease I* (Exo I) i *Shrimp alkaline phosphatase* (SAP).

Prečišćavanje korišćenjem *QIAquick PCR Purification Kit*-a

QIAquick PCR Purification Kit se koristi za prečišćavanje jednolančanih i dvolančanih DNK fragmenata veličine 100 bp – 10 kb dobijenih PCR reakcijom od prajmera, nukleotida, polimeraze, soli i drugih nečistoća. Prečišćavanje se zasniva na adsorpciji DNK na *QIAquick* silika-membranu kolone u prisustvu visoke koncentracije soli, dok ostali molekuli prolaze kroz kolonu. PCR produkt koji je potrebno prečistiti pomeša se sa puferom za vezivanje, koji obezbeđuje odgovarajuću koncentraciju soli i pH za adsorpciju DNK za silika-membranu kolone. Zatim se puferom za prečišćavanje

uklanjaju svi molekuli koji nisu adsorbovani na membranu kolone (prajmeri, soli, neugrađeni nukleotidi itd). Na kraju se DNK eluira sa kolone elucionim puferom.

Prečišćavanje korišćenjem Exo I i SAP enzima

Prečišćavanje se zasniva na sposobnosti enzima *Exonuclease I* (Exo I) i *Shrimp alkaline phosphatase* (SAP) da razgrade neugrađene prajmere (Exo I) i uklone fosfatne grupe sa dNTP-ova (SAP), ostavljajući ih u vidu nukleozida. U PCR produkt dodaju se enzimi Exo I i SAP, dobro se izmeša i inkubira se 15 min na 37°C, kada enzimi svojom aktivnošću prečišćavaju uzorak. Potom se uzorak zagreje 15 min na 85°C da bi se enzimi inaktivirali. Ovako prečišćen uzorak spreman je za dalju pripremu za sekvenciranje.

Reakcija obeležavanja DNK pre sekvenciranja (Cycle sequencing reakcija)

Reakcija obeležavanja DNK pre sekvenciranja (engl. *cycle sequencing*) slična je PCR reakciji. Za razliku od PCR reakcije, u *cycle sequencing* reakciji, osim dNTP-ova koriste se i 2',3'-dideoksinukleotidi (ddNTP), pri čemu je svaki od ddNTP-ova obeležen jednom od četiri fluorescentne boje koje nakon ekscitacije emituju svetlost na različitim talasnim dužinama. Svi nukleotidi (i dNTP i obeleženi ddNTP), polimeraza i pufer koji su potrebni za *cycle sequencing* reakciju nalaze se u *BigDye Terminator Ready Reaction Kit*-u. Osim toga, umesto genomske DNK koja se dodaje u klasičnu PCR reakciju, kao matrica za ovu reakciju dodaje se prečišćeni PCR produkt čiju sekvencu treba odrediti, kao i samo jedan od para prajmera koji je korišćen u PCR reakciji.

Kao i u klasičnoj PCR reakciji, u sukcesivnim ciklusima denaturacije, hibridizacije i elongacije dolazi do linearnog umnožavanja željenog DNK molekula. DNK polimeraza po principu komplementarnosti na određenoj poziciji nasumično ugrađuje dNTP ili ddNTP. Nakon ugradnje ddNTP-a, usled nedostatka 3' hidroksilne grupe na ddNTP-u, onemogućena je ugradnja sledećeg nukleotida u taj molekul DNK i taj fragment ostaje obeležen fluorescentnom bojom na ddNTP-u na svom 3' kraju. Rezultat *cycle sequencing* reakcije je smeša fragmenata DNK različitih dužina, koji na svojim 3' krajevima sadrže bojama obeležene ddNTP.

Količina svakog od reagenasa korišćenih u *cycle sequencing* reakciji dati su u Tabeli 7.

Tabela 7. Količina reagenasa korišćenih u *cycle sequencing* reakciji.

REAGENSI	KOLIČINA
<i>Ready Reaction Premix v3.1 (2,5x)</i>	1,5 µl
<i>Big Dye Sequencing Buffer (5x)</i>	1,5 µl
Prajmer (3,2 pmol/µl)	2 µl
PCR produkt	*
Redestilovana voda	**

* Količina PCR produkta koju treba dodati određuje se u zavisnosti od dužine produkta i to:

Dužina PCR produkta	Količina
100-200 bp	1-3 ng
200-500 bp	3-10 ng
500-1000 bp	10-40 ng
>2000 bp	20-50 ng

** Voda se dodaje u odgovarajućoj zapremini tako da je ukupna zapremina reakcione smeše 20 µl

Protokol (temperature i trajanje svakog koraka) za *cycle sequencing* reakciju date su u Tabeli 8.

Tabela 8. Protokol za *cycle sequencing* reakciju.

Inicijalna denaturacija	96°C 1 min	25 ciklusa
Denaturacija	96°C 10 s	
Hibridizacija	50°C 5 s	
Elongacija	60°C 4 min	

Precipitacija

Dobijeni fragmenti DNK nakon *cycle sequencing* reakcije prečišćavaju se od neugrađenih, bojama obeleženih ddNTP-ova, koji bi dali signale tokom iščitavanja sekvence na automatskom DNK sekvenatoru i ometali pravilno određivanje sekvence ciljnog DNK molekula. Uzorci mogu da se prečiste etanol/EDTA precipitacijom ili korišćenjem *BigDye XTerminator Purification Kit-a*.

Etanol/EDTA precipitacija

Tokom prečišćavanja, EDTA vezuje višak soli, dok etanol pomaže precipitaciji DNK fragmenata, da bi nakon svakog koraka centrifugiranja u supernatantu ostali neugrađeni ddNTP-ovi, koji se odliju, a preostali talog prečišćenih obeleženih DNK fragmenata rastvara se u *HiDi-Formamide-u*, i denaturiše. Time se omogućava da DNK fragmenti ostanu u jednolančanoj linearnoj formi, da bi pravilno putovali tokom elektroforeze.

Prečišćavanje korišćenjem *BigDye XTerminator Puification Kit-a*

U PCR produkt *cycle sequencing* reakcije dodaju se rastvori *XTerminator* i SAM. Uzorak se potom vorteksuje 30 min. Tokom vorteksovanja komponente rastvora *XTerminator* vezuju neugrađene ddNTP-ove, dNTP-ove i soli iz produkta *cycle sequencing* reakcije, dok rastvor SAM stabilizuje fragmente nakon prečišćavanja. Nakon vorteksovanja, uzorak se centrifugira, pri čemu u supernatantu ostaje prečišćeni DNK produkt, dok su u talogu vezani neugrađeni ddNTP-ovi, soli i ostale nečistoće.

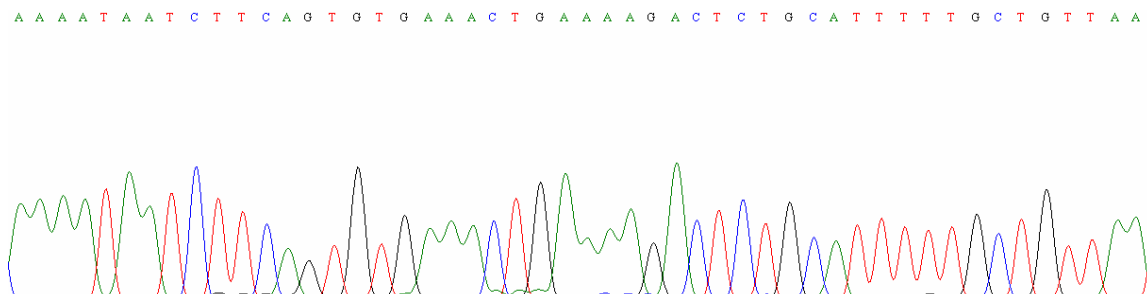
SEKVENCIRANJE DNK

Uzorci dobijeni nakon *cycle sequencing* reakcije i precipitacije predstavljaju smešu fragmenata DNK različitih dužina, koji na svojim 3' krajevima imaju ugrađen ddNTP obeležen fluorescentnom bojom. Da bi se iščitala sekvenca DNK potrebno je fragmente razdvojiti po dužini i iščitati redosled ddNTP-ova na njihovim 3' krajevima. To se postiže razdvajanjem komponenata smeše na osnovu dužine kapilarnom elektroforezom na automatskom DNK sekvenatoru (*ABI PRISM 310 Genetic Analyzer*).

Fragmenti pod uticajem električnog polja putuju kroz kapilaru ispunjenu polimerom, koji ima ulogu analognu ulozi gela u klasičnoj gel elektroforezi. Kraći fragmenti će putovati brže pa će pre stići do prozora za detekciju, prozirnog dela kapilare na njenom suprotnom kraju. Kada fragmenti stignu do prozora za detekciju, laserskim zrakom se ekscituju boje kojima su ddNTP-ovi obeleženi. Pri vraćanju iz ekscitovanog u osnovno nepobuđeno stanje boja emituje svetlost određene talasne dužine koja je specifična za svaku od četiri boje. CCD kamerom (engl. *charge-coupled device* - CCD) detektuje se emitovana svetlost i redosled i jačina tih signala memoriše u kompjuteru. Obradom podataka *Sequence Analysis* softverom dobija se redosled nukleotida početnog DNK molekula.

U ovom radu za sekvenciranje korišćen je polimer POP6, kapilara od 48 cm. Uslovi elektroforeze bili su sledeći: 15kV, 36 min, 50°C (*Run module Seq POP6 Rapid 1ml E.md4*), injeksiono vreme 30 sekundi na 3kV.

Primer rezultata automatskog sekvenciranja prikazan je na Slici 8.



Slika 8. Primer elektroferograma dobijenog automatskim sekvenciranjem.

ANALIZA SEKVENCI

Podaci dobijeni nakon kapilarne elektroforeze i ekscitacije fluorescentnih boja na ddNTP-ovima obrađuju se u *Sequencing Analysis* softveru. Dobijene sekvence se ispituju na prisustvo promena upotrebom BLAST programa (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>), upoređivanjem sa sekvencama gena BRCA koje ne sadrže mutacije (engl. *wild type* - wt) (GenBank: U14680 za BRCA1 i U43746 za BRCA2). Značaj detektovanih promena se analizira u bazi *Breast Cancer Information Core (BIC) database* (<http://research.nhgri.nih.gov/bic/>), bazi podataka do

sada detektovanih i objavljenih mutacija u genima BRCA1 i BRCA2, kao i u bazi *Leiden Open Variation Database* (LOVD) (<http://www.lovd.nl/2.0/>). Osim toga, značaj *missense* mutacija, koje dovode do zamena amino kiselina u proteinu, dodatno se proverava *PolyPhen* softverom (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph/>), sa ciljem da se preciznije utvrdi eventualni značaj datih promena. Ovaj program predviđa moguć efekat zamene amino kiseline na strukturu i funkciju proteina, uzimajući u obzir poziciju zamenjene amino kiseline, tj. da li je data aminokiselina u domenu proteina važnom za njegovu funkciju, kao što su vezujuća mesta, aktivna mesta, mesta koja formiraju neke hemijske veze itd. Ovaj program koristi i višestruka poređenja (engl. *multiple alignments*) da otkrije da li postoje slične promene u homologim proteinima. Takođe, analizirajući amino kiselinsku zamenu u poznatim 3D strukturama otkriva da li postoji veovatnoća da zamena uništi hidrofobno jezgro proteina, elektrostatičke interakcije, interakcije sa ligandima ili druge važne odlike proteina. Kao rezultat ovih analiza, *PolyPhen* daje nekoliko rezultata:

- **verovatno oštećujuća promena** (engl. *probably damaging*) - sa visokom sigurnošću pretpostavlja se da utiče na funkciju ili strukturu proteina;
- **moguće oštećujuća promena** (*possibly damaging*) - pretpostavlja se da utiče na funkciju ili strukturu proteina;
- **benigna promena** (*benign*) - najverovatnije nema fenotipski efekat;
- **promena nepoznatog značaja** (*unknown*) – kada u retkim slučajevima nedostatak podataka onemogućava da predvidi efekat zamene amino kiseline.

Za analizu u *PolyPhen* programu korišćene su baze sa wt sekvencom proteina, i to za BRCA1 korišćena je baza P38398, a za BRCA2 P51587.

PCR SPECIFIČAN ZA ALEL

PCR specifičan za alel je modifikacija PCR metode kojom mogu da se identifikuju vrlo male promene u sekvenci DNK, npr. insercija, delecija ili zamena samo jednog nukleotida. U ovoj reakciji koriste se prajmeri dizajnirani tako da su komplementarni jednom od mogućih alela koji se ispituje. Prajmeri su dizajnirani tako

da se sa *wt* alela dobija produkt različite dužine u odnosu na produkt koji se dobija sa alela koji nosi ispitivanu promenu.

Nakon hibridizacije prajmera za matricu polimeraza ne može da se veže i da započne elongaciju ako između matrice i prajmera postoji nekomplementarno sparena baza blizu ili na samom 3' kraju prajmera. Polimeraza će se vezati i nastaviti polimerizaciju samo sa alela za koji je 3' kraj prajmera komplementarno vezan za matricu. Pošto se prajmeri dizajniraju tako da se nakon amplifikacije sa svakog od alela dobiju produkti različitih dužina, analizom produkata reakcije na elektroforezi na agaroznom gelu može se odrediti koji je od alela prisutan u ispitivanom uzorku.

PCR specifičan za alel je korišćen za određivanje prisustva mutacije 5382insC u 20. egzonu gena BRCA1. Korišćen je par prajmera (20F i 20R) koji su komplementarni sekvenci udaljenoj od pozicije mutacije i vezuju se za matricu i u prisustvu i u odsustvu mutacije, dajući produkt veličine 399 bp. Osim ovog para prajmera, u reakciju se dodaje i prajmer (20Rins1) koji je komplementaran samo sekvenci koja sadrži pomenutu inserciju i uz 20F prajmer daje produkt veličine 143 bp. Uzorci homozigoti za *wt* alel davaće produkt od 399 bp sa oba alela što će se na agaroznom gelu videti kao jedna traka. Heterozigoti za 5382insC mutaciju davaće produkt veličine 399 bp sa oba alela i produkt veličine 143bp sa alela sa mutacijom, što će se na agaroznom gelu videti kao dve trake. Homozigoti za alel sa mutacijom umiru u embrionalnom stadijumu, s obzirom da su homozigotne oštećujuće mutacije u genu BRCA1 letalne.

Sekvence prajmera koji su korišćeni za detekciju 5382insC mutacije su:

20F 5'-ATA TGA CGT GTC TGC TCC AC-3'

20R 5'-GGG AAT CCA AAT TAC ACA GC-3'

20Rins1 5'-CCT TTC TGT CCT GGG GAT T-3'

Pozicije prajmera za PCR specifičan za alel za detekciju mutacije 5382insC u genu BRCA1 date su na Slici 9.

ctcccaaagt gctaggatta caggggtgag ccaactgcgcc tggcctgaat gccttaaat **20F** atgacgtgtct
 gctccacttc cattgaagga agcttctctt tctcttatcc tgatgggtg tgtttggtt **cttcagcat**
 gatttgaag tcagaggaga tgtgtcaat ggaagaaacc accaaggctc **aaagcgagca**
20Rins1 agagaatccc aggacagaaa ggtaaagctc cctccctcaa gttgacaaaa atctcacccc
 accactctgt attccactcc ccttgcaga gatgggccgc tcattttgt aagacttatt acatacatc
 acagtgctag ataccttcac acaggttctt tttcactct tccatccca cacataaat aagtattgtc
 tctactttat gaatgataaa actaagagat ttagagaggc **tggttaatt** **ggattcccg** ctcgggtca
20R

Slika 9. Pozicije prajmera za PCR specifičan za alel za detekciju mutacije 5382insC u genu BRCA1. Zelenim je obeležen 20. egzon gena BRCA1, plavim pozicije 20F i 20R prajmera, podvučena sekvenca predstavlja mesto vezivanja 20Rins1 prajmera, dok je crvenim obeležena tražena mutacija (insertovani C).

Količina reagenasa korišćenih za PCR specifičan za alel date su u Tabeli 9.

Tabela 9. Količina reagenasa korišćenih za PCR specifičan za alel.

KOMPONENTE	FINALNO	ZAPREMINA (μl)
<i>AmpliTaq Gold PCR Master Mix</i>	1x	10
Prajmeri 20F i 20Rins1	7.8 pmol (400 nM)	2,6
Prajmer 20R	3.9 pmol (200 nM)	1,3
Genomska DNK	100 ng	*
Voda		**
Ukupna zapremina		20 μl

* Zapremina rastvora genomske DNK koja je potrebna za reakciju određuje se na osnovu izmerene koncentracije izolovane DNK

** Voda se dodaje u odgovarajućoj zapremini tako da je ukupna zapremina reakcione smeše 20 μl

Protokol korišćen za PCR specifičan za alel isti je kao za *touchdown PCR* korišćen za amplifikaciju egzona 7, 19, 20, 22 gena BRCA1 i egzona 11a gena BRCA2.

Dobijena dužina produkta proveravana je elektroforezom na 2% agaroznom gelu na gore opisan način. Kao pozitivna kontrola (uzorak koji ima ispitivanu mutaciju) i *wt* kontrola (uzorak koji nema ispitivanu mutaciju) korišćeni su uzorci za koje je

sekvenciranjem prethodno utvrđeno prisustvo odnosno odsustvo ispitivane mutacije. Za uzorke koji su se na agaroznom gelu pokazali kao pozitivni prisustvo mutacije potvrđeno je sekvenciranjem 20. egzona gena BRCA1.

STATISTIČKA OBRADA PODATAKA

Za statističku obradu podataka korišćeni su testovi neparametrijske statistike: χ^2 test i Fišerov test.

REZULTATI

Analiza uzoraka sa porodičnom istorijom za karcinom dojke i/ili jajnika

Testirano je 85 osoba. Detalji delova gena BRCA1 i BRCA2 i broj osoba kod kojih su oni analizirani, dati su u Tabeli 10. Delovi gena koji će se analizirati određivani su na osnovu procene verovatnoće da se u svakom od gena može naći mutacija (BRCAPRO programom) za svaku osobu. Kod 16 osoba analizirano je samo prisustvo porodičnih mutacija, dok je kod 7 osoba detekovana *frameshift* mutacija u jednom od gena, pa je analiza time bila završena pre kompletiranja analize celih gena.

Tabela 10. Delovi gena koji su analizirani i broj osoba kod kojih je izvršena analiza.

Analizirano	Broj osoba
Ceo kodirajući region gena BRCA1 i BRCA2	11
Ceo kodirajući region gena BRCA1	43
Ceo kodirajući region gena BRCA2	0
Ceo kodirajući region gena BRCA1 i egzoni 10 i 11 gena BRCA2	5
Ceo kodirajući region gena BRCA2 i egzoni 2, 5, 11 i 20 gena BRCA1	3
Porodična mutacija	16

Detektovano je 7 *frameshift* mutacija kod 9 osoba, i to 4 mutacije u genu BRCA1 i 3 u genu BRCA2 (Tabele 11 i 12). Od toga, detektovane su tri nove *frameshift* mutacije koje do sada nisu bile prijavljene u BIC i LOVD bazama mutacija u genima BRCA. To su mutacija 4765del20 u egzonu 15 gena BRCA1, mutacija 4366insTT u egzonu 11 gena BRCA2, kao i mutacija 7511delT u egzonu 14 gena BRCA2.

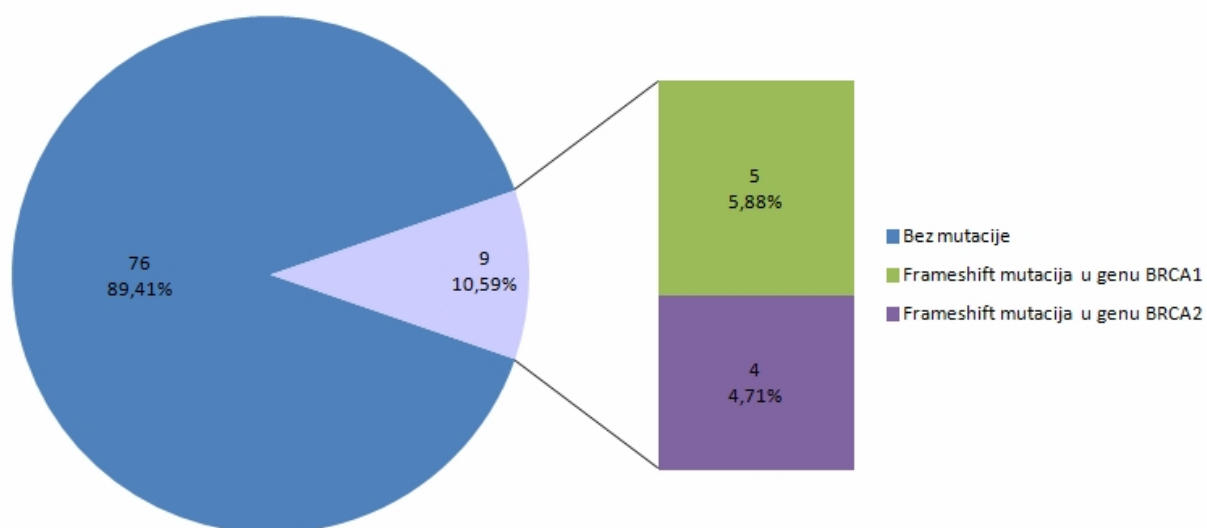
Tabela 11. Detektovane *frameshift* mutacije u genu BRCA1.

EGZON	MUTACIJA	EFEKAT NA PROTEIN	BROJ OSOBA
11	969ins7	STOP 288	1
11	2138delA	STOP 700	2
15	4765del20	STOP 1566	1
20	5382insC	STOP 1829	1

Tabela 12. Detektovane *frameshift* mutacije u genu BRCA2.

EGZON	MUTACIJA	EFEKAT NA PROTEIN	BROJ OSOBA
10	1991del4	STOP 612	1
11	4366insTT	STOP 1388	2
14	7511delT	STOP 2468	1

Učestalost *frameshift* mutacija u uzorku porodica sa naslednim karcinomom dojke i/ili jajnika iznosi 10,59% (9/85) (Slika 10).



Slika 10. Učestalost mutacija u uzorku porodica sa naslednim karcinomom dojke i/ili jajnika. Mutacija u genu BRCA1 detektovano je kod 5 osoba, dok je mutacija u genu BRCA2 detektovana kod 4 osobe. Učestalost mutacija iznosi 10,59% (9/85).

Detektovana je 1 *nonsense* mutacija u genu BRCA2 (10204A>T, K3326X) kod 1 osobe.

Detektovane su i brojne *missense* mutacije, klasifikovane *PolyPhen* programom kao *probably* ili *possibly damaging* u genu BRCA1 (Tabela 13) i u genu BRCA2 (Tabela 14). Detektovana je 1 *missense* mutacija u genu BRCA2 (3007A>G, M927V)

kod 2 osobe iz iste porodice za koju se smatra da je verovatno oštećujuća (*probably damaging*) (nema literaturnih podataka, ali je u drugoj laboratoriji pretpostavljeno da može da doprinosi povećanom riziku za oboljevanje).

Tabela 13. Detektovane *missense* mutacije u genu BRCA1.

EGZON	MUTACIJA	ZAMENA AMINOKISELINE	EFEKAT MUTACIJE BIC BAZA	EFEKAT MUTACIJE POLYPHEN	BROJ OSOBA	UČESTALOST
11	2731C>T (P871L)	Pro > Leu	Polymorphism	Benign	31	50% (31/62)
11	1563A>T (I482F)	Ile > Phe		Benign	1	1,61% (1/62)
11	3232A>G (E1038G)	Glu > Gly	Polymorphism	Benign	36	58,06% (36/62)
11	3238G>A (S1040N)	Ser > Asn	Unclassified variant	Benign	5	8,06% (5/62)
11	3667A>G (K1183R)	Lys > Arg	Polymorphism	Benign	35	56,45% (35/62)
11	2196G>A (D693N)	Asp > Asn	Polymorphism	Benign	7	11,29% (7/62)
16	4956A>G (S1613G)	Ser > Gly	Polymorphism	Benign	37	62,71% (37/59)
11	2640C>T (R841W)	Arg > Trp	Unclassified variant	Possibly damaging	1	1,61% (1/62)
11	1186A>G (Q356R)	Gln > Arg	Polymorphism	Possibly damaging	14	22,22% (14/63)
15	4654G>T (S1512I)	Ser > Ile	Polymorphism	Probably damaging	1	1,69% (1/59)
16	5075G>A (M1652I)	Met > Ile	Unclassified variant	Probably damaging	6	10,17% (6/59)

Tabela 14. Detektovane *missense* mutacije u genu BRCA2.

EGZON	MUTACIJA	ZAMENA AMINOKISELIN E	EFEKAT MUTACIJE BIC BAZA	EFEKAT MUTACIJE POLYPHEN	BROJ OSOBA	UČESTALOST
9	962G>A (R245K)	Arg > Lys		Benign	1	7,14% (1/14)
10	1342C>A (H372N)	His > Asn	Polymorphism	Benign	5	21,74% (5/23)
11	3941T>C (V1238A)	Val > Ala		Benign	2	9,52% (2/21)
11	3199A>G (N991D)	Asn > Asp	Polymorphism	Benign	1	4,76% (1/21)
11	6328C>T (R2034C)	Arg > Cys	Unclassified variant	Benign	1	4,76% (1/21)
10	1075A>G (I283V)	Ile > Val	Unclassified variant	Benign	1	4,76% (1/21)
10	1093A>C (N289H)	Asn > His	Polymorphism	Possibly damaging	1	4,76% (1/21)
10	2024T>C (S599F)	Ser > Phe		Possibly damaging	22	91,67% (22/24)
15	7834T>C (S2536P) 7836T>C	Ser > Pro		Possibly damaging	12	70,59% (12/17)

Detektovane su i brojne sinonimne mutacije u genu BRCA1 (Tabela 15) i u genu BRCA2 (Tabela 16).

Tabela 15. Detektovane sinonimne mutacije u genu BRCA1.

EGZON	MUTACIJA	BROJ OSOBA	UČESTALOST
7	443A>G (A108A)	1	1,70% (1/59)
11	2430T>C (L771L)	38	61,28% (38/62)
11	2201C>T (S694S)	39	62,90% (39/62)
11	3539T>C (S1140S)	1	1,61% (1/62)
13	4427T>C (S1436S)	34	57,63% (34/59)

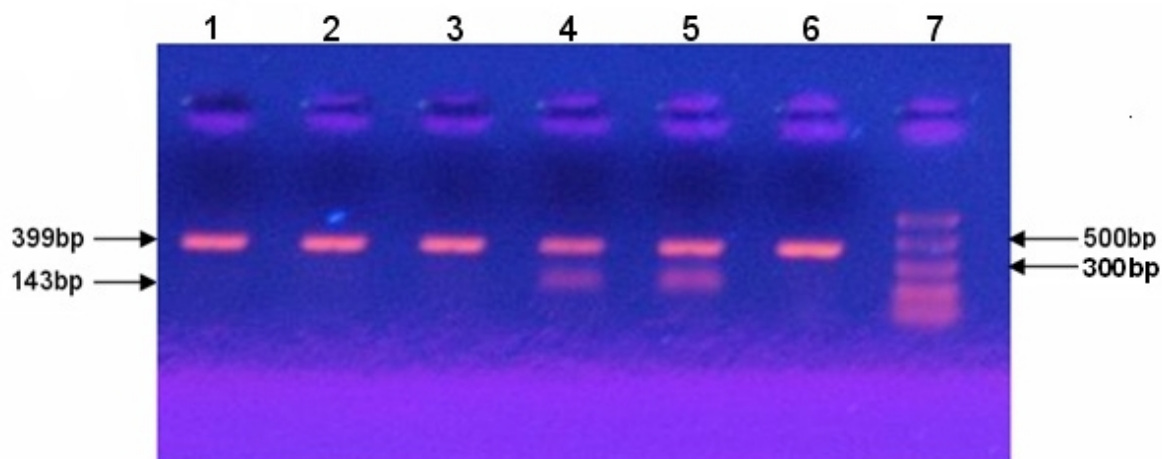
Tabela 16. Detektovane sinonimne mutacije u genu BRCA2.

EGZON	MUTACIJA	BROJ OSOBA	UČESTALOST
11	4035T>C (V1269V)	10	47,62% (10/21)
11	3624A>G (K1132K)	5	23,81% (5/21)
11	3111G>A (Q961Q)	1	4,76% (1/21)
11	3744G>A (S1172S)	3	14,29% (3/21)
11	2457T>C (H743H)	1	4,76% (1/21)
10	1593A>G (S455S)	1	4,76% (1/21)
14	7470A>G (S2414S)	3	21,43% (3/14)
27	10461A>G (T3411T)	1	7,14% (1/14)

Analiza sistematskog uzorka karcinoma dojke

Prisustvo mutacije 5382insC u genu BRCA1 analizirano je PCR-om specifičnim za alel, čiji su produkti analizirani elektroforezom na agaroznom gelu. Prisustvo samo jednog produkta (jedna traka na gelu) dobija se kod homozigota za *wt* alel i pokazuje odsustvo tražene mutacije. Prisustvo dva produkta (dve trake na gelu) ukazuje na prisustvo tražene mutacije. Na Slici 11 je prikazan primer rezultata PCR-a specifičnog za alel na agaroznom gelu. U kolonama 1-4 su uzorci ispitivanih osoba, u koloni 5 je pozitivna kontrola, u koloni 6 je negativna kontrola, u koloni 7 je dužinski marker. Pozitivna i negativna kontrola predstavljaju uzorke ispitanika kod kojih je sekvenciranjem prethodno potvrđeno prisustvo, odnosno odsustvo mutacije 5382insC.

Uzorci u kolonama 1-3 su negativni, dok je uzorak u koloni 4 pozitivan za mutaciju 5382insC u genu BRCA1.



Slika 11. Rezultati PCR-a specifičnog za alel. U kolonama 1-4 su uzorci ispitanika, u koloni 5 je pozitivna kontrola, u koloni 6 je negativna kontrola, u koloni 7 je dužinski marker.

Mutacija 5382insC u BRCA1 genu detektovana je kod jedne osobe u sistematskom uzorku karcinoma dojke, pa učestalost ove mutacije toj grupi iznosi 0,39% (1/257).

Analiza upotrebe BRCAPRO programa u ispitivanoj grupi

Podaci za verovatnoću nalaženja mutacija u genima BRCA1 i BRCA2 (BRCAPRO programom) bili su dostupni za 74 analizirana ispitanika. Medijana BRCAPRO verovatnoće u datoj grupi iznosila je 25,40%.

Upoređivanje BRCAPRO verovatnoće u odnosu na prisustvo/odsustvo mutacija

Upoređivana je zastupljenost ispitanika sa BRCAPRO verovatnoćom manjom ili većom od određene granične vrednosti u grupi u kojoj nije pokazano prisustvo mutacija ili su detektovani samo benigni polimorfizmi (n=31) u odnosu na grupu ispitanika sa detektovanim oštećujućim (*frameshift*) i verovatno oštećujućim (*probably damaging*) mutacijama (prema proceni PolyPhen programa) (n=15). Zadata granica za BRCA

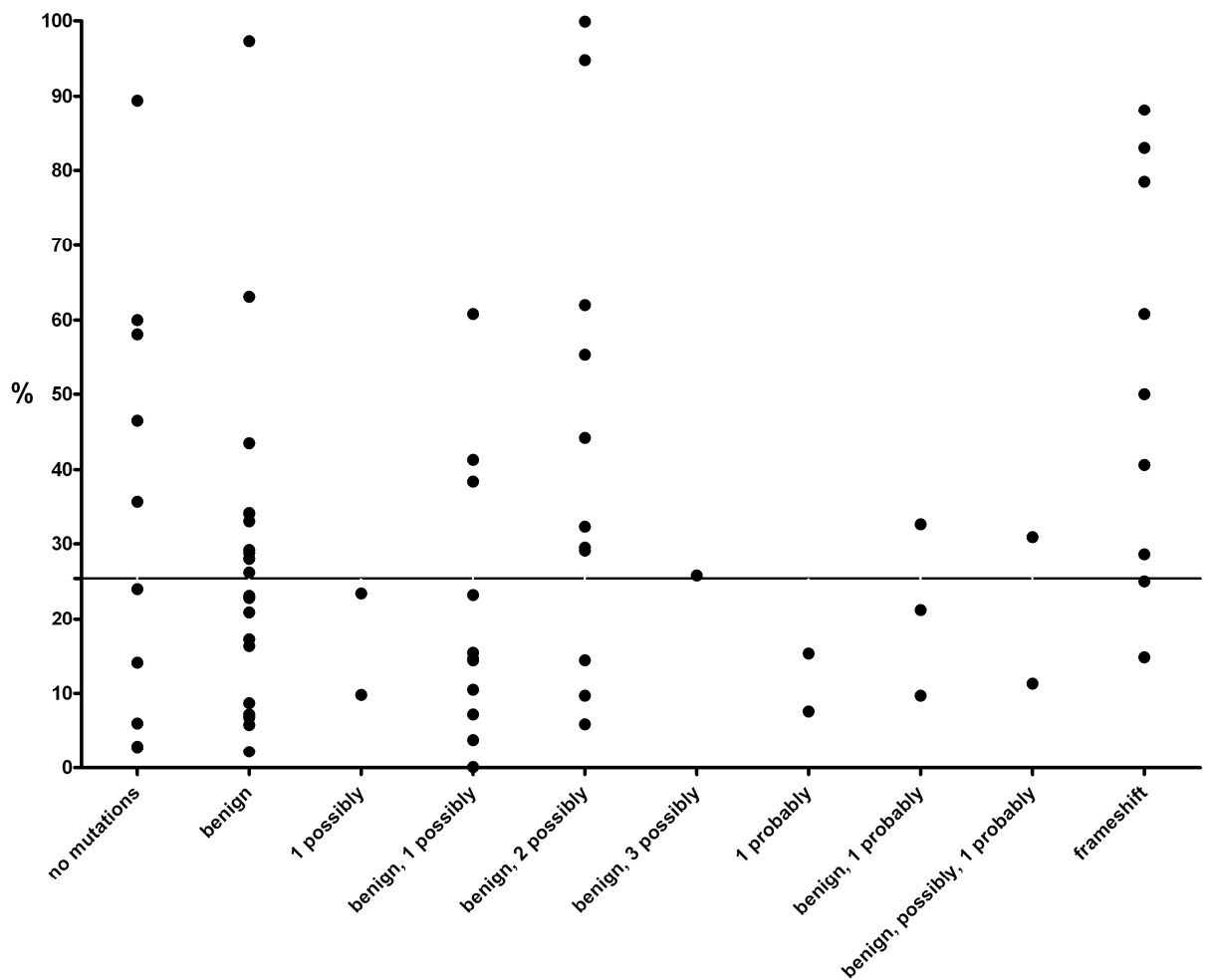
testiranje pri upotrebi BRCAPRO iznosi 10%. Zbog toga je korelisan broj ispitanika sa BRCAPRO verovatnoćom većom ili manjom od 10% u već spomenutim grupama. Statistički značajna razlika nije pokazana (χ^2 test) (Slika 12) (Tabela 17).

Kada se grupa ispitanika bez prisustva mutacija i sa benignim polimorfizmima upoređuje sa grupom ispitanika sa oštećujućim (*frameshift*) i verovatno oštećujućim (*probably damaging*) mutacijama u odnosu na vrednost BRCAPRO verovatnoće koja je jednaka medijani (25,40%), statistički značajna razlika nije nađena (χ^2 test) (Slika 12) (Tabela 17).

Sa zadatom granicom za BRCAPRO verovatnoću od 40%, korelisan je broj ispitanika u već spomenutim grupama - grupama ispitanika bez prisustva mutacija i sa benignim polimorfizmima naspram grupe ispitanika sa oštećujućim mutacijama i verovatno oštećujućim mutacijama. Statistički značajna razlika nije pokazana (χ^2 test) (Slika 12) (Tabela 17).

Ukoliko se posmatra BRCAPRO verovatnoća veća ili manja od 10% u grupi ispitanika sa oštećujućim (*frameshift*) mutacijama (n=9) naspram grupe ispitanika sa benignim polimorfizmima (prema PolyPhen programu) (n=21), nema statistički značajne razlike (Fišerov test) (Slika 12) (Tabela 17). Ukoliko se upoređuju iste grupe ispitanika sa granicom za BRCAPRO verovatnoću jednaku medijani (25,40%), nema statistički značajne razlike (Fišerov test) (Slika 12) (Tabela 17). Ukoliko se date grupe porede u odnosu na vrednost BRCAPRO verovatnoće od 40%, uočava se statistički značajno veća zastupljenost ispitanika sa BRCAPRO verovatnoćom većom ili jednakom 40% u grupi ispitanika sa oštećujućim mutacijama (6/9 prema 3/21) (Fišerov test, p=0,0078) (Slika 12) (Tabela 17).

Upoređivanje zastupljenosti BRCAPRO verovatnoće iznad i ispod zadatih vrednosti kod ispitanika kod kojih su pronađene mutacije sa moguće oštećujućim efektom (*probably damaging*) (n=27) naspram onih kod kojih su pronađene verovatno oštećujuće promene (*possibly damaging*) (n=7) u genima BRCA1/2 (prema PolyPhen programu) nije pokazalo statistički značajnu razliku kada su kao granična vrednost za BRCAPRO verovatnoću uzimane vrednosti od 10%, 25,40% (medijana) i 40% (u sva tri slučaja korišćen je Fišerov test) (Slika 12) (Tabela 17).



Slika 12. BRCAPRO verovatnoće u odnosu na detektovane mutacije u genima BRCA1 i BRCA2.

Upoređivana je i zastupljenost BRCAPRO verovatnoće iznad i ispod određene granične vrednosti kod ispitanika kod kojih nisu pronađene mutacije (n=10) naspram onih kod kojih su pronađene oštećujuće (*frameshift*) mutacije (n=9) u genima BRCA1/2 i nisu nađene statistički značajne razlike kada su za graničnu vrednost BRCAPRO verovatnoće uzimane vrednosti od 10%, 25,40% (medijana) i 40% (u sva tri slučaja je korišćen Fišerov test) (Slika 12) (Tabela 17).

Tabela 17. Upoređivanje različitih grupa ispitanika u odnosu na vrednosti BRCAPRO verovatnoće.

	10%	25,40% (medijana)	40%
Bez mutacija i benigne mutacije u odnosu na oštećujuće i verovatno oštećujuće mutacije	NSZ	NSZ	NSZ
Benigne mutacije u odnosu na oštećujuće mutacije	NSZ	NSZ	p=0.0078
Moguće oštećujuće mutacije u odnosu na verovatno oštećujuće mutacije	NSZ	NSZ	NSZ
Bez mutacija u odnosu na oštećujuće mutacije	NSZ	NSZ	NSZ
Bez mutacija i benigne mutacije u odnosu na moguće oštećujuće, verovatno oštećujuće i oštećujuće mutacije	NSZ	NSZ	NSZ

NSZ – nema statističke značajnosti

Upoređivana je i zastupljenost ispitanika u grupama bez mutacija i sa prisustvom benignih mutacija (n=31) u odnosu na grupu sa moguće oštećujućim (*possibly damaging*), verovatno oštećujućim (*probably damaging*) i sa oštećujućim (*frameshift*) mutacijama (prema PolyPhen programu) (n=43) u odnosu na različite vrednosti BRCAPRO verovatnoće. Za graničnu vrednost BRCAPRO verovatnoće uzimane su vrednosti od 10%, 25,40% (medijana) i 40% i ni za jednu od ovih vrednosti nije nađena statistički značajno veća zastupljenost BRCAPRO verovatnoća manjih/većih u odnosu na zadate vrednosti između ove dve grupe ispitanika (u sva tri slučaja korišćen je χ^2 test) (Slika 12) (Tabela 17).

Upoređivanje BRCAPRO verovatnoće u odnosu na broj obolelih srodnika u porodici

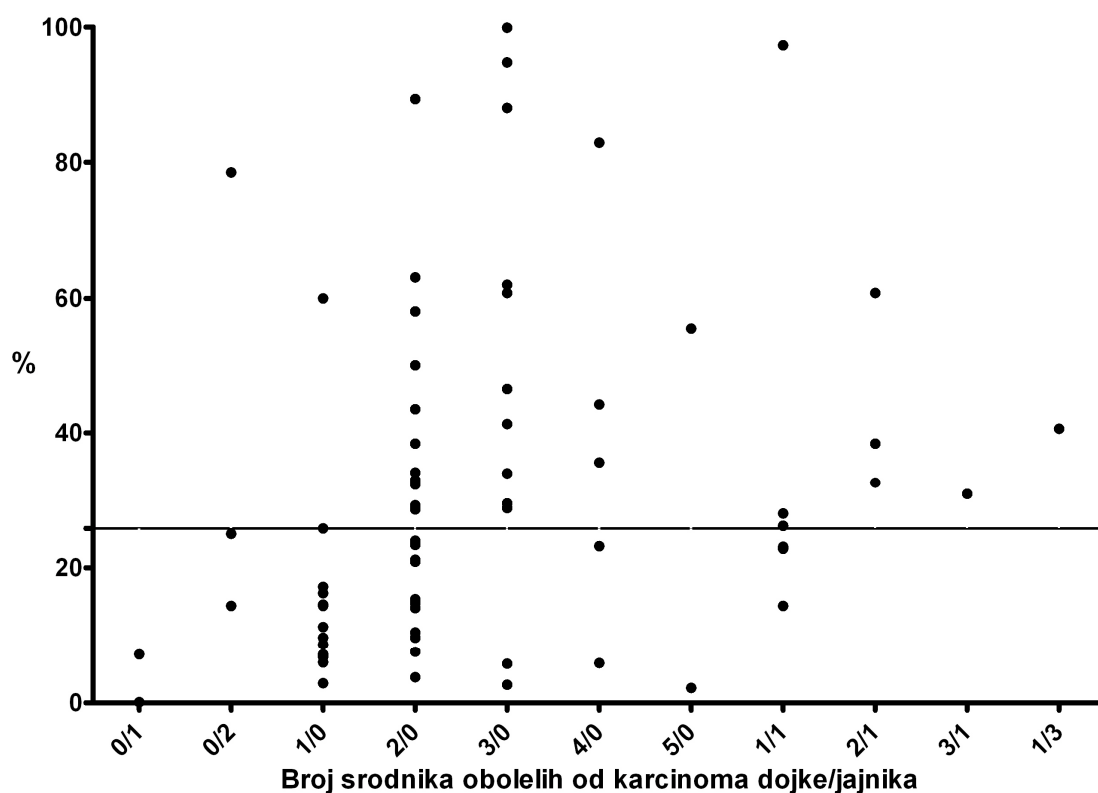
Urađena je i analiza eventualne povezanosti broja obolelih srodnika u porodicama sa BRCAPRO verovatnoćom. Analizirano je ukupno 74 ispitanika. Medijana BRCAPRO verovatnoće u datoj grupi iznosila je 25,40%.

Ukoliko se porede porodice sa samo jednim obolelim srodnikom (karcinom dojke ili jajnika) (n=16) sa porodicama u kojima je obolelo 2 ili više srodnika (n=58) u odnosu na broj ispitanika sa BRCAPRO verovatnoćom manjom ili većom od 10%, nađena je statistički značajno veća zastupljenost porodica sa BRCAPRO verovatnoćom koja je jednaka ili veća od 10% u porodicama sa 2 ili više obolela srodnika (50/58 naspram 7/16) (χ^2 test, p=0,00035) (Slika 13) (Tabela 18).

Ukoliko se posmatraju iste grupe porodica (porodice sa samo jednim obolelim članom i porodice sa 2 ili više obolelih članova) u odnosu na broj ispitanika sa BRCAPRO verovatnoćom manjom ili većom od medijane (25,40%), uočava se statistički značajno veća zastupljenost porodica sa BRCAPRO verovatnoćom koja je jednaka ili prevazilazi BRCAPRO medijanu u porodicama sa 2 ili više obolela srodnika (35/58 naspram 2/16) (Fišerov test, p=0,0013) (Slika 13) (Tabela 18).

Ukoliko se ove dve grupe porede u odnosu na granicu za BRCAPRO verovatnoću od 40%, uočava se statistički značajno veća zastupljenost porodica sa BRCAPRO verovatnoćom koja je jednaka ili veća od 40% u porodicama sa 2 ili više obolela srodnika (19/58 naspram 1/16) (Fišerov test, p=0,0257) (Slika 13) (Tabela 18).

Ukoliko se razmatraju porodice u kojima se javlja samo karcinom jajnika (1 ili 2 obolela člana) (n=5) prema onim porodicama kod kojih postoje oboleli i od karcinoma dojke i od karcinoma jajnika (1 ili više slučajeva) (n=11), statistički značajno se ne razlikuje učestalost onih porodica koje prevazilaze vrednost BRCAPRO verovatnoće od 10% (Fišerov test) (Slika 13) (Tabela 18). Takođe, ukoliko se ove dve grupe porede u odnosu na medijanu BRCAPRO verovatnoće (25,40%), kao i u odnosu na granicu od 40%, ne uočava se statistički značajna razlika učestalosti porodica čija je BRCAPRO verovatnoća jednaka ili prevazilazi zadate vrednosti (u oba slučaja korišćen je Fišerov test) (Slika 13) (Tabela 18).



Slika 13. BRCAPRO verovatnoće u odnosu na broj obolelih srodnika u porodici od karcinoma dojke, odnosno karcinoma jajnika.

Analizirane su i porodice u kojima se javlja samo karcinom dojke – porodice sa 1 obolelim srodnikom (n=14) upoređivane su sa porodicama sa 2 ili više članova obolelih od karcinoma dojke (n=44), a u odnosu na dobijenu BRCAPRO verovatnoću. U statistički značajno većem broju porodica sa više slučajeva obolelih od karcinoma dojke BRCAPRO verovatnoća je jednaka ili prevazilazi 10% u odnosu na porodice sa jednim članom obolelim od karcinoma dojke (36/44 prema 7/7) (χ^2 test, p=0,0179) (Slika 13) (Tabela 18). Kada se ove dve grupe porede u odnosu na BRCAPRO medijanu (25,40%), uočava se statistički značajno veća zastupljenost porodica sa 2 ili više članova obolelih od karcinoma dojke čija je BRCAPRO verovatnoća jednaka ili veća od medijane (26/44 prema 2/14) (Fišerov test, p=0,005) (Slika 13) (Tabela 18). Takođe, kada se ove dve grupe porodica porede u odnosu na BRCAPRO verovatnoću od 40%, uočava se statistički značajno veća zastupljenost porodica sa 2 ili više članova obolelih od karcinoma dojke čija je BRCAPRO verovatnoća jednaka ili veća od 40% u odnosu na porodice sa jednim članom obolelim od karcinoma dojke (15/44 prema 1/7) (Fišerov test, p=0,0403) (Slika 13) (Tabela 18).

Tabela 18. Upoređivanje različitih grupa pacijenata u odnosu na različite vrednosti BRCA_{PRO} verovatnoće.

	10%	25,40% (medijana)	40%
1 oboleo član porodice u odnosu na 2 ili više obolelih članova porodice	p=0,00035	p=0,0013	p=0,0257
Karcinom jajnika u odnosu na karcinom dojke i karcinom jajnika	NSZ	NSZ	NSZ
1 oboleo član od karcinoma dojke u odnosu na 2 ili više obolelih od karcinoma dojke	p=0,0179	p=0,005	p=0,0403

NSZ – nema statističke značajnosti

DISKUSIJA

Ključni događaj u kancerogenezi je gubitak kontrole nad genomskom stabilnošću i proliferacijom. Da bi se obezbedilo da ćelija ne nastavi sa deobom nakon oštećenja DNK, ćelije imaju povezane mehanizme kontrolnih tačaka ćelijskog ciklusa i mehanizme popravke oštećenja DNK (pregledno u Jackson and Bartek, 2009). Neposredno nakon što se oštećenja DNK detektuju, aktiviraju se kontrolne tačke ćelijskog ciklusa i ćelijski ciklus se zaustavlja. Time ćelija dobija određeno vreme da popravi oštećenje DNK pre nego što nastavi sa replikacijom DNK i ćelijskom deobom. Ukoliko ćelija ne uspe da popravi oštećenje, aktivira se programirana ćelijska smrt (apoptoza). Ukoliko ćelija pretrpi oštećenje u nekom od gena uključenih u neki od puteva popravke oštećenja DNK, mutacije koje se dogode nakon toga ostaju nepopravljene, dovodeći do nakupljanja mutacija i genomske nestabilnosti. Ćelija na taj način može da stekne i mutaciju u nekom od gena za aktivaciju apoptoze, onemogućavajući njenu aktivaciju, čime ćelija postaje besmrtna. Ako ćelija stekne i mutaciju u nekom od gena za kontrolu ćelijskog ciklusa, izgubiće mogućnost zaustavljanja ćelijske deobe i počće nekontrolisano da se deli formirajući tumore.

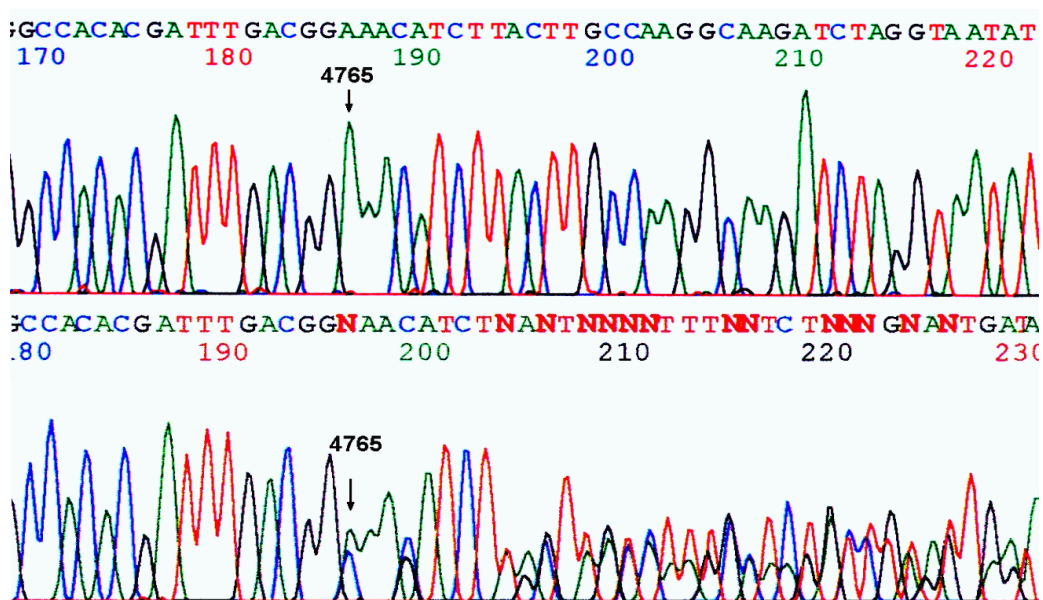
Proteini BRCA1 i BRCA2 ključni su proteini u kontrolnim tačkama ćelijskog ciklusa i mehanizmima popravke oštećenja DNK. Mutacije u jednom od ovih gena koje narušavaju normalnu funkciju proteina predstavljaju korak bliže gubitku kontrole nad genomskom stabilnošću i ćelijskom deobom, pa osobe koje naslede mutacije u ovim genima češće oboljevaju od karcinoma. Zavisno od pozicije i vrste mutacije funkcija proteina će biti manje ili više narušena, doprinoseći u manjoj ili većoj meri riziku za oboljevanje. Tako *frameshift* mutacije, koje dovode do produkcije skraćenog proteina, znatno oštećuju protein, jer on gubi neke od domena ključnih za funkciju, znatno doprinoseći riziku za oboljevanje od kancera. S druge strane, *missense* mutacije mogu da imaju različit uticaj na funkciju proteina, zavisno od pozicije zamenjene amino kiseline. Ukoliko je promenjena amino kiselina u ključnom domenu za funkciju proteina i ukoliko je uloga te amino kiseline u toj funkciji značajnija, to je i efekat ove zamene amino kiseline, kao posledica *missense* mutacije, veći. Isto tako, mnoge *missense* mutacije mogu u manjoj meri uticati na funkciju proteina ili njegovo vezivanje za druge proteine, pa mogu malo ili umereno doprinositi povećanju rizika za oboljevanje od karcinoma.

MOGUĆI EFEKAT DETEKTOVANIH MUTACIJA

Osnovno pitanje prilikom analize mutacija u genima BRCA je da li određena mutacija utiče na strukturu i funkciju proteinskih produkata ovih gena.

Frameshift mutacije u genu BRCA1

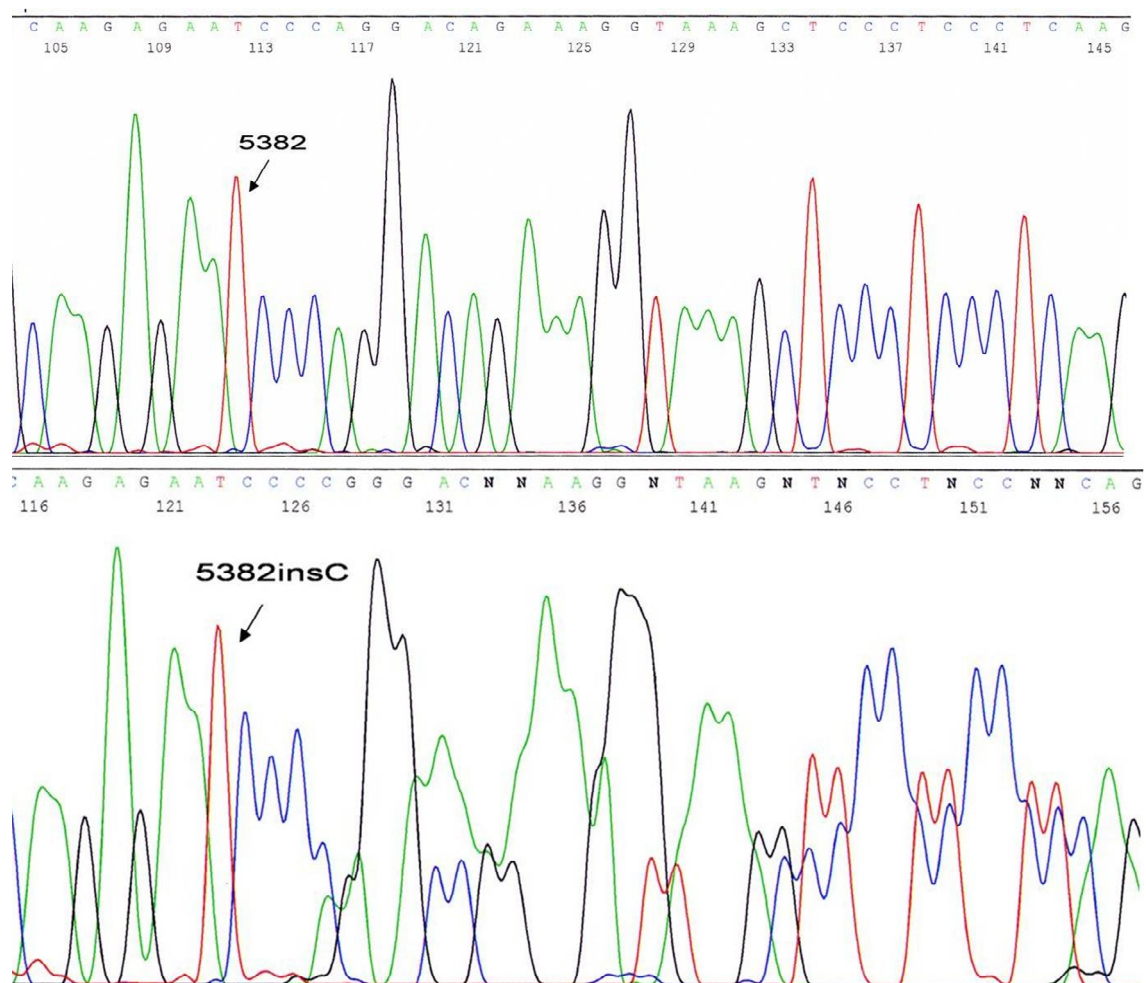
Mutacija **4765del20** u genu BRCA1 (Slika 14) otkrivena u uzorku u ovom radu, predstavlja novu mutaciju koja nije do sada nađena u literaturnim podacima, a nije ni objavljena u BIC i LOVD bazama. Ova mutacija predstavlja deleciju 20 bp i na osnovu promene okvira čitanja nađeno je da za posledicu ima promenu amino kiselina 1549-1565 sa STOP kodonom na poziciji 1566 (Dobričić et al., 2010). Time je protein BRCA1 skraćen gubitkom skoro 300 amino kiselina sa svog C kraja. Nedostaju mu oba BRCT domena, što može ozbiljno da naruši njegovu funkciju onemogućavajući interakcije sa različitim proteinima posredstvom BRCT domena, predisponirajući za kancer (Dobričić et al., 2010).



Slika 14. Elektroferogram dela egzona 15 gena BRCA1. U gornjem delu slike prikazana je wt sekvenca, a u donjem delu sekvenca sa mutacijom 4765del20.

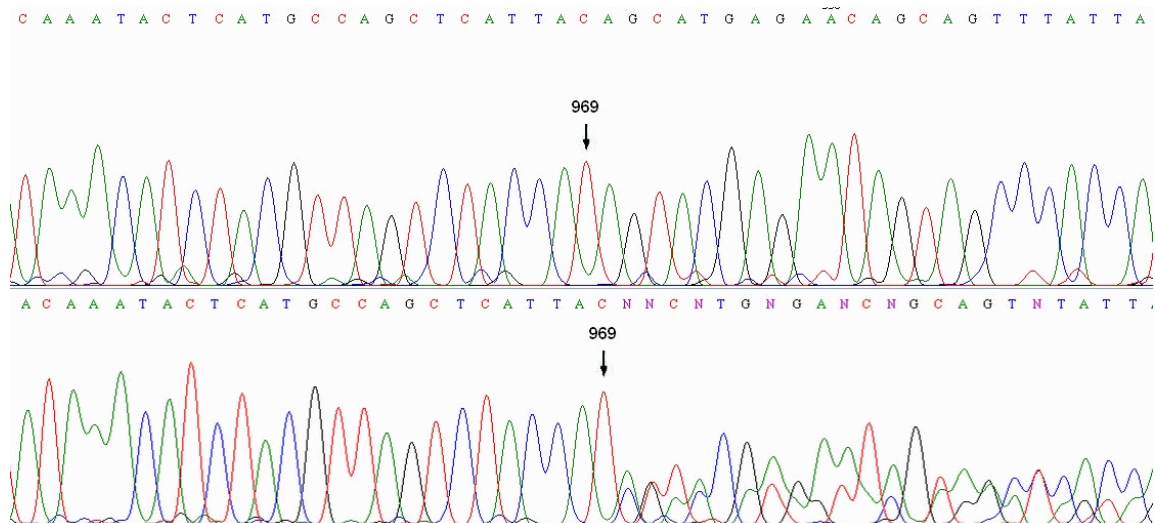
Osim ove mutacije, mutacija **5382insC** u genu BRCA1 (Slika 15) takođe dovodi do sinteze proteina skraćenog za 35 amino kiselina. Ova mutacija narušava strukturu

drugog BRCT domena, onemogućavajući normalne funkcije koje ovaj protein ostvaruje posredstvom ovog domena.



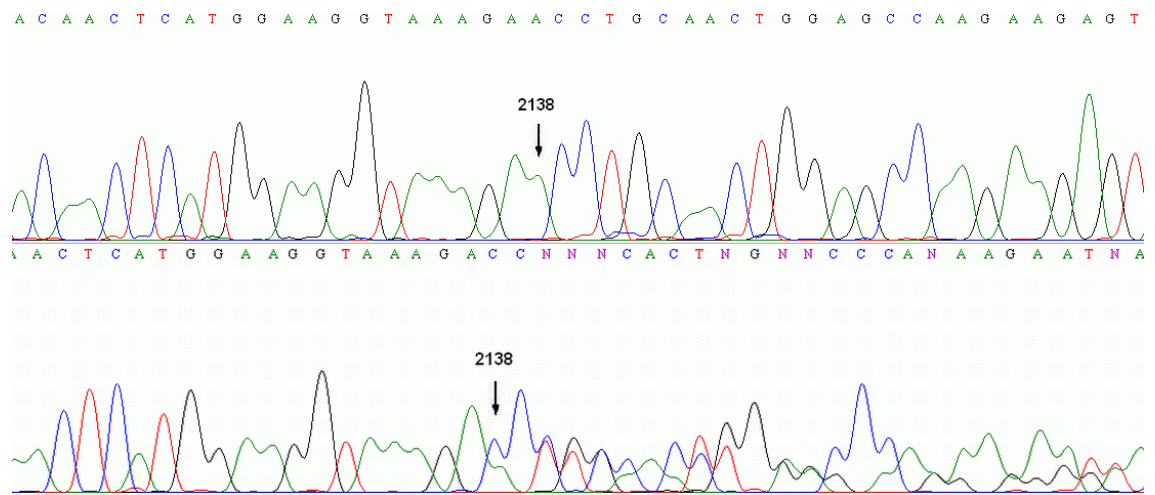
Slika 15. Elektroferogram dela egzona 20 gena BRCA1. U gornjem delu slike prikazana je *wt* sekvenca, a u donjem delu sekvenca sa mutacijom 5382insC.

Mutacija **969ins7** u genu BRCA1 (Slika 16) dovodi do sinteze proteina koji ima samo 287 amino kiselina. Ovako skraćen protein ima samo RING domen i jedan od NLS signala. Osim nemogućnosti ostvarivanja funkcija koje zahtevaju ostale domene ovog proteina (DNK-vezujući domen, BRCT domeni), postavlja se pitanje da li ovako kratak protein može imati očuvanu ikakvu funkciju. Usled očuvane strukture RING domena, moguće je da je očuvana interakcija sa BARD1 i eventualno neke od funkcija koje ovaj kompleks ima a koje ne zahtevaju ostatak proteina BRCA1.



Slika 16. Elektroferogram dela egzona 11 gena BRCA1. U gornjem delu slike prikazana je *wt* sekvenca, a u donjem delu sekvenca sa mutacijom 969ins7.

Mutacija **2138delA** u genu BRCA1 (Slika 17) usled pomerenog okvira čitanja stvara STOP kodon na poziciji 700. Ovako skraćen protein ima očuvan RING domen, NLS signale, dok se transkripcija završava negde na sredini DNK-vezujućeg domena. Pitanje funkcionalnosti ovako skraćenog proteina ostaje, kao i u slučaju mutacije 969ins7.



Slika 17. Elektroferogram dela egzona 11 gena BRCA1. U gornjem delu slike prikazana je *wt* sekvenca, a u donjem delu sekvenca sa mutacijom 2138delA.

Protein BRCA1 posredstvom BRCT domena interaguje sa proteinima koji modifikuju hromatin. Nedostatkom ovih domena, interakcija sa ovim proteinima je

onemogućena, što narušava modifikaciju hromatina koja je potrebna za prilaz proteina uključenih u popravku oštećenja DNK mestu oštećenja. Time oštećenje ostaje nepristupačno za popravku, pa je manje verovatno da će biti popravljeno.

Osim toga, BRCA1 posredstvom BRCT domena interaguje sa RNK polimerazom II, utičući na njenu funkciju. S jedne strane pokazano je da heterodimer BRCA1-BARD1 ubikvitinira RNK polimerazu II i time inhibira transkripciju (Kleiman et al., 2005; Starita et al., 2005), dok s druge strane ima podataka da BRCA1 svojim C-terminalnim domenom (amino kiseline 1560-1863) učestvuje u aktivaciji transkripcije (Monteiro et al., 1996). Nedostatkom poslednjih 300 amino kiselina, a samim tim i BRCT domena, onemogućena je kontrola transkripcije (kako njena inhibicija, tako i aktivacija) posredstvom proteina BRCA1. Kako BRCA1 aktivira transkripciju gena za ER- α vezujući se za njegov promotorski deo, ESR1, nefunkcionalan protein BRCA1 ne može da aktivira transkripciju sa ovog promotora, što objašnjava i pojavu da karcinomi povezani sa mutacijama u genu BRCA1 veoma često ne ekspimiraju receptor za estrogen (ER-). Osim ove kontrole transkripcije, BRCA1 posredstvom N-terminusa i BRCT domena kontroliše i transkripciju posredovanu ER- α (Fan et al., 2001). Ima podataka da BRCA1 inhibira transkripciju posredstvom ovog hormonskog receptora i kada je estrogen vezan za ovaj receptor i kada nije (Fan et al., 1999; Zheng et al., 2001). S jedne strane, BRCA1 sprečava aktivaciju transkripcije kada ER nije aktiviran ligandom, odnosno sprečava transkripciju kada ćelija nije dobila signal za to (Zheng et al., 2001). S druge strane, BRCA1 inhibira i transkripciju aktiviranu vezivanjem liganda (estrogena) za receptor ER (Fan et al., 1999). Može se pretpostaviti da BRCA1 predstavlja faktor koji vrši finu regulaciju transkripcije posredovane ovim hormonskim receptorom.

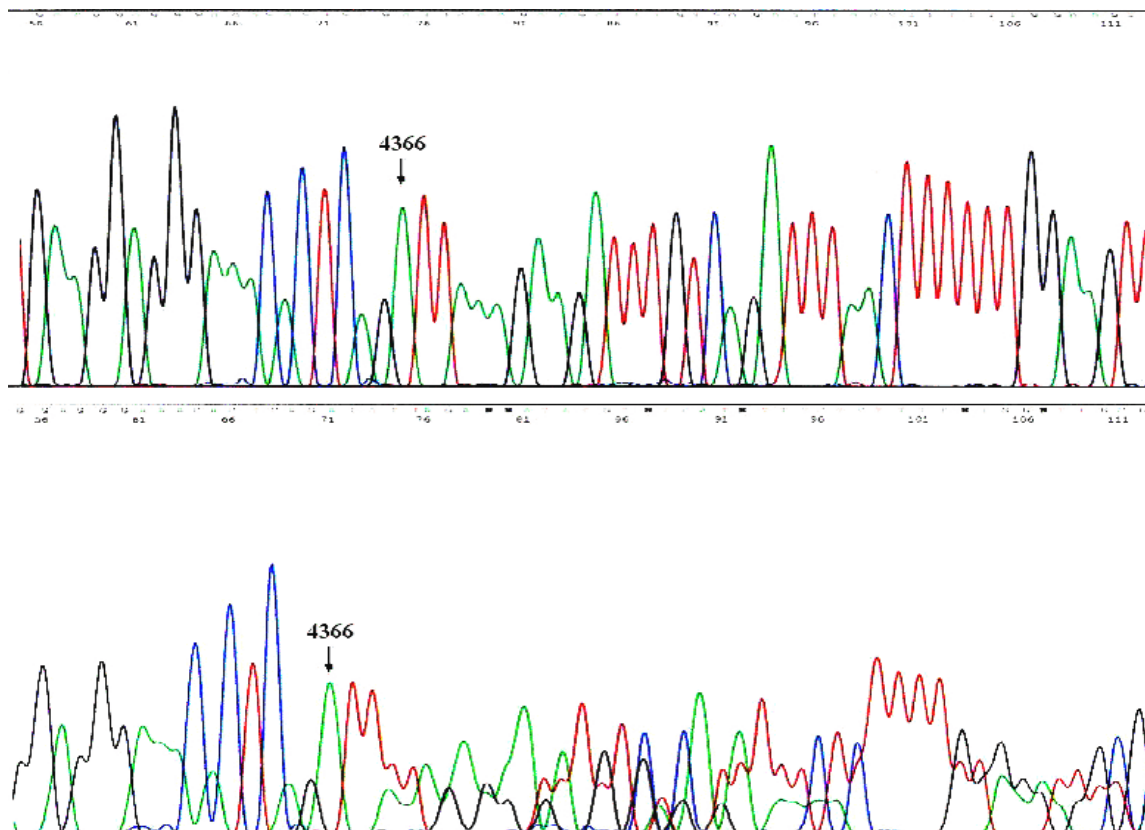
Interakcija BRCA1 sa p53 i modifikacija njegove funkcije zahteva drugi BRCT domen proteina BRCA1 (amino kiseline 1756-1855) (Chai et al., 1999). Ukoliko je ova interakcija narušena nedostatkom ovog domena (usled *frameshift* mutacije koja pomera okvir čitanja i stvara STOP kodon uzvodno od ovog domena), narušena je i aktivacija G1/S kontrolne tačke ćelijskog ciklusa nakon oštećenja DNK i aktivacija mehanizama popravke nastalih oštećenja DNK. Ovo može voditi fiksiranju mutacija u genomu, nakupljanju mutacija svakom narednom deobom ćelije (genomskoj nestabilnosti) i nekontrolisanoj deobi, odnosno tumorogenezi. Može se pretpostaviti da BRCA1, zaustavljajući p53 zavisnu apoptozu i aktiviranjem mehanizama za popravku oštećenja

DNK daje ćeliji „šansu“ i potrebno vreme da pokuša da popravi oštećenja i izbegne smrt. S obzirom da BRCA1 može i da indukuje apoptozu nezavisno od p53 kroz različite signalne puteve, kao što su H-Ras, MEKK4, JNK, Fas i Fas ligand (Thangaraju et al., 2000), može se pretpostaviti da je BRCA1 jedan od proteina koji vrše finu regulaciju i koordinaciju puteva koji vode zaustavljanju ćelijskog ciklusa, popravci oštećenja DNK i apoptozi i određuju kojim će od ovih puteva ćelija da „krene“.

U slučaju mutacija 969ins7 i 2138delA, proteini su izrazito skraćeni i imaju samo 287 odnosno 700 amino kiselina. Ovim proteinima nedostaju brojna mesta fosforilacije od strane ATM, ATR i drugih kinaza (Ser 988, Ser1143, Ser1280, Ser1387, Ser1423, Ser1457, Ser1524 i dr.) kojima BRCA1 biva aktiviran da zaustavi ćelijski ciklus u različitim fazama nakon oštećenja DNK. Zato ćelija sa ovako skraćenim proteinom BRCA1 nastavlja da se deli i nakon što je pretrpela dodatna oštećenja DNK. Time dolazi do nakupljanja mutacija u genomu (genomske nestabilnosti), gubitka kontrole nad proliferacijom i tumorogeneze.

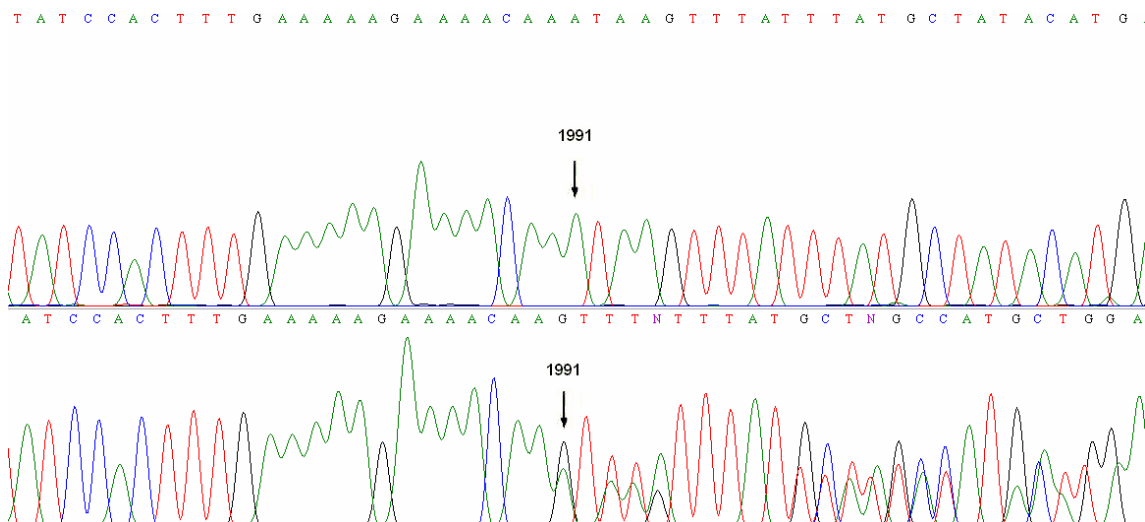
Frameshift mutacije u genu BRCA2

Mutacija **4366insTT** u genu BRCA2 (Slika 18) takođe predstavlja novu mutaciju koja do sada nije bila opisana u literaturi, niti je objavljena u BIC i LOVD bazama. Ova mutacija predstavlja inserciju 2 bp i pomeranjem okvira čitanja ova mutacija dovodi do promene 7 amino kiselina počevši od pozicije 1381 sa STOP kodonom na poziciji 1388 (Dobričić et al., 2010). Proteinskom produktu ovako mutiranog gena BRCA2 nedostaje više od 2000 amino kiselina na C kraju. STOP kodon je lociran između ponovaka BRC2 i BRC3 (EMBL: IPR015525), dovodeći do toga da proteinu nedostaju BRC3-BRC8, uključujući i BRC3 i BRC4 koji vezuju RAD51 (Pellegrini et al., 2002). Amino kiseline na pozicijama od 1414 do 1463 u BRC3 domenu proteina BRCA2 ključne su za vezivanje RAD51 (Wong et al., 1997). Ovako skraćenom proteinu nedostaju ove amino kiseline i ne može da veže RAD51, pa time ne može ni da ga odvede u jedro i reguliše njegovu funkciju u homologoj rekombinaciji. Ćelije koje nose ovakvu mutaciju nemaju funkcionalan put popravke dvolančanih oštećenja DNK posredstvom homologe rekombinacije, genom im je nestabilan usled nakupljanja nepopravljenih oštećenja DNK, pa nosioci ove mutacije imaju povećanu predispoziciju za kancer.



Slika 18. Elektroferogram dela egzona 11 gena BRCA2. U gornjem delu slike prikazana je *wt* sekvenca, a u donjem delu sekvenca sa mutacijom 4366insTT.

Mutacija **1991del4** u genu BRCA2 (Slika 19) dovodi do stvaranja STOP kodona na poziciji 612. Kao i u slučaju mutacije 4366insTT, ni ovako skraćeni protein ne može da veže RAD51 usled nedostatka ključnih BRC ponovaka. Samim tim ovaj skraćeni protein ne može da reguliše stvaranje nukleoproteinskog filameta prilikom popravke dvolančanih prekida DNK, ostavljajući ovaj mehanizam popravke nefunkcionalnim. Dakle, obe ove mutacije uzrok su predispozicije za oboljevanje od kancera usled genomske nestabilnosti koja je posledica nefunkcionalnosti jednog od mehanizama popravke oštećenja DNK.

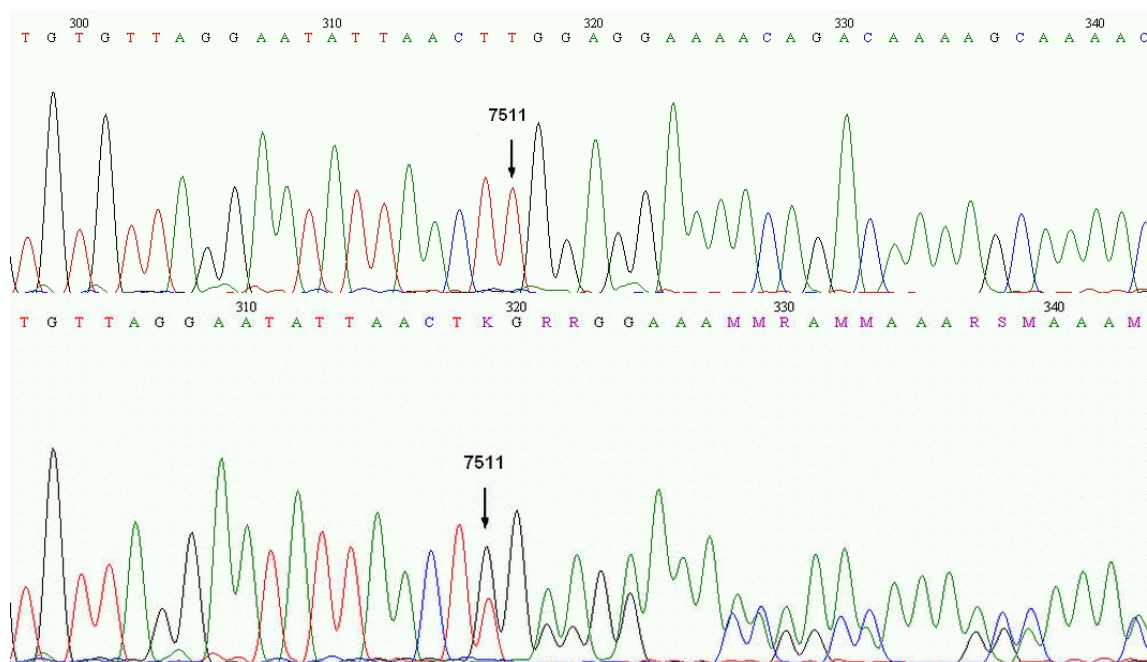


Slika 19. Elektroferogram dela egzona 10 gena BRCA2. U gornjem delu slike prikazana je *wt* sekvenca, a u donjem delu sekvenca sa mutacijom 1991del4.

Još jedna nova mutacija detektovana je u egzonu 14 gena BRCA2. Mutacija **7511delT** (Slika 20) pomera okvir čitanja i dovodi do STOP kodona na poziciji 2468. Ovako skraćen protein iako ima očuvane sve BRC ponovke i može da veže RAD51, ima narušen domen za vezivanje za jednolančanu DNK koji je ključan za dovođenje RAD51 do jednolančane DNK na mestu oštećenja i formiranje nukleoproteinskog filameta u procesu popravke dvolančanih prekida DNK posredstvom homologe rekombinacije. Stoga, i ova mutacija dovodi do nefunkcionalnosti popravke dvolančanih prekida, povećavajući verovatnoću za malignu transformaciju ćelije koje je poseduju, predisponirajući za kancer osoba koje su je nasledile.

Osim svega navedenog, svaka od ovih *frameshift* mutacija u genu BRCA2 dovodi do sinteze skraćenih proteina kojima nedostaju signali za lokalizaciju u jedru (engl. *nuclear localization signals* - NLSs), koji se nalaze na samom C-kraju proteina BRCA2. Samim tim, ovi proteini ostaju u citoplazmi i ne mogu da izvrše svoju funkciju u jedru u popravci oštećenja DNK. Naime, BRCA2 vezuje i transportuje RAD51 u nukleus, jer RAD51 nema NLSs. U prilog ovome govori i nalaz da se skraćeni proteini BRCA2, kojima nedostaju NLSs na C-kraju, nalaze u citoplazmi, zajedno sa većim delom proteina RAD51 (Spain et al., 1999; Davies et al., 2001). Nakon ulaska u jedro, BRCA2-RAD51 odlaze do mesta oštećenja, BRCA2 se vezuje svojim DNK-vezujućim

domenom za jednolančanu DNK na mestu oštećenja i time dovodi i RAD51 do mesta oštećenja DNK, gde se stvaraju fokusi proteina koji učestvuju u popravci oštećenja (Yuan et al., 1999). U tim fokusima i RAD51 treba da izvrši svoju ulogu formirajući nukleoproteinski filament vezujući se u vidu polimera za jednolančanu DNK i katalizujući traženje homologe sekvence na sestrinskoj hromatidi i započinje popravku posredovanu homologom rekombinacijom.



Slika 20. Elektroferogram dela egzona 14 gena BRCA2. U gornjem delu slike prikazana je *wt* sekvenca, a u donjem delu sekvenca sa mutacijom 7511delT.

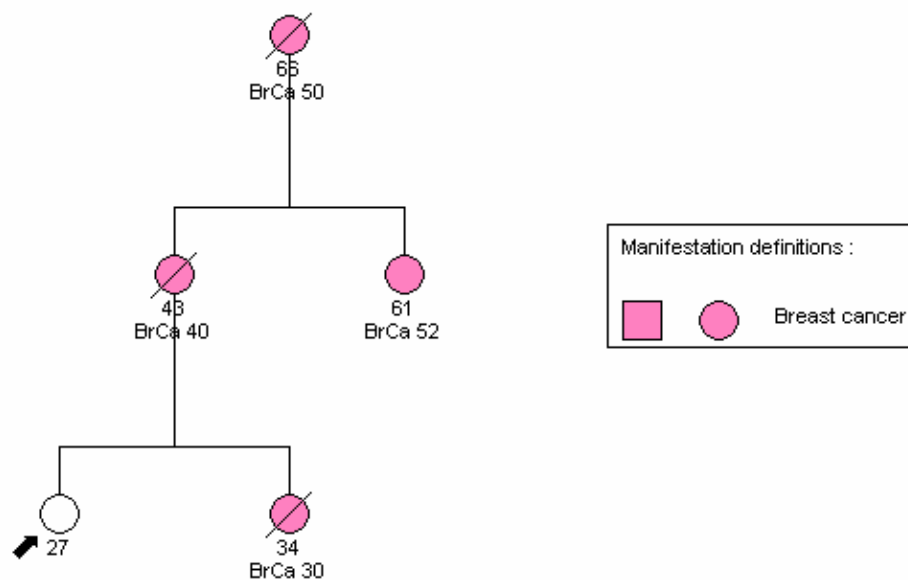
Za ćelije koje nose mutaciju u genu BRCA2 i deficijentne su u funkciji proteina BRCA2 karakteristična je genomska nestabilnost. Naime, tokom deoba ove ćelije akumuliraju velike hromozomske rearanžmane, kao što su translokacije i velike delecije (Gretarsdottir et al., 1998; Patel et al., 1998; Tutt et al., 1999; Yu et al., 2000). Ove anomalije mogu se objasniti nedostatkom proteina BRCA2 koji bi kontrolisao RAD51 u rekombinaciji i popravci oštećenja DNK tokom S faze ćelijskog ciklusa. Međutim, nedostatak funkcije proteina BRCA2 povezan je i sa promenama u broju hromozoma (Patel et al., 1998; Tutt et al., 1999; Yu et al., 2000), amplifikacijom centrozoma, kao i sa formiranjem mikronukleusa, neuobičajenih telašaca koja sadrže DNK (Tutt et al., 1999). Ovo može da se objasni nedostatkom uloge BRCA2 u kontroli raspodele

hromozoma interakcijom sa hBUBR1, koji je deo strukture kinetohora (Futamura et al., 2000). Ovo je još jedan od uzroka genomske nestabilnosti ćelija koje imaju mutaciju u genu BRCA2 i njihovog povećanog potencijala za malignu transformaciju.

Nonsense mutacija u genu BRCA2

Mutacija **K3326X** u egzonu 27 gena BRCA2 dovodi do skraćenog proteina BRCA2, kome nedostaju poslednje 93 amino kiseline na C kraju. Za ovu mutaciju se smatra da nije oštećujuća, tj. da ne utiče na funkciju proteina. Postavlja se pitanje da li ovakav nedostatak na C-terminusu narušava strukturu nekog od NLSs koji se nalaze u tom delu proteina BRCA2, i ako narušava, da li to ima uticaja na premeštanje ovog proteina iz citoplazme u jedro. Rezultati ranijih istraživanja lokalizacije skraćenih proteina BRCA2 pokazuju da se proteini koji su skraćeni nizvodno od pozicije 3270 nalaze u nukleusu (Spain et al., 1999). To dovodi do zaključka da *nonsense* mutacija K3326X ne dovodi do narušavanja NLSs i da može biti neutralna, bez kliničkog značaja, kao što je BIC i LOVD baze podataka i klasifikuju. U nekim istraživanjima ova mutacija je bila nađena zajedno sa oštećujućim mutacijama (Haraldsson et al., 1998; Claes et al., 2003), dok je u drugim nađeno da nema razlike u njenoj učestalosti u grupi obolelih osoba i kontrolnoj grupi (Mazoyer et al., 1996), pa je pretpostavljen njen neutralan efekat. Osim toga, funkcionalna analiza prisustva ove mutacije dala je rezultate slične rezultatima za *wt* BRCA2 (Wu et al., 2005). Međutim, Martin i saradnici (2005) našli su da ova *nonsense* mutacija ima skoro 5 puta veću učestalost u porodicama sa naslednim karcinomom pankreasa u odnosu na kontrolnu grupu. Uz ove rezultate kao i veličinu delecije koju ova mutacija izaziva na proteinskom nivou, potrebno je detaljnije istražiti klinički značaj ove mutacije. Moguće je da ona malo ili umereno povećava rizik oboljevanje od karcinoma.

U našoj studiji, ova promena nađena je kod jedne osobe koja nije obolela, u porodici SRB048, sa izrazitim porodičnim nakupljanjem karcinoma dojke (Slika 21). S obzirom da testirana osoba nije obolela, moguće je da ona nije nasledila oštećujuću porodičnu mutaciju, a da je detektovana *nonsense* mutacija nije oštećujuća i ne doprinosi riziku za oboljevanje. Kako uzorci obolelih osoba iz ove porodice nisu bili dostupni za analizu, nije bilo moguće utvrditi eventualno postojanje oštećujuće porodične mutacije koja bi otklonila sumnju u efekat detektovane *nonsense* promene.



Slika 21. Prikaz obolelih i testiranih srodnika porodice SRB048.

Missense mutacije u genima BRCA

Osim *frameshift* mutacija, i *missense* mutacije mogu biti oštećujuće. Zamena ključne amino kiseline u domenu za interakciju sa drugim proteinom onemogućava tu interakciju i ostvarivanje funkcije proteinskog kompleksa čije je stvaranje narušeno. Tako na primer, interakcija BRCA1 sa BARD1 narušava se BRCA1 *missense* mutacijama koje dovode do zamene amino kiselina na pozicijama Cys61 ili Cys64 (mutacije C61G ili C64G). Ovim mutacijama menjaju se ključni cisteinski ostaci u RING domenu BRCA1, kojim ovaj protein interaguje sa proteinom BARD1 (Wu et al., 1996; Brzovic et al., 2001). Onemogućavanje stvaranja proteinskog kompleksa BRCA1-BARD1 narušava njegove funkcije, koje uključuju ubikvitinaciju E3 ubikvitin ligaznom aktivnošću ovog kompleksa, narušavajući kontrolu duplikacije centrozoma (dovodeći do aneuploidije) i inhibiciju transkripcije (ubikvitinacijom RNK polimeraze II).

Missense mutacija C61G veoma je česta u različitim zemljama i ranije je bila detektovana kod pacijenta iz naše zemlje (Konstantopoulou et al., 2004). Među 85 testiranih osoba u ovom uzorku nije detektovana ova promena, niti ijedna druga oštećujuća mutacija *missense* tipa.

Missense mutacije koje ne dovode do potpunog narušavanja funkcije proteina BRCA1 ili BRCA2 mogu zamenom amino kiseline da dovedu do male ili umerene promene u strukturi domena koji su bitni za interakciju sa drugim proteinima ili za ostvarivanje neke od funkcija proteina. Ove mutacije obično su obeležene kao promene nepoznatog kliničkog značaja ili kao neklasifikovane (engl. *unclassified variants*). Efekat ovakvih promena procenjuje se softverskim programima na osnovu položaja i vrste zamenjene amino kiseline i opisuju se određenom verovatnoćom da doprinose povećanju rizika za oboljevanje (PolyPhen softver ih opisuje kao *possibly* ili *probably damaging*). Takođe, praćenjem postojanja ovih promena kod obolelih osoba u porodicama sa nakupljanjem karcinoma dojke i jajnika procenjuje se njihov doprinos povećanju rizika za oboljevanje. Ukoliko se *missense* mutacija nalazi *in trans* sa poznatom oštećujućom mutacijom smatra se da je ona neutralna (benigna) i da ne dovodi do značajnog povećanja rizika za oboljevanje (jer homozigotne oštećujuće mutacije u genima BRCA1 ili BRCA2 dovode do letalnog ishoda u embrionalnom stadijumu). Međutim, mutacije *missense* tipa mogu malo ili umereno da dovode do povećanja rizika za oboljevanje menjajući penetrabilnost gena kod nosioca oštećujuće mutacije u genu BRCA1 ili BRCA2. Kod osoba koje nisu nosioci oštećujućih mutacija u genima BRCA, postojanje više *missense* mutacija nepoznatog efekta možda ima kumulativan efekat na umereno povećanje rizika za oboljevanje od karcinoma dojke i/ili jajnika. Zbog svega navedenog, klasifikacija *missense* mutacija može se vremenom menjati sa dobijanjem novih podataka o njihovom efektu, pa neka promena prvo klasifikovana kao mutacija nepoznatog značaja ili sa mogućim oštećujućim efektom, kasnijim detaljnijim uvidom može da se pokaže kao neutralna, bez kliničkog značaja, i obrnuto.

***Missense* mutacije u genu BRCA1**

Uporednom analizom proteina BRCA1 kod drugih vrsta, na osnovu konzerviranosti određenih pozicija amino kiselina među vrstama, nađeno je da su, od *missense* mutacija nađenih među našim ispitanicima (Tabela 13), neutralne ili sa malim kliničkim značajem sledeće zamene amino kiselina u genu BRCA1: P871L, Q356R, E1038G, S1040N, K1183R, D693N, S1512I, S1613G, M1652I (Abkevich et al., 2004), a nema podataka jedino za R841W i I482F. Kombinacijom transkripcionih testova i

pojavljivanjem zajedno sa poznatim deletirajućim mutacijama u genu BRCA1 potvrđeno je da je S1512I neutralna promena (Phelan et al., 2005). Takođe, kombinovanjem više metoda, za mutaciju M1652I (Arnold et al., 2002; Mirkovic et al., 2004), kao i za S1040N (Arnold et al., 2002) potvrđeno je da su neutralne. Ranija istraživanja pokazala su da su mutacije Q356R i P871L povezane sa povećanim rizikom za oboljevanje od karcinoma jajnika (Janezic et al., 1999). Međutim, analizom većeg broja ispitanika pokazano je da njihovo prisustvo mutacija nije povezano sa povećanim rizikom kako za karcinom dojke (Dunning et al., 1997; Seymour et al., 2008), tako ni za karcinom jajnika (Wenham et al., 2003). E1038G nalazi se u delu proteina koji biva fosforilisan tokom popravke oštećenja DNK. S1613G utiče na interakciju sa BRCA2 i na p300/CBP transkripcionu ko-aktivaciju, ali nije nađeno da je povezan sa pojavom ranog karcinoma dojke (Tommasi et al., 2008). K1183R je takođe lociran u delu proteina koji biva fosforilisan tokom popravke oštećenja DNK, ali je pokazano da je obrnuto povezan sa rizikom za posedovanje mutacije (Tommasi et al., 2005).

Prema LOVD bazi, u kojoj su sakupljeni literaturni podaci o mutacijama u različitim genima, za mutacije u genu BRCA1 Q356R, D693N, R841W, P871L, E1038G, K1183R, S1613G, M1652I postoje radovi čiji rezultati ukazuju na mogućnost da utiču na povećanje rizika za oboljevanje, dok su ostale *missense* promene u genu BRCA1 detektovane kod naših ispitanika neutralne.

Doprinos riziku *missense* mutacija u genu BRCA1 procenjivan je i na osnovu segregacije sa bolešću, odsustva u etnički odgovarajućim kontrolama, konzerviranosti amino kiseline i pozicije u okviru konzerviranog i potencijalno funkcionalnog domena. Takvom analizom je pokazano da su promene Q356R, D693N, L871P, E1038G, S1040N, K1183R, S1512I, S1613G i M1652I verovatno neutralne (Couch et al., 1996; Greenman et al., 1998).

Za mutaciju 2640C>T (R841W) u genu BRCA1, koja je bila nađena i zajedno sa poznatom deletirajućom mutacijom, smatra se da ne doprinosi visokom riziku za oboljevanje (Goldgar et al., 2004). Međutim, ne može se isključiti mogućnost da ova promena umereno doprinosi povećanju rizika (Goldgar et al., 2004), na šta ukazuje i analiza u *PolyPhen* programu koji za ovu zamenu amino kiseline klasifikuje kao *possibly damaging*. Takođe, ranija istraživanja povezivala su ovu promenu sa povećanim rizikom za oboljevanje (Janezic et al., 1999). Kombinujući različite metode (evolutivnu očuvanost određenih amino kiselina, kao i preračunavanja obima promena

koje zamena amino kiselina ima kao posledicu) nađeno je da mutacije R841W i Q356R u genu BRCA1 doprinose riziku (Lee et al., 2008). Koristeći se evolutivnim pristupom, nađeno je da mutacija R841W verovatno utiče na funkciju proteina BRCA1 (Fleming et al., 2003), dok je za istu mutaciju ranije, koristeći Bayesian metodu, utvrđeno da verovatno podiže rizik za oboljevanje (Petersen et al., 1998).

Postoje podaci da su mutacije Q356R i S1512I u genu BRCA1 nađene zajedno u dve porodice sa slučajevima muškaraca obolelih od karcinoma dojke, dok nisu nađene zajedno kod 218 zdravih kontrola, pa je pretpostavljeno da ove dve mutacije kada se nađu zajedno doprinose povećanju rizika (Hadjisavvas et al., 2002). Među našim uzorcima kod jedne ženske osobe koja je obolela od karcinoma dojke *in situ* u genu BRCA1 nađene su samo ove dve promene (analiza gena BRCA2 nije rađena). Ovaj rezultat može da predstavlja potvrdu navedenog literaturnog podatka koji ukazuje na mogućnost da ove dve promene zajedno doprinose povećanju rizika za oboljevanje.

Potencijalni klinički značaj *missense* mutacija vremenom se menja, dobijanjem više podataka povezanosti ovih mutacija sa oboljevanjem. Zbog ovakvih protivrečnih nalaza potreban je oprez pri tumačenju ovakvih rezultata i savetovanju nakon testiranja.

Missense mutacije u genu BRCA2

Funkcionalna analiza mutacije N372H gena BRCA2 dalo je rezultate slične kao za *wt* gen BRCA2, a nađeno je i da se nasleđuje zajedno sa oštećujućim mutacijama, pa je verovatno da je ova mutacija neutralna (neoštećujuća) (Wu et al., 2005). Za ovu mutaciju pretpostavljeno je da može da povećava rizik za nastanak karcinoma dojke i jajnika kada je u HH homozigotnom stanju (Healey et al., 2000; Auranen et al., 2003). Seymour i saradnici (2008) su našli povećani rizik za oboljevanje od karcinoma dojke povezan sa ovom mutacijom samo u grupi visoko rizičnih žena bez mutacije u genima BRCA1/2. Oni su pretpostavili da mutacije sa niskim i umerenim doprinosom riziku mogu da budu maskirane drugim genetičkim faktorima. U odsustvu oštećujućih mutacija u genima BRCA1/2, promene koje nisko ili umereno doprinose riziku za oboljevanje svojim kumulativnim efektom mogu da doprinesu riziku za oboljevanje u visoko rizičnim porodicama.

Od osoba testiranih u našoj studiji, tri nose HH genotip, dve imaju HN genotip, a 17 NN genotip. Sve 3 osobe sa HH genotipom su obolele, i to po jedna žena od ranog karcinoma dojke i od karcinoma jajnika i jedan muškarac od karcinoma dojke. Od dve

osobe sa HN genotipom, jedna je obolela od karcinoma jajnika, a druga nije obolela. Ovi rezultati mogu da ukažu na postojanje uticaja ove promene u HH homozigotnom obliku na rizik za oboljevanje. Wu i saradnici (2005) su pokazali da N372H, kao i *nonsense* mutacija K3326X, nemaju efekat na funkciju proteina BRCA2. Ove dve mutacije su često nalažene zajedno sa poznatim oštećujućim mutacijama, što dodatno potvrđuje da ove dve promene verovatno ne povećavaju rizik za karcinom dojke.

Prema LOVD bazi, od *missense* mutacija u genu BRCA2, jedino za mutaciju N289H postoje podaci da možda doprinosi riziku za oboljevanje. Za homozigote za histidinski alel mutacije N372H pokazano je da povećavaju rizik za karcinom dojke (relativni rizik RR=1,3-1,5) (Healey et al., 2000; Spurdle et al., 2002). S druge strane, u velikoj studiji koja je uključivala 15000 obolelih i 15000 kontrola ova povezanost nije potvrđena: za HH homozigote RR=1,12, dok je za heterozigote RR=1,05 (The Breast Cancer Association Consortium, 2006). Amino kiselina koja biva zamenjena ovom mutacijom pripada regionu proteina BRCA2 za koji je pokazano da interaguje sa histon acetiltransferazom P/CAF (amino kiseline 290-453 proteina BRCA2) (Fuks et al., 1998). Smatra se da kroz ovu interakciju BRCA2 moduliše transkripciju modifikujući hromatin (Fuks et al., 1998). Moguće je da ova promena amino kiseline na poziciji 372 ima uticaja na ovu interakciju, imajući za posledicu izmenjeno funkcionisanje proteina BRCA2, pa i izmenjeno remodelovanje hromatina. U jednoj studiji je ova promena bila povezana i sa oboljevanjem u kasnijoj životnoj dobi, boljom diferenciranošću i višim nivoom ekspresije PR (Tommasi et al., 2008).

ANALIZA UPOTREBE BRCA PRO PROGRAMA U ISPITIVANOJ GRUPI

Geni BRCA1 i BRCA2 su veoma veliki (preko 20 egzona po genu) i mutacije u ovim genima nisu grupisane u određenim regionima, pa testiranje podrazumeva analizu celih kodirajućih regiona oba gena, što predstavlja dugotrajan, mukotrpan i veoma skup proces. S obzirom da su mutacije u genima BRCA1 i BRCA2 povezane u proseku sa oko 50% naslednih karcinoma dojke (6-79%, Anglian Breast Cancer Study Group, 2000), čine se napori da se nađu načini da se prepoznaju porodice kod kojih je veća verovatnoća da se mutacije detektuju a da se izbegne nepotrebno i skupo testiranje

porodica kod kojih je mala verovatnoća da će se mutacije naći. Jedan od načina da se precizno suzi broj ispitanika koje treba testirati je korišćenje programa koji na osnovu različitih podataka iz porodične istorije preračunava verovatnoću detekcije mutacija u genima BRCA1 i BRCA2. Jedan od takvih programa je BRCAPRO program, koji procenu vrši na osnovu podataka iz porodice (broj obolelih srodnika, stepen srodstva, lokalizacija kancera, starost u vreme oboljevanja, trenutna starost, starost u vreme smrti, kao i etničko poreklo od Aškenazi Jevreja). Osobe koje prema ovom programu imaju procenjenu verovatnoću za nalaženje mutacija u genima BRCA1/2 jednaku ili veću od 10% kandidati su za BRCA testiranje. BRCAPRO program se pokazao kao bolji od drugih sličnih programa iste namene, a bolji je (veće specifičnosti) i od korišćenja samo porodične istorije za procenu verovatnoće da određena osoba nosi mutaciju u genu BRCA1 ili genu BRCA2 (van Harssel et al., 2010).

Međutim, BRCAPRO, kao i svaki drugi program, ima svoja ograničenja: zavisi od objavljenih procena penetrabilnosti oba gena BRCA1/2, ne uzima u obzir nefamilijarne faktore rizika za karcinom dojke (karakteristike tumora kod obolelih, dužinu reproduktivnog ciklusa i dr.). Osim toga, prilikom procene verovatnoće postojanja mutacije u datoj porodici program uzima u obzir samo srodnike prvog i drugog stepena srodstva. Program stoga ponekad daje niske procene verovatnoće u slučajevima kada je testiranje indicirano. Tako, na primer, za rani karcinom dojke (pre 35. godine života), koji je često povezan sa mutacijama u genu BRCA1, BRCAPRO program daje verovatnoću postojanja mutacije od oko 6%, čime ove obolele osobe ne bi bile kandidati za testiranje, a kod kojih je indicirano BRCA testiranje. Zbog svega navedenog, pri odabiru osoba za testiranje u obzir se ne uzima samo kriterijum dobijen BRCAPRO programom (verovatnoća $\geq 10\%$), već se on kombinuje sa dodatnim podacima iz porodične istorije koji bi mogli biti procenjeni ili nisu uzeti u obzir prilikom procene BRCAPRO programom (dalji oboleli srodnici, karakteristike tumora itd.), pa se u nekim slučajevima, kada za to postoji opravdanost, testiraju i osobe čija je procenjena verovatnoća manja od 10%, kao u slučaju ranog karcinoma dojke.

Korelacija u odnosu na detektovane mutacije

Korelacija vrednosti BRCAPRO verovatnoće sa detektovanim mutacijama u genima BRCA1/2 u ispitivanoj grupi rađena je u pokušaju da se utvrdi eventualna granica BRCAPRO verovatnoće koja bi dala mogućnost predviđanja pronalaza

mutacija različitog značaja, od benignih polimorfizama, preko neklasifikovanih varijanti (verovatno ili moguće oštećujućih), pa do oštećujućih mutacija u genima BRCA1/2.

Sve oštećujuće (*frameshift*) mutacije nađene su kod osoba čija je procena verovatnoće da nose mutaciju u genima BRCA1/2 BRCAPRO softverom bila >10% (Tabela 19). Ovo je u skladu sa činjenicom da je granica BRCAPRO verovatnoće od 10% uzeta kao jedan od uključujućih kriterijuma za BRCA testiranje. U Tabeli 19 za osobe SRB026/2 i SRB038/3 u zagradi su date prvobitne procene verovatnoće da su nosioci mutacije. Kasnije, kada je kod majke od osobe SRB026/2 nađena mutacija, verovatnoća za osobu SRB026/2 da je nasledila mutaciju porasla je na 50%. U slučaju osobe SRB038/3, prvo je mutacija detektovana kod njene tetke, pa je nakon toga i verovatnoća za osobu SRB038/3 da je nasledila mutaciju porasla na 25%. Kod većine nosioca oštećujućih mutacija u genima BRCA (6/9) procenjena BRCAPRO verovatnoća je bila veća od 40%. Stoga je i ova vrednost BRCAPRO verovatnoće, sem granične vrednosti od 10% i medijane od 25,40%, uvedena u analizu eventualne upotrebljivosti BRCAPRO programa za procenu BRCAPRO verovatnoće koja bi možda mogla da doprinese boljoj identifikaciji osoba koja nose štetne mutacije ili neklasifikovane varijante sa moguće i verovatno oštećujućim efektom, u odnosu na one koje nose benigne polimorfizme.

Tabela 19. Verovatnoće da osobe nose mutaciju procenjene BRCAPRO softverom kod osoba kod kojih je detektovana oštećujuća (*frameshift*) mutacija.

Porodica	Gen	Mutacija	BRCAPRO
SRB010	BRCA1	4765del20	40,6%
SRB038/1		2138delA	78,5%
SRB038/3		2138delA	(15,3%) 25%
SRB042		5382insC	83,0%
SRB076		969ins7	60,8%
SRB077	BRCA2	1991del4	88,1%
SRB026/1		4366insTT	14,8%
SRB026/2		4366insTT	(12,2%) 50%
SRB047		7511delT	28,6%

Statistički značajna razlika dobijena je jedino pri poređenju grupe ispitanika kod kojih je detektovana oštećujuća (*frameshift*) mutacija sa grupom ispitanika kod kojih su detektovane samo benigne promene u odnosu na BRCAPRO verovatnoću od 40%, i uočen je statistički značajno veći broj ispitanika sa BRCAPRO verovatnoćom koja je veća ili jednaka zadatoj vrednosti (40%) u grupi ispitanika kod kojih je detektovana oštećujuća mutacija (Tabela 17). Iz ovoga se može zaključiti da procenjena verovatnoća BRCAPRO programom iznad 40% ukazuje na povećanu mogućnost detektovanja oštećujućih mutacija kod tih ispitanika u odnosu na one sa BRCAPRO verovatnoćom ispod 40%. Ovaj podatak, uz činjenicu da su sve oštećujuće (*frameshift*) mutacije nađene kod osoba čije su BRCAPRO verovatnoće veće od 10% potvrđuju da je BRCAPRO program koristan pri odabiru ispitanika za testiranje. Dobijeni rezultati ukazuju da bi se povećanjem granice za BRCAPRO verovatnoću prilikom odabira ispitanika za BRCA testiranje mogla postići veća efikasnost samog testiranja.

Upoređivana je i grupa ispitanika kod kojih nije nađena nijedna mutacija sa grupom ispitanika kod kojih je detektovana oštećujuća (*frameshift*) mutacija, u odnosu na BRCAPRO verovatnoću za koju su kao granica uzete vrednosti od 10%, 25,40% i 40%. Ni za jednu od ovih graničnih vrednosti nije nađena statistički značajna razlika u zastupljenosti ispitanika iz ove dve grupe koji imaju vrednosti BRCAPRO verovatnoće manje/veće od zadatih graničnih vrednosti. Takođe, upoređivanjem grupe ispitanika kod kojih nije nađena nijedna mutacija ili su nađene benigne promene sa grupom ispitanika kod kojih su nađene oštećujuće (*frameshift*) ili verovatno oštećujuće (*probably damaging*) mutacije (prema PolyPhen programu), a u odnosu na broj ispitanika čija je procena verovatnoće BRCAPRO programom bila veća ili manja od 10%, 25,40% i 40%, nije nađena statistički značajna razlika ni za jednu od pomenutih vrednosti BRCAPRO verovatnoće (Tabela 17). Statistički značajna razlika između ovih grupa najverovatnije nije nađena jer u grupama ispitanika kod kojih nije nađena nijedna mutacija i kod kojih su detektovane samo benigne promene ima dosta osoba sa BRCAPRO verovatnoćom većom od 10% (7, odnosno 15 ispitanika), kao i onih sa BRCAPRO verovatnoćom većom od 40% (4, odnosno 3 ispitanika). Kod ovih ispitanika moguća je pojava familijarnog nakupljanja karcinoma dojke i/ili jajnika, slučajno ili usled nekih zajedničkih sredinskih faktora. Moguće je i postojanje velikih genskih rearanžmana gena BRCA1 ili BRCA2 (duplikacije ili delecije jednog ili više

egzona), koje automatskim sekvenciranjem, koje je korišćeno u ovom radu, nije moguće detektovati. Povećan rizik za nastanak karcinoma kod ovih osoba mogao bi se objasniti i metilacijom promotora gena BRCA1 ili BRCA2, čime bi se smanjila njihova ekspresija, što bi moglo da dovede do smanjene efikasnosti popravke oštećenja DNK. Moguće je i da ove osobe imaju mutaciju u nekom od drugih gena za koje je pokazano da doprinose riziku za oboljevanje od karcinoma dojke ili jajnika u malom broju slučajeva (do nekoliko procenata), kao što su ATM, ATR, CHK2, RAD51, PALB2, RAD51C, p53 itd. Treba uzeti u obzir i da je uz grupu oštećujućih mutacija, pri ovom upoređivanju pridodata grupa genskih varijanti sa eventualnim kliničkim značajem, pri čemu će se možda pokazati da su neke od tih varijanti i benigne, što utiče i na podelu grupa koje su upoređivane.

Poređenjem ispitanika kod kojih su detektovane moguće oštećujuće (*possibly damaging*) mutacije u odnosu na ispitanike kod kojih su detektovane verovatno oštećujuće (*probably damaging*) mutacije (prema PolyPhen programu), a u odnosu na BRCAPRO verovatnoće manje ili veće od 10%, 25,40% i 40%, nije uočena statistički značajna razlika niti za jednu od zadatih vrednosti BRCAPRO verovatnoće. Ovo ukazuje na činjenicu da se na osnovu BRCAPRO verovatnoće ne može predvideti da li će se kod ispitanika detektovati moguće ili verovatno oštećujuće mutacije, verovatno i zbog toga što podela na date varijante ne mora da bude adekvatna, tj. ne može se isključiti da neka od verovatno oštećujućih varijanti nema klinički značaj i obratno. U kliničkom smislu, nemogućnost predviđanja prisustva ovih vrsta genskih promena ne predstavlja veliki nedostatak BRCAPRO programa, s obzirom da je za određeni broj promena, moguće ili verovatno oštećujućeg tipa, već pokazano da nemaju klinički značaj. Tako je promena M1652I u genu BRCA1 prema PolyPhen programu verovatno oštećujućeg tipa (*probably damaging*). Analizom prisustva ove promene u kontrolnoj grupi osoba bez porodične istorije za karcinom dojke i/ili karcinom jajnika povezan sa mutacijama u genima BRCA pokazano da M1652I nema klinički značaj, odnosno da ne doprinosi povećanju rizika za oboljevanje od karcinoma dojke i jajnika (Arnold et al., 2002). Takođe, na osnovu predviđanja posledica strukturnih promena na funkciju proteina, za M1652I je predviđeno da je neutralna, tj. da nema posledice na funkciju proteina, pa samim tim ne doprinosi povećanju rizika za oboljevanje (Mirkovic et al., 2004). Takođe, za promenu S1512I u genu BRCA1, koja je prema PolyPhen programu

verovatno oštećujuća (*probably damaging*), kombinacijom transkripcionih testova i detekcijom zajedno sa poznatim deletirajućim mutacijama u genu BRCA1 potvrđeno je da je i ova promena neutralna (Phelan et al., 2005).

Na osnovu dobijenih rezultata, može se reći da podizanje granice BRCAPRO verovatnoće na 40% povećava mogućnost razlikovanja benignih od oštećujućih mutacija. Međutim, sva pomeranja granice BRCAPRO verovatnoće nisu se pokazala efikasna u odnosu na mogućnost razlikovanja neklasifikovanih varijanti od benignih polimorfizama i oštećujućih mutacija, kao i unutar neklasifikovanih varijanti razlikovanje moguće oštećujućih od verovatno oštećujućih promena. S obzirom da neklasifikovane varijante predstavljaju *missense* mutacije u genima BRCA1/2, čija je eventualna uloga u nastanku naslednog kancera posledica promena u funkciji proteina koje kodiraju i procenjuje se na osnovu kompjuterskih modela (PolyPhen), ove promene za sada predstavljaju najveći problem u karakterisanju nasledne predispozicije za karcinom dojke i/ili jajnika. Ovo pitanje je veoma kompleksno i još uvek otvoreno u literaturi, pa zbog toga i nemogućnost karakterisanja ovih promena uz upotrebu programa za predviđanje verovatnoće za nalaženje mutacija ne iznenađuje.

Korelacija u odnosu na broj obolelih srodnika u porodici

Analizirana je i vrednost BRCAPRO verovatnoće u ispitivanim porodicama u odnosu na broj obolelih članova u svakoj od njih i to i onih koji su obuhvaćeni BRCAPRO programom (prvi i drugi stepen srodstva), kao i onih koje BRCAPRO program pri analizi ne uzima u obzir. Ovom analizom ispitivano je da li broj obolelih srodnika u široj porodici, kao i anatomska lokalizacija naslednog kancera (dojka ili jajnik) utiču na povećanje BRCAPRO verovatnoće.

Uočen je statistički značajno veći broj porodica sa BRCAPRO verovatnoćom većom ili jednakom od 10, 25, 40% i 40% u grupi porodica sa 2 ili više obolela srodnika od karcinoma dojke ili karcinoma jajnika u odnosu na porodice sa samo jednim obolelim članom, bilo od karcinoma dojke, bilo od karcinoma jajnika (broj srodnika se ne odnosi samo na srodnike prvog i drugog stepena srodstva, već na sve članove šire porodice). Statistički značajno veći broj porodica sa BRCAPRO verovatnoćom većom ili jednakom zadatim vrednostima (10%, 25, 40% i 40%) nađen je i u grupi porodica sa 2

ili više slučajeva karcinoma dojke u odnosu na grupu porodica sa jednim članom obolelim od karcinoma dojke (Tabela 18). Ovi podaci dovode do zaključka da BRCAPRO verovatnoća raste sa porastom broja obolelih članova porodice kako iz uže tako iz šire porodice. S obzirom da BRCAPRO program za procenu verovatnoće da je neka osoba nosilac mutacije u genima BRCA1/2 uzima u obzir pre svega broj obolelih članova porodice i njihovu starost u vreme oboljevanja, ovaj nalaz je očekivan. Sa porastom broja obolelih članova porodice, kao i sa oboljevanjem u sve ranijoj životnoj dobi, raste i procenjena verovatnoća za detektovanje mutacije. Postojanje slučajeva kada je procenjena verovatnoća niska kod osoba u čijoj je porodici oboleo veći broj srodnika (Slika 13) može se objasniti činjenicom da program uzima u obzir samo obolele srodnike prvog i drugog stepena srodstva. Tako u nekim slučajevima postoji veći broj obolelih srodnika u široj porodici, ali je u BRCAPRO program moguće uneti podatke samo za obolele srodnike prvog i drugog stepena srodstva, pa je procenjena verovatnoća niža od realne i odgovara onoj za manji broj obolelih srodnika.

Analizirana je i razlika između porodica sa obolelima samo od karcinoma jajnika u odnosu na porodice sa obolielima i od karcinoma jajnika i od karcinoma dojke. U našoj grupi nije nađena statistički značajana razlika u zastupljenosti onih porodica sa BRCAPRO verovatnoćom iznad 10%, 25,40% i 40% (Tabela 18). Ovo ukazuje na činjenicu da tip karcinoma ne utiče mnogo na ukupnu BRCAPRO procenu verovatnoće (mada može da utiče na procene za svaki od gena pojedinačno), već da na procenu verovatnoće veći uticaj ima broj obolelih srodnika u porodici.

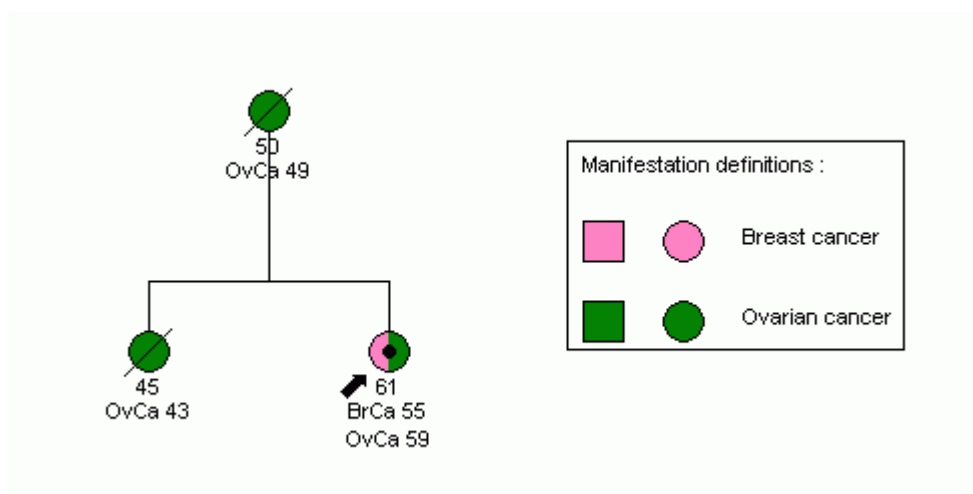
Analiza povezanosti broja obolelih srodnika i vrednosti BRCAPRO verovatnoće pokazuje da se već od 2 obolela srodnika pa naviše uspostavlja korelacija sa vrednošću BRCAPRO verovatnoće. Ovaj rezultat treba posmatrati naročito u svetlu činjenice da širu porodicu nije moguće analizirati kroz BRCAPRO program, što znači da pri proceni kandidata za testiranje treba nalaz BRCAPRO verovatnoće kombinovati sa analizom rodoslova u koji su uneti i podaci za srodnike iz šire porodice. U odnosu na anatomske lokalizacije tumora, dobijeni rezultati ukazuju na bolju povezanost između vrednosti BRCAPRO verovatnoće i karcinoma dojke u odnosu na karcinom jajnika.

ANALOGIJA SA HISTOLOGIJOM

Mutacije u genu BRCA1

Delecija 20 bp u egzonu 15 gena BRCA1, **4765del20**, nađena je kod jedne osobe u porodici SRB010 (Slika 22). Nažalost, drugi oboleli članovi ove porodice, njena majka i sestra, su preminule, pa nije bilo moguće utvrditi da li su i one bile nosioci ove mutacije. Može se pretpostaviti da su obe bile nosioci ove mutacije, s obzirom da su obe bile obolele od karcinoma jajnika. Takođe, osoba kod koje je nađena ova nova mutacija u genu BRCA1 nema potomke, a drugi rođaci nisu bili dostupni za testiranje, pa je testiranje u ovoj porodici završeno testiranjem samo ovog jednog njenog člana.

Osoba kod koje je detektovana mutacija 4765del20u genu BRCA1 stara 61 godinu, obolela je od invazivnog karcinoma dojke u 55. godini života. Patološki nalaz pokazao je da je reč o duktalnom karcinomu, bez podataka o veličini tumora, histološkog gradusa (HG) II i jedarnog gradusa (NG) III, bez pozitivnih regionalnih limfnih čvorova (0/6), ER5+, PR7+ i HER2-. U 59. godini života ispitanica je obolela i od karcinoma jajnika seroznog tipa, stadijuma IIIa, HG II-III, NG III.

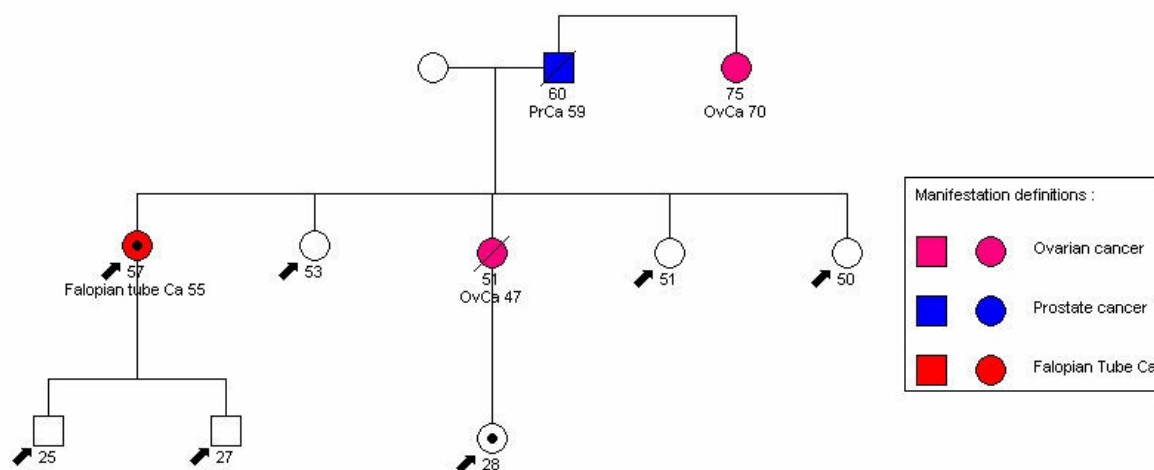


Slika 22. Prikaz obolelih i testiranih srodnika porodice SRB010.

Karcinomi dojke povezani sa mutacijama u genu BRCA1 najčešće su „trosrtno negativni“. Karakterišu se odsustvom estrogenog receptora (ER), kao i odsustvom progesteronskog receptora (PR), čija je sinteza kontrolisana estrogenom (Leavitt et al., 1977), kao i odsustvom ekspresije HER2 receptora. BRCA1 kontroliše sintezu ER- α ,

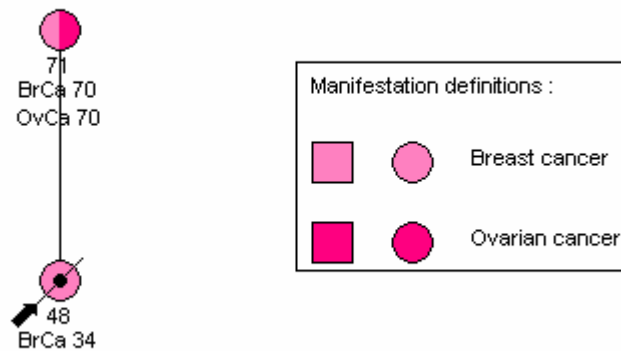
vezujući se za promotorski region gena za ovaj receptor, ESR1 (Hosey et al., 2007), pa kod karcinoma povezanih sa mutacijama u genu BRCA1, kod kojih je protein BRCA1 nefunkcionalan usled postojanja mutacije, najčešće nema ni ekspresije ER- α . Međutim, karcinom dojke povezan sa mutacijom u genu BRCA1 u porodici SRB010 je ER+ i PR+, što je na prvi pogled u suprotnosti sa gore navedenom činjenicom o negativnosti za hormonske receptore karcinoma dojke povezanih sa mutacijom u genu BRCA1. S druge strane, nedavno je nađeno da nosioci mutacija u genu BRCA1 kod kojih se dijagnostikuje prvi invazivni karcinomi dojke nakon 50. godine života češće imaju ER+ karcinome dojke u odnosu na mlađe obolele nosioce mutacija u genu BRCA1 (Tung et al., 2010). U ovu grupu bi spadao i ER+ karcinom dojke povezan sa mutacijom u genu BRCA1 nađen u porodici SRB010 kod osobe stare 55 godina. Osim toga, duktalni tip i visok gradus (HG II i NG III) ovog tumora u saglasnosti je sa literaturnim podacima o predominantnom duktalnom histološkom tipu i visokom gradusu karcinoma dojke povezanih sa mutacijom u genu BRCA1 (Sowter and Ashworth, 2005). Postoji mogućnost da ER+ karcinomi dojke povezani sa mutacijama u genu BRCA1 predstavljaju posebnu prelaznu histopatološku grupu između ER- karcinoma povezanih sa mutacijama u genu BRCA1 i ER+ sporadičnih karcinoma (Tung et al., 2010). Postoji i verovatnoća da su neki od ER+ karcinoma dojke kod nosioca mutacije u genu BRCA1 slučajni, tj. da nisu povezani sa gubitkom funkcije gena BRCA1 (Tung et al., 2010). Malo je verovatno da je ER+ karcinom dojke kod nosioca mutacije u genu BRCA1 iz porodice SRB010 slučajan, tj. da nije povezan sa mutacijom i gubitkom funkcije gena BRCA1, jer nosilac pripada grupi visoko rizičnih osoba sa jakim porodičnom istorijom: i njena majka i njena sestra su bile obolele od karcinoma jajnika, a i ona sama je obolela i od karcinoma dojke i od karcinoma jajnika (Slika 22). U 59. godini života ova osoba je obolela i od karcinoma jajnika seroznog tipa, stadijuma IIIa, HG II-III, NG III. Ovo je u skladu sa literaturnim podacima da su karcinomi jajnika povezani sa mutacijom u genu BRCA1 češće seroznog tipa i visokog gradusa u odnosu na sporadične (Sowter and Ashworth, 2005).

Mutacija **2138delA** u genu BRCA1 detektovana je u porodici SRB038 (Slika 23) u kojoj postoje slučajevi karcinoma jajnika, kao i slučaj karcinoma prostate i jajovoda. Ovo je u skladu sa literaturnim podacima koji ukazuju na to da su mutacije u genu BRCA1 često povezane sa pojavom karcinoma jajnika (Elit, 2001).



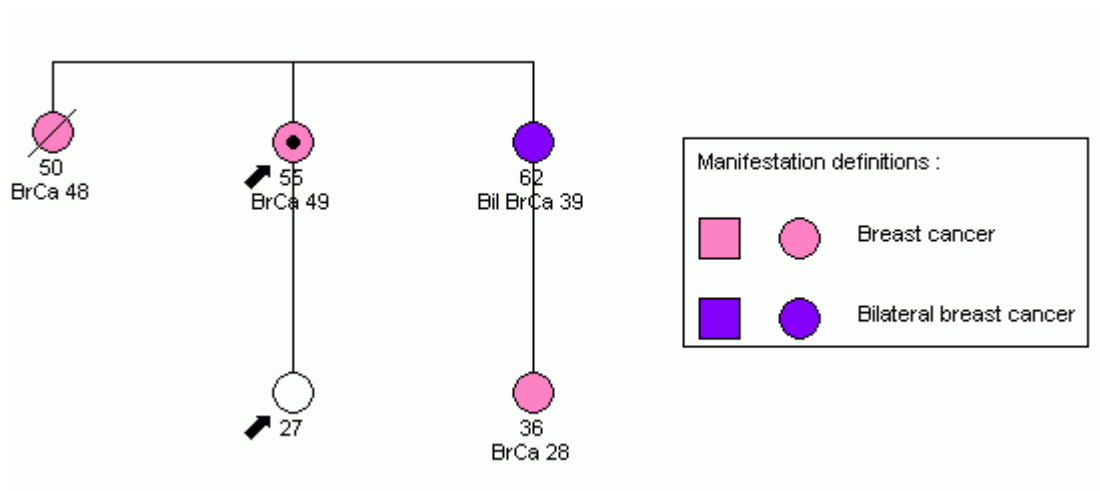
Slika 23. Prikaz obolelih i testiranih srodnika porodice SRB038.

Mutacija **969ins7** u genu BRCA1 nađena je kod osobe iz porodice SRB076 obolele od ranog karcinoma dojke, čija je majka razvila i karcinom dojke i karcinom jajnika (Slika 24). Ovo daje uobičajenu sliku pedigrea porodica sa porodičnom mutacijom u genu BRCA1, koje su česte kod osoba koje razviju i karcinom dojke i karcinom jajnika ili rani karcinom dojke. Ova osoba je razvila lobularni karcinom dojke, HG II, NGII, bez pozitivnih limfnih čvorova, ER+, PR+, HER2-. Ranija pojava karcinoma dojke u skladu je sa literaturnim podacima o povezanosti ranog oboljevanja sa mutacijama u genu BRCA1 (Loman et al., 2001). Pozitivnost tumora za hormonske receptore kod ove osobe nije u skladu sa uobičajenom povezanošću mutacija u genu BRCA1 sa trostruko negativnim karcinomima dojke opisanim u literaturi (pregledno u Sowter and Ashworth, 2005).



Slika 24. Prikaz obolelih i testiranih srodnika porodice SRB076.

Mutacija **5382insC** u genu **BRCA1** nađena je u porodici SRB042 (Slika 25), kod osobe obolele od karcinoma dojke, čije su dve sestre razvile karcinom dojke (od toga jedna bilateralni), kao i sestričina koja je razvila rani karcinom dojke.

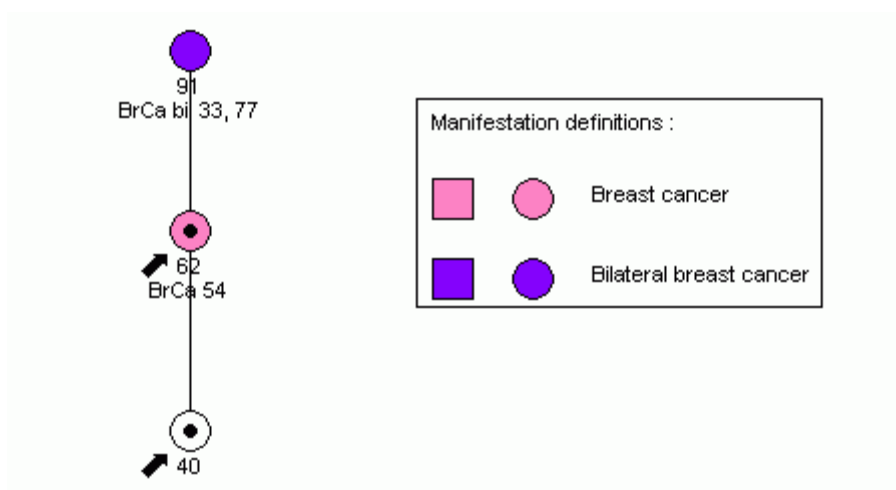


Slika 25. Prikaz obolelih i testiranih srodnika porodice SRB042.

Ovo je dobar primer porodice sa porodičnom mutacijom u genu **BRCA1** sa nakupljanjem samo karcinoma dojke (engl. *site specific breast cancer*).

Mutacije u genu BRCA2

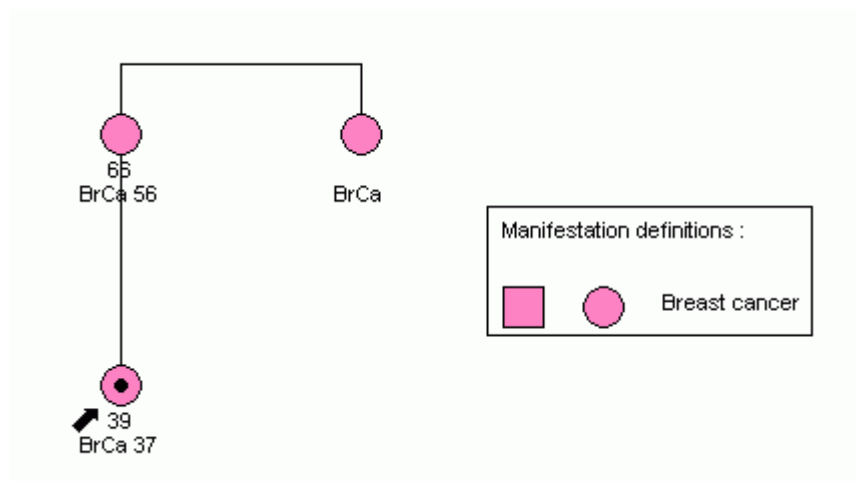
Insercija 2 bp u egzonu 11 gena BRCA2, **4366insTT**, nađena je u porodici SRB026 (Slika 26). Nosioци ove mutacije su dva člana ove porodice, majka i ćerka, dok uzorak najstarijeg člana ove porodice (babe po majci) nije bio dostupan za testiranje, ali se može pretpostaviti da je i ona nosilac ove mutacije s obzirom da je u toku života razvila bilateralni karcinom dojke, i to prvi pre 35. godine života. Prva testirana osoba, majka, stara 62 godine, obolela je od invazivnog dukalnog karcinoma dojke u 54. godini života. Tumor je imao sledeće karakteristike: veličina T1 (15 mm), GR11, HG II, ER3+, PR3+, sa pozitivnim regionalnim limfnim čvorovima (2/13). Njena ćerka, druga osoba testirana iz ove porodice, testirana je u 40. godini života i za sada nije obolela. Majka prve ispitanice, koja je stara 91 godinu, imala je bilateralni karcinom dojke, prvi u 33, drugi u 77. godini života.



Slika 26. Prikaz obolelih i testiranih srodnika porodice SRB026.

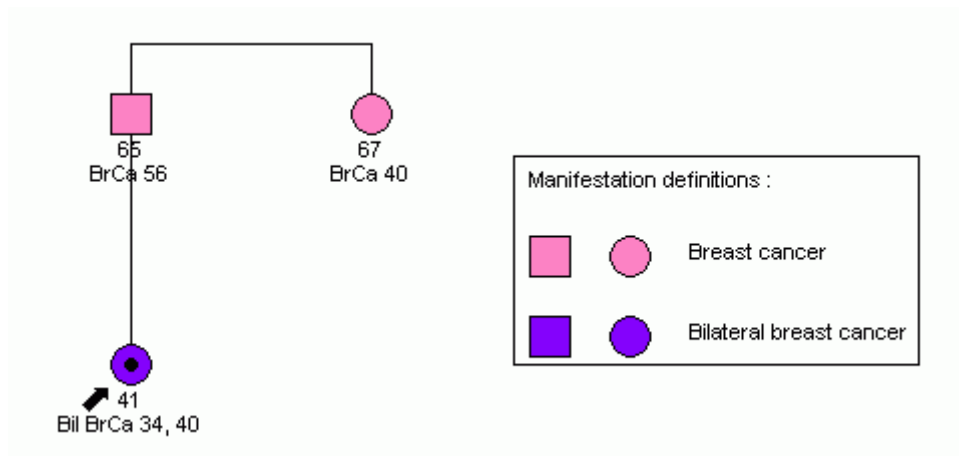
Patobiloške karakteristike karcinoma dojke nađene kod osobe iz porodice SRB026 su očekivane, s obzirom na uobičajenu sličnost karcinoma dojke povezanih sa mutacijom u genu BRCA2 sa sporadičnim, odnosno na pozitivnost na hormonske receptore (ER+ i PR+), kao i na viši gradus ovih tumora (Lakhani et al., 2002; Robson et al., 2004; Honrado et al., 2005).

Frameshift mutacija **7511delT** detektovana je u egzonu 14 gena BRCA2 u porodici SRB047, kod ženske osobe obolele od karcinoma dojke, čije su i majka i tetka obolele od istog karcinoma (Slika 27). Ona je razvila lobularni karcinom dojke, HG II, NG II, ER+, PR+ i HER2. Pozitivnost za hormonske receptore kao i viši gradus karcinoma karakteristični su za karcinome dojke povezane sa mutacijom u genu BRCA2 (Lakhani et al., 2002; Robson et al., 2004; Honrado et al., 2005).



Slika 27. Prikaz obolelih i testiranih srodnika porodice SRB047.

Mutacija **1991del4** u genu BRCA2 nađena kod osobe iz porodice SRB077, obolele od bilateralnog karcinoma dojke (prvi karcinom dojke je bio rani, u 34. godini života) (Slika 28). Na prvi pogled, ovaj nalaz je neočekivan, s obzirom da su i bilateralni i rani karcinom dojke obično vezani za mutacije u genu BRCA1 (Loman et al., 2001; Metcalfe et al., 2004). Međutim, kada se uzme u obzir da su i otac i očeva sestra testirane osobe bili oboleli od karcinoma dojke (Slika 28), prisustvo karcinoma dojke kod muškarca u ovoj porodici ukazuje na veću verovatnoću postojanja porodične mutacije u genu BRCA2 u ovoj porodici.



Slika 28. Prikaz obolelih i testiranih srodnika porodice SRB077.

Testirana osoba iz porodice SRB077 prvo je razvila lobularni karcinom dojke, ER+, PR+, sa pozitivnim limfnim čvorovima. Nakon toga, razvila je i duktalni karcinom dojke *in situ* na drugoj dojci, takođe ER+ i PR+, bez pozitivnih limfnih čvorova. Pozitivnost za hormonske receptore karakteristična je za karcinome dojke povezane sa mutacijom u genu BRCA2 (Lakhani et al., 2002; Robson et al., 2004; Honrado et al., 2005).

U Tabeli 20 dat je pregled osoba kod kojih je detektovana *frameshift* mutacija, od koje vrste karcinoma su oboleli u koliko godina, kao i koliko slučajeva karcinoma različitih vrsta je svako od njih imao u porodici.

Može se uočiti da je kod svih osoba koje su bile obolele od karcinoma jajnika ili su u porodici imale srodnika (1 ili više) obolelog od karcinoma jajnika nađena mutacija u genu BRCA1. Ovo je u skladu sa literaturnim podacima da su kod karcinoma jajnika češće mutacije u genu BRCA1 (Elit, 2001). Za osobe koje su bile obolele i od karcinoma dojke i od karcinoma jajnika, ili su imale srodnika koji je oboleo od oba ova tipa karcinoma, takođe je nađeno da su nosioci mutacije u genu BRCA1. Ovo je takođe u skladu sa literaturnim podacima da osobe koje su obolele od karcinoma dojke i koje nose mutaciju u genu BRCA1 ili BRCA2 imaju povećan rizik da obole i od karcinoma jajnika (Finch et al., 2006).

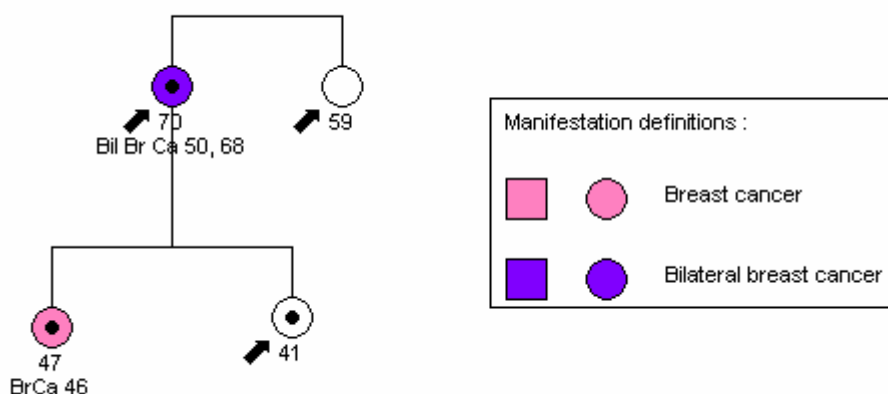
**Tabela 20. Pregled oboljenja i porodične istorije osoba kod kojih je nađena
frameshift mutacija.**

Gen	Frameshift mutacija	Vrsta karcinoma (starost)	Broj obolelih srodnika		Druge vrste karcinoma (broj srodnika)
			Karcinom dojke	Karcinom jajnika	
BRCA1	969ins7	Karcinom dojke (34) Karcinom jajnika (43)	1*	1*	
	2138delA	Karcinom jajovoda (55)			Karcinom prostate (1)
		Nije obolela		2	Karcinom jajovoda (1) Karcinom prostate (1)
	4765del20	Karcinom dojke (55) Karcinom jajnika (59)		2	
	5382insC	Karcinom dojke (49)	3 (1 bilateralni, 1 rani)	2	
BRCA2	1991del4	Karcinom dojke (34)	2 (1 kod muškarca)		
	4366insTT	Karcinom dojke (bilateralni) (54)	1		
		Nije obolela	2 (1 bilateralni)		
7511delT	Karcinom dojke (37)	1			

*Karcinom dojke i jajnika kod iste osobe

Iz Tabele 20 takođe se vidi da među nosiocima mutacije u genu BRCA2 nema obolelih od karcinoma jajnika, kao ni osoba koje su imale srodnika obolelog od ovog tipa karcinoma. Ovo je u skladu sa podacima u literaturi da su karcinomi jajnika češće povezani sa mutacijama u genu BRCA1 u odnosu na mutacije u genu BRCA2 (Elit, 2001). Takođe, među nosiocima mutacije u genu BRCA2 je i jedna osoba čiji je jedan muški srodnik bio oboleo od karcinoma dojke, što je u skladu sa češćom povezanošću karcinoma dojke kod muškaraca sa mutacijama u genu BRCA2 (The Breast Cancer Linkage Consortium, 1999).

Missense mutacija 3007A>G, **M927V**, u genu BRCA2 detektovana je kod 2 osobe iz porodice SRB082 (Slika 29). Ova mutacija nije opisana u literaturi, a analizom u PolyPhen programu dobijena je procena da je verovatno oštećujuća (*probably damaging*), pa je pretpostavljeno da može da doprinosi povećanom riziku za oboljevanje. Činjenica da su oba obolela člana ove porodice nosioci ove promene (Slika 29) pokazuje da je ova pretpostavka osnovana. Takođe, obe obolele osobe su obolele u kasnijoj životnoj dobi (posle 45. godine), što je u skladu sa povezanošću mutacija u genu BRCA2 sa kasnijim oboljevanjem u odnosu na nosioce mutacije u genu BRCA1 (Loman et al., 2001).



Slika 29. Prikaz obolelih i testiranih osoba iz porodice SRB082.

UČESTALOST MUTACIJA U RAZLIČITIM GRUPAMA TESTIRANIH OSOBA

Prema dosadašnjim literaturnim podacima, u porodicama sa nakupljanjem karcinoma dojke i/ili jajnika učestalost mutacija u genu BRCA1 iznosi 0,7-29%, a u genu BRCA2 1,5-25% (pregledno u Fackenthal and Olopade, 2007). Ukupno, mutacije u oba gena povezanih sa karcinomom dojke sa porodičnom istorijom čini oko 20% (pregledno u Fackenthal and Olopade, 2007). U našem uzorku ova učestalost iznosi 10,59%, što je u datim okvirima nađenim od strane drugih autora.

Literaturni podaci pokazuju da se među slučajevima **ranog karcinoma dojke**, nezavisno od porodične istorije, mutacije u genu BRCA1 nalaze sa učestalošću 0,7-10%, a mutacije u genu BRCA2 1-6% (pregledno u Fackenthal and Olopade, 2007). Među našim analiziranim osobama, od 19 ranih karcinoma dojke (uključujući i jednu osobu koja je osim ranog karcinoma dojke kasnije imala i kontralateralni karcinom dojke, kao i dve osobe koje su osim ranog karcinoma dojke kasnije razvile i karcinom jajnika, odnosno karcinom jajnika, debelog creva i pluća), mutacija je nađena kod dve osobe, što čini **10,53%** (2/19). Jedna od mutacija nađena je u genu BRCA1, 969ins7, što je u skladu sa literaturnim podacima koji ukazuju na povezanost mutacija u genu BRCA1 sa ranim oboljevanjem (Loman et al., 2001). Osim toga, ova mutacija je detektovana kod osobe obolele prvo od ranog karcinoma dojke, a potom i od karcinoma jajnika, što je takođe u skladu sa literaturnim podacima koji pokazuju da osobe, nosioci mutacije u genima BRCA1 ili BRCA2, obolele od karcinoma dojke imaju povećani rizik za oboljevanje i od karcinoma jajnika (Finch et al., 2006). Majka ove osobe obolela je takođe i od karcinoma dojke i od karcinoma jajnika (Slika 18). Druga mutacija detektovana je u genu BRCA2, 1991del4, kod osobe koja je obolela od ranog, a kasnije i od bilateralnog karcinoma dojke. Mutacije u genu BRCA2 inače nisu povezane sa ranim i bilateralnim karcinomom dojke (češće su to mutacije u genu BRCA1), ali ovaj rezultat postaje razumljiv kada se uzme u obzir da ova osoba u porodici ima slučaj muške osobe obolele od karcinoma dojke. Kod osoba koje su obolele samo od ranog karcinoma dojke (n=16) nije nađena nijedna mutacija ni u genu BRCA1 niti u genu BRCA2.

Kod 8 testiranih osoba koje su obolele od **bilateralnog karcinoma dojke** (uključujući i 1 osobu koja razvila i karcinom pluća i 2 osobe koje su razvile i karcinom debelog creva, kao i osobu koja je razvila rani i bilateralni karcinom dojke), nađena je jedna mutacija u genu BRCA2. Ovo je u suprotnosti sa literaturnim podacima koji pokazuju da su mutacije u genu BRCA1 češće kod osoba obolelih od bilateralnog karcinoma dojke (Metcalf et al., 2004). Jedina mutacija nađena u genu BRCA2 u ovoj grupi testiranih osoba, 1991del4, je nađena kod osobe koja je obolela prvo od ranog karcinoma dojke a zatim je kasnije razvila karcinom dojke i na drugoj dojci. Nalaz mutacije u genu BRCA2 je u suprotnosti sa pojavom ranog i bilateralnog karcinoma dojke, ali kada se uzme u obzir da je otac ove osobe oboleo od karcinoma dojke, nalaz mutacije u genu BRCA2 postaje jasan. Učestalost mutacije u ovoj grupi testiranih osoba obolelih od bilateralnog karcinoma dojke iznosi **12,50%** (1/8).

Učestalost mutacija u genu BRCA2 među **karcinomima dojke kod muškaraca**, nezavisno od porodične istorije i starosti u trenutku oboljevanja, iznosi 7-14% (pregledno u Fackenthal and Olopade, 2007). Naša analiza kod 4 testirana muškaraca obolela od karcinoma dojke nije pokazala prisustvo nijedne mutacije. Ovo je u suprotnosti sa literaturnim podacima koji pokazuju povezanost mutacija u genu BRCA2 i pojavu karcinoma dojke kod muškaraca (The Breast Cancer Linkage Consortium, 1999; Tai et al., 2007). Među osobama koje su u porodici imale muškog srodnika obolelog od karcinoma dojke (4 osobe), a i same su obolele od karcinoma dojke (od toga 1 od ranog karcinoma dojke i jedna od ranog i bilateralnog karcinoma dojke), detektovana je jedna mutacija u genu BRCA2 (1991del4). Ukupno, uzimajući u obzir sve osobe iz porodica sa slučajem karcinoma dojke kod muškaraca (8 osoba iz 7 porodica), nađena je jedna mutacija u genu BRCA2 i učestalost iznosi **12,50%** (1/8), što je u okviru datih literaturnih podataka.

U sistematskim uzorcima **karcinoma jajnika**, prema literaturi, učestalost mutacija u genu BRCA1 je veća i iznosi 4-29%, dok je učestalost mutacija u genu BRCA2 0,6-15,6% (pregledno u Fackenthal and Olopade, 2007). Među našim ispitanicima, kod 3 testirane osobe koje su obolele samo od karcinoma jajnika, od kojih je samo jedna imala porodičnu istoriju za karcinom dojke, nije nađena nijedna mutacija. Kod 5 testiranih osoba obolelih i od karcinoma dojke i od karcinoma jajnika (od toga

jedna od ranog karcinoma dojke, karcinoma jajnika, karcinoma debelog creva i karcinoma pluća), nađene su 2 mutacije u genu BRCA1 (**40%**; 2/5). Ovo je u skladu sa literaturnim podacima koji ukazuju na povećani rizik nosioca mutacije u genu BRCA1 ili BRCA2 da nakon oboljevanja od karcinoma dojke obole i od karcinoma jajnika (Finch et al., 2006). Osim toga, mutacije u genu BRCA1 povećavaju rizik za oboljevanje od karcinoma jajovoda, što je i potvrđeno nalazom da je jedna testirana osoba, obolela od karcinoma jajovoda, nosilac mutacije u genu BRCA1 (2138delA). Osoba koja je imala rani karcinom dojke, karcinom jajnika, karcinom debelog creva i karcinom pluća nije nosilac mutacija, mada klinička slika ukazuje na visoku verovatnoću postojanja mutacije u genima BRCA kod ove osobe.

UČESTALOST MUTACIJA U SISTEMATSKIM UZORCIMA

Učestalost mutacija u genima BRCA kod pacijenata sa karcinomom dojke ili jajnika nezavisno od porodične istorije, starosti u vreme dijagnoze ili drugih pokazatelja visokog rizika, iznose 0-7% za mutacije u genu BRCA1 i 1-3% za mutacije u genu BRCA2, dok je učestalost za oba gena 1,8-4,7% (pregledno u Fackenthal and Olopade, 2007).

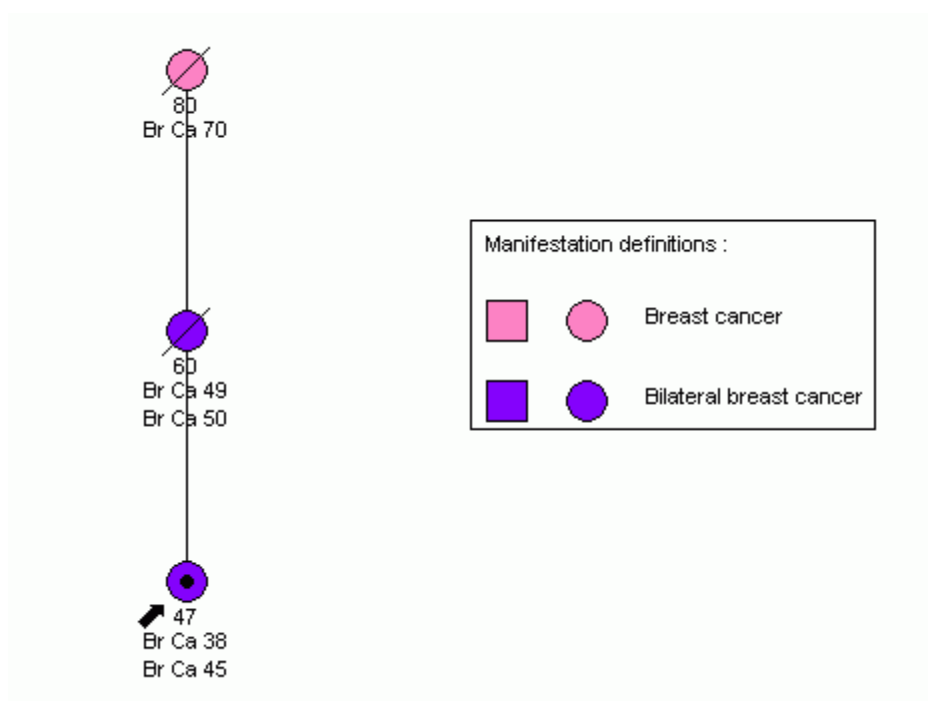
Učestalost mutacije 5382insC u genu BRCA1 u sistematskim uzorcima karcinoma dojke u različitim zemljama iznosi: u Rusiji 3,7% (Sokolenko et al., 2006), u Poljskoj 1,9-2,1% (Gorski et al., 2005; Brozek et al., 2011), u Grčkoj 1,3% (Armaou et al., 2009), u Nemačkoj 1% (Backe et al., 1999).

Učestalost 5382insC mutacije u genu BRCA1 u našem sistematskom uzorku karcinoma dojke od **0,39%** (1/257) ne uklapa se u pretpostavljenu sliku raspodele ove mutacije u Evropi, po kojoj njena učestalost opada od istoka ka zapadu Evrope. Takođe, ovaj rezultat nije ni u skladu sa višom učestalošću ove mutacije u narodima slovenskog porekla (Gorski et al., 2005; Sokolenko et al., 2006; Janavičius, 2010). Niska učestalost ove mutacije u sistematskom uzorku karcinoma dojke u našoj zemlji, međutim, može biti odraz čestih migracija i mešanja naroda na ovim prostorima.

Jedina osoba iz sistematskog uzorka karcinoma dojke kod koje je nađena mutacija u genu BRCA1 pripada visoko rizičnoj grupi, s obzirom da je ona obolela od bilateralnog karcinoma dojke, kao i njena majka, dok je i baba po majci bila obolela od

karcinoma dojke (Slika 30). Ona je u 38. godini života razvila karcinom u desnoj dojci, lobularnog tipa, T1, GRII, ER+, PR-, sa negativnim regionalnim limfnim čvorovima. Nakon toga, u 45. godini života razvila je tumor u levoj dojci, duktalnog tipa, T1, GRII, ER+, PR+, sa negativnim regionalnim limfnim čvorovima.

Prisustvo mutacije u genu BRCA1 kod ove osobe u skladu je sa literaturnim podacima koji govore o visokoj povezanosti ovih mutacija sa bilateralnim karcinomima dojke (Sokolenko et al., 2006). Može se pretpostaviti da je i njena majka nosilac iste mutacije s obzirom da je i ona razvila bilateralni karcinom dojke. Osim toga, prisustvo mutacije u ovoj porodici u skladu je i sa sve ranijim oboljevanjem u svakoj narednoj generaciji, kao što je slučaj u ovoj porodici.



Slika 30. Prikaz obolelih srodnika osobe iz sistematskog uzorka karcinoma dojke kod koje je nađena mutacija 5382insC u genu BRCA1.

S obzirom da tri nove mutacije (4765del20 u genu BRCA1 i 4366insTT i 7511delT u genu BRCA2) nisu pronađene ni kod jedne druge testirane osobe, pretpostavlja se da ove mutacije porodično-specifične a ne populaciono-specifične. Takođe, nijedna druga oštećujuća mutacija nije nađena u 3 i više nezavisnih porodica (osim 5382insC), što bi ukazivalo da su potencijalno osnivačke mutacije karakteristične

za našu populaciju. Daljim analizama, testiranjem većeg broja osoba, moguće je da će se neka od ovih mutacija pokazati kao populaciono-specifična i česta kod osoba iz porodica sa naslednim karcinomom dojke i/ili jajnika.

Određivanjem spektra mutacija u genima BRCA za svaku populaciju doprinosi se kompletiranju slike distribucije ovih mutacija u Evropi. Osim toga, omogućava se i brže i ekonomičnije testiranje osoba pod rizikom ciljanim testiranjem na mutacije karakterističnim za populaciju iz koje osoba koja se testira vodi poreklo.

Analiza osoba sa pozitivnom porodičnom istorijom, kao i analiza sistematskog uzorka karcinoma dojke na prisustvo 5382insC mutacije u genu BRCA1 nije pokazala postojanje neke česte (osnivačke) mutacije u grupi obolelih i/ili visokorizičnih osoba iz naše populacije. Detektovane su nove mutacije, najverovatnije karakteristične samo za porodicu u kojima su i nađene, kao i mutacije ranije nađene u nekoliko različitih porodica iz različitih populacija.

SAVETOVANJE NAKON DOBIJANJA REZULTATA GENETIČKOG TESTIRANJA

Oštećujućim mutacijama smatraju se pre svega *frameshift*, *nonsense*, kao i neke *missense* mutacije, kao mutacije sa sigurnim oštećujućim efektom na funkciju proteina BRCA i kliničkim značajem u smislu povećanja rizika za oboljevanje. I neke *missense* mutacije nepoznatog kliničkog značaja tretiraju se pri savetovanju kao oštećujuće, pogotovo ako neki od programa za procenu efekta zamene amino kiselina ukazuje na njihov oštećujući efekat, kao što PolyPhen program za neke promene daje ocenu da su *possibly* ili *probably damaging*.

Osobama za koje se utvrdi da su nosioci neke od ovih oštećujućih promena, prilikom savetovanja nakon dobijanja rezultata testiranja predočavaju se činjenice o povećanim rizicima za oboljevanje, kao i mere koje je moguće preduzeti. Osim mera za smanjenje rizika za oboljevanje (preventivnih hirurških zahvata), postoji i opcija češćeg kliničkog praćenja, koja nije mera za smanjenje rizika sama po sebi, ali omogućava da

se, ukoliko dođe do oboljevanja, karcinom detektuje u ranoj fazi, kada je izlječenje jednostavnije, brže i verovatnije.

Iako im je, kao jedna od opcija za smanjenje rizika predložena bilateralna salpingo-ooforektomija (uklanjanje jajnika sa jajovodima), kao i bilateralna mastektomija, nijedan od naših ispitanika koji su nosioci oštećujućih mutacija nije se opredelio za ovaj hirurški zahvat, verovatno i zbog toga što postojanje mutacija u genima BRCA ne podrazumeva da će osoba sigurno i oboleti.

ZAKLJUČCI

Najvažniji dobijeni rezultati su:

- Pronađeno je 7 oštećujućih mutacija kod 9 ispitanika: 4 u genu BRCA1 (5/9 ispitanika) i 3 u genu BRCA2 (4/9 ispitanika).
- Učestalost oštećujućih mutacija u genima BRCA1 i BRCA2 iznosi 10,59% (9/85).
- Pored već poznatih oštećujućih mutacija detektovane su i 3 nove mutacije (1 u genu BRCA1 i 2 u genu BRCA2) koje do sada nisu bile opisane u literaturi.
- Učestalost mutacije 5382insC u genu BRCA1 u sistematskom uzorku karcinoma dojke je 0,39% (1/257).
- Podizanjem granice BRCAPRO verovatnoće na 40% moguće je uočiti razliku između benignih polimorfizama i oštećujućih mutacija.
- Nije moguće subgrupisanje neklasifikovanih varijanti na osnovu vrednosti BRCAPRO verovatnoće.
- BRCAPRO verovatnoća, sem sa srodnicima prvog i drugog stepena srodstva, koreliše i sa brojem obolelih srodnika u široj porodici.
- U odnosu na anatomsku lokalizaciju, BRCAPRO verovatnoća koreliše sa brojem srodnika obolelim od karcinoma dojke, ali ne i od karcinoma jajnika.

Na osnovu najvažnijih dobijenih rezultata izvedeni su sledeći zaključci:

- Učestalost mutacija u genima BRCA1/2 kod ispitanika pod rizikom za nastanak naslednog karcinoma dojke i/ili jajnika u Srbiji slična je učestalostima dobijenim u drugim populacijama.
- Osim već poznatih tipova mutacija u genima BRCA1/2 pokazane su i nove porodično-specifične mutacije.
- Nisu detektovane mutacije koje bi se mogle okarakterisati kao osnivačke mutacije za našu populaciju.
- BRCAPRO program pokazao se kao koristan pri odabiru osoba za BRCA testiranje, ali pri odabiru kandidata za testiranje treba analizirati i rodoslov
- Podizanje granice BRCAPRO verovatnoće sa 10% na 40% moglo bi da poveća efikasnost BRCA testiranja.

LITERATURA

- Abeliovich D, Kaduri L, Lerer I, Weinberg N, Amir G, Sagi M, Zlotogora J, Heching N, Peretz T. The founder mutations 185delAG and 5382insC in BRCA1 and 6174delT in BRCA2 appear in 60% of ovarian cancer and 30% of early-onset breast cancer patients among Ashkenazi women. *Am J Hum Genet* 1997, 60:505-514.
- Abkevich V, Zharkikh A, Deffenbaugh AM, Frank D, Chen Y, Shattuck D, Skolnick MH, Gutin A, Tavtigian SV. Analysis of missense variation in human BRCA1 in the context of interspecific sequence variation. *J Med Genet* 2004, 41:492-507.
- Agata S, Viel A, Della Puppa L, Cortesi L, Fersini G, Callegaro M, Dalla Palma M, Dolcetti R, Federico M, Venuta S, Miolo G, D'Andrea E, Montagna M. Prevalence of BRCA1 genomic rearrangements in a large cohort of Italian breast and breast/ovarian cancer families without detectable BRCA1 and BRCA2 point mutations. *Genes Chromosomes Cancer* 2006, 45:791-797.
- Alani E, Lee S, Kane MF, Griffith J, Kolodner RD. *Saccharomyces cerevisiae* MSH2, a mismatch repair protein, also recognizes Holliday junctions in DNA. *J Mol Biol* 1997, 265:289-301.
- Anderson WF, Jatoi I, Tse J, Rosenberg PS. Male breast cancer: a population-based comparison with female breast cancer. *J Clin Oncol* 2010, 28:232-239.
- Anglian Breast Cancer Study Group. Prevalence and penetrance of BRCA1 and BRCA2 mutations in a population-based series of breast cancer cases. *Br J Cancer* 2000, 83:1301-1308.
- Antoniou A, Pharoah PD, Narod S, Risch HA, Eyfjord JE, Hopper JL, Loman N, Olsson H, Johannsson O, Borg A, Pasini B, Radice P, Manoukian S, Eccles DM, Tang N, Olah E, Anton-Culver H, Warner E, Lubinski J, Gronwald J, Gorski B, Tulinius H, Thorlacius S, Eerola H, Nevanlinna H, Syrjäkoski K, Kallioniemi OP, Thompson D, Evans C, Peto J, Lalloo F, Evans DG, Easton DF. Average risks of breast and ovarian cancer associated with BRCA1 or BRCA2 mutations detected in case series unselected for family history: a combined analysis of 22 studies. *Am J Hum Genet* 2003, 72:1117-1130.
- Armaou S, Pertesi M, Fostira F, Thodi G, Athanasopoulos PS, Kamakari S, Athanasiou A, Gogas H, Yannoukakos D, Fountzilas G, Konstantopoulou I.

Contribution of BRCA1 germ-line mutations to breast cancer in Greece: a hospital-based study of 987 unselected breast cancer cases. *Br J Cancer* 2009, 101:32-37.

- Arnold N, Peper H, Bandick K, Kreikemeier M, Karow D, Teegen B, Jonat W. Establishing a control population to screen for the occurrence of nineteen unclassified variants in the BRCA1 gene by denaturing high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2002, 782:99-104.
- Atchley DP, Albarracin CT, Lopez A, Valero V, Amos CI, Gonzalez-Angulo AM, Hortobagyi GN, Arun BK. Clinical and pathologic characteristics of patients with BRCA-positive and BRCA-negative breast cancer. *J Clin Oncol* 2008, 26:4282-8.
- Auranen A, Spurdle AB, Chen X, Lipscombe J, Purdie DM, Hopper JL, Green A, Healey CS, Redman K, Dunning AM, Pharoah PD, Easton DF, Ponder BA, Chenevix-Trench G, Novik KL. BRCA2 Arg372His polymorphism and epithelial ovarian cancer risk. *Int J Cancer* 2003, 103:427-430.
- Auvinen A, Curtis RE, Ron E. Risk of subsequent cancer following breast cancer in men. *J Natl Cancer Inst* 2002, 94:1330-1332.
- Backe J, Hofferbert S, Skawran B, Dörk T, Stuhmann M, Karstens JH, Untch M, Meindl A, Burgemeister R, Chang-Claude J, Weber BH. Frequency of BRCA1 mutation 5382insC in German breast cancer patients. *Gynecol Oncol* 1999, 72:402-6.
- Basham VM, Lipscombe JM, Ward JM, Gayther SA, Ponder BAJ, Easton DF, Pharoah PDP. BRCA1 and BRCA2 mutations in a population-based study of male breast cancer. *Breast Cancer Res* 2002, 4:R2.
- Bennett RJ, Keck JL, Wang JC. Binding specificity determines polarity of DNA unwinding by the Sgs1 protein of *S. cerevisiae*. *J Mol Biol* 1999, 289:235-248.
- Bergfeldt K, Rydh B, Granath F, Gronberg H, Thalib L, Adami HO, Hall P. Risk of ovarian cancer in breast-cancer patients with a family history of breast or ovarian cancer: a population-based cohort study. *Lancet* 2002, 360:891-894.
- Berliner JL, Fay AM. Risk assessment and genetic counseling for hereditary breast and ovarian cancer: recommendations of the National Society of Genetic Counselors. *J Genet Couns* 2007, 16:241-260.
- Bloom KJ, Govil H, Gattuso P, Reddy V, Francescatti D. Status of HER-2 in male and female breast carcinoma. *Am J Surg* 2001, 182:389-392.

- Bochar DA, Wang L, Beniya H, Kinev A, Xue Y, Lane WS, Wang W, Kashanchi F, Shiekhattar R. BRCA1 is associated with a human SWI/SNF-related complex: linking chromatin remodeling to breast cancer. *Cell* 2000, 102:257-265.
- Boulton SJ, Jackson SP. Identification of a *Saccharomyces cerevisiae* Ku80 homologue: roles in DNA double strand break rejoining and in telomeric maintenance. *Nucleic Acids Res* 1996, 24:4639-4648.
- Brose MS, Rebbeck TR, Calzone KA, Stopfer JE, Nathanson KL, Weber BL. Cancer risk estimates for BRCA1 mutation carriers identified in a risk evaluation program. *J Nat Cancer Inst* 2002, 94:1365-1372.
- Brown AL, Lee CH, Schwarz JK, Mitiku N, Piwnicka-Worms H, Chung JH. A human Cds1-related kinase that functions downstream of ATM protein in the cellular response to DNA damage. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999, 96:3745-3750.
- Brozek I, Cybulska C, Ratajska M, Piatkowska M, Kluska A, Balabas A, Dabrowska M, Nowakowska D, Niwinska A, Pamula-Pilat J, Tecza K, Pekala W, Rembowska J, Nowicka K, Mosor M, Januszkiewicz-Lewandowska D, Rachtan J, Grzybowska E, Nowak J, Steffen J, Limon J. Prevalence of the most frequent BRCA1 mutations in Polish population. *J Appl Genet* 2011, 52:325-330.
- Brzovic PS, Rajagopal P, Hoyt DW, King MC, Klevit RE. Structure of a BRCA1-BARD1 heterodimeric RING-RING complex. *Nat Struct Biol* 2001, 8:833-837.
- Burma S, Chen BP, Murphy M, Kurimasa A, Chen DJ. ATM phosphorylates histone H2AX in response to DNA double-strand breaks. *J Biol Chem* 2001, 276:42462-42467.
- Cahill DP, Lengauer C, Yu J, Riggins GJ, Willson JK, Markowitz SD, Kinzler KW, Vogelstein B. Mutations of mitotic checkpoint genes in human cancers. *Nature* 1998, 392:300-303.
- Cantor SB, Bell DW, Ganesan S, Kass EM, Drapkin R, Grossman S, Wahrer DC, Sgroi DC, Lane WS, Haber DA, Livingston DM. BACH1, a novel helicase-like protein, interacts directly with BRCA1 and contributes to its DNA repair function. *Cell* 2001, 105:149-160.
- Carmichael A, Sami AS, Dixon JM. Breast cancer risk among the survivors of atomic bomb and patients exposed to therapeutic ionising radiation. *Eur J Surg Oncol* 2003, 29:475-479.

- Celeste A, Fernandez-Capetillo O, Kruhlak MJ, Pilch DR, Staudt DW, Lee A, Bonner RF, Bonner WM, Nussenzweig A. Histone H2AX phosphorylation is dispensable for the initial recognition of DNA breaks. *Nature Cell Biol* 2003, 5:675-679.
- Chai YL, Cui J, Shao N, Shyam E, Reddy P, Rao VN. The second BRCT domain of BRCA1 proteins interacts with p53 and stimulates transcription from the p21^{WAF1/CIP1} promoter. *Oncogene* 1999, 18:263-268.
- Chan GKT, Schaar BT, Yen TJ. Characterization of the Kinetochores Binding Domain of CENP-E Reveals Interactions with the Kinetochores Proteins CENP-F and hBUBR1. *J Cell Biol* 1998, 143:49-63.
- Chen CF, Chen PL, Zhong Q, Sharp ZD, Lee WH. Expression of BRC repeats in breast cancer cells disrupts the BRCA2eRad51 complex and leads to radiation hypersensitivity and loss of G2/M checkpoint control. *J Biol Chem* 1999, 274:32931-32935.
- Chen CF, Li S, Chen Y, Chen PL, Sharp ZD, Lee WH. The Nuclear Localization Sequences of the BRCA1 Protein Interact with the Importin- α Subunit of the Nuclear Transport Signal Receptor. *J Biol Chem* 1996a, 271:32863-32868.
- Chen J. Ataxia Telangiectasia-related Protein Is Involved in the Phosphorylation of BRCA1 following Deoxyribonucleic Acid Damage. *Cancer Res* 2000, 60:5037-5039.
- Chen L, Nievera CJ, Lee AY, Wu X. Cell cycle-dependent complex formation of BRCA1•CtIP•MRN is important for DNA double-strand break repair. *J Biol Chem* 2008, 283:7713-7720.
- Chen S, Iversen ES Jr, Friebel T, Finkelstein D, Weber BL, Eisen A, Peterson LE, Schildkraut JM, Isaacs C, Peshkin BN, Corio C, Leondaridis L, Tomlinson G, Dutson D, Kerber R, Amos CI, Strong LC, Berry DA, Euhus DM, Parmigiani G. Characterization of BRCA1 and BRCA2 mutations in a large US sample. *J Clin Oncol* 2006, 24:863-871.
- Chen S, Parmigiani G. Meta-analysis of BRCA1 and BRCA2 penetrance. *J Clin Oncol* 2007, 25:1329-1333.
- Chen Y, Farmer AA, Chen CF, Jones DC, Chen PL, Lee WH. BRCA1 Is a 220-kDa Nuclear Phosphoprotein That Is Expressed and Phosphorylated in a Cell Cycle-dependent Manner. *Cancer Res* 1996, 56:3168-3172.

- Chiba N, Parvin JD. The BRCA1 and BARD1 Association with the RNA Polymerase II Holoenzyme. *Cancer Res* 2002, 62:4222-4228.
- Claes K, Poppe B, Machackova E, Coene I, Foretova L, De Paepe A, Messiaen L. Differentiating pathogenic mutations from polymorphic alterations in the splice sites of BRCA1 and BRCA2. *Genes Chromosomes Cancer* 2003, 37:314-320.
- Claus EB, Schildkraut JM, Thompson WD, Risch NJ. The genetic attributable risk of breast and ovarian cancer. *Cancer* 1996, 77:2318-2324.
- Contractor KB, Kaur K, Rodrigues GS, Kulkarni DM, Singhal H. Male breast cancer: is the scenario changing. *World J Surg Oncol* 2008, 6:58.
- Cortez D, Wang Y, Qin J, Elledge SJ. Requirement of ATM-dependent phosphorylation of Brca1 in the DNA damage response to double-strand breaks. *Science* 1999, 286:1162-1166.
- Couch FJ, Farid LM, Deshano ML, Tavtigian SV, Calzone K, Campeau L, Peng Y, Bogden B, Chen Q, Neuhausen S, Shattuck Eidens D, Godwin A, Daly M, Radford DM, Sedlacek S, Rommens J, Simard J, Garber J, Merajver S, Weber BL. BRCA2 germline mutations in male breast cancer cases and breast cancer families. *Nat Genet* 1996, 13:123-125.
- Critchlow SE, Bowater RP, Jackson SP. Mammalian DNA double-strand break repair protein XRCC4 interacts with DNA ligase IV. *Curr Biol* 1997, 7:588-598.
- Daly MB, Axilbund JE, Buys S, Crawford B, Farrell CD, Friedman S, Garber JE, Goorha S, Gruber SB, Hampel H, Kaklamani V, Kohlmann W, Kurian A, Litton J, Marcom PK, Nussbaum R, Offit K, Pal T, Pasche B, Pilarski R, Reiser G, Shannon KM, Smith JR, Swisher E, Weitzel JN; National Comprehensive Cancer Network. Genetic/Familial High-Risk Assessment: Breast and Ovarian. *Clinical Practice Guidelines in Oncology. J Natl Compr Canc Netw* 2010, 8:562-594.
- Daniels MJ, Wang Y, Lee M, Venkitaraman AR. Abnormal cytokinesis in cells deficient in the breast cancer susceptibility protein BRCA2. *Science* 2004, 306:876-879.
- Davies AA, Masson JY, McIlwraith MJ, Stasiak AZ, Stasiak A, Venkitaraman AR, West SC. Role of BRCA2 in control of the RAD51 recombination and DNA repair protein. *Mol Cell* 2001, 7:273-282.

- de Jager M, Dronkert ML, Modesti M, Beerens CE, Kanaar R, van Gent DC. DNA-binding and strand-annealing activities of human Mre11: implications for its roles in DNA double-strand break repair pathways. *Nucleic Acids Res* 2001, 29:1317-1325.
- Dobričić J, Branković-Magić M, Filipović S, Radulović S. Novel BRCA1/2 mutations in Serbian breast and breast-ovarian cancer patients with hereditary predisposition. *Cancer Genet Cytogenet* 2010, 202:27-32.
- Dong Y, Hakimi MA, Chen X, Kumaraswamy E, Cooch NS, Godwin AK, Shiekhattar R. Regulation of BRCC, a holoenzyme complex containing BRCA1 and BRCA2, by a signalosome-like subunit and its role in DNA repair. *Mol Cell* 2003, 12:1087-1099.
- Dunning AM, Chiano M, Smith NR, Dearden J, Gore M, Oakes S, Wilson C, Stratton M, Peto J, Easton D, Clayton D, Ponder BA. Common BRCA1 variants and susceptibility to breast and ovarian cancer in the general population. *Hum Mol Genet* 1997, 6:285-289.
- Easton DF. Familial risks of breast cancer. *Breast Cancer Res* 2002, 4:179-181.
- Elliott B, Richardson C, Jasin M. Chromosomal translocation mechanisms at intronic alu elements in mammalian cells. *Mol Cell* 2005, 17:885-894.
- Elit L. Familial ovarian cancer. *Can Fam Physician* 2001, 47:778-784.
- Fabbro M, Savage K, Hobson K, Deans AJ, Powell SN, McArthur GA, Khanna KK. BRCA1-BARD1 Complexes Are Required for p53^{Ser-15} Phosphorylation and a G₁/S Arrest following Ionizing Radiation-induced DNA Damage. *J Biol Chem* 2004, 279:31251-31258.
- Fackenthal JD, Olopade OI. Breast cancer risk associated with BRCA1 and BRCA2 in diverse populations. *Nat Rev Cancer* 2007, 7:937-948.
- Fan S, Wang J, Yuan R, Ma Y, Meng Q, Erdos MR, Pestell RG, Yuan F, Auborn KJ, Goldberg ID, Rosen EM. BRCA1 inhibition of estrogen receptor signaling in transfected cells. *Science* 1999, 284:1354-1356.
- Fan S, Ma YX, Wang C, Yuan RQ, Meng Q, Wang JA et al. Role of direct interaction in BRCA1 inhibition of estrogen receptor activity. *Oncogene* 2001, 20:77-87.
- Ferla R, Calo V, Cascio S, Rinaldi G, Badalamenti G, Carreca I, et al. Founder mutations in BRCA1 and BRCA2 genes. *Ann Oncol* 2007, 18(Suppl 6):vi93-98.

- Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer* 2010, 127:2893-2917.
- Finch A, Beiner M, Lubinski J, Lynch HT, Moller P, Rosen B, Murphy J, Ghadirian P, Friedman E, Foulkes WD, Kim-Sing C, Wagner T, Tung N, Couch F, Stoppa-Lyonnet D, Ainsworth P, Daly M, Pasini B, Gershoni-Baruch R, Eng C, Olopade OI, McLennan J, Karlan B, Weitzel J, Sun P, Narod SA. Hereditary Ovarian Cancer Clinical Study Group. Salpingo-oophorectomy and the risk of ovarian, fallopian tube, and peritoneal cancers in women with a BRCA1 or BRCA2 Mutation. *JAMA* 2006, 296:185-192.
- Fleming MA, Potter JD, Ramirez CJ, Ostrander GK, Ostrander EA. Understanding missense mutations in the BRCA1 gene: an evolutionary approach. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003, 100:1151-1156.
- Foray N, Marot D, Gabriel A, Randrianarison V, Carr AM, Perricaudet M, Ashworth A, Jeggo P. A subset of ATM- and ATR-dependent phosphorylation events requires the BRCA1 protein. *EMBO* 2003, 22:2860-2871.
- Ford D, Easton DF, Stratton M, Narod S, Goldgar D, Devilee P, Bishop DT, Weber B, Lenoir G, Chang-Claude J, Sobol H, Teare MD, Struewing J, Arason A, Scherneck S, Peto J, Rebbeck TR, Tonin P, Neuhausen S, Barkardottir R, Eyfjord J, Lynch H, Ponder BA, Gayther SA, Zelada-Hedman M, et al. Genetic heterogeneity and penetrance analysis of the BRCA1 and BRCA2 genes in breast cancer families. The Breast Cancer Linkage Consortium. *Am J Hum Genet* 1998, 62:676-689.
- Frank TS, Deffenbaugh AM, Reid JE, Hulick M, Ward BE, Lingenfelter B, Gumper KL, Scholl T, Tavtigian SV, Pruss DR, Critchfield GC. Clinical characteristics of individuals with germline mutations in BRCA1 and BRCA2: Analysis of 10,000 individuals. *J Clin Oncol* 2002, 20:1480-1490.
- Friedman LS, Gayther SA, Kurosaki T, Gordon D, Noble B, Casey G, Ponder BA, Anton Culver H. Mutation analysis of BRCA1 and BRCA2 in a male breast cancer population. *Am J Hum Genet* 1997, 60:313-319.
- Fuks F, Milner J, Kouzarides T. BRCA2 associates with acetyltransferase activity when bound to P/CAF. *Oncogene* 1998, 17:2351-2354.

- Futamura M, Arakawa H, Matsuda K, Katagiri T Saji S, Miki Y, Nakamura Y. Potential Role of BRCA2 in a Mitotic Checkpoint after Phosphorylation by hBUBR1. *Cancer Res* 2000, 60:1531-1535.
- Gatei M, Scott SP, Filippovitch I, Soronika N, Lavin MF, Weber B, Khanna KK. Role for ATM in DNA Damage-induced Phosphorylation of BRCA1. *Cancer Res* 2000, 60:3299-3304.
- Gatei M, Zhou BB, Hobson K, Scott S, Young D, Khanna KK. Ataxia telangiectasia mutated (ATM) kinase and ATM and Rad3 related kinase mediate phosphorylation of Brca1 at distinct and overlapping sites. In vivo assessment using phospho-specific antibodies. *J Biol Chem* 2001, 276:17276-17280.
- Gilmore PM, McCabe N, Quinn JE, Kennedy RD, Gorski JJ, Andrews HN, McWilliams S, Carty M, Mullan PB, Duprex WP, Liu ET, Johnston PG, Harkin DP. BRCA1 Interacts with and Is Required for Paclitaxel-Induced Activation of Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase 3. *Cancer Res* 2004, 64:4148-4154.
- Giordano SH. A review of the diagnosis and management of male breast cancer. *Oncologist* 2005; 10:471-479.
- Giordano SH, Cohen DS, Buzdar AU, Perkins G, Hortobagiy GN. Breast carcinoma in men: a population-based study. *Cancer* 2004, 101:51-57.
- Goldgar DE, Easton DF, Deffenbaugh AM, Monteiro AN, Tavtigian SV, Couch FJ; Breast Cancer Information Core (BIC) Steering Committee. Integrated evaluation of DNA sequence variants of unknown clinical significance: application to BRCA1 and BRCA2. *Am J Hum Genet* 2004, 75:535-544.
- Gorski B, Cybulski C, Huzarski T, Byrski T, Gronwald J, Jakubowska A, Stawicka M, Gozdecka-Grodecka S, Szwiec M, Urbański K, Mituś J, Marczyk E, Dziuba J, Wandzel P, Surdyka D, Haus O, Janiszewska H, Debniak T, Tołoczko-Grabarek A, Medrek K, Masojć B, Mierzejewski M, Kowalska E, Narod SA, Lubiński J. Breast cancer predisposing alleles in Poland. *Breast Cancer Res Treat* 2005, 92:19-24.
- Gorski B, Jakubowska A, Huzarski T, Byrski T, Gronwald J, Grzybowska E, Mackiewicz A, Stawicka M, Bebenek M, Sorokin D, Fiszer-Maliszewska Ł, Haus O, Janiszewska H, Niepsuj S, Gózdź S, Zaremba L, Posmyk M, Płużańska M, Kilar E, Czudowska D, Waśko B, Miturski R, Kowalczyk JR, Urbański K, Szwiec M, Koc J, Debniak B, Rozmiarek A, Debniak T, Cybulski C, Kowalska E, Tołoczko-Grabarek A, Zajaczek S, Menkiszak J, Medrek K, Masojć B, Mierzejewski M, Narod SA,

- Lubiński J. A high proportion of founder BRCA1 mutations in Polish breast cancer families. *Int J Cancer* 2004, 110:683-686.
- Gravel S, Chapman JR, Magill C, Jackson SP. DNA helicases Sgs1 and BLM promote DNA double-strand break resection. *Genes Dev* 2008, 22:2767-2772.
 - Grawunder U, Wilm M, Wu X, Kulesza P, Wilson TE, Mann M, Lieber MR. Activity of DNA ligase IV stimulated by complex formation with XRCC4 protein in mammalian cells. *Nature* 1997, 388:492-495.
 - Greenman J, Mohammed S, Ellis D, Watts S, Scott G, Izatt L, Barnes D, Solomon E, Hodgson S, Mathew C. Identification of missense and truncating mutations in the BRCA1 gene in sporadic and familial breast and ovarian cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 1998, 21:244-249.
 - Gretarsdottir S, Thorlacius S, Valgardsdottir R, Gudlaugsdottir S, Sigurdsson S, Steinarsdottir M, Jonasson JG, Anamthawat-Jonsson K, Eyfjörd JE. BRCA2 and p53 mutations in primary breast cancer in relation to genetic instability. *Cancer Res* 1998, 58:859-862.
 - Gu J, Lu H, Tippin B, Shimazaki N, Goodman MF, Lieber MR. XRCC4:DNA ligase IV can ligate incompatible DNA ends and can ligate across gaps. *EMBO J* 2007, 26:1010-1023.
 - Gudmundsdottir K, Ashworth A. The roles of BRCA1 and BRCA2 and associated proteins in the maintenance of genomic stability. *Oncogene* 2006, 25:5864-5874.
 - Hadjisavvas A, Adamou A, Kitsios P, Phanis C, Kyriacou K, Christodoulou CG. Q356R and S151R are BRCA1 variants that may be associated with breast cancer in a Cypriot family. *Oncol Rep* 2002, 9:383-386.
 - Hall JM, Lee MK, Newman B, Morrow JE, Anderson LA, Huey B, King MC. Linkage of early-onset familial breast cancer to chromosome 17q21. *Science* 1990, 250:1684-1689.
 - Hamajima N, Hirose K, Tajima K, Rohan T, Calle EE, Heath CW Jr, Coates RJ, Liff JM, Talamini R, Chantarakul N, Koetsawang S, Rachawat D, Morabia A, Schuman L, Stewart W, Szklo M, Bain C, Schofield F, Siskind V, Band P, Coldman AJ, Gallagher RP, Hislop TG, Yang P, Kolonel LM, Nomura AM, Hu J, Johnson KC, Mao Y, De Sanjosé S, Lee N, Marchbanks P, Ory HW, Peterson HB, Wilson HG, Wingo PA, Ebeling K, Kunde D, Nishan P, Hopper JL, Colditz G, Gajalanski V, Martin N, Pardthaisong T, Silpisornkosol S, Theetranont C, Boosiri B, Chutivongse

S, Jimakorn P, Virutamasen P, Wongsrichanalai C, Ewertz M, Adami HO, Bergkvist L, Magnusson C, Persson I, Chang-Claude J, Paul C, Skegg DC, Spears GF, Boyle P, Evstifeeva T, Daling JR, Hutchinson WB, Malone K, Noonan EA, Stanford JL, Thomas DB, Weiss NS, White E, Andrieu N, Brêmond A, Clavel F, Gairard B, Lansac J, Piana L, Renaud R, Izquierdo A, Viladiu P, Cuevas HR, Ontiveros P, Palet A, Salazar SB, Aristizabel N, Cuadros A, Tryggvadottir L, Tulinius H, Bachelot A, Lê MG, Peto J, Franceschi S, Lubin F, Modan B, Ron E, Wax Y, Friedman GD, Hiatt RA, Levi F, Bishop T, Kosmelj K, Primic-Zakelj M, Ravnihar B, Stare J, Beeson WL, Fraser G, Bullbrook RD, Cuzick J, Duffy SW, Fentiman IS, Hayward JL, Wang DY, McMichael AJ, McPherson K, Hanson RL, Leske MC, Mahoney MC, Nasca PC, Varma AO, Weinstein AL, Moller TR, Olsson H, Ranstam J, Goldbohm RA, van den Brandt PA, Apelo RA, Baens J, de la Cruz JR, Javier B, Lacaya LB, Ngelangel CA, La Vecchia C, Negri E, Marubini E, Ferraroni M, Gerber M, Richardson S, Segala C, Gatei D, Kenya P, Kungu A, Mati JG, Brinton LA, Hoover R, Schairer C, Spirtas R, Lee HP, Rookus MA, van Leeuwen FE, Schoenberg JA, McCredie M, Gammon MD, Clarke EA, Jones L, Neil A, Vessey M, Yeates D, Appleby P, Banks E, Beral V, Bull D, Crossley B, Goodill A, Green J, Hermon C, Key T, Langston N, Lewis C, Reeves G, Collins R, Doll R, Peto R, Mabuchi K, Preston D, Hannaford P, Kay C, Rosero-Bixby L, Gao YT, Jin F, Yuan JM, Wei HY, Yun T, Zhiheng C, Berry G, Cooper Booth J, Jelihovsky T, MacLennan R, Shearman R, Wang QS, Baines CJ, Miller AB, Wall C, Lund E, Stalsberg H, Shu XO, Zheng W, Katsouyanni K, Trichopoulou A, Trichopoulos D, Dabancens A, Martinez L, Molina R, Salas O, Alexander FE, Anderson K, Folsom AR, Hulka BS, Bernstein L, Enger S, Haile RW, Paganini-Hill A, Pike MC, Ross RK, Ursin G, Yu MC, Longnecker MP, Newcomb P, Bergkvist L, Kalache A, Farley TM, Holck S, Meirik O; Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. Alcohol, tobacco and breast cancer--collaborative reanalysis of individual data from 53 epidemiological studies, including 58,515 women with breast cancer and 95,067 women without the disease. *Br J Cancer* 2002, 87:1234-1245.

- Hammarsten O, DeFazio LG, Chu G. Activation of DNA-dependent protein kinase by singlestranded DNA ends. *J Biol Chem* 2000, 275:1541-1550.

- Haraldsson K, Loman N, Zhang QX, Johannsson O, Olsson H, Borg A. BRCA2 germ-line mutations are frequent in male breast cancer patients without a family history of the disease. *Cancer Res* 1998, 58:1367-1371.
- Harkin DP, Bean JM, Miklos D, Song YH, Truong VB, Englert C, Christians FC, Ellisen LW, Maheswaran S, Oliner JD, Haber DA. Induction of GADD45 and JNK/SAPK-dependent apoptosis following inducible expression of BRCA1. *Cell* 1999, 97:575-586.
- Hartmann C, John AL, Klaes R, Hofmann W, Bielen R, Koehler R, Janssen B, Bartram CR, Arnold N, Zschocke J. Large BRCA1 gene deletions are found in 3% of German highrisk breast cancer families. *Hum Mutat* 2004, 24:534.
- Hashizume R, Fukuda M, Maeda I, Nishikawa H, Oyake D, Yabuki Y, Ogata H, Ohta T. The RING heterodimer BRCA1-BARD1 is a ubiquitin ligase inactivated by a breast cancer-derived mutation. *J Biol Chem* 2001, 276:14537-14540.
- Healey CS, Dunning AM, Teare MD, Chase D, Parker L, Burn J, Chang-Claude J, Mannermaa A, Kataja V, Huntsman DG, Pharoah PD, Luben RN, Easton DF, Ponder BA. A common variant in BRCA2 is associated with both breast cancer risk and prenatal viability. *Nat Genet* 2000, 26:362-364.
- Hemminki K, Scelo G, Boffetta P, Mellekjaer L, Tracey E, Andersen A, Brewster DH, Pukkala E, McBride M, Kliever EV, Chia KS, Pompe-Kirn V, Martos C, Jonasson JG, Li X, Brennan P. Second primary malignancies in patients with male breast cancer. *Br J Cancer* 2005, 92:1288-1292.
- Hermeking H, Lengauer C, Polyak K, He TC, Zhang L, Thiagalingam S, Kinzler KW, Vogelstein B. 14-3-3 σ Is a p53-Regulated Inhibitor of G2/M Progression. *Mol Cell* 1997, 1:3-11.
- Hoeijmakers JHJ. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* 2001, 411:366-374.
- Honrado E, Benitez J, Palacios J. The molecular pathology of hereditary breast cancer: genetic testing and therapeutic implications. *Mod Pathol* 2005, 18:1305-1320.
- Honrado E, Benitez J, Palacios J. The pathology of hereditary breast cancer. *Hered Cancer Clin Pract* 2004, 2:131-138.
- Hosey AM, Gorski JJ, Murray MM, Quinn JE, Chung WY, Stewart GE, James CR, Farragher SM, Mulligan JM, Scott AN, Dervan PA, Johnston PG, Couch FJ, Daly

- PA, Kay E, McCann A, Mullan PB, Harkin DP. Molecular basis for estrogen receptor alpha deficiency in BRCA1-linked breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 2007, 99:1683-1694.
- Hsu LC, White RL. BRCA1 is associated with the centrosome during mitosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998, 95:12983-12988.
 - Huen MSY, Sy SMH, Chen J. BRCA1 and its toolbox for the maintenance of genome integrity. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2010, 11:138-148.
 - Ivanov EL, Sugawara N, Fishman-Lobell J, Haber JE. Genetic requirements for the single-strand annealing pathway of double-strand break repair in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 1996, 142:693-704.
 - Jablonski SA, Chan GK, Cooke CA, Earnshaw WC, Yen TJ. The hBUB1 and hBUBR1 kinases sequentially assemble onto kinetochores during prophase with hBUBR1 concentrating at the kinetochore plates in mitosis. *Chromosoma (Berl.)* 1998, 107:386-396.
 - Jackson SP, Bartek J. The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature* 2009, 461:1071-1078.
 - Janavičius R. Founder BRCA1/2 mutations in the Europe: implications for hereditary breast-ovarian cancer prevention and control. *The EPMA Journal* 2010, 1:397-412.
 - Janezic SA, Ziogas A, Krumroy LM, Krasner M, Plummer SJ, Cohen P, Gildea M, Barker D, Haile R, Casey G, Anton-Culver H. Germline BRCA1 alterations in a population-based series of ovarian cancer cases. *Hum Mol Genet* 1999, 8:889-897.
 - Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E. Cancer statistics, 2010. *CA Cancer J Clin* 2010, 60:277-300.
 - Jin Y, Xu XL, Yang MCW, Wei F, Ayi TC, Bowcock AM, Baer R. Cell cycle-dependent colocalization of BARD1 and BRCA1 proteins in discrete nuclear domains. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997, 94:12075-12080.
 - Johansen Taber KA, Morisy LR, Osbahr AJ 3rd, Dickinson BD. Male breast cancer: risk factors, diagnosis, and management (Review). *Oncol Rep* 2010, 24:1115-1120.
 - Kadouri L, Hubert A, Rotenberg Y, Hamburger T, Sagi M, Nechushtan C, Abeliovich D, Peretz T. Cancer risks in carriers of the BRCA1/2 Ashkenazi founder mutations. *J Med Genet* 2007, 44:467-471.
 - Kelsey JL, Gammon MD, John EM: Reproductive factors and breast cancer. *Epidemiol Rev* 1993, 15:36-47.

- Kennedy RD, D'Andrea AD. The Fanconi Anemia/BRCA pathway: new faces in the crowd. *Genes Dev* 2005, 19: 2925-2940.
- Khanna KK, Lavin MF, Jackson SP, Mulhern TD. ATM, a central controller of cellular responses to DNA damage. *Cell Death Differ* 2001, 8:1052-1065.
- King MC, Marks JH, Mandell JB, New York Breast Cancer Study Group. Breast and ovarian cancer risks due to inherited mutations in BRCA1 and BRCA2. *Science* 2003, 302:643-646.
- Kleiman FE, Wu-Baer F, Fonseca D, Kaneko S, Baer R, Manley JL. BRCA1/BARD1 inhibition of mRNA 3' processing involves targeted degradation of RNA polymerase II. *Genes Dev* 2005, 19:1227-1237.
- Ko MJ, Murata K, Hwang DS, Parvin JD. Inhibition of BRCA1 in breast cell lines causes the centrosome duplication cycle to be disconnected from the cell cycle. *Oncogene* 2006, 25:298-303.
- Konstantopoulou I, Janković R, Raičević L, Ladopoulou A, Armaou S, Nikolopoulos G, Pandis N, Nasioulas G, Radulović S, Yannoukakos D. BRCA1 and BRCA2 genes mutation analysis in patients with a family history of breast and ovarian cancer. *Jugoslav Med Biochem* 2004, 23: 271-277.
- Koonin EV, Altschul SF, Bork P. BRCA1 protein products... Functional motifs.... *Nat Genet* 1996, 13:266-268.
- Korde LA, Zujewski JA, Kamin L, Giordano S, Domchek S, Anderson WF, Bartlett JM, Gelmon K, Nahleh Z, Bergh J, Cutuli B, Pruneri G, McCaskill-Stevens W, Gralow J, Hortobagyi G, Cardoso F. Multidisciplinary meeting on male breast cancer: summary and research recommendations. *J Clin Oncol* 2010, 28:2114-2122.
- Kramer JL, Velazquez IA, Chen BE, Rosenberg PS, Struewing JP, Greene MH. Prophylactic oophorectomy reduces breast cancer penetrance during prospective, long-term follow-up of BRCA1 mutation carriers. *J Clin Oncol* 2005, 23:8629-8635.
- Kuhfittig-Kulle S, Feldmann E, Odersky A, Kuliczowska A, Goedecke W, Eggert A, Pfeiffer P. The mutagenic potential of non-homologous end joining in the absence of the NHEJ core factors Ku70/80, DNA-PKcs and XRCC4-LigIV. *Mutagenesis* 2007, 22:217-233.
- Lakhani SR, van de Vijver MJ, Jacquemier J, Anderson TJ, Osin PP, McGuffog L, Easton DF. The pathology of familial breast cancer: predictive value of immunohistochemical markers estrogen receptor, progesterone receptor, Her-2, and

p53 in patients with mutations in BRCA1 and BRCA2. *J Clin Oncol* 2002, 20:2310-2318.

- Leavitt WW, Chen TJ, Allen TC. Regulation of progesterone receptor formation by estrogen action. *Ann N Y Acad Sci* 1977, 286:210-225.
- Lecarpentier J, Noguès C, Mouret-Fourme E, Stoppa-Lyonnet D, Lasset C, Caron O, Fricker JP, Gladieff L, Faivre L, Sobol H, Gesta P, Frenay M, Luporsi E, Coupier I; GENEPSO, Lidereau R, Andrieu N. Variation in breast cancer risk with mutation position, smoking, alcohol, and chest X-ray history, in the French National BRCA1/2 carrier cohort (GENEPSO). *Breast Cancer Res Treat* 2011, 130:927-938.
- Lee JS, Collins KM, Brown AL, Lee CH, Chung JH. hCds1-mediated phosphorylation of BRCA1 regulates the DNA damage response. *Nature* 2000, 404:201-204.
- Lee JW, Blanco L, Zhou T, Garcia-Diaz M, Bebenek K, Kunkel TA, Wang Z, Povirk LF. Implication of DNA polymerase lambda in alignment-based gap filling for nonhomologous DNA end joining in human nuclear extracts. *J Biol Chem* 2004, 279:805-811.
- Lee TC, Lee AS, Li KB. Incorporating the amino acid properties to predict the significance of missense mutations. *Amino Acids* 2008, 35:615-626.
- Li CI, Anderson BO, Daling JR, Moe RE. Trends in incidence rates of invasive lobular and ductal breast carcinoma. *JAMA* 2003, 289:1421-1424.
- Lieber MR, Ma Y, Pannicke U, Schwarz K. Mechanism and regulation of human non-homologous DNA end-joining. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003, 4:712-720.
- Liede A, Karlan BY, Narod SA. Cancer risks for male carriers of germline mutations in BRCA1 or BRCA2: a review of the literature. *J Clin Oncol* 2004, 22:735-742.
- Lindor NM, McMaster ML, Lindor CJ, Greene MH; National Cancer Institute, Division of Cancer Prevention, Community Oncology and Prevention Trials Research Group. Concise handbook of familial cancer susceptibility syndromes - second edition. *J Natl Cancer Inst Monogr* 2008, 38:1-93.
- Liu Q, Guntuku S, Cui XS, Matsuoka S, Cortez D, Tamai K, Luo G, Carattini-Rivera S, DeMayo F, Bradley A, Donehower LA, Elledge SJ. Chk1 is an essential kinase that is regulated by Atr and required for the G(2)/M DNA damage checkpoint. *Genes Dev* 2000, 14:1448-1459.

- Loman N, Johannsson O, Kristoffersson U, Olsson H, Borg A. Family history of breast and ovarian cancers and BRCA1 and BRCA2 mutations in a population-based series of early-onset breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 2001, 93:1215-1223.
- Lopez-Girona A, Furnari B, Mondesert O, Russell P. Nuclear localization of Cdc25 is regulated by DNA damage and a 14-3-3 protein. *Nature* 1999, 397:172-175.
- Lou Z, Chini CC, Minter-Dykhouse K, Chen J. Mediator of DNA damage checkpoint protein 1 regulates BRCA1 localization and phosphorylation in DNA damage checkpoint control. *J Biol Chem* 2003, 278:13599–13602.
- Lubinski J, Phelan CM, Ghadirian P, Lynch HT, Garber J, Weber B, Tung N, Horsman D, Isaacs C, Monteiro AN, Sun P, Narod SA. Cancer variation associated with the position of the mutation in the BRCA2 gene. *Fam Cancer* 2004, 3:1-10.
- Lynch HT, Casey MJ, Snyder CL, Bewtra C, Lynch JF, Butts M, Godwin AK. Hereditary ovarian carcinoma: Heterogeneity, molecular genetics, pathology, and management. *Mol Oncol* (2009) 97-137.
- Lynch HT, Watson P, Narod SA. The Genetic Epidemiology of Male Breast Carcinoma. *Cancer* 1999, 86:744-746.
- Ma JL, Kim EM, Haber JE, Lee SE. Yeast Mre11 and Rad1 proteins define a Ku-independent mechanism to repair double-strand breaks lacking overlapping end sequences. *Mol Cell Biol* 2003, 23:8820-8828.
- Ma Y, Pannicke U, Schwarz K, Lieber MR. Hairpin opening and overhang processing by an Artemis/DNA-dependent protein kinase complex in nonhomologous end joining and V(D)J recombination. *Cell* 2002, 108:781-794.
- MacLachlan TK, Somasundaram K, Sgagias M, Shifman Y, Muschel RJ, Cowan KH, El-Deiry WS. BRCA1 Effects on the Cell Cycle and the DNA Damage Response Are Linked to Altered Gene Expression. *J Biol Chem* 2000, 275:2777-2785.
- Mæhle L, Apold J, Paulsen T, Hagen B, Løvsløtt K, Fiane B, Van Ghelue M, Clark N, Møller P. High risk for ovarian cancer in a prospective series is restricted to BRCA1/2 mutation carriers. *Clin Cancer Res* 2008, 14:7569-7573.
- Mallon E, Osin P, Nasiri N, Blain I, Howard B, Gusterson B. The basic pathology of human breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2000, 5:139-163.

- Marmorstein LY, Kinev AV, Chan GK, Bochar DA, Beniya H, Epstein JA, Yen TJ, Shiekhattar R. A Human BRCA2 Complex Containing a Structural DNA Binding Component Influences Cell Cycle Progression. *Cell* 2001, 104:247-257.
- Marsischky GT, Lee S, Griffith J, Kolodner RD. *Saccharomyces cerevisiae* MSH2/6 complex interacts with Holliday junctions and facilitates their cleavage by phage resolution enzymes. *J Biol Chem* 1999, 274:7200-7206.
- Martin ST, Matsubayashi H, Rogers CD, Philips J, Couch FJ, Brune K, Yeo CJ, Kern SE, Hruban RH, Goggins M. Increased prevalence of the BRCA2 polymorphic stop codon K3326X among individuals with familial pancreatic cancer. *Oncogene* 2005, 24:3652-3656.
- Matsuoka S, Huang M, Elledge SJ. Linkage of ATM to cell cycle regulation by the Chk2 protein kinase. *Science* 1998, 282:1893-1897.
- Mazoyer S, Dunning AM, Serova O, Dearden J, Puget N, Healey CS, Gayther SA, Mangion J, Stratton MR, Lynch HT, Goldgar DE, Ponder BA, Lenoir GM. A polymorphic stop codon in BRCA2. *Nat Genet* 1996, 14:253-254.
- Metcalfe K, Lynch HT, Ghadirian P, Tung N, Olivotto I, Warner E, Olopade OI, Eisen A, Weber B, McLennan J, Sun P, Foulkes WD, Narod SA. Contralateral breast cancer in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. *J Clin Oncol* 2004, 22:2328-2335.
- Meza JE, Brzovic PS, King MC, Klevit RE. Mapping the functional domains of BRCA1. Interaction of the ring finger domains of BRCA1 and BARD1. *J Biol Chem* 1999, 274:5659-5665.
- Miao H, Verkooijen HM, Chia KS, Bouchardy C, Pukkala E, Larønningen S, Mellekjær L, Czene K, Hartman M. Incidence and outcome of male breast cancer: an international population-based study. *J Clin Oncol* 2011, 29:4381-4386.
- Miki Y, Swensen J, Shattuck-Eidens D, Futreal PA, Harshman K, Tavtigian S, Liu Q, Cochran C, Bennett LM, Ding W, Bell R, Rosenthal J, Hussey C, Tran T, McClure M, Frye C, Hattier T, Phelps R, Haugen-Strano A, Katcher H, Yakumo K, Gholami Z, Shaffer D, Stone S, Bayer S, Wray C, Bogden R, Dayananth P, Ward J, Tonin P, Narod S, Bristow PK, Norris FH, Helvering L, Morrison P, Rosteck P, Lai M, Barrett JC, Lewis C, Neuhausen S, Cannon-Albright L, Goldgar D, Wiseman R, Kamb A, Skolnick MH. A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science* 1994, 266:66-71.

- Miljuš D, Živković S, Božić Z. Incidencija i mortalitet raka u centralnoj Srbiji 2009. Registar za rak u centralnoj Srbiji. Institut za zaštitu zdravlja Srbije „Dr. Milan Jovanović - Batut“, Beograd, 2011.
- Milner J, Ponder B, Hughes-Davies L, Seltmann M, Kouzarides T. Transcriptional activation functions in BRCA2. *Nature* 1997, 386:772-773.
- Mimori T, Hardin JA. Mechanism of interaction between Ku protein and DNA. *J Biol Chem* 1986, 261:10375-10379.
- Mirkovic N, Marti-Renom MA, Weber BL, Sali A, Monteiro AN. Structure-based assessment of missense mutations in human BRCA1: implications for breast and ovarian cancer predisposition. *Cancer Res* 2004, 64:3790-3797.
- Modugno F, Ness RB, Allen GO, Schildkraut JM, Davis FG, Goodman MT. Oral contraceptive use, reproductive history, and risk of epithelial ovarian cancer in women with and without endometriosis. *Am J Obstet Gynecol* 2004, 191:733-740.
- Montagna M, Dalla Palma M, Menin C, Agata S, De Nicolo A, Chieco-Bianchi L, D'Andrea E. Genomic rearrangements account for more than one-third of the BRCA1 mutations in northern Italian breast/ovarian cancer families. *Hum Mol Genet* 2003, 12:1055-1061.
- Monteiro ANA, August A, Hanafusa H. Evidence for a transcriptional activation function of BRCA1 C-terminal region. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996, 93:13595-13599.
- Moore JK, Haber JE. Cell cycle and genetic requirements of two pathways of nonhomologous end-joining repair of double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 1996, 16:2164-2173.
- Morimoto LM, White E, Chen Z, Chlebowski RT, Hays J, Kuller L, Lopez AM, Manson J, Margolis KL, Muti PC, Stefanick ML, McTiernan A. Obesity, body size, and risk of postmenopausal breast cancer: the Women's Health Initiative (United States). *Cancer Causes Control* 2002, 13:741-751.
- Muir D, Kanthan R, Kanthan SC. Male versus female breast cancers. A population-based comparative immunohistochemical analysis. *Arch Pathol Lab Med* 2003, 127:36-41.
- Mullan PB, Quinn JE, Harkin DP. The role of BRCA1 in transcriptional regulation and cell cycle control. *Oncogene* 2006, 25:5854-5863.

- Narod SA, Foulkes WD. BRCA1 and BRCA2: 1994 and beyond. *Nat Rev Cancer* 2004, 4:665-676.
- Nimonkar AV, Ozsoy AZ, Genschel J, Modrich P, Kowalczykowski SC. Human exonuclease 1 and BLM helicase interact to resect DNA and initiate DNA repair. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008, 105:16906-16911.
- Okada S, Ouchi T. Cell cycle differences in DNA damage-induced BRCA1 phosphorylation affect its subcellular localization. *J Biol Chem* 2003, 278:2015-2020.
- Ottini L, Palli D, Rizzo S, Federico M, Bazan V, Russo A. Male breast cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* 2010, 73:141-155.
- Pal T, Permeth-Wey J, Betts JA, Krischer JP, Fiorica J, Arango H, LaPolla J, Hoffman M, Martino MA, Wakeley K, Wilbanks G, Nicosia S, Cantor A, Sutphen R. BRCA1 and BRCA2 Mutations Account for a Large Proportion of Ovarian Carcinoma Cases. *Cancer* 2005, 104:2807-2816.
- Pao GM, Janknecht R, Ruffner H, Hunter T, Verma IM. CBP/p300 interact with and function as transcriptional coactivators of BRCA1. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000, 97:1020-1025.
- Papp J, Raicevic L, Milasin J, Dimitrijevic B, Radulovic S, Olah E. Germline mutation analysis of BRCA1 and BRCA2 genes in Yugoslav breast/ovarian cancer families. *Oncol Rep* 1999, 6:1435-1438.
- Patel KJ, Vu VP, Lee H, Corcoran A, Thistlethwaite FC, Evans MJ, Colledge WH, Friedman LS, Ponder BA, Venkitaraman AR. Involvement of Brca2 in DNA repair. *Mol Cell* 1998, 1:347-357.
- Paull TT, Cortez D, Bowers B, Elledge SJ, Gellert M. From the cover: direct DNA binding by Brca1. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001, 98:6086-6091.
- Paull TT, Gellert M. The 3' to 5' exonuclease activity of Mre 11 facilitates repair of DNA double-strand breaks. *Mol Cell* 1998, 1:969-979.
- Paull TT, Rogakou EP, Yamazaki V, Kirchgessner CU, Gellert M, Bonner WM. A critical role for histone H2AX in recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage. *Curr Biol* 2000, 10:886-895.
- Pellegrini L, Yu DS, Lo T, Anand S, Lee M, Blundell TL, Venkitaraman AR. Insights into DNA recombination from the structure of a RAD51- BRCA2 complex. *Nature* 2002, 420:287-293.

- Peng CY, Graves PR, Thoma RS, Wu Z, Shaw AS, Piwnica-Worms H. Mitotic and G2 checkpoint control: regulation of 14-3-3 protein binding by phosphorylation of Cdc25C on serine-216. *Science* 1997, 277:1501-1505.
- Perkins GH, Middleton LP. Breast cancer in men. *BMJ* 2003, 327:239-240.
- Petersen GM, Parmigiani G, Thomas D. Missense mutations in disease genes: a Bayesian approach to evaluate causality. *Am J Hum Genet* 1998, 62:1516-1524.
- Petrini HJJ. The Mammalian Mre11-Rad50-Nbs1 Protein Complex: Integration of Functions in the Cellular DNA–Damage Response. *Am J Hum Genet* 1999, 64:1264-1269.
- Petrucelli N, Daly MB, Feldman GL. Hereditary breast and ovarian cancer due to mutations in BRCA1 and BRCA2. *Genet Med*. 2010, 12:245-59.
- Phelan CM, Đapić V, Tice B, Favis R, Kwan E, Barany F, Manoukian S, Radice P, van der Luijt RB, van Nesselrooij BP, Chenevix-Trench G, kConFab, Caldes T, de la Hoya M, Lindquist S, Tavtigian SV, Goldgar D, Borg A, Narod SA, Monteiro AN. Classification of BRCA1 missense variants of unknown clinical significance. *J Med Genet* 2005, 42:138-146.
- Puget N, Stoppa-Lyonnet D, Sinilnikova OM, Pagès S, Lynch HT, Lenoir GM, Mazoyer S. Screening for germ-line rearrangements and regulatory mutations in BRCA1 led to the identification of four new deletions. *Cancer Res* 1999, 59:455-461.
- Ramus SJ, Gayther SA. The Contribution of BRCA1 and BRCA2 to Ovarian Cancer. *Mol Oncol* 2009, 3:138-150.
- Ratajska M, Brozek I, Senkus-Konefka E, Jassem J, Stepnowska M, Palomba G, Pisano M, Casula M, Palmieri G, Borg A, Limon J. BRCA1 and BRCA2 point mutations and large rearrangements in breast and ovarian cancer families in Northern Poland. *Oncol Rep* 2008, 19:263-268.
- Rebbeck TR, Friebel T, Lynch HT, Neuhausen SL, van 't Veer L, Garber JE, Evans GR, Narod SA, Isaacs C, Matloff E, Daly MB, Olopade OI, Weber BL. Bilateral prophylactic mastectomy reduces breast cancer risk in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: the PROSE Study Group. *J Clin Oncol* 2004, 22:1055-1162.
- Rebbeck TR, Lynch HT, Neuhausen SL, Narod SA, Van't Veer L, Garber JE, Evans G, Isaacs C, Daly MB, Matloff E, Olopade OI, Weber BL; Prevention and Observation of Surgical End Points Study Group. Prophylactic oophorectomy in carriers of BRCA1 or BRCA2 mutations. *N Engl J Med* 2002, 346:1616-22.

- Ree AH, Bratland A, Nome RV, Stokke T, Fodstad O. Repression of mRNA for the PLK cell cycle gene after DNA damage requires BRCA1. *Oncogene* 2003, 22:8952-8955.
- Risch HA, McLaughlin JR, Cole DE, Rosen B, Bradley L, Fan I, Tang J, Li S, Zhang S, Shaw PA, Narod SA. Population BRCA1 and BRCA2 mutation frequencies and cancer penetrances: a kin-cohort study in Ontario, Canada. *J Natl Cancer Inst* 2006, 98:1694-1706.
- Risch HA, McLaughlin JR, Cole DE, Rosen B, Bradley L, Kwan E, Jack E, Vesprini DJ, Kuperstein G, Abrahamson JL, Fan I, Wong B, Narod SA. Prevalence and penetrance of germline BRCA1 and BRCA2 mutations in a population series of 649 women with ovarian cancer. *Am J Hum Genet* 2001, 68:700-710.
- Robson ME, Chappuis PO, Satagopan J, Wong N, Boyd J, Goffin JR, Hudis C, Roberge D, Norton L, Bégin LR, Offit K, Foulkes WD. A combined analysis of outcome following breast cancer: Differences in survival based on BRCA1/BRCA2 mutation status and administration of adjuvant treatment. *Breast Cancer Res* 2004, 6:R8-R17.
- Rogakou EP, Pilch DR, Orr AH, Ivanova VS, Bonner WM. DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J Biol Chem* 1998, 273:5858-5868.
- Ron E, Ikeda T, Preston DL, Tokuoka S. Male breast cancer incidence among atomic bomb survivors. *J Natl Cancer Inst* 2005, 97:603-605.
- Roshak AK, Capper EA, Imburgia C, Fornwald J, Scott G, Marshall LA. The human polo-like kinase, PLK, regulates cdc2/cyclin B through phosphorylation and activation of the cdc25C phosphatase. *Cell Signal* 2000, 12:405-411.
- Rothkamm K, Kruger I, Thompson LH, Lobrich M. Pathways of DNA double-strand break repair during the mammalian cell cycle. *Mol Cell Biol* 2003, 23:5706-5715.
- Rubin SC, Benjamin I, Behbakht K, Takahashi H, Morgan MA, LiVolsi VA, Berchuck A, Muto MG, Garber JE, Weber BL, Lynch HT, Boyd J. Clinical and pathological features of ovarian cancer in women with germ-line mutations of BRCA1. *N Engl J Med* 1996, 335:1413-1416.
- Rudlowski C, Friedrichs N, Faridi A, Füzesi L, Moll R, Bastert G, Rath W, Büttner R. Her-2/neu gene amplification and protein expression in primary male breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2004, 84:215-223.

- Ruffner H, Jiang W, Craig AG, Hunter T, Verma IM. BRCA1 is phosphorylated at serine 1497 in vivo at a cyclin-dependent kinase 2-phosphorylation site. *Mol Cell Biol* 1999, 19:4843-4854.
- Sartori AA, Lukas C, Coates J, Mistrik M, Fu S, Bartek J, Baer R, Lukas J, Jackson SP. Human CtIP promotes DNA end resection. *Nature* 2007, 450:509-514.
- Sasco AJ, Lowenfels AB, Pasker-de Jong P. Review article: epidemiology of male breast cancer. A meta-analysis of published case-control studies and discussion of selected aetiological factors. *Int J Cancer* 1993, 53:538-549.
- Satram-Hoang S, Ziogas A, Anton-Culver H. Risk of second primary cancer in men with breast cancer. *Breast Cancer Res* 2007, 9(Suppl1):S10.
- Saurin AJ, Borden KLB, Boddy MN, Freemont PS. Does this have a familiar RING? *Trends Biochem Sci* 1996; 21:208-214.
- Seymour IJ, Casadei S, Zampiga V, Rosato S, Danesi R, Falcini F, Strada M, Morini N, Naldoni C, Paradiso A, Tommasi S, Schittulli F, Amadori D, Calistri D. Disease family history and modification of breast cancer risk in common BRCA2 variants. *Oncol Rep* 2008, 19:783-786.
- Schouten LJ, Rivera C, Hunter DJ, Spiegelman D, Adami HO, Arslan A, Beeson WL, van den Brandt PA, Buring JE, Folsom AR, Fraser GE, Freudenheim JL, Goldbohm RA, Hankinson SE, Lacey JV Jr, Leitzmann M, Lukanova A, Marshall JR, Miller AB, Patel AV, Rodriguez C, Rohan TE, Ross JA, Wolk A, Zhang SM, Smith-Warner SA. Height, body mass index, and ovarian cancer: a pooled analysis of 12 cohort studies. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2008, 17:902-912.
- Schwacha A, Kleckner N. Identification of double Holliday junctions as intermediates in meiotic recombination. *Cell* 1995, 83:783-791.
- Scully R, Anderson SF, Chao DM, Wei W, Ye L, Zoung RA et al. BRCA1 is a component of the RNA polymerase II holoenzyme. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997, 94:5605-5610.
- Scully R, Chen J, Ochs RL, Keegan K, Hoekstra M, Feunteun J, Livingston DM. Dynamic changes of BRCA1 subnuclear location and phosphorylation state are initiated by DNA damage. *Cell* 1997a, 90:425-435.
- Scully R, Ganesan S, Brown M, De Caprio JA, Cannistra SA, Feunteun J, Schnitt S, Livingston DM. Location of BRCA1 in human breast and ovarian cell lines. *Science* 1996, 272:123-125.

- Seymour IJ, Casadei S, Zampiga V, Rosato S, Danesi R, Falcini F, Strada M, Morini N, Naldoni C, Paradiso A, Tommasi S, Schittulli F, Amadori D, Calistri D. Disease family history and modification of breast cancer risk in common BRCA2 variants. *Oncol Rep* 2008, 19:783-786.
- Shrivastav M, De Haro LP, Nickoloff JA. Regulation of DNA double-strand break repair pathway choice. *Cell Research* 2008, 18:134-147.
- Sokolenko AP, Mitiushkina NV, Buslov KG, Bit-Sava EM, Iyevleva AG, Chekmariova EV, Kuligina ESh, Ulibina YM, Rozanov ME, Suspitsin EN, Matsko DE, Chagunava OL, Trofimov DY, Devilee P, Cornelisse C, Togo AV, Semiglazov VF, Imyanitov EN. High frequency of BRCA1 5382insC mutation in Russian breast cancer patients. *Eur J Cancer* 2006, 42:1380-1384.
- Sowter HM, Ashworth A. BRCA1 and BRCA2 as ovarian cancer susceptibility genes. *Carcinogenesis* 2005, 26:1651-1656.
- Spain BH, Larson CJ, Shihabuddin LS, Gage FH, Verma IM. Truncated BRCA2 is cytoplasmic: implications for cancer-linked mutations. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999, 96:13920-13925.
- Spurdle AB, Hopper JL, Chen X, Dite GS, Cui J, McCredie MR, Giles GG, Ellis-Steinborner S, Venter DJ, Newman B, Southey MC, Chenevix-Trench G. The BRCA2 372 HH genotype is associated with risk of breast cancer in Australian women under age 60 years. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2002, 11:413-416.
- Starita LM, Horwitz AA, Keogh MC, Ishioka C, Parvin JD, Chiba N. BRCA1/BARD1 Ubiquitinate Phosphorilated RNA Polymerase II. *J Biol Chem* 2005, 280:24498-24505.
- Starita LM, Machida Y, Sankaran S, Elias JE, Griffin K, Schlegel BP, Gygi SP, Parvin JD. BRCA1-dependent ubiquitination of γ -tubulin regulates centrosome number. *Mol Cell Biol* 2004, 24:8457-8466.
- Stark JM, Jasin M. Extensive loss of heterozygosity is suppressed during homologous repair of chromosomal breaks. *Mol Cell Biol* 2003, 23:733-743.
- Stiff T, Walker SA, Cerosaletti K, Goodarzi AA, Petermann E, Concannon P, O'Driscoll M, Jeggo PA. ATR-dependent phosphorylation and activation of ATM in response to UV treatment or replication fork stalling. *EMBO J* 2006, 25:5775-5782.

- Stucki M, Clapperton JA, Mohammad D, Yaffe MB, Smerdon SJ, Jackson SP. MDC1 directly binds phosphorylated histone H2AX to regulate cellular responses to DNA double-strand breaks. *Cell* 2005, 123:1213-1226.
- Sung P. Catalysis of ATP-dependent homologous DNA pairing and strand exchange by yeast RAD51 protein. *Science* 1994, 265:1241-1243.
- Suzuki K, Kodama S, Watanabe M. Recruitment of ATM protein to double strand DNA irradiated with ionizing radiation. *J Biol Chem* 1999, 274:25571-25575.
- Sy SM, Huen MS, Chen J. PALB2 is an integral component of the BRCA complex required for homologous recombination repair. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009, 106:7155-7160.
- Tai YC, Domchek S, Parmigiani G, Chen S. Breast cancer risk among male BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. *J Natl Cancer Inst* 2007, 99:1811-1814.
- Teng LS, Zheng Y, Wang HH. BRCA1/2 associated hereditary breast cancer. *J Zhejiang Univ Sci B* 2008, 9:85-89.
- Terry P, Miller AB, Jones JG, Rohan TE. Cigarette smoking and the risk of invasive epithelial ovarian cancer in a prospective cohort study. *Eur J Cancer* 2003, 39:1157-1164.
- Thakur S, Zhang HB, Peng Y, Le H, Carroll B, Ward T, Yao J, Farid LM, Couch FJ, Wilson RB, Weber BL. Localization of BRCA1 and a Splice Variant Identifies the Nuclear Localization Signal. *Mol Cell Biol* 1997, 17:444-452.
- Thangaraju M, Kaufmann SH, Couch FJ. BRCA1 facilitates stress-induced apoptosis in breast and ovarian cancer cell lines. *J Biol Chem* 2000, 275:33487-33496.
- The Breast Cancer Association Consortium, 2006. Commonly Studied Single-Nucleotide Polymorphisms and Breast Cancer: Results From the Breast Cancer Association Consortium. *J Natl Cancer Inst* 2006, 98:1382-1396.
- The Breast Cancer Linkage Consortium. Cancer risks in BRCA2 mutation carriers. *J Natl Cancer Inst* 1999, 91:1310-1316.
- Thomas DB, Rosenblatt K, Jimenez LM, McTiernan A, Stalsberg H, Stemhagen A, Thompson WD, Curnen MG, Satariano W, Austin DF, Greenberg RS, Key C, Kolonel LN, West DW. Ionizing radiation and breast cancer in men (United States). *Cancer Causes Control* 1994, 5:9-14.

- Thompson D, Easton D, for the Breast Cancer Linkage Consortium. Variation in cancer risks, by mutation position, in BRCA2 mutation carriers. *Am J Hum Genet* 2001, 68:410-419.
- Thorlacius S, Olafsdottir G, Tryggvadottir L, Neuhausen S, Jonasson JG, Tavtigian SV, Tulinius H, Ogmundsdottir HM, Eyfjord J. A single BRCA2 mutation in male and female breast cancer families from Iceland with varied cancer phenotypes. *Nat Genet* 1996, 13:117-119.
- Thorlacius S, Sigurdsson S, Bjarnadottir H, Olafsdottir G, Jonasson JG, Tryggvadottir L, Tulinius H, Eyfjord JE. Study of a single BRCA2 mutation with high carrier frequency in a small population. *Am J Hum Genet* 1997, 60:1079-1084.
- Thorslund T, West SC. BRCA2: a universal recombinase regulator. *Oncogene* 2007, 26:7720-7730.
- Tibbetts RS, Cortez D, Brumbaugh KM, Scully R, Livingston D, Elledge SJ, Abraham RT. Functional interactions between BRCA1 and the checkpoint kinase ATR during genotoxic stress. *Genes Dev* 2000, 14:2989-3002.
- Tommasi S, Crapolicchio A, Lacalamita R, Bruno M, Monaco A, Petroni S, Schittulli F, Longo S, Digennaro M, Calistri D, Mangia A, Paradiso A. BRCA1 mutations and polymorphisms in a hospital-based consecutive series of breast cancer patients from Apulia, Italy. *Mutat Res* 2005, 578:395-405.
- Tommasi S, Pilato B, Pinto R, Monaco A, Bruno M, Campana M, Digennaro M, Schittulli F, Lacalamita R, Paradiso A. Molecular and in silico analysis of BRCA1 and BRCA2 variants. *Mutat Res* 2008, 644:64-70.
- Tung KH, Wilkens LR, Wu AH, McDuffie K, Nomura AM, Kolonel LN, Terada KY, Goodman MT. Effect of anovulation factors on pre- and postmenopausal ovarian cancer risk: revisiting the incessant hypothesis. *Am J Epidemiol* 2005, 161:321-329.
- Tung N, Wang Y, Collins LC, Kaplan J, Li H, Gelman R, Comander AH, Gallagher B, Fetten K, Krag K, Stoeckert KA, Legare RD, Sgroi D, Ryan PD, Garber JE, Schnitt SJ. Estrogen receptor positive breast cancers in BRCA1 mutation carriers: clinical risk factors and pathologic features. *Breast Cancer Res* 2010, 12:R12.
- Tutt A, Gabriel A, Bertwistle D, Connor F, Paterson H, Peacock J, Ross G, Ashworth A. Absence of Brca2 causes genome instability by chromosome breakage and loss associated with centrosome amplification. *Curr Biol* 1999, 9:1107-1110.

- Uchiumi F, Ohta T, Tanuma S. Replication factor C recognizes 5'-phosphate ends of telomeres. *Biochem Biophys Res Commun* 1996, 229:310-315.
- Unger MA, Nathanson KL, Calzone K, Antin-Ozerkis D, Shih HA, Martin AM, Lenoir GM, Mazoyer S, Weber BL. Screening for genomic rearrangements in families with breast and ovarian cancer identifies BRCA1 mutations previously missed by conformation-sensitive gel electrophoresis or sequencing. *Am J Hum Genet* 2000, 67:841-850.
- van Harsseel JJT, van Roozendaal CEP, Detisch Z, Brandao RD, Paulussen ADC, Zeegers M, Blok MJ, Gomez Garcia EB. Efficiency of BRCAPRO and Myriad II mutation probability thresholds versus cancer history criteria alone for BRCA1/2 mutation detection. *Fam Cancer* 2010, 9:193-201.
- van Sprundel TC, Schmidt MK, Rookus MA, Brohet R, van Asperen CJ, Rutgers EJ, Van't Veer LJ, Tollenaar RA. Risk reduction of contralateral breast cancer and survival after contralateral prophylactic mastectomy in BRCA1 or BRCA2 mutation carriers. *Br J Cancer* 2005, 93:287-292.
- Vaughn JP, Cirisano FD, Huper G, Berchuck A, Futreal PA, Marks JR, Iglehart JD. Cell Cycle Control of BRCA2. *Cancer Res* 1996, 56:4590-4594.
- Venkitaraman AR. Cancer Susceptibility and the Functions of BRCA1 and BRCA2. *Cell* 2002, 108:171-182.
- Walker JR, Corpina RA, Goldberg J. Structure of the Ku heterodimer bound to DNA and its implications for double-strand break repair. *Nature* 2001, 412: 607-614.
- Wang Y, Cortez D, Yazdi P, Neff N, Elledge SJ, Qin J. BASC, a super complex of BRCA1-associated proteins involved in the recognition and repair of aberrant DNA structures. *Genes Dev* 2000, 14:927-939.
- Wenham RM, Schildkraut JM, McLean K, Calingaert B, Bentley RC, Marks J, Berchuck A. Polymorphisms in BRCA1 and BRCA2 and risk of epithelial ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 2003, 9:4396-4403.
- West SC. Molecular views of recombination proteins and their control. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003, 4:435-445.
- Whittemore AS, Gong G, Itnyre J. Prevalence and contribution of BRCA1 mutations in breast cancer and ovarian cancer: results from three U.S. population-based case-control studies of ovarian cancer. *Am J Hum Genet* 1997, 60:496-504.

- Whittemore AS, Gong G, John EM, McGuire V, Li FP, Ostrow KL, DiCioccio R, Felberg A, West DW. Prevalence of BRCA1 mutation carriers among U.S. non-Hispanic Whites. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2004, 13:2078-2083.
- Wong AKC, Pero R, Ormonde PA, Tavtigian SV, Bartel PL. RAD51 interacts with the evolutionarily conserved BRC motifs in the human breast cancer susceptibility gene *brca2*. *J Biol Chem* 1997, 272:31941-31944.
- Wong C, Stearns T. Centrosome number is controlled by a centrosome-intrinsic block to reduplication. *Nat Cell Biol* 2003, 5:539-544.
- Wooster R, Bignell G, Lancaster J, Swift S, Seal S, Mangion J, Collins N, Gregory S, Gumbs C, Micklem G. Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2. *Nature* 1995, 378:789-792.
- Wu K, Hinson SR, Ohashi A, Farrugia D, Wendt P, Tavtigian SV, Deffenbaugh A, Goldgar D, Couch FJ. Functional evaluation and cancer risk assessment of BRCA2 unclassified variants. *Cancer Res* 2005, 65:417-426.
- Wu LC, Wang ZW, Tsan JT, Spillman MA, Phung A, Xu XL, Yang MCW, Hwang LY, Bowcock AM, Baer R. Identification of a RING protein that can interact *in vivo* with the BRCA1 gene product. *Nat Genet* 1996, 14:430-440.
- Xia B, Dorsman JC, Ameziane N, de Vries Y, Rooimans MA, Sheng Q, Pals G, Errami A, Gluckman E, Llera J, Wang W, Livingston DM, Joenje H, de Winter JP. Fanconi anemia is associated with a defect in the BRCA2 partner PALB2. *Nature Genet* 2007, 39:159-161.
- Xia B, Sheng Q, Nakanishi K, Ohashi A, Wu J, Christ N, Liu X, Jasin M, Couch FJ, Livingston DM. Control of BRCA2 cellular and clinical functions by a nuclear partner, PALB2. *Mol Cell* 2006, 22:719-729.
- Xiao Z, Chen Z, Gunasekera AH, Sowin TJ, Rosenberg SH, Fesik S, Zhang H. Chk1 mediates S and G2 arrests through Cdc25A degradation in response to DNA-damaging agents. *J Biol Chem* 2003, 278:21767-21773.
- Xu B, Kim S, Kastan MB. Involvement of BRCA1 in S-phase and G2-phase checkpoints after ionizing irradiation. *Mol Cell Biol* 2001, 21:3445-3450.
- Xu B, O'Donnell AH, Kim ST, Kastan MB. Phosphorylation of serine 1387 in BRCA1 is specifically required for the Atm-mediated S-phase checkpoint after ionizing irradiation. *Cancer Res* 2002, 62:4588-4591.

- Yaneva M, Kowalewski T, Lieber MR. Interaction of DNA-dependent protein kinase with DNA and with Ku: biochemical and atomic-force microscopy studies. *EMBO J* 1997, 16:5098-5112.
- Yang H, Jeffrey PD, Miller J, Kinnucan E, Sun Y, Thoma NH, Zheng N, Chen PL, Lee WH, Pavletich NP. BRCA2 function in DNA binding and recombination from a BRCA2–DSS1–ssDNA structure. *Science* 2002, 297:1837-1848.
- Yarden RI, Brody LC. BRCA1 interacts with components of the histone deacetylase complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999, 96:4983-4988.
- Yarden RI, Pardo-Reoyo S, Sgagias M, Cowan KH, Brody LC. BRCA1 regulates the G2/M checkpoint by activating CHK1 kinase upon DNA damage. *Nat Genet* 2002, 30:285-289.
- Ye Q, Hu YF, Zhong H, Nye AC, Belmont AS, Li R. BRCA1-induced large-scale chromatin unfolding and allele-specific effects of cancer-predisposing mutations. *J Cell Biol* 2001, 155:911-921.
- Yu VP, Koehler M, Steinlein C, Schmid M, Hanakahi LA, van Gool AJ, West SC, Venkitaraman AR. Gross chromosomal rearrangements and genetic exchange between nonhomologous chromosomes following BRCA2 inactivation. *Genes Dev* 2000, 14:1400-1406.
- Yu X, Baer R. Nuclear Localization and Cell Cycle-specific Expression of CtIP, a Protein That Associates with the BRCA1 Tumor Suppressor. *J Biol Chem* 2000, 275:18541-18549.
- Yu X, Gabriel A. Ku-dependent and Ku-independent end-joining pathways lead to chromosomal rearrangements during double-strand break repair in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 2003, 163:843-856.
- Yuan SS, Lee SY, Chen G, Song M, Tomlinson GE, Lee EY. BRCA2 is required for ionizing radiation-induced assembly of Rad51 complex in vivo. *Cancer Res* 1999, 59:3547-3551.
- Zhan Q, Antinore MJ, Wang XW, Carrier F, Smith ML, Harris CC, Fornace AJ. Association with Cdc2 and inhibition of Cdc2/Cyclin B1 kinase activity by the p53-regulated protein Gadd45. *Oncogene* 1999, 18:2892-2900.
- Zhang F, Ma J, Wu J, Ye L, Cai H, Xia B, Yu X. PALB2 links BRCA1 and BRCA2 in the DNA-damage response. *Curr Biol* 2009, 19:524-529.

- Zhang J, Willers H, Feng Z, Ghosh JC, Kim S, Weaver DT, Chung JH, Powell SN, Xia F. Chk2 phosphorylation of BRCA1 regulates DNA double-strand break repair. *Mol Cell Biol* 2004, 24:708-718.
- Zheng L, Annab LA, Afshari CA, Lee WH, Boyer TG. BRCA1 mediates ligand-independent transcriptional repression of the estrogen receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001, 98:9587-9592.
- Zhong Q, Chen CF, Li S, Chen Y, Wang CC, Xiao J, Chen PL, Sharp ZD, Lee WH. Association of BRCA1 with the hRad50-hMre11-p95 complex and the DNA damage response. *Science* 1999, 285:747-750.
- Zhuang J, Zhang J, Willers H, Wang H, Chung JH, van Gent DC, Hallahan DE, Powell SN, Xia F. Checkpoint Kinase 2-Mediated Phosphorylation of BRCA1 Regulates the Fidelity of Nonhomologous End-Joining. *Cancer Res* 2006, 66:1401-1408.

BIOGRAFIJA AUTORA

Jelena Dobričić rođena je 21. maja 1979. godine u Beogradu. Školske 1998/1999. godine upisala je Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu, studijsku grupu Molekularna biologija i fiziologija. U trećoj godini fakulteta odabrala je smer Eksperimentalna biomedicina. Diplomirala je 28. juna 2004. godine sa prosekom ocena 9,33. Školske 2004/2005. godine upisala je magistarske studije na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, smer Molekularna biologija i biohemija. Školske 2008/2009. godine upisala je doktorske studije, smer Molekularna biologija, na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu.

U toku osnovnih studija stipendista je Republičke fondacije za razvoj naučnog i umetničkog podmlatka pri Ministarstvu prosvete Republike Srbije u periodu od oktobra 2002. do februara 2004. godine. Tokom poslediplomskih studija, u periodu od februara 2005. do aprila 2006. godine, stipendista je Ministarstva nauke i zaštite životne sredine Republike Srbije. Aprila 2006. godine stiče zvanje istraživač-pripravnik, a oktobra 2008. zvanje istraživač-saradnik. Od aprila 2006. godine zaposlena je na Institutu za onkologiju i radiologiju Srbije, gde je i uradila doktorsku disertaciju na projektu Ministarstva nauke i tehnološkog razvoja, odnosno Ministarstva prosvete i nauke Republike Srbije.

Изјава о ауторству

Потписани-а _____ Јелена Добричић _____
број уписа _____ IO060048 _____

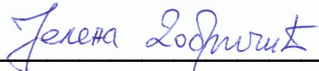
Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом
Учесталост и типови мутација у генима BRCA у породицама са позитивном историјом за карцином дојке и/или јајника у Србији

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

У Београду, _____

Потпис докторанда



Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора _____ Јелена Добричић _____
Број уписа _____ Ю060048 _____
Студијски програм _____ Молекуларна биологија _____
Наслов рада _____ Учесталост и типови мутација у генима BRCA у породицама са позитивном историјом за карцином дојке и/или јајника у Србији _____
Ментор _____ проф др Марина Стаменковић-Радак _____

Потписани _____ Јелена Добричић _____

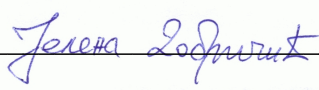
изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанда

У Београду, _____



Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом: Учесталост и типови мутација у генима BRCA у породицама са позитивном историјом за карцином дојке и/или јајника у Србији

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

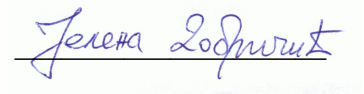
Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, _____



1. Ауторство - Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. Ауторство – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.