

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Jelena G. Filipović Tričković

**MOLEKULARNO-CITOGENETIČKA  
KARAKTERIZACIJA HROMOZOMSKIH PREKIDA  
U LIMFOCITIMA PERIFERNE KRVI PACIJENATA  
OBOLELIH OD FANKONIJEVE ANEMIJE U  
RAZLIČITIM FAZAMA BOLESTI**

Doktorska disertacija

Beograd, 2018

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Jelena G. Filipović Tričković

**MOLECULAR-CYTOGENETIC  
CHARACTERIZATION OF CHROMOSOMAL  
BREAKAGES IN PERIPHERAL BLOOD  
LYMPHOCYTES OF FANCONI ANEMIA  
PATIENTS IN DIFFERENT STAGES OF THE  
DISEASE**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2018

***Mentori:***

dr Gordana Joksić

naučni savetnik

Univerzitet u Beogradu -Institut za nuklearne nauke "Vinča"

dr Katarina Zeljić

vanredni profesor

Univerzitet u Beogradu - Biološki fakultet

***Komisija za pregled i ocenu doktorske disertacije:***

dr Gordana Joksić

naučni savetnik

Univerzitet u Beogradu -Institut za nuklearne nauke "Vinča"

dr Katarina Zeljić

vanredni profesor

Univerzitet u Beogradu - Biološki fakultet

dr Marina Stamenković-Radak

redovni profesor

Univerzitet u Beogradu -Biološki fakultet

***Datum odbrane:***

*Ova doktorska disertacija je urađena u Laboratoriji za fizičku hemiju Instituta za nuklearne nauke "Vinča".*

*Najveću zahvalnost dugujem dr Gordani Joksić za stečeno znanje, korisne savete, razumevanje i posvećeno vreme zahvaljujući kojima je ova disertacija urađena.*

*Posebno se zahvaljujem dr Thomasu Liehru i njegovom istraživačkom timu na znanju koje sam stekla u njegovoj laboratoriji i vremenu provedenom na Institutu za humanu genetiku Univerzitetske klinike u Jeni u Nemačkoj, bez čega izrada ove teze ne bi bila moguća.*

*Dr Vesni Mandušić se zahvaljujem na uloženom trudu, nesebičnim savetima i saradnji.*

*Takođe se zahvaljujem dr Katarini Zeljić i dr Marini Stamenković-Radak na uloženom vremenu i stručnim sugestijama prilikom oblikovanja teze.*

*Zahvaljujem se i svim kolegama iz Laboratorije za fizičku hemiju Instituta za nuklearne nauke "Vinča" na saradnji i pomoći, a posebno dr Ivani Joksić, dr Andreji Leskovic, dr Sandri Petrović i Ani Valenti Šobot na podršci, nesebičnoj pomoći i prijateljstvu.*

*Najviše od svega zahvalna sam svojoj porodici na bezgraničnom strpljenju, podršci i razumevanju.*

## **Naslov: Molekularno-citogenetička karakterizacija hromozomskih prekida u limfocitima periferne krvi pacijenata obolelih od Fankonijeve anemije u različitim fazama bolesti**

### **Sažetak**

Česta fragilna mesta (CFS) su hromozomski regioni skloni lezijama, suženjima i prekidima u uslovima replikativnog stresa *in vitro*. Najčešće se mogu naći kod sindroma hromozomskih nestabilnosti kao što je Fankonijeva anemija (FA), retka nasledna bolest koju karakteriše sklonost ka razvoju maligniteta i progresivna insuficijencija koštane srži, povećan broj hromozomskih prekida i radijala i telomerna fragilnost. Cilj ovog istraživanja je molekularno-citogenetička karakterizacija hromozomskih prekida u limfocitima periferne krvi, ispitivanje zajedničkog mesta javljanja - kolokalizacije prekida sa CFS i analiza mutacija u *FANCD2* genu kod FA-D2 pacijenata iz Srbije kako bi se utvrdilo da li CFS zavise od tipa mutacija u *FANCD2* genu. Navedeni parametri su analizirani kod pacijenata u različitim fazama bolesti kako bi se identifikovali prognostički parametri bolesti.

Rezultati su pokazali da FA-D2 hromozomski prekidi kolokalizuju sa CFS, karakteristični su za komplementacionu grupu i distribucija im se menja sa progresijom bolesti. Učestalost radijala i telomernih fuzija značajno je viša kod pacijenata sa teškom insuficijencijom koštane srži i može predstavljati prognostički parametar bolesti. Radijali se formiraju između nehomologih hromozoma, uključujući i polne i autozome. Otkriveno je novo fragilno mesto u regionu 1q42.2. Sangerovim sekvenciranjem je otkriveno 10 varijanti *FANCD2* gena, uglavnom dubokih intronskih, od kojih su tri novootkrivene (c.2396 C>A, c.206-246delG i c.2715+573 C>T). *In-silico* analizom identifikovane su tri patogene varijante kod više pacijenata koji nisu u srodstvu, koje mogu biti specifične za populaciju u Srbiji. Poređenje rezultata molekularno-citogenetičke i analize mutacija pokazalo je da ne postoji povezanost CFS i varijanti *FANCD2* gena.

**Ključne reči:** Česta fragilna mesta, Fankonijeva anemija, telomerne fuzije, radijali, *FANCD2* varijante, duboke intronske varijante, insuficijencija koštane srži.

**Naučna oblast:** **Biologija**

**Uža naučna oblast:** **Genetika**

**UDK:** [576.32/36:575::576.3]:[616.155.194:616-008.3/5]:576.316:575.224:612.112  
(497.11)(043.3)

**Title: Molecular-cytogenetic characterization of chromosomal breakages in peripheral blood lymphocytes of Fanconi anemia patients in different stages of the disease**

**Abstract**

Common fragile sites (CFSs) are chromosomal regions prone to gaps, constrictions and breaks under conditions of replication stress *in vitro*. They are mostly found in chromosomal instability syndromes such as Fanconi anemia (FA). FA is rare inherited disease characterized by cancer predisposition, progressive bone marrow failure, increased level of chromosomal breakages, radial figures and marked telomere fragility. The aim of this study was to perform molecular-cytogenetic characterization of chromosomal breakages and co-localization with CFSs in peripheral blood lymphocytes, as well as to analyze *FANCD2* gene mutations in FA-D2 patients from Serbia. These parameters were monitored in patients at different stages of the disease in order to identify the prognostic parameters of the disease.

The results of this study showed that FA-D2 chromosomal breakages co-localize with CFS, they are specific for the complementation group and their distribution pattern changes with the disease progression. The frequency of radials and telomere fusions is significantly higher in patients with severe bone marrow failure and could be of predictive value. Radials are composed of non-homologous chromosomes, including sex chromosomes as well as autosomes. One novel fragile site is found in region 1q42.2. Ten variants of *FANCD2* gene are detected by Sanger sequencing, mostly in deep intronic regions, among which three are novel (c.2396 C>A, c.206-246delG i c.2715+573 C>T). *In-silico* analysis revealed three pathogenic variants in several unrelated patients, indicating their possible association to Serbian population. Matching the results of molecular-cytogenetic characterization and mutation analysis showed that there is no relationship between CFS and *FANCD2* variants.

**Key words:** CFS, Fanconi anemia, telomere fusions, radials, *FANCD2* variants, deep intonic variants, bone marrow failure.

**Scientific field:** Biology

**Scientific subfield:** Genetics

**UDC:** [576.32/36:575::576.3]:[616.155.194:616-008.3/5]:576.316:575.224:612.112  
(497.11)(043.3)



## *Lista skraćenica*

ACD – shelterin complex subunit and telomerase recruitment factor  
ALL – Akutna Limfoblastna Leukemija  
ALT – Alternative Lengthening of Telomeres; Alternativno produžavanje telomera  
APAF-1 – Apoptosis-Activating Factor  
ATM – Ataxia Telangiectasia Mutated  
ATR – Ataxia Telangiectasia and Rad3-related  
BAC – Bacterial Artificial Chromosome  
BARD1 – BRCA1-Associated Ring Domain 1  
BCL2 – B-Cell Lymphoma 2  
BLAST – Basic Local Alignment Search Tool  
BLM – Bloom Syndrome protein  
BRCA1 i 2 – Breast Cancer Susceptibility gene 1 i 2  
BrdU – Bromodeoxyuridine  
BRIP1 – BRCA1-Interacting Protein C-terminal helicase  
CBC – Complete Blood Count  
CFS – Common Fragile Sites; Česta fragilna mesta  
CHK1 – Checkpoint Kinase 1  
CLL – Hronična Limfocitna Leukemija  
CNOT8 – CCR4-NOT Transcription Complex Subunit 8  
CNV – Copy Number Variants; Varijante broja kopija  
CV – Consensus Value; Konsenzus vrednosti  
DAPI – 4',6'- diamidino-2-phenylindole  
dbSNP – The Single Nucleotide Polymorphism database  
DDR – DNA Damage Repair; Popravka DNK oštećenja  
DEB – Diepoksibutan  
DMD – Duchenne Muscular Dystrophy, Dystrophin  
dNTPs – Deoxyribonucleoside Triphosphates  
DSBs – Double Strand Breaks; dvolančani prekidi  
DVL3 – Dishevelled  
EDTA – Ethylenediaminetetraacetic Acid  
ERCC4 – Excision-Repair Cross-Complementation group 4

ERFS – Early Replicating Fragile Sites; Rano replikujuća fragilna mesta

ESEs – Exon Splicing Enhancers; Pojačivači splajsovanja u egzonima

ESSs – Exon Splicing Silencers; Prigušivači splajsovanja u egzonima

FA – Fankonijeva anemija

FA-A - FA-U – Fankonijeva anemija komplementaciona grupa A-U

FADO – Failure of Activation Dormant Origins; Nemogućnost aktivacije dormantnih mesta replikacije

FAN1 – Fanconi-Associated Nuclease 1

FANCA - FANCU – Fankoni anemija protein A-U

FANCD2-P1 i P2 – FANCD2 Pseudogen 1 i 2

FHIT – Fragile Histidine Triad

FISH - Fluorescentna *in situ* Hibridizacija

FRA(broj hromozoma)(redosled otkrivanja) – Nomenklatura fragilnih mesta

FS – Fragilna Mesta

GUIDE-seq – Genome-wide Unbiased Identification of DSBs Enabled by Sequencing

HF – High Fidelity

HGVS – Human Genome Variation Society

HPV – Humani Papilomavirus

HR – Homologa Rekombinacija

HSC – Hematopoetska Stem Čelija

HSF – Human Splicing Finder

ICL – Interstrand Crosslinks; Unakrsne DNK veze

IFN- $\gamma$  – Interferon Gama

ISCN – International System for Human Cytogenetic Nomenclature

ISEs – Intron Splicing Enhancers; Pojačivači splajsovanja u intronima

ISSs – Intron Splicing Silencers; Prigušivači splajsovanja u egzonima

LOH – Loss Of Heterozygosity; Gubitak heterozigotnosti

MAP3K21 – Mitogen-Activated Protein Kinase 21

MDS – Mijelodisplazni Sindrom

MLPA – Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification

MMC – Mitomicin C

NCBI – National Center for Biotechnology Information

NFKB – Nuclear Factor Kappa-light-chain-enhancer of activated B cells  
NGS – Next Generation Sequencing; Sekvenciranje nove generacije  
NHEJ – Non-Homologous End Joining; Nehomologo spajanje krajeva  
OMIM – Online Mendelian Inheritance in Man  
PALB2 – Partner and Localizer of BRCA2  
PAPPA – Pregnancy-Associated Plasma Protein A  
PARK2 – Parkinson Disease 2  
PBS – Phosphate Buffered Saline; Rastvor fosfatnog pufera  
PCR – Polymerase Chain Reaction; Lančana reakcija polimerizacije  
PNA – Peptide Nucleic Acid  
POT1 – Protection of Telomeres 1  
PTC – Papillary Thyroid Carcinoma  
Q-FISH – Quantitative Fluorescent *In Situ* Hybridization; Kvantitativna *in situ* fluorescentna hibridizacija  
RAD51C – RAD51 paralog C  
RAP1 – TRF2-Interacting Telomeric Protein  
RET – Rearranged during Transfection  
RFS – Rare Fragile Sites; Retka fragilna mesta  
RISC – RNA Induced Silencing Complex  
RTLU – Relative Telomere Length Unit; Relativna jedinica dužine telomera  
SCE – Sister Chromatid Exchange; Razmena sestrinskih hromatida  
SLX4 – Structure-specific Endonuclease Subunit  
SSC – Saline-Sodium Citrate; Natrijum citratni rastvor  
TBE – Tris-Borate-EDTA  
TEMED – Tetramethylethylenediamine  
TIF – Telomere dysfunction Induced Foci; Fokusi indukovani telomernom disfunkcijom  
TIN2 – TRF-Interacting Nuclear factor 2  
TNF- $\alpha$  – Tumor Necrosis Factor Alpha  
TRF1 i 2 – Telomeric Repeat-binding Factor 1 i 2  
TSNAX – Translin Associated Factor X  
UBE2T – Ubiquitin Conjugating Enzyme E2 T  
UMD – Universal Mutation Database

VEGF – Vascular Endothelial Growth Factor

WES – Whole Exome Sequencing; Sekvenciranje celog egzoma

wt – wild type

WWOX – WW Domain Containing Oxidoreductase

XLF – XRCC4 like factor

XRCC2 – X-Ray Repair Cross Complementing 2

XRCC5 – X-ray Repair Cross Complementing 5

XRCC9 – X-Ray Repair Cross Complementing 9

## Sadržaj

<b>1. Uvod</b> .....	1
1.1. Fragilna mesta.....	2
1.1.1. Retka fragilna mesta .....	2
1.1.2. Česta fragilna mesta .....	4
1.1.2.1. Mehanizmi nestabilnosti čestih fragilnih mesta .....	5
1.1.2.2. Česta fragilna mesta i DNK struktura.....	6
1.1.2.3. Česta fragilna mesta i dinamika replikacije.....	8
1.1.2.4. Epigenetika čestih fragilnih mesta – tkivna zavisnost i struktura hromatina.....	9
1.1.2.5. Česta fragilna mesta i geni.....	11
1.1.2.6. Česta fragilna mesta i transkripcija.....	12
1.1.2.7. Česta fragilna mesta i proteini popravke DNK oštećenja.....	13
1.1.2.8. Telomere i česta fragilna mesta .....	14
1.1.3. Rano replikujuća fragilna mesta .....	15
1.1.4. Klinički značaj fragilnih mesta .....	16
1.2. Fankonijeva anemija .....	18
1.2.1. FA ćelijski fenotip.....	19
1.2.2. Značaj ispitivanja FA hromozomskih prekida, telomera i radijalnih hromozomskih struktura.....	19
1.2.3. FA nasleđivanje, geni, kandidat geni i mutacije.....	20
1.2.4. FANCD2 gen.....	23
<b>2. Cilj</b> .....	27
<b>3. Materijal i metode</b> .....	28
3.1. Uzorci.....	28
3.2. Kultura limfocita periferne krvi i analiza hromozomskih aberacija.....	28
3.3. Tehnika inverznog DAPI bojenja i DAPI traka.....	29

3.4. Citogenetička analiza .....	29
3.5. Molekularno-citogenetička analiza hromozomskih prekida .....	30
3.6. Telomerni FISH.....	32
3.7. Sekvenciranje FANCD2 gena .....	33
3.7.1. Izolacija DNK.....	33
3.7.2. Odabir regiona i konstrukcija prajmera .....	33
3.7.3. Lančana reakcija polimerizacije .....	36
3.7.4. Gel elektroforeza .....	37
3.7.5. Prečišćavanje PCR produkata .....	38
3.7.6. Sekvenciranje i analiza rezultata .....	38
3.7.7. In-silico analiza .....	39
3.8. Statistička analiza .....	40
<b>4. Rezultati .....</b>	<b>41</b>
4.1. Analiza hromozomskih prekida u limfocitima periferne krvi.....	43
4.2. Molekularno-citogenetička karakterizacija FA-D2 hromozomskih prekida i poređenje sa regionima fragilnih mesta.....	47
4.3. Analiza učestalosti i strukture radijala i učešće telomera u njihovom nastanku .....	52
4.4. Analiza telomernih fuzija.....	55
4.4.1. Relativna kvantifikacija dužine telomera .....	58
4.5. Analiza mutacija u odabranim regionima gena FANCD2.....	61
4.5.1. Egzonske varijante.....	63
4.5.2. Intronske varijante .....	65
4.5.3. Distribucija varijanti gena FANCD2 među pacijentima .....	67
<b>5. Diskusija.....</b>	<b>70</b>
<b>6. Zaključci.....</b>	<b>94</b>
<b>7. Literatura .....</b>	<b>96</b>

## 1. Uvod

Danas se zna da se humani genom sadrži 3,2 milijarde parova nukleotida - linearnu sekvencu koja sadrži celokupni nasledni material jednog organizma (Iyer i sar., 2011; Marian, 2014). Transkripciono aktivni delovi DNK čine gene - osnovne materijalne i funkcionalne jedinice nasleđivanja. Geni sadrže kodirajuće sekvence, egzone, i nekodirajuće, introne, koji se nakon prepisivanja u informacionu RNK (primarni transkript, pre-iRNK) posebnim mehanizmima isecaju i egzoni spajaju. Ovakva "zrela" iRNK se u procesu translacije prevodi u aminokiselinsku sekvencu proteina. Prema podacima iz Human Genome Project-a, humani genom sadrži oko 25000 gena, čija veličina može varirati od nekoliko stotina do preko dva miliona baznih parova (bp) (Cooper i sar., 2010; International Human Genome Sequencing, 2004).

Promene u genetičkom materijalu koje dovode do strukturnih izmena u genu, a koje za posledicu imaju fenotipske promene predstavljaju genske mutacije (Cooper i sar., 2010; Griffiths i sar., 2000). Po mehanizmu nastanka razlikuju se delecije (gubitak nukleotida), duplikacije (udvajanje nukleotida), insercije (umetanje nukleotida) i supstitucije (zamene jednog nukleotida drugim). U zavisnosti od efekta koji imaju na funkciju proteina, mutacije se dele na *tihe* mutacije koje ne utiču na funkciju proteina (engl. silent); mutacije promene smisla koje dovode do zamene aminokiseline u proteinu i menjaju funkciju proteina (engl. missense), i mutacije koje dovode do prevremenog stvaranja stop kodona i prekida sinteze proteina (engl. nonsense). Posebno mesto zauzimaju mutacije splajsnog mesta (engl. splice-site mutations) koje dovode do poremećaja u obradi primarnog transkripta iRNK i mogu imati širok raspon efekata na funkciju proteina (Griffiths i sar., 2000; Vaz-Drago i sar., 2017).

Složenim procesima pakovanja celokupna DNK je upakovana u hromosome. Nemački citolog Walther Flemming prvi je 1882. godine primetio u ćelijama obojene strukture, kasnije nazvane hromozomi (od grčkih reči "chromo" – boja i "soma" – telo) (Flemming, 1965). Tjio i Levan su 1956. godine ustanovili da se u jedru somatskih ćelija čoveka nalazi 46 hromozoma (Tjio i Levan, 1956). Promene u broju ili građi hromozoma nazivaju se hromozomske aberacije: numeričke (promene u broju hromozoma) i strukturne (promene u građi hromozoma). Numeričke aberacije mogu biti

poliploidije (kada dolazi do promene broja haploidinih setova hromozoma) i aneuploidije (kada su prisutne promene u broju pojedinačnih hromozoma). Do sada je precizno definisano dvadeset različitih strukturnih hromozomskih aberacija u genomu čoveka (Simons i sar., 2013). Najčešće su delecije (gubitak delova hromozoma), duplikacije (udvajanje delova hromozoma), inverzije (okretanje delova hromozoma za 180°) i translokacije (razmene delova nehomologih hromozoma). Posebno mesto među strukturnim hromozomskim aberacijama zauzimaju fragilna mesta.

### **1.1. Fragilna mesta**

Fragilna mesta (engl. Fragile Sites, FS) predstavljaju specifične regione metafaznih hromozoma koji su skloni lezijama (engl. gapovima), suženjima ili prekidima. Citogenetički su vidljiva u posebnim uslovima kultivisanja (Simons i sar., 2013). Fragilna mesta opisana su na svim hromozomima, pa je i njihova nomenklatura u skladu sa lokalizacijom i redosledom otkrivanja (npr. FRA3B je drugo fragilno mesto otkriveno na hromozomu 3, FRAXA prvo otkriveno na X hromozomu itd.). Na osnovu njihove učestalosti u populaciji, kao i načina indukcije, FS se dele na česta i retka. Zajednička karakteristika i čestih i retkih FS je da je za njihovu citogenetičku ekspresiju neophodna specifična indukcija u toku kultivisanja ćelija, sa izuzetkom FRA16B i FRA17A za koja su opisani slučajevi spontane ekspresije (Sutherland i Baker, 2000). Retka fragilna mesta se uglavnom nasleđuju, za razliku od čestih koja se mogu naći kod svih osoba sa niskom učestalošću, a naročito su prisutna kod sindroma hromozomskih nestabilnosti kao što je Fankonijeva anemija (FA) (Lukusa i Fryns, 2008).

#### **1.1.1. Retka fragilna mesta**

Kao što i sam naziv kaže, retka fragilna mesta na hromozomima, RFS (engl. Rare Fragile Sites), su retko prisutna u opštoj populaciji (manje od 5%) (Lukusa i Fryns, 2008), nasleđuju se kodominantno, ali se mogu javiti i *de novo* (Sutherland i sar., 1985). U odnosu na način indukcije RFS mogu se klasifikovati u četiri grupe:



1. Folat senzitivna FS;
2. Distamicin A senzitivna FS;
3. Distamicin A/bromdeoksiuridin (BrdU) inducibilna FS i
4. BrdU inducibilna FS.

Najveći broj RFS, 24 od 31 RFS, su folat senzitivna FS (Lukusa i Fryns, 2008). Ovaj tip FS se eksprimira kada se ćelije kultivišu *in vitro* u medijumu bez folata ili u prisustvu inhibitora metabolizma folata (metotreksat), a predstavljaju regione ekspanzije CGG ili CCG trinukleotidnih ponovaka u blizini CpG ostrvaca, indukuju njihovu hipermetilaciju i posledično fragilnost (Ashley-Koch i sar., 1998; Schwartz i sar., 2005).

Kod svake naredne generacije rizik od nasleđivanja RFS se povećava. Ovakva "genetička anticipacija" je prvi put primećena kod sindroma fragilnog X (FRAXA fragilno mesto) i nazvana Šermanov paradox (Sherman i sar., 1984). U zdravoj populaciji broj trinukleotidnih ponovaka je ograničen (do 50 CGG ponovaka kod FRAXA), dok pojava velikog broja ponovaka (>200) dovodi do ekspresije fragilnog mesta (Schwartz i sar., 2005). Veći broj ponovaka zapravo ubrzava i uvećava njihovo dalje umnožavanje, bilo zbog proklizavanja DNK polimeraze, nejednakog krosing-overa ili nefunkcionalne reparacije pogrešno sparenih baza (engl. "mismatch repera") (Sutherland i Richards, 1999). U trenutku kada broj ponovaka predje kritični broj (60-230 za FRAXA) (Jin i Warren, 2000), nastaje tzv. "premutaciona faza" u kojoj još uvek nema citogenetičke ekspresije fragilnog mesta, ali CGG/CCG ponovci postaju izuzetno nestabilni i u narednoj generaciji dostižu kritičan broj (>230 za FRAXA), što posledično dovodi do ekspresije fragilnog mesta.

Citogenetičku ekspresiju nestabilnosti ovih regiona uslovljava nekoliko faktora: ekspanzija trinukleotidnih ponovaka na jednom DNK lancu dovodi do formiranja stabilnih alternativnih DNK struktura koje usporavaju dinamiku replikacije (Samadashwily i sar., 1997); replikacija se dodatno usporava i zbog hiperfleksibilnosti ponovljenih sekvenci, a elongacija trinukleotidnih ponovaka znatno smanjuje efikasnost formiranja nukleozoma *in vitro*, što se pojačava njihovom metilacijom (Wang i Griffith, 1996). Sve ovo dovodi do dekondezacije hromatina u ovim regionima, što se citogenetički manifestuje kao fragilno mesto.

Za razliku od folat senzitivnih FS, ne-folat senzitivna FS su indukovana distamicinom A i/ili bromdeoksiuridinom (BrdU), analogom timidina. Distamicin A i slične komponente kao što su netropsin i Hoechst 33258 se sa visokim afinitetom vezuju za DNK, naročito za AT bogate regione, dok se BrdU selektivno vezuje za DNK umesto pirimidinskih baza u toku sinteze DNK, što dovodi do usporavanja replikacije (Lukusa i Fryns, 2008). I za distamicin A i BrdU inducibilna fragilna mesta dokazana je slična molekularna osnova. Naime, analiza sekvenci kloniranih FS, FRA16B (16q22.1, distamicin A senzitivno) i FRA10A (10q25.2, BrdU inducibilno) pokazala je da se oba sastoje od velikog broja AT minisatelitnih ponovaka čiji broj može da dostigne i nekoliko kilobaznih parova (kbp) (Hewett i sar., 1998; Yu i sar., 1997). Oba fragilna mesta u osnovi imaju veliki broj AT minisatelitnih ponovaka (33 bp za FRA16B i 42 bp za FRA10A) koji se umnožavaju. Kada je broj ponovaka veći od 5 kbp dolazi do nastanka i citogenetičke ekspresije fragilnog mesta. AT minisatelitni ponovci imaju veliku sklonost ka formiranju DNK alternativnih struktura, usporavajući na taj način replikaciju DNK, koja se kod ovih FS dešava u kasnoj S ili G2 fazi ćelijskog ciklusa. Zastoj u replikaciji dovodi do nekompletne kondenzacije hromozoma bilo zbog ometanja kondenzacije od strane replikacione mašinerije koja je još uvek aktivna u ovim kasno-replikujućim regionima, ili zbog toga što ovi regioni nereplikovani ulaze u G2 fazu, nakon što je signalizacija za kondenzaciju već završena. Nekompletna kondenzacija je u svakom slučaju preduslov za nastanak nestabilnog hromatina u ovim regionima, što se manifestuje pojavom lezija i prekida na metafaznim hromozomima (Schwartz i sar., 2005).

### **1.1.2. Česta fragilna mesta**

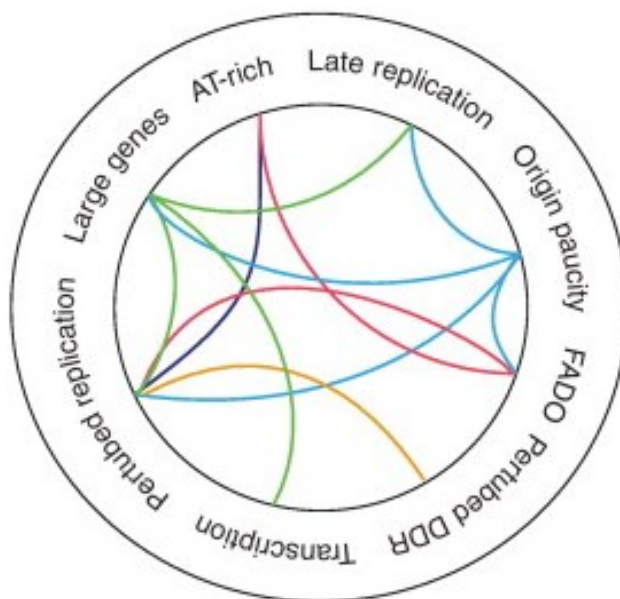
Česta fragilna mesta, CFS (engl. Common Fragile Sites), predstavljaju velike (<1Mb - 10Mb), evoluciono konzervirane, kasnoreplikujuće hromozomske regione koji su skloni dvolančanim prekidima DNK, DSBs (engl. Double-Strand Breaks). Mogu se naći sa različitom učestalošću na metafaznim hromozomima svih osoba. Do sada je opisano više od 230 čestih fragilnih mesta (Mrasek i sar., 2010). U odnosu na način indukcije *in vitro*, CFS se mogu klasifikovati u nekoliko grupa:

1. Afidikolin indukovana CFS,
2. CFS koja su indukovana nedostatkom ćelijskog pula nukleotida (dNTPs),
3. 5-azacitidin indukovana CFS i
4. BrdU indukovana CFS.

Najveći broj CFS *in vitro* indukovani su afidikolinom, inhibitorom DNK polimeraze  $\alpha$ ,  $\delta$  i  $\epsilon$ , koji u maloj koncentraciji ne dovodi do zastoja ćelijskog rasta, ali usporava replikaciju DNK (Glover i sar., 1984). Smanjena ćelijska rezerva dNTP-a, naročito u prisustvu inhibitora folata, takođe može dovesti do njihove indukcije (Barbi i sar., 1984; Glover i sar., 2017). CFS mogu biti indukovani i 5-azacitidinom, analogom citozina koji se ugrađuje u DNK u toku replikacije, kao i bromdeoksiuridinom, analogom purina, ali se ova fragilna mesta mapiraju na drugim hromozomskim regionima u odnosu na retka fragilna mesta indukovana BrdU (Sutherland i sar., 1985). Pored toga, izvesni dijetetski i faktori spoljne sredine kao što su kofein, cigarete i hipoksija takođe mogu doprineti njihovoj ekspresiji (Dillon i sar., 2010).

#### ***1.1.2.1. Mehanizmi nestabilnosti čestih fragilnih mesta***

Veliki broj istraživanja pokazao je da su, bez obzira na način indukcije, u uslovima replikativnog stresa CFS predilekciona mesta u genomu za razmenu sestrinskih hromatida, translokacije, delecije i kompleksne hromozomske rearanžmane, genske amplifikacije i virusnu integraciju, naročito onkogenih virusa (Arlt i sar., 2006). Zbog svega toga smatra se da imaju veliku ulogu u nastanku hromozomske nestabilnosti koja prethodi procesima kancerogeneze (Ma i sar., 2012). Njihova fragilnost najverovatnije je posledica ulaska u mitozu pre završene replikacije, ali tačan mehanizam odgovoran za odloženu replikaciju nije do kraja razjašnjen (Le Tallec i sar., 2014). Do sada je predloženo nekoliko hipoteza koje bi mogle i objasniti njihovu fragilnost (Slika 1.1).

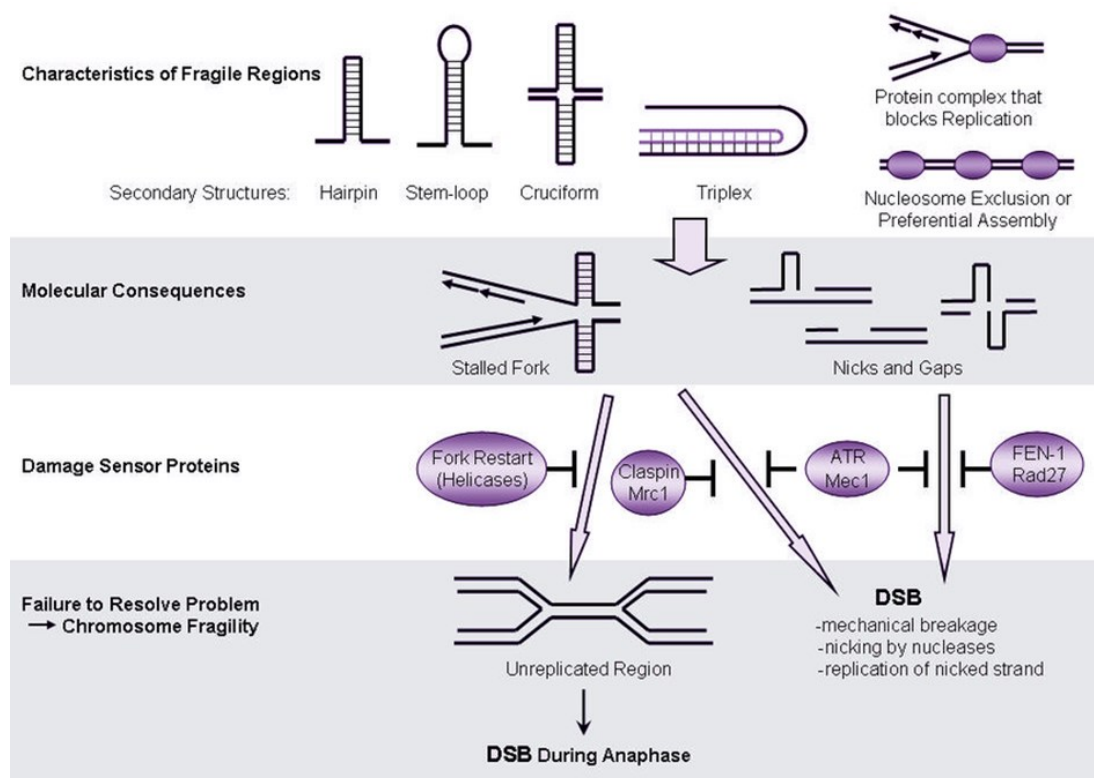


**Slika 1.1.** Faktori koji utiču na nestabilnost CFS i interakcije među njima (prikazane linijama) – DNK struktura (AT sekvence); kasna replikacija; proređenost replikacionih mesta; nemogućnost aktivacije dormantnih replikacionih mesta (engl. Failure of Activation Dormant Origins, FADO); poremećaj popravke DNK oštećenja (engl. DNA Damage Repair, DDR); transkripcija; prisustvo velikih gena. Preuzeto iz Ozeri-Galai i sar., 2012.

### 1.1.2.2. Česta fragilna mesta i DNK struktura

Analize molekularno kloniranih CFS nisu pokazale ekspanziju dinukleotidnih ili trinukleotidnih mini- i mikrosatelitnih ponovaka kao kod retkih FS, ali je utvrđeno da CFS sadrže visoko fleksibilne AT-bogate sekvence (hiperfleksibilne grupacije), koje imaju visok potencijal da formiraju DNK alternativne strukture (Slika 1.2.) kao što su Z-DNK, forma ukosnice, krstaste forme, tripleks i kvadripleks DNK (Dillon i sar., 2013; Schwartz i sar., 2005). Hiperfleksibilne grupacije su prepreka za replikativnu viljušku jer usporavaju aktivnost topoizomeraze i umanjuju efikasnost polimeraze (Thys i sar., 2015). Zanimljivo je i da se CFS citogenetički mapiraju u R-trakama (koje su inače bogate CG sekvencama), a sadrže hiperfleksibilne AT bogate sekvence koje su karakteristika G-traka. Ova nesrazmera između sekvenci CFS i njihovog neposrednog

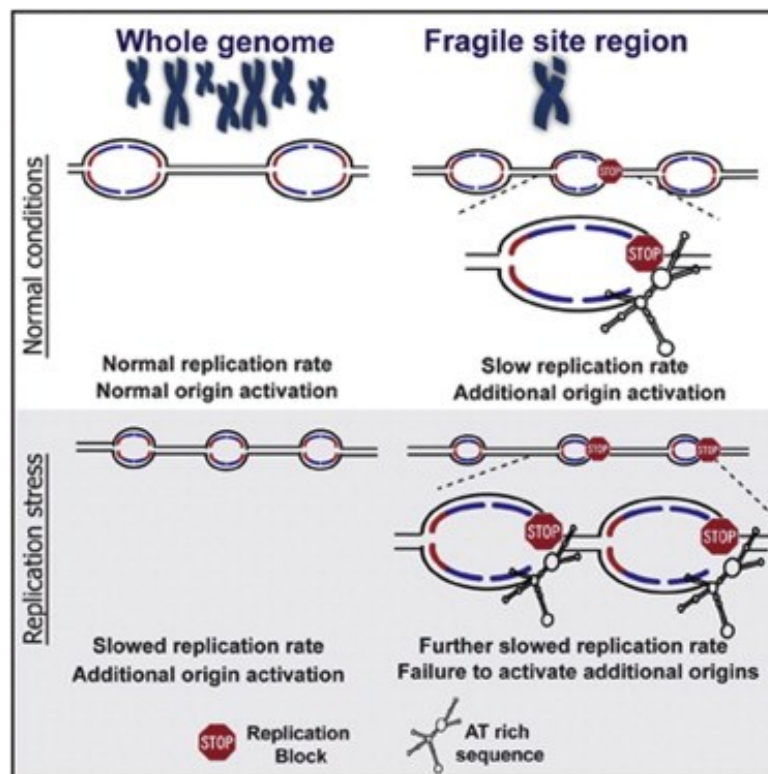
okruženja takođe može uticati na kontrolu DNK replikacije i kondenzacije hromatina i doprineti njihovoj nestabilnosti (Mishmar i sar., 1999). *In-silico* analiza hiperfleksibilnih grupacija pokazala je da oni veoma lako formiraju alternativne strukture koje su stabilnije od nasumičnih sekvenci iste dužine i kompozicije (Zlotorynski i sar., 2003), što takođe usporava replikaciju. Kada se ćelije izlože niskim dozama afidikolina, dolazi do razdvajanja kompleksa DNK helikaze i topoizomeraze od replikativne polimeraze što dovodi do rastezanja jednolančane DNK i formiranja DNK alternativnih struktura (Durkin i Glover, 2007). Ukoliko se ove strukture ne poprave, na tim mestima u anafazi ćelijskog ciklusa nastaju dvolančani prekidi, DSBs i dolazi do ekspresije fragilnih mesta (Freudenreich, 2007). S druge strane, u humanom genomu postoji veliki broj AT bogatih regiona koji nisu CFS, što znači da DNK struktura nije dovoljna za nastanak CFS, već doprinosi njihovoj nestabilnosti (Glover i sar., 2017).



**Slika 1.2.** Alternativne DNK strukture (forma ukosnice, petlje i krstaste forme) dovode do zastoja replikativne viljuške, ulaska nereplikovanih regiona u mitozu i nastanka fragilnih mesta. Preuzeto iz Freudenreich, 2007.

### ***1.1.2.3. Česta fragilna mesta i dinamika replikacije***

Replikacija CFS odvija se u kasnoj S fazi ćelijskog ciklusa ili započne sredinom S faze, ali je značajno prolongirana, pa se ovi hromozomski regioni označavaju kao kasno-replikujući regioni. U uslovima replikativnog stresa, CFS ostaju nereplikovana u G2 fazi, pa čak kao takva ulaze u mitozu, što za krajnji ishod ima njihovu nestabilnost (Debatisse i sar., 2012). Ispitivanja dinamike replikacije u regionima najčešćih CFS (FRA3B (3p14.2), FRA16D (16q23.2) i FRA6E (6q26)) pokazala su da nema razlike u dinamici replikacije u odnosu na ostatak genoma u netretiranim limfocitima (Letessier i sar., 2011; Palakodeti i sar., 2004; Palumbo i sar., 2010). Tretman afidikolinom značajno usporava replikaciju, takođe bez razlike u odnosu na druge regione u genomu. Mapiranje mesta inicijacije replikacije pokazalo je da ih u fragilnim regionima ima značajno manje, dok su mesta terminacije replikacije normalno zastupljena, ali se nakon tretmana afidikolinom i ona značajno proređuju (Letessier i sar., 2011). Stabilnost fragilnih regiona se u netretiranim ćelijama održava aktivacijom dormantnih mesta replikacije, zahvaljujući kojima se replikacija završava pravovremeno, pre ulaska u mitozu (Slika 1.3.). U uslovima replikativnog stresa nema dodatnih dormantnih mesta koja bi se aktivirala (Ozeri-Galai i sar., 2012), replikaciona viljuška dugo putuje, zbog čega nereplikovani regioni ulaze u mitozu indukujući prekide i ekspresiju CFS (Le Tallec i sar., 2014).



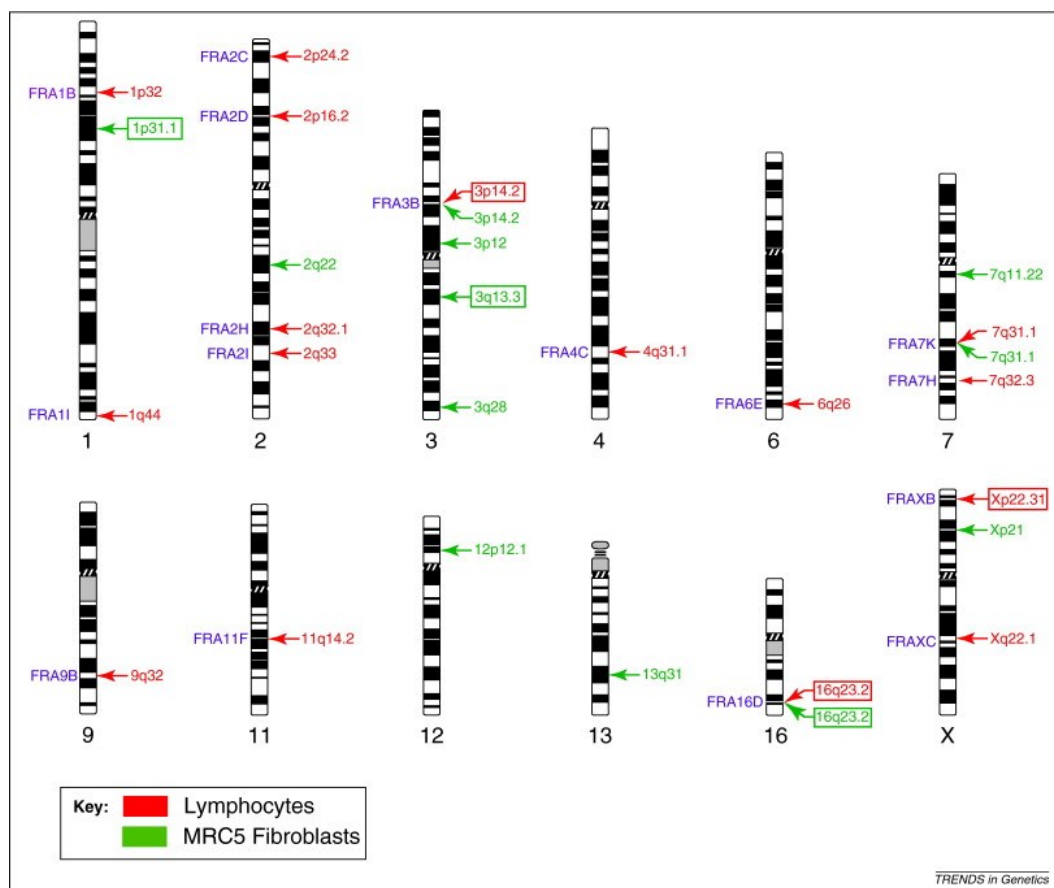
**Slika 1.3.** Usporena replikacija i nemogućnost aktivacije dormantnih mesta replikacije u regionima CFS. Preuzeto iz Ozeri-Galai i sar., 2011.

#### 1.1.2.4. Epigenetika čestih fragilnih mesta – tkivna zavisnost i struktura hromatina

Mapiranje fragilnih mesta (u limfocitima, fibroblastima, epitelijalnim ćelijama dojke i kolona i eritroidnim ćelijama) pokazalo je da je većina mapiranih FS prisutna u svim tipovima ćelija, ali da stepen nestabilnosti značajno varira u zavisnosti od tipa ćelija (Le Tallec i sar., 2013), što znači da samo određeni broj regiona u određenom tipu ćelija može postati nestabilan (Slika 1.4.). Tako, na primer, FRA3B i FRA16D su najčešća fragilna mesta u limfocitima periferne krvi, dok su u fibroblastima ovi regioni stabilni, a FRA1L i FRA3L pokazuju najveći stepen nestabilnosti. Istraživanje gustine inicijacionih mesta replikacije CFS u različitim tipovima ćelija pokazala je da se u fibroblastima njihova gustina u FRA3B ne razlikuje od ostatka genoma, dok su u FRA1L i FRA3L fragilnim mestima prisutni veliki regioni sa proređenim inicijacionim mestima, za razliku od limfocita gde su stabilni (Letessier i sar., 2011). Tkivna

zavisnost CFS pokazuje da DNK struktura *per se* ne može dovesti do njihove nestabilnosti (Debatisse i sar., 2012), već da dinamika replikacije koja je drugačija u različitim tipovima ćelija ima ključnu ulogu u nastanku nestabilnosti.

U regionima fragilnih mesta zapažene su epigenetičke modifikacije histona, kao što su metilacija i acetilacija (Georgakilas i sar., 2014). Inhibicija histon deacetilaze i DNK metilacije smanjuje kondenzaciju hromatina i ekspresiju CFS (Jiang i sar., 2009), što pokazuje da stepen kondenzacije hromatina ima značajnu ulogu u nastanku CFS. Kompaktan hromatin sprečava vezivanje replikativnog kompleksa za DNK i onemogućava efikasnu popravku DNK oštećenja (Cann i Dellaire, 2011; Iizuka i sar., 2006). Međutim, kako kompaktan hromatin nije karakteristika svih CFS, ne može se smatrati glavnim faktorom u nastanku fragilnih mesta, već samo može doprineti njihovoj nestabilnosti (Ozeri-Galai i sar., 2014).



**Slika 1.4.** Ekspresija različitih CFS u različitim tipovima ćelija. Crvene strelice pokazuju najčešće CFS u limfocitima, a zelene u fibroblastima. Preuzeto iz Debatisse i sar., 2012.

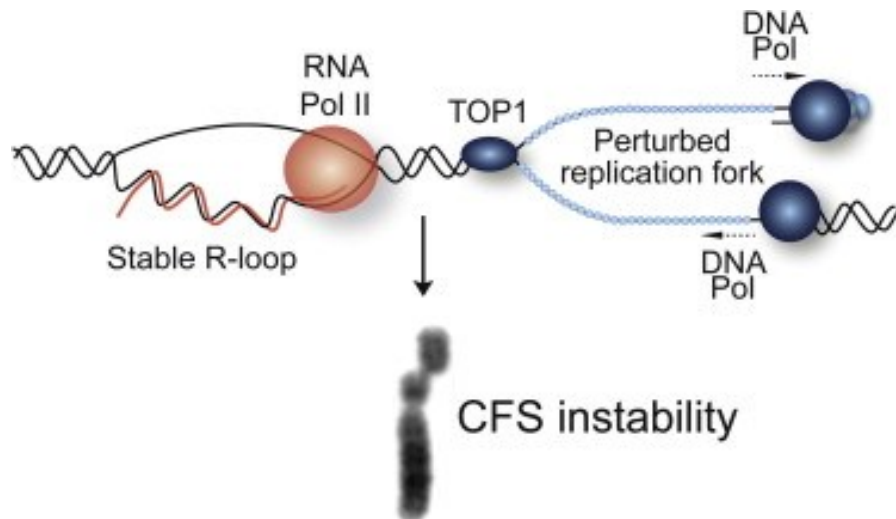


### 1.1.2.5. Česta fragilna mesta i geni

CFS su evoluciono konzervirana među vrstama (Ruiz-Herrera i sar., 2005), pa se, s obzirom na to da predstavljaju jedan od glavnih uzroka genomske nestabilnosti, postavlja pitanje kako ih evolucija nije eliminisala. Iako se smatraju *in vitro* fenomenom, češće su prisutna u regionima koji su uključeni u hromozomske rearanžmane kod kičmenjaka, što zajedno sugerise da su u toku evolucije ovi regioni bili skloni i *in vivo* prekidima, kao i da mogu imati značajnu ulogu u organizaciji genoma (Ruiz-Herrera i sar., 2006). CFS nisu samo strukturni domeni, već predstavljaju funkcionalne jedinice. U regionima CFS nalaze se veliki geni, od 600 kb do >2Mb, pa tako između 80 i 100% humanih CFS, u zavisnosti od tipa ćelija, kao i 100% CFS embrionalnih ćelija miša sadrži gene duže od 300 kb (Helmrich i sar., 2006; Le Tallec i sar., 2013), što je i više od 15 puta duže od prosečne dužine humanih gena. Evoluciona konzerviranost CFS u kojima se nalaze ovi geni, ukazuje na njihovu značajnu ulogu u održavanju ćelijske homeostaze. Približno polovina rekurentnih fokalnih delecija u humanim kancerima vodi poreklo od CFS koja su nestabilna u ćelijama od kojih kancer vodi poreklo (Bignell i sar., 2010). Potvrđeno je da većina gena koja čine pul CFS pripadaju proto-onkogenima i tumor-supresorskim genima (Miron i sar., 2015). Tako se, na primer, FRA3B (3p14.2) mapira u regionu tumor-supresorskog gena *FHIT* (engl. Fragile Histidine Triad) koji je često deletiran u gastrointestinalnim kancerima, kancerima dojke, pluća, cerviksa i B-ćelijskog limfoma (Iliopoulos i sar., 2006). *FHIT* je veliki gen (1.5 Mb) i predstavlja mesto integracije humanog papiloma virusa, kao i mesto translokacije t(3;8)(p14.2;q24) kod familijarnog karcinoma bubrega (Pekarsky i sar., 2002). U regionu drugog najčešćeg CFS, FRA16D (16q23.2) nalazi se tumor-supresorski gen *WWOX* (engl. WW Domain Containing Oxidoreductase) dužine oko 1 Mb. Fragilno mesto FRA16D je povezano sa gubitkom heterozigotnosti, LOH (engl. Loss Of Heterozygosity) kod kancera dojke, prostate, pluća, skvamocelularnog karcinoma ezofagusa i multiplog mijeloma. Homozigotne delecije *WWOX*-a detektovane su kod različitih adenokarcinoma, dok se kod multiplog mijeloma mesta translokacije mapiraju u ovom region (Iliopoulos i sar., 2006; O'keefe i Richards, 2006).

### ***1.1.2.6. Česta fragilna mesta i transkripcija***

Skorija istraživanja fragilnih mesta u čijim regionima su prisutni veliki geni pokazala su da postoji korelacija između njihove nestabilnosti i transkripcije, što govori u prilog teoriji o tkivnoj-zavisnosti CFS (Helmrich i sar., 2011). Transkripcija velikih gena, naročito onih dužih od 800 kb, je dug proces i potrebno je više od jednog ćelijskog ciklusa da se završi, zbog čega se dešava da transkripciona i replikaciona mašinerija istovremeno putuju duž istog lanca. Nestabilnost nastaje kada dođe do kolizije transkripcije i replikacije i nastanka R-petlji (Slika 1.5.), struktura koje formira nascentni transkript sa DNK lancem i replikacionom viljuškom i koji predstavljaju veliku pretnju genomske stabilnosti (Aguilera i Garcia-Muse, 2012). Istraživanja ipak nisu uspjela da dokažu vezu između transkripcije velikih gena i nestabilnosti regiona u kojem se nalaze, sugerirajući da je za ispoljavanje nestabilnosti CFS formacija R-petlji nedovoljna, ali joj može doprineti u uslovima replikativnog stresa (Le Tallec i sar., 2013). Odgovor na ove pretpostavke dali su nedavno Wilson i saradnici (Wilson i sar., 2015). Oni su pokazali na nekoliko eksperimentalnih modela da se CFS javljaju u istim hromozomskim regionima kao i varijante broja kopija - CNV (engl. Copy Number Variants) u istoj ćelijskoj liniji, kao i da ti regioni odgovaraju najvećim aktivnim transkripcionim jedinicama u datoj ćelijskoj liniji. Pored toga, dokazali su i da veličina transkripcionih jedinica pozitivno koreliše sa vremenom replikacije u svim genima, pri čemu je u sredini velikih transkripcionih jedinica zabeležen najveći zastoj replikativne viljuške, koji dovodi do ekstremne nestabilnosti regiona CFS u uslovima replikativnog stresa (Wilson i sar., 2015).

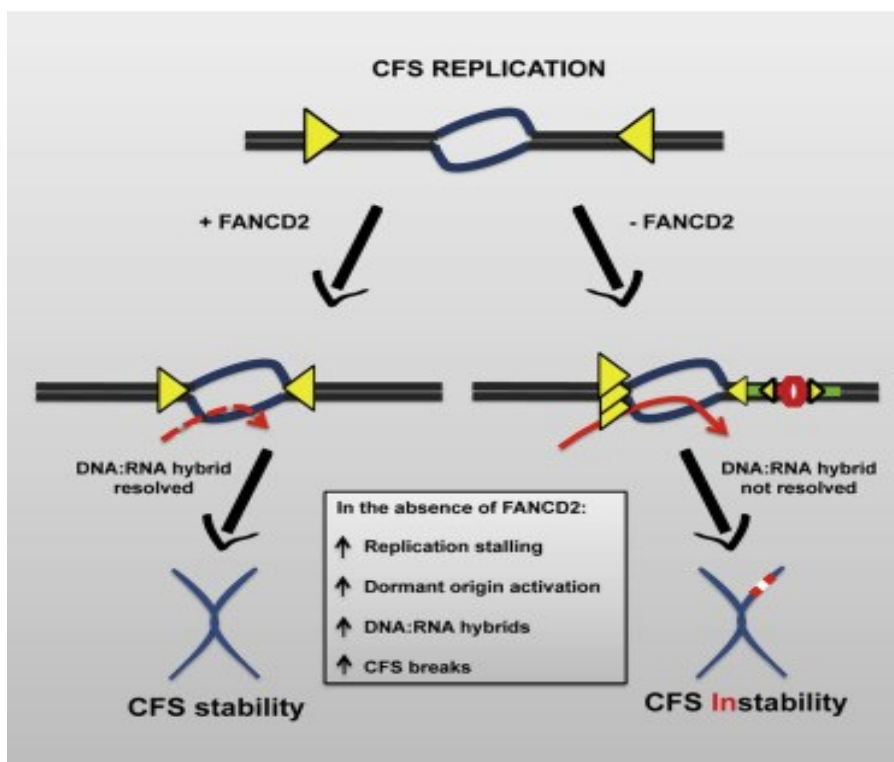


**Slika 1.5.** Nastanak stabilnih R-petlji između primarnog RNK transkripta i DNK lanca usled istovremenog putovanja transkripcione i replikacione mašinerije duž istog lanca DNK. Preuzeto iz Helmrich i sar., 2011.

#### 1.1.2.7. Česta fragilna mesta i proteini popravke DNK oštećenja

Veliki broj proteina odgovornih za popravku DNK oštećenja, DDR (engl. DNA Damage Repair) proteini, uključeni su u očuvanje stabilnosti CFS, pre svega ATR, CHK1, BRCA1, RAD51, Claspin, BLM i FANC proteini (Mazouzi i sar., 2014). Pokazano je da deplecija bilo kojeg od ovih proteina dovodi do ekspresije CFS i u uslovima normalne replikacije, a pojačava se u uslovima replikativnog stresa. Ovo je naročito izraženo kod gubitka ATR-a, proteina koji se aktivira u odgovoru na dvolančane prekide DNK (Casper i sar., 2002). Mada još uvek nije u potpunosti razjašnjeno na koji način nedostatak ovih proteina dovodi do ekspresije fragilnih mesta, pretpostavlja se da je to posledica njihove uloge u DDR-u i direktnog efekta na brzinu replikacione viljuške (Koundrioukoff i sar., 2013). Kako se većina CFS ispoljava nakon tretmana afidikolinom, uloga homologe rekombinacije (HR), jednog od puteva popravke DNK oštećenja, u odgovoru na dvolančane prekide nastale u uslovima replikativnog stresa je od velikog značaja. Proteini FA/BRCA signalnog puta, naročito FANCD2 protein ima značajnu ulogu u homologoj rekombinaciji i regulaciji stabilnosti fragilnih mesta (Durkin i Glover, 2007; Howlett i sar., 2005). U odgovoru na DNK

oštećenja, kao što su tretman afidikolinom i hidroksiurejom, u S fazi ćelijskog ciklusa dolazi do aktivacije FA/BRCA signalnog puta monoubikvitinacijom FANCD2 proteina – centralnog proteina ovog puta (FANCD2-Ub). FANCD2-Ub se potom prenosi u jedro, aktivira FAN1 nukleazu i sa proteinima DNK reparacionog mehanizma, BRCA1 i RAD51, uklanja zaglavljenu replikativnu viljušku i ponovo uspostavlja replikaciju (Lachaud i sar., 2016). Pored toga, FANCD2 je neophodan i za uklanjanje R-petlji i aktivaciju dormantnih mesta replikacije, što sve zajedno olakšava replikaciju i sprečava nastanak hromozomskih abnormalnosti (Slika 1.6.) (Madireddy i sar., 2016).



**Slika 1.6.** Uloga FANCD2 proteina u očuvanju stabilnosti CFS. Preuzeto iz Madireddy i sar., 2016.

#### 1.1.2.8. Telomere i česta fragilna mesta

Pored opisanih CFS koja se tipično nalaze u intersticijalnim delovima hromozoma, zanimljivo je da se i krajevi hromozoma, telomere, u uslovima replikativnog stresa ponašaju kao fragilna mesta (Sfeir i sar., 2009). Telomere su

nukleoproteinske strukture sastavljene od kratkih palindromskih DNK ponovaka (5'-TTAGGG-3') i proteina šelterina (TRF1, TRF2, POT1, ACD, TIN2 i RAP1) (Sarkar i Liu, 2016). Glavna uloga šelterina je u regrutovanju DDR proteina i sprečavanju istih da telomere prepoznaju kao dvolančane prekide, kako bi zaštitili krajeve hromozoma i sprečili nastanak telomernih fuzija (Holohan i sar., 2014). Poremećaji u održavanju homeostaze telomera mogu dovesti do aktivacije DDR proteina, zastoja u replikaciji i genomske nestabilnosti.

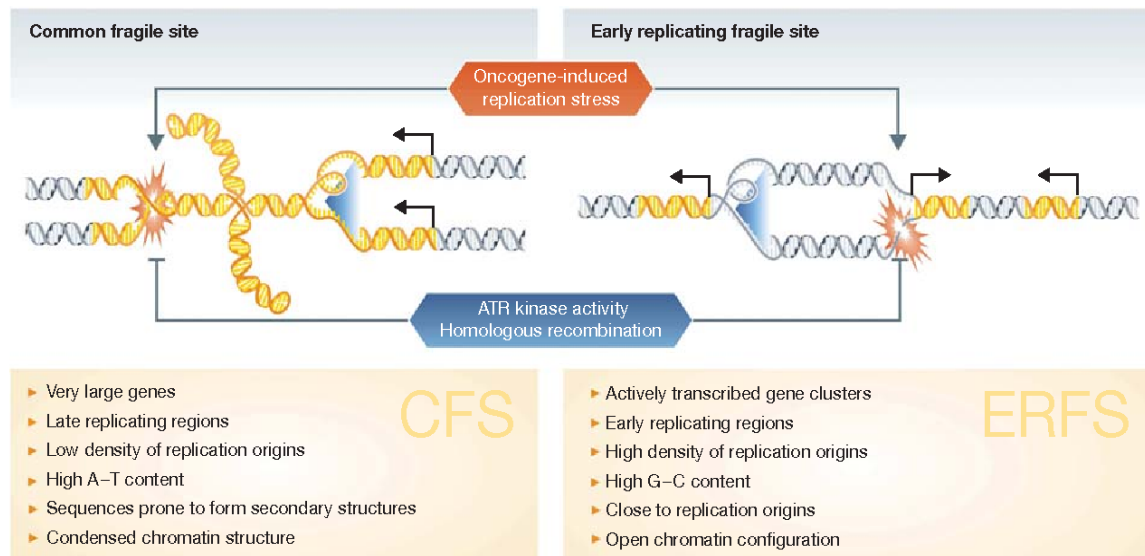
Zahvaljujući specifičnoj strukturi i jedinstvenoj građi (engl. T-loop konfiguracija), vezanim proteinima i sklonosti za formiranje alternativnih DNK struktura (G-kvadripleksi), telomere predstavljaju stalni izazov za DNK replikativnu mašineriju i mehanizme reparacije, zbog čega u uslovima replikativnog stresa ispoljavaju fragilni fenotip (Doksani i De Lange, 2014; Sfeir i sar., 2009).

Pored šelterina, ulogu u održavanju telomera imaju i akcesorni proteini koji su uključeni u DDR, kao što su proteini FA/BRCA signalnog puta, naročito FANCD2 (Joksic i sar., 2012; Sarkar i Liu, 2016). Deplecija FANCD2 proteina dovodi do porasta ekstrahromozomskih telomernih signala i nastanka fragilnih telomera (Root i sar., 2016).

### ***1.1.3. Rano replikujuća fragilna mesta***

Pored tradicionalne podele fragilnih mesta na česta i retka, nedavno je otkrivena nova klasa FS indukovanih hidroksiurejom, rano replikujuća fragilna mesta, ERFS (engl. Early Replicating Fragile Sites) (Barlow i sar., 2013). Slično čestim fragilnim mestima, ERFS su osetljiva na replikativni stres, ali se za razliku od njih replikuju u ranoj S fazi ćelijskog ciklusa i imaju veliku gustinu mesta replikacije. Bogata su dugim i kratkim repetitivnim sekvencama, imaju visok sadržaj GC nukleotida i kolokalizuju sa transkripciono aktivnim klasterima gena (Slika 1.7.). Nestabilnost i čestih i rano replikujućih fragilnih mesta se pojačava inhibicijom ATR-a, locirana su u transkripciono aktivnim regionima i predstavljaju mesta

hromozomskih rearanžmana, pa se pretpostavlja da su isti mehanizmi odgovorni za njihovu fragilnost (Georgakilas i sar., 2014; Oestergaard i Lisby, 2017).



**Slika 1.7.** Razlika između čestih i rano replikujućih fragilnih mesta. Preuzeto iz Mortusewicz i sar., 2013.

### 1.1.4. Klinički značaj fragilnih mesta

Iako je do danas opisano 230 CFS, svega 19 je klonirano i molekularno okarakterisano (Ma i sar., 2012). Pored najčešćih i najviše proučavanih FRA3B i FRA16D (Ried i sar., 2000; Zimonjic i sar., 1997) klonirana su i FRA2G (Limongi i sar., 2003), FRA2H (Brueckner i sar., 2012), FRA4F (Rozier i sar., 2004), FRA6E (Denison i sar., 2003), FRA6F (Morelli i sar., 2002), FRA7B (Bosco i sar., 2010), FRA7G (Huang i sar., 1998; Huang i sar., 1999; Miller i sar., 2006), FRA7I (Ciullo i sar., 2002), FRA7K (Helmrich i sar., 2007), FRA8C (Ferber i sar., 2004), FRA9E (Callahan i sar., 2003), FRA10F (Li i sar., 2010), FRA10G (Gandhi i sar., 2006; Gandhi i sar., 2010), FRAXB (Arlt i sar., 2002) and FRAXC (Mcavoy i sar., 2007). Detaljna istraživanja CFS fokusirana su na pronalaženje gena u fragilnim regionima i utvrđivanje njihove uloge u procesima kancerogeneze.

Dva tumor supresorska gena *FHIT* i *WWOX* su locirana unutar FRA3B i FRA16D. Hromozomski prekidi u FRA3B regionu, gubitak heterozigotnosti (LOH) i

homozigotne delecije *FHIT* gena utvrđene su kod tumora pluća, bubrega, dojke, digestivnog trakta i limfoma (Michael i sar., 1997; Mimori i sar., 1999; Roy i sar., 2011), dok je LOH u regionu FRA16D povezan sa limfomima, karcinomima dojke, pluća, ezofagusa, želuca i pankreasa (Kuroki i sar., 2002; Ried i sar., 2000).

Hromozomski prekidi, u regionu FRA7G (7q31.2) lokusu receptorske kinaze (*MET* onkogen) zapažene su kod kancera želuca, ezofagusa i glioblastoma (Miller i sar., 2006). FRA7G takođe je LOH mesto u karcinomima dojke, jajnika i prostate (Huang i sar., 1999).

Lociranost tumor supresorskih gena unutar regiona CFS i povećana lomljivost hromozoma u regionima CFS kod različitih kancera utvrđena je i kod drugih kloniranih fragilnih mesta: *PAPPA* gen (engl. Pregnancy-Associated Plasma Protein A) lociran u regionu FRA9E (9q32), *PARK2* (engl. Parkinson Disease 2) koji je lociran u regionu FRA6E (6q26), a oba gena su kandidat tumor supresorski geni. Dokazan je gubitak heterozigotnosti i gubitak ekspresije navedenih gena u ćelijama karcinoma jajnika (Callahan i sar., 2003; Denison i sar., 2003). FRA10G (10q11) prekidi dovode do nastanka onkogenih *RET/PTC* (aktivacija *RET* protoonkogen) amplifikacija i rearanžmana koji su česti kod papilarnog tiroidnog karcinoma, PTC (Gandhi i sar., 2010). FRA8C (8q24) je često mesto integracije humanog papiloma virusa (HPV) kod tumora grlića materice. U ovom regionu se nalazi i *MYC* onkogen koji je često amplifikovan ili translociran u različitim tumorima (Ferber i sar., 2004; Ferber i sar., 2003). *DMD* gen (engl. Duchenne Muscular Dystrophy, Dystrophin) se nalazi u regionu FRAXC (Xq22.1) i smanjeno je eksprimiran u tumorima mozga (Mcavoy i sar., 2007).

Iako je kloniranje CFS pokazalo da su u ovim regionima uglavnom prisutni protoonkogeni ili tumor supresorski geni čije su delecije, translokacije i amplifikacije ključne u procesima kancerogeneze, protein-kodirajući geni ne moraju uvek biti prisutni u fragilnim mestima koja su povezana sa kancerima. Mapiranje fragilnog mesta FRA2H (2q32) koje je jedno od najaktivnijih CFS u humanom genomu i eksprimira se kod neuroblastoma, karcinoma kolona i dojke, pokazalo je da se ovo fragilno mesto prostire na oko 530 kbp, ali ne sadrži aktivne protein-kodirajuće gene, već gen koji se prepisuje u veliku nekodirajuću RNK čija funkcija još uvek nije otkrivena (Brueckner i sar., 2012).

## 1.2. Fankonijeva anemija

Fankonijeva anemija (FA) je retko nasledno, genetički heterogeno oboljenje koje pripada grupi sindroma hromozomskih nestabilnosti. Bolest je prvi put opisao švajcarski pedijatar Gvido Fankoni 1927. godine kao hereditarnu pancitopeniju praćenu niskim rastom, hiperpigmentacijom i makrocitozom (Fanconi, 1967). Fankonijevu anemiju klinički karakteriše široki spektar kongenitalnih anomalija (Mehta i Tolar, 2002-2018), predispozicija ka razvoju maligniteta, i progresivna pancitopenija koja dovodi do insuficijencije koštane srži (Soulier, 2011).

Učestalost Fankonijeve anemije kreće se od 1/200000 do 1/400000 u većini populacija, veća učestalost se sreće kod Aškenazi Jevreja, 1/30000 i Afrikanaca, 1/22000 (Barankin i sar., 2005; Mathew, 2006; Tipping i sar., 2001).

Bolest nastaje kao posledica mutacije u genima (*FANC* geni) koji kodiraju proteine FA/BRCA signalnog puta (FANC proteini). FA/BRCA signalni put ima značajnu ulogu u odgovoru na oštećenja DNK, održavanju homeostaze hematopoetskog tkiva, razvoju i diferencijaciji krvnih ćelija (Wang i Gautier, 2010; Yung i sar., 2013). Nasleđuje se X-vezano recesivno (FA-B komplementaciona grupa) i autozomno-recesivno (sve ostale komplementacione grupe od FA-A do FA-U). Mutacija u bilo kojem od do sada 19 opisanih FA gena dovodi do nastanka odgovarajuće komplementacione grupe Fankonijeve anemije (Mehta i Tolar, 2002-2018). Najčešća komplementaciona grupa u Srbiji je FA-D2 (Vujic i sar., 2014). Za razliku od ostalih komplementacionih grupa kod FA-D2 pacijenata prisutne su teže kongenitalne anomalije i ranija pojava hematoloških komplikacija. U opsežnom istraživanju FA-D2 Kalb-a i saradnika nije zabeležen nijedan pacijent bez fenotipskih manifestacija bolesti, dok je procenat FA pacijenata bez malformacija generalno procenjen na skoro 30% (Kalb i sar., 2007; Tischkowitz i Dokal, 2004).



### **1.2.1. FA ćelijski fenotip**

Osnovna karakteristika FA ćelijskog fenotipa je povećan broj spontanih i indukovanih hromozomskih prekida. FA ćelije pokazuju hipersenzitivnost na dejstvo DNK alkilirajućih agenasa (kao što su diepoksibutan (DEB) i mitomicin C (MMC)), povećavajući učestalost hromozomskih prekida što se koristi u dijagnostici bolesti (Auerbach, 2009). Kada se FA ćelije *in vitro* izlože ovim agensima dolazi do porasta učestalosti hromozomskih prekida i formiranja radijalnih hromozomskih struktura (tri i kvadri-radijala, složenih radijala), zastoja u G2/M fazi ćelijskog ciklusa, smanjenog ćelijskog preživljavanja i ubrzanog skraćivanja telomera (Joksic i sar., 2012). Iz tog razloga *in vitro* DEB-test se koristi kao rutinska metoda u diferencijalnoj dijagnozi Fankonijeve anemije. Nedostatak testa je što i druge bolesti hromozomskih nestabilnosti (Nijmegen breakage sindrom, Ataksija telangiektazija, Blumov sindrom i druge) pokazuju veću učestalost hromozomskih i hromatidnih prekida u odgovoru na alkilirajuće agense (Nakanishi i sar., 2002). Zbog nespecifičnosti DEB-testa u diferencijalnoj dijagnostici FA, a različitih terapijskih pristupa i potrebom za što ranijim lečenjem, od velikog su značaja dodatne metode za dijagnostiku FA ćelijskog fenotipa, poput analize ćelijskog ciklusa protočnom citometrijom nakon tretmana DEB-om (Seyschab i sar., 1995), utvrđivanje komplementacionih grupa imunoblotingom (Shimamura i D'andrea, 2003) i određivanje mutacija u FA genima (Ameziane i sar., 2012; Park i sar., 2015).

### **1.2.2. Značaj ispitivanja FA hromozomskih prekida, telomera i radijalnih hromozomskih struktura**

Kako je hromozomska nestabilnost, jedna od glavnih ćelijskih obeležja FA, to Fankonijevu anemiju čini pogodnim model sistemom za proučavanje radijala i hromozomskih prekida. Radijali su hromozomske strukture karakteristične za Fankonijevu anemiju i predstavljaju osnovu dijagnostičkog testiranja FA (Kuhn i Therman, 1982; Owen i sar., 2014). Pojava spontanih radijala čija se učestalost povećava u odgovoru na alkilirajuće agense tipična je za FA ćelije (Owen i sar., 2014).

U zavisnosti od njihovog izgleda i broja hromozoma uključenih u njihov nastanak klasifikuju se na triradijale, kvadiradijale i multiradijale (složene radijale) (Simons i sar., 2013). Iako postoji nekoliko predloženih načina, tačan mehanizam njihovog nastanka još uvek nije utvrđen.

Dosadašnja istraživanja su pokazala da su kod pacijenata FA-A i FA-C komplementacione grupe hromozomski prekidi locirani u regionima CFS (Schoder i sar., 2010), dok za ostale komplementacione grupe, uključujući i FA-D2, ovakva istraživanja do sada nisu sprovedena. Kako su FA pacijenti skloni razvoju malignih tumora, molekularna karakterizacija FA-D2 hromozomskih prekida i korelacija sa CFS može da bude od prediktivnog značaja za tok bolesti. Pored velikog broja hromozomskih i hromatidnih prekida lociranih u CFS regionima, kod FA pacijenata i telomerni regioni su skloni prekidima, i ponašaju se kao CFS (Sfeir i sar., 2009). Velika učestalost nefunkcionalnih telomera i izražena telomerna fragilnost je tipična za FA-D2 ćelijski fenotip (Joksic i sar., 2012). U dosadašnjim istraživanjima nije ispitivana uloga telomera u nastanku radijala, niti da li učestalost i struktura radijala i telomernih fuzija mogu biti pokazatelji kliničkog toka i ishoda bolesti.

Kod FA-D2 pacijenata primećena je ranija pojava hematoloških komplikacija, uključujući i insuficijenciju koštane srži, kraći period od nastanka insuficijencije do transplantacije koštane srži, kao i generalno kraći životni vek (Mehta i Tolar, 2002-2018). Upravo zbog toga bi molekularno-citogenetička analiza hromozomskih prekida, telomera i radijala u limfocitima periferne krvi pacijenata u različitim stadijumima bolesti mogla biti od značaja za identifikovanje prognostičkih faktora toka bolesti.

### ***1.2.3. FA nasleđivanje, geni, kandidat geni i mutacije***

Do sada je opisano 19 FA gena koji kodiraju grupu proteina koji kooperativno funkcionišu u FA/BRCA signalnom putu u prepoznavanju i popravci DNK oštećenja (Dong i sar., 2015): *FANCA*, *FANCB*, *FANCC*, *FANCD1 (BRCA2)*, *FANCD2*, *FANCE*, *FANCF*, *FANCG*, *FANCI*, *FANCJ (BRIPI)*, *FANCN (PALB2)*, *FANCO (RAD51C)*,

*FANCP (SLX4)*, *FANCO (ERCC4)*, *FANCS (BRCA1)*, *FANCR (RAD51)*, *FANCT (UBE2T)* i *FANCU (XRCC2)*.

*FANCC* je prvi FA gen koji je otkriven 65 godina nakon što je Fankonijeva anemija opisana, metodom komplementarnog kloniranja (Strathdee i sar., 1992). U godinama iza toga zahvaljujući ovoj i razvoju novih metoda kao što su poziciono kloniranje, studije asocijacije i sekvenciranje nove generacije (engl. Next Generation Sequencing, NGS), otkriveno je do sada još 18 gena FA/BRCA puta.

Mutacije u *FANCA*, *FANCC* i *FANCG* genima su najčešće u populaciji, čine oko 85% svih prijavljenih mutacija (Mehta i Tolar, 2002-2018; Schneider i sar., 2015). Mutacije u *FANCC* genu čine oko 14% svih mutacija u FA genima. *FANCA* je drugi otkriven, ujedno i najčešće mutiran gen kod FA pacijenata (oko 65%), pri čemu su velike intragenske delecije najčešći vid mutacija u ovom genu (Lo Ten Foe i sar., 1996; Solomon i sar., 2015). Učestalost mutacija u *FANCG* genu iznosi oko 10%, pri čemu je za ovaj gen u mnogim populacijama vezan za efekat osnivačke mutacije (Mehta i Tolar, 2002-2018). Za ovaj gen je kasnije otkriveno da je to zapravo *XRCC9* gen koji ima ulogu u popravci dvolančanih DNK prekida (engl. X-ray Repair Cross-Complementing protein 9).

Mutacije u *FANCB*, *FANCD1*, *FANCE* i *FANCF* genu zajedno čine oko 10% prijavljenih mutacija (Mehta i Tolar, 2002-2018). *FANCB* je jedini FA gen koji nije smešten na autozomima, već na X hromozomu, pa je FA-B komplementaciona grupa tako jedina koja se nasleđuje X-vezano recesivno. Učestalost mutacija u *FANCB* genu iznosi oko 2%, pri čemu su najčešće opisane tačkaste mutacije, male insercije i velike delecije, što uglavnom dovodi do stvaranja skraćenog proteina (engl. truncated protein) (Moldovan i D'andrea, 2009). Učestalost *FANCD1* mutacija iznosi oko 3% i one takođe dovode do nastanka skraćene forme proteina. Za ovaj gen je kasnije utvrđeno da je identičan *BRCA2* genu (engl. Breast Cancer Susceptibility Gene 2). Pored toga što bialelske mutacije u *FANCD1* dovode do nastanka FA, heterozigotni nosioci imaju povećani rizik za obolevanje od karcinoma dojke i jajnika (Petrucci i sar., 2010). Mutacije u *FANCE* genu javljaju se u oko 3%, a u *FANCF* genu u 2% opisanih slučajeva. Najčešće mutacije u *FANCF* su kratke delecije koje dovode do pomeranja okvira čitanja (engl. frameshift mutacije) i stvaranja prevremenog stop kodona (Gille i sar., 2012).

Učestalost mutacija u *FANCI*, *FANCI* (engl. BRCA1-interacting protein C-terminal helicase, *BRIP1*), *FANCL*, *FANCN* (engl. Partner And Localizer of BRCA2, *PALB2*), *FANCO* (engl. RAD51 paralog C, *RAD51C*), *FANCP* (engl. Structure-Specific Endonuclease Subunit, *SLX4*), *FANCO* (engl. Excision-Repair Cross-Complementation group 4, *ERCC4*), *FANCS* (engl. Breast Cancer Susceptibility Gene 1, *BRCA1*), *FANCR* (*RAD51* rekombinaza), *FANCT* (engl. Ubiquitin Conjugating Enzyme E2 T, *UBE2T*) i *FANCU* (engl. X-Ray Repair Cross Complementing 2, *XRCC2*) zajedno čini manje od 5% prijavljenih mutacija u FA genima i uglavnom su u vidu tačkastih mutacija, insercija nukleotida, splajsnih mutacija i mutacija koje dovode do stvaranja prevremenog stop kodona i skraćenog proteina (Mehta i Tolar, 2002-2018; Schneider i sar., 2015).

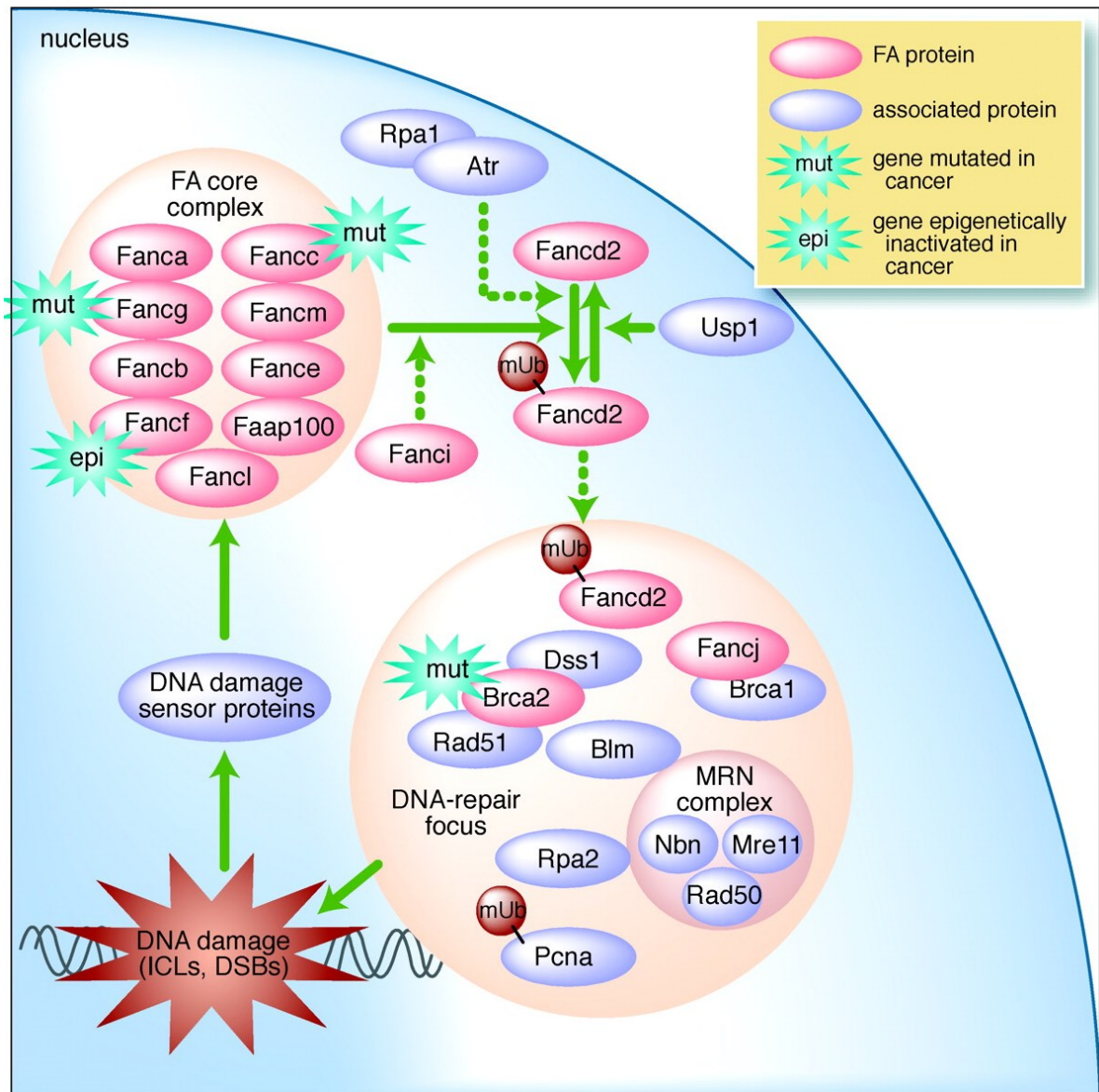
Tek je nedavno otkriveno da mutacije u *FANCR* (*RAD51* rekombinaza), *FANCT* (*UBE2T*) i *FANCU* (*XRCC2*) dovode do nastanka FA (Ameziane i sar., 2015; Park i sar., 2016; Rickman i sar., 2015). *RAD51* rekombinaza je homolog bakterijskog DNK proteina RecA i ima ključnu ulogu u procesu popravke dvolančanih prekida DNK homologom rekombinacijom (Jasin i Rothstein, 2013). *UBE2T* gen kodira ubikvitin-konjugujući enzim E2T za koji je prethodno bilo poznato da učestvuje u FA/BRCA signalnom putu tako što je neophodan za ubikvitinizaciju *FANCD2* proteina (Hira i sar., 2015; Machida i sar., 2006; Rickman i sar., 2015). Mutacije u *FANCU* (*XRCC2*) genu opisane su kod samo jednog pacijenta (Park i sar., 2016).

Do nedavno se smatralo da postoji još jedna komplementaciona grupa, FA-M, međutim postojanje ove grupe ostaje kontroverzno, jer je opisana kod samo jednog FA pacijenta koji je pored toga imao mutacije i u *FANCA* genu (Singh i sar., 2009).

Učestalost FA-D2 komplementacione grupe, odnosno mutacija u *FANCD2* genu, u svetskoj populaciji je niska i iznosi između 1% i 3.3% (Kalb i sar., 2007; Levitus i sar., 2004; Mehta i Tolar, 2002-2018), dok je u Srbiji najčešća komplementaciona grupa Fankonijeve anemije FA-D2 (Vujic i sar., 2014).

#### 1.2.4. *FANCD2* gen

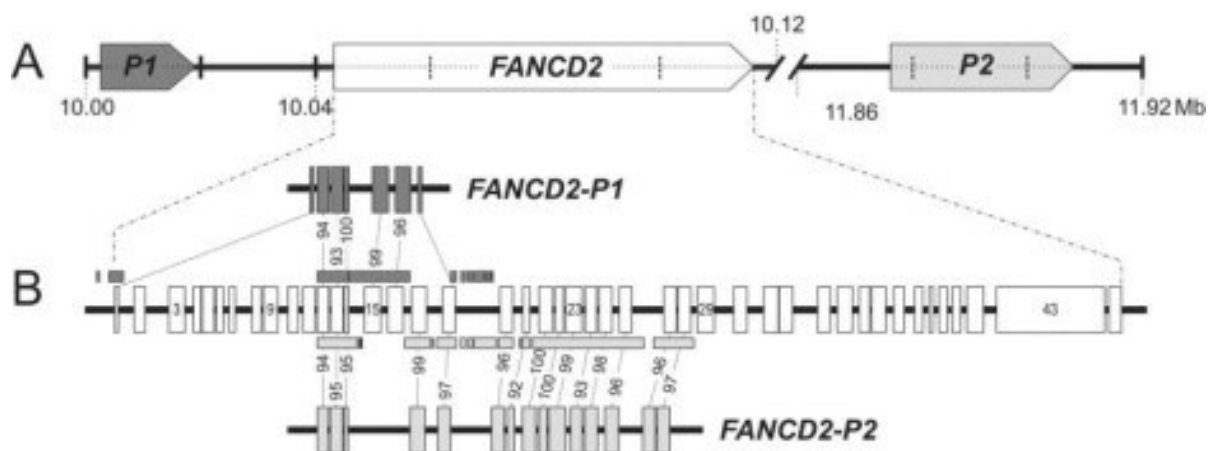
*FANCD2* gen (Locus Reference Genomic, LRG\_306) kodira centralni protein FA/BRCA signalnog puta FANCD2 (Slika 1.8.) koji se u odgovoru na DNK oštećenja monoubikvitinizuje u S-fazi ćelijskog ciklusa na poziciji K561 uz pomoć ushodnih proteina FA/BRCA puta. Monoubikvitirana izoforma FANCD2 (*FANCD2-L*) se zatim transportuje u jedro, akumulira na mestima oštećenja i interaguje sa nishodnim, efektorskim proteinima, FANCD1, FANCN, FANCI i FANCO uključenim u popravku dvolančanih prekida DNK (Kee i D'andrea, 2010). O značaju ovog gena u očuvanju genomske stabilnosti govori visok stepen evolucione konzerviranosti kod različitih taksona eukariota kao što su *Arabidopsis thaliana*, *Caenorhabditis elegans* i *Drosophila melanogaster*, mnogo veći nego što je to slučaj sa *FANCA*, *FANCC*, *FANCE*, *FANCF* i *FANCG* genima (Blom i sar., 2002; Timmers i sar., 2001). Dodatno, kod *FANCD2* *knock-out* miševa dolazi do perinatalne smrti, mikrooftalmije i ranih epitelijalnih karcinoma (Houghtaling i sar., 2003).



**Slika 1.8.** Uloga FANCD2 proteina u FA/BRCA signalnom putu. Preuzeto iz Gallmeier i Kern, 2007.

*FANCD2* gen otkrili su Timmers i saradnici 2001. godine metodom pozicionog kloniranja. Lociran je na kratkom kraku hromozoma 3, u regionu 3p25.3. Sadrži 44 egzona i približno 75.5 kbp, pri čemu je start kodon lokalizovan u egzonu 2. *FANCD2* ima okvir čitanja od 4353 bp koji kodira protein od 1451 aminokiseline, molekularne težine približno 166 kDa i ima dve proteinske izoforme, FANCD2-L i FANCD2-S (Timmers i sar., 2001).

Iako je otkriven pre više od 15 godina, postoji ograničen broj istraživanja mutacija u ovom genu (Ameziane i sar., 2012; Chandrasekharappa i sar., 2013; Chang i sar., 2014; Gille i sar., 2012; Kalb i sar., 2007; Knies i sar., 2012), pre svega zbog postojanja dva pseudogena, *FANCD2-P1* (NCBI Acc. No. NG\_025673.2) i *FANCD2-P2* (NCBI Acc. No. XM\_017030238.1) koji se nalaze u neposrednoj blizini funkcionalnog gena na kratkom kraku hromozoma 3 (Slika 1.9.). *FANCD2-P1* nalazi se oko 24 kbp ushodno od *FANCD2* gena i sadrži 16 kbp, dok se *FANCD2-P2* nalazi 1.76 Mbp nishodno od *FANCD2* i sadrži 31.5 kbp. Oba pseudogena pokazuju visok stepen homologije sa prednjim (*FANCD2-P1*) i srednjim (*FANCD2-P2*) delom *FANCD2* gena: egzoni 1-18 *FANCD2-P1* pseudogena sa egzonima 1, 12-16 i 3' delom egzona 18 *FANCD2* gena; egzoni 12-18 *FANCD2-P2* pseudogena sa egzonima 12-14 i 17-28 *FANCD2* gena. Homologija nije ograničena samo na egzone gena i pseudogena, već je prisutna i u pripadajućim intronima, naročito je izražena u intronima 21-26 što sve zajedno u velikoj meri otežava konstrukciju prajmera za amplifikaciju specifičnih regiona gena (Kalb i sar., 2007).



**Slika 1.9.** Topografija *FANCD2* gena i pseudogena, *FANCD2-P1* i *FANCD2-P2*. A – Lokalizacija pseudogena ushodno i nishodno od funkcionalnog *FANCD2* gena; sva tri gena imaju istu orijentaciju. B – Prikazani su egzoni *FANCD2* gena i ekvivalenti kod pseudogena; isprekidanim linijama povezani su regioni koji dele homologiju i označeni procenti homologije. Preuzeto iz Kalb i sar., 2007.

Dosadašnja istraživanja mutacija u *FANCD2* genu pokazala su da su sve pronađene mutacije hipomorfne, odnosno imunoblotingom je pokazano da je uvek

prisutna izvesna rezidualna aktivnost proteina, pa se pretpostavlja da kod ljudi potpuni nedostatak *FANCD2* nije moguć (Kalb i sar., 2007). Kalb i saradnici sprovedi su najopsežniju studiju do sada u koju je bilo uključeno 29 pacijenta iz 24 porodice različite etničke pripadnosti i pokazali da je većina detektovanih mutacija u vidu tačkastih mutacija i malih delecija. Najveći deo mutacija lociran je u intronskim regionima gena i dovodi do aberantnog splajsovanja (Ameziane i sar., 2012; Kalb i sar., 2007). Za razliku od ostalih FA gena u kojima su uglavnom opisane homozigotne recesivne mutacije, u *FANCD2* genu su prisutne složene heterozigotne mutacije.

Molekularna analiza mutacija u FA genima je značajna za potvrdu dijagnoze FA, za prenatalno i za testiranje nosioca mutacija, kao i za predikciju ishoda hemioterapije (Borriello i sar., 2007). Pored toga, pokazano je da su čak i monoalelske mutacije pojedinih FA gena, kao što je *FANCD2*, povezane sa povećanim rizikom za razvoj solidnih i tumora hematopoetskog sistema (Smetsers i sar., 2012), što molekularne analize čini važnim kako u dijagnostici, tako i u evaluaciji komplikacija bolesti. Mutacije u *FANCD2* genu kod pacijenata iz Srbije do sada nisu analizirane. Sekvenciranje *FANCD2* gena omogućilo bi detekciju mutacija koje su povezane sa težim oblicima bolesti i nastankom komplikacija, kao i identifikaciju mutacija karakterističnih za naše područje.



## 2. Cilj

Predmet doktorske disertacije je molekularno – citogenetička karakterizacija hromozomskih prekida u limfocitima pacijenata obolelih od FA-D2, ispitivanje kolokalizacije prekida sa fragilnim mestima i analiza mutacija u *FANCD2* genu, sa ciljem da se ispita postavljena hipoteza da najčešće zastupljena fragilna mesta predstavljaju prognostički faktor toka bolesti i da zavise od tipa mutacija u *FANCD2* genu.

Ovo je prva karakterizacija hromozomskih prekida i mutacija *FANCD2* gena u FA-D2 komplementacionoj grupi Fankonijeve anemije u našoj populaciji.

### **Postavljena hipoteza testirana je na sledeći način:**

1. Analizirani su spontani i DEB-indukovani hromozomski prekidi u limfocitima periferne krvi.
2. Nađeni hromozomski prekidi su molekularno-citogenetički okarakterisani i utvrđeno je da li se nalaze u regionima fragilnih mesta.
3. Analizirana je učestalost i struktura radijala.
4. Analizirana je učestalost telomernih fuzija i utvrđeno je da li učestalost fuzija koreliše sa dužinom telomera pojedinačnih hromozoma.
5. Utvrđeno je da li se učestalost i distribucija FA-D2 hromozomskih prekida razlikuje od prekida kod drugih komplementacionih grupa, odnosno da li su karakteristični za FA-D2 ćelije.
6. Analizirane su mutacije u određenim egzonima i intronima *FANCD2* gena da bi se utvrdilo da li kod FA-D2 pacijenata postoje mutacije karakteristične za našu populaciju.
7. Navedeni parametri praćeni su kod pacijenata u različitim fazama bolesti kako bi se identifikovali prognostički parametri bolesti.

### **3. Materijal i metode**

#### **3.1. Uzorci**

Šest pacijenata (pet ženskog i jedan muškog pola) uzrasta od 3 do 13 godina, sa prethodno postavljenom dijagnozom Fankonijeve anemije je uključeno u istraživanje. Uzorci periferne krvi uzeti su prilikom redovne kontrole na Odeljenju za Hematoonkologiju Instituta za zdravstvenu zaštitu majke i deteta „Dr Vukan Čupić“ u Beogradu. Periferna krv pacijenata uzorkovana je u Li-heparinskim vakutajnerima. Dijagnoza Fankonijeve anemije prethodno je postavljena na osnovu kliničkih parametara i potvrđivanja FA ćelijskog fenotipa standardnim DEB-testom na limfocitima periferne krvi (Auerbach, 2009) i potvrđena testom hromozomskih aberacija na fibroblastima kože u prisustvu DEB-a. Na Univerzitetu u Barseloni, Španija, Odsek za genetiku i mikrobiologiju (c/o Prof. dr J. Surralles), Western blot analizom utvrđena je pripadnost FA-D2 komplementacionoj grupi pacijenata. Stadijum bolesti pacijenata utvrđen je na osnovu hematoloških parametara (CBC, engl. Complete Blood Count) i pregleda koštane srži na osnovu standardnih kriterijuma (Vujic i sar., 2014). Pacijenti su u skladu sa tim podeljeni u dve grupe, grupa A pacijenata sa teškom insuficijencijom koštane srži i grupa B sa umerenom insuficijencijom koštane srži.

Etički odbor Instituta za zdravstvenu zaštitu majke i deteta "Dr Vukan Čupić" u Beogradu odobrio je ovo istraživanje i sve metode korišćene u njemu, uz informisani pristanak roditelja pacijenata.

#### **3.2. Kultura limfocita periferne krvi i analiza hromozomskih aberacija**

Za analizu hromozomskih aberacija iz limfocita periferne krvi korišćeni su alikvoti pune heparinizirane krvi pacijenata. 0,5 mL krvi pacijenata zasađeno je u 4,5 mL PB-MAX Karyotyping medijuma (Invitrogen-Gibco, Paisley, VB). Kulture limfocita su gajene 72 sata na 37 °C. Paralelno su postavljene kulture tretirane diepoksibutanom (DEB, Sigma Chemicals Co., Nemačka) 48 h nakon inicijacije

(finalna koncentracija DEB-a - 0,1 µg/mL). 3 h pre preparacije hromozoma u kulture je dodat kolhicin (Sigma-Aldrich, Munich, Nemačka) u finalnoj koncentraciji od 2,5 µg/mL.

Preparacija kultura je izvršena ispiranjem ćelijske suspenzije hipotoničnim rastvorom 0,56 % KCl, 20 min. na 37 °C. Ćelijske suspenzije su fiksirane u McCarnoy fiksativu (metanol i sirćetna kiselina u odnosu 3:1), 3 puta. Posle svakog koraka ćelije su centrifugirane 10 min. na 1800 rpm, a supernatant dekantovan. Preparati su napravljeni nanošenjem ćelijske suspenzije na čiste mikroskopske pločice i sušenjem na plamenu.

### ***3.3. Tehnika inverznog DAPI bojenja i DAPI traka***

Nakon nanošenja suspenzija, mikroskopska predmetna stakla su inkubirana preko noći na sobnoj temperaturi, dehidratirana u seriji rastućih koncentracija etanola (70%, 95% i 100%) po pet minuta u svakom, a potom obojene DAPI-Vectashield rastvorom (4',6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI)-containing Vectashield, Vector Laboratories Ltd, Peterborough, VB). Nakon nanošenja DAPI boje, mikroskopske pločice su pokrivene pokrovnim ljušpicama i ostavljene na 4°C najmanje 20 minuta, nakon čega su spremne za analizu. Analiza preparata urađena je na Zeiss-Axioimager A1 epifluorescentnom mikroskopu korišćenjem ISIS imidžing softverskog paketa (MetaSystems, Altussheim, Nemačka).

### ***3.4. Citogenetička analiza***

Metafazne figure analizirane su u skladu sa aktuelnim ISCN (engl. International System for Human Cytogenetic Nomenclature) standardima (Simons i sar., 2013). Za karakterizaciju hromozomskih prekida analizirano je najmanje 800 metafaznih figura po uzorku.

### 3.5. Molekularno-citogenetička analiza hromozomskih prekida

Nakon utvrđivanja najčešćih hromozomskih prekida tehnikom DAPI traka, izvršena je detaljna molekularno-citogenetička karakterizacija mesta prekida fluorescentnom *in situ* hibridizacijom (Locus-specific FISH, BAC-FISH – Bacterial Artificial Chromosome FISH) sa odgovarajućim BAC-probama (Mrasek i sar., 2015). BAC-FISH je urađen na Institutu za humanu genetiku Univerzitetske klinike u Jeni (Nemačka) u laboratoriji prof. dr Thomasa Liehra. BAC-probe za odgovarajuće hromozomske regione izabrane su iz kolekcije Instituta za humanu genetiku Univerzitetske klinike u Jeni na osnovu literaturnih podataka (Borgaonkar, 1994; Lukusa i Fryns, 2008; Mrasek i sar., 2010; Simonic i Gericke, 1996) i proverene u dostupnim bazama podataka (UCSC Genome Browser – <http://genome-euro.ucsc.edu>, Entrez genome view – [www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/mapview](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/mapview) i Database of Genomic variants – <http://dgv.tcag.ca>).

Po završetku analize metafaznih figura, sa mikroskopskih pločica uklonjene su pokrovne ljušpice i DAPI ispiranjem u 100% etanolu (dva puta po 10 minuta na šejkeru). Pločice su potom inkubirane u rastvoru pepsina 5 minuta na 37°C (20% pepsin u 0.2N HCl-u), isprane u 1xPBS-u i fiksirane u 1% rastvoru formalina 20 minuta. Nakon fiksiranja, usledila je dehidracija u seriji rastućih koncentracija etanola (70, 90 i 100 %, svaki po 5 minuta) i denaturacija u 70% rastvoru formamida 2-3 minuta na grejnoj ploči na 75°C. Denaturisani preparati su momentalno uronjeni u hladni etanol (70% etanol, 4°C) da bi se očuvala jednolančana DNK, a potom je usledila dehidracija u 90% i 100% etanolu. Na dehidratirane i osušene preparate nanete su prethodno pripremljene probe, pokriveni su pokrovnom ljušpicom i hibridizovani preko noći u vlažnoj mračnoj komori na 37°C. Priprema proba podrazumevala je denaturaciju probe u hibridizacionom puferu i COT1 humano DNK na 75°C 5 minuta, potom pre-aniling 30 minuta na 37°C i hlađenje do 4°C.

Po završenoj hibridizaciji usledilo je ispiranje preparata u 4xSSC/0.2 % Tween20 rastvoru na sobnoj temperaturi 5 minuta, zatim u 1xSSC rastvoru na 62–65°C 5 minuta i potom dehidracija u seriji rastućih etanola (70%, 90% i 100%, svaki po 5 minuta). Preparati su obojeni DAPI-Vectashield rastvorom po prethodno opisanoj proceduri, pokriveni pokrovnim ljušpicama i analizirani pomoću epifluorescentnog

mikroskopa AxioImagerA1 i softverskog sistema ISIS (MetaSystems, Altlussheim, Germany). U Tabeli 3.1. prikazane su korišćene BAC-probe i hromozomski regioni kojima odgovaraju.

**Tabela 3.1.** BAC-probe korišćene za fluorescentnu *in situ* hibridizaciju za najčešće hromozomske prekide.

Citogenetička lokalizacija prekida	Molekularno-citogenetička lokalizacija prekida	Fragilno mesto	BAC-proba	Genomska pozicija BAC-probe (GRCh38/hg38)	Dužina BAC-probe (bp)
1p13	1p13.3	FRA1N	RP11-242D10	108,286,251-108,444,610	158,360
1q21	1q21.2	FRA1F	RP11-301M17	148,212,841-148,403,949	191,109
1q42	1q42.2	Near FRA1H	RP11-109G24	234,128,597-234,284,858	156,262
2q34-35	2q35	FRA2U	RP11-316O14	219,342,197-219,525,821	183,625
3p14.2-14.3	3p14.2	FRA3B	RP11-129K20*	62,907,940-63,081,722	173,783
3p21	3p21.31	FRA3H	RP11-787O14	50,161,062-50,356,034	194,973
3q27	3q27.2	FRA3C	RP11-110C15	185,411,747-185,567,641	155,895
5q13	5q13.2	FRA5K	RP11-497H16	70,259,868-70,586,536	326,669
5q33	5q33.2	FRA5O	RP11-265I24 RP11-494C5	155,069,365-155,244,700	175,336
7q32	7q32.3	FRA7H	RP11-138A9  RP11-36B6	130,878,137-131,042,211  130,790,208-130,791,724	164,075  1,517
11q13	11q13.4	FRA11H	RP11-449G14	71,888,341-72,093,010	204,670
14q24	14q24.3	FRA14G	RP3-414A15	73,616,700-73,633,778	17,079
16q22	16q22.1	FRA16C, FRA16B	RP11-106J23*	69,952,667-70,143,212	190,546
16q23	16q23.1	FRA16D	RP11-358L22	77,995,886-78,162,900	167,015
18q21	18q21.3	FRA18B	RP11-15C15	61,328,532-61,522,229	193,698

\*naziv BAC-probe odgovara prethodnom unosu (Human GRCh37/hg19), genomska pozicija i dužina su u skladu sa novim unosom (GRCh38/hg38 unos)

### 3.6. Telomerni FISH

Posle završene prethodne analize urađena je fluorescentna *in situ* hibridizacija (telomerni FISH, Q-FISH, engl. Quantitative Fluorescent *In Situ* Hybridization) sa telomernom cPNA (engl. Peptide Nucleic Acid) oligonukleotidnom probom (PNA FISH Kit/Cy3 K5326, DAKO Glostrup, Danska) (Joksic i sar., 2017). PNA telomerna proba je otporna na degradaciju nukleazama i peptidazama i specifično hibridizuje sa telomernom DNK (Poon i Lansdorp, 2001) .

DAPI je uklonjen prema gore navedenoj proceduri, pločice su dehidratirane u seriji rastućih etanola (70%, 90% i 100%, svaki po 5 minuta) i denaturisane u prisustvu 70% rastvora formamida 2-3 minuta na grejnoj ploči na 75°C. Potom su uronjene u hladni 70% etanol (4°C) da bi se očuvala jednolančana DNK, a zatim i u 90% i 100% etanol. Nakon sušenja preparati su hibridizovani sa Cy-3 obeleženom telomernom PNA probom (CCCTAA)<sub>n</sub> 3' suplementiranom sa PNA centromernom probom za hromozom 2 (referentni centromerni signal) (DAKO, Glostrup, Danska) u finalnoj koncentraciji 2 ng/mL. PNA proba za centromeru hromozoma 2 dodata je u telomernu probu. Pločice su zatim hibridizovane 2 sata u mračnoj vlažnoj komori na sobnoj temperaturi i po isteku hibridizacije isprane dva puta po 15 minuta u 70% formamidu i tri puta po 5 minuta u 1xPBS-u. Posle sušenja i bojenja DAPI-Vectashield rastvorom, analizirane su pomoću epifluorescentnog AxioImagerA1 mikroskopa i Q-FISH softvera koji je deo softverskog paketa ISIS.

Analizirane su telomerne fuzije, učešće telomernih sekvenci u nastanku radijalnih hromozomskih figura i izvršeno je merenje dužine telomera, prosečna i na svakom pojedinačnom hromozomu. Merenje dužine telomera analizirano je na 20 metafaza po uzorku. Dužina telomera izražena je u vidu relativnih jedinica dužine telomera, RTLU (engl. Relative Telomere Length Units) koja je definisana kao odnos intenziteta telomernih signala i referentnog centromernog signala hromozoma 2.

### 3.7. Sekvenciranje *FANCD2* gena

#### 3.7.1. Izolacija DNK

Za sekvenciranje regiona *FANCD2* gena korišćena je DNK izolovana iz zamrznutih primarnih fibroblasta kože pacijenata. Izolacija DNK urađena je FlexiGene DNA Kit-om (Qiagen, SAD) po uputstvu proizvođača: nakon brzog odleđivanja, ćelijska suspenzija je centrifugirana 10 minuta na 2000 rpm, supernatant dekantovan, a ćelijskom peletu dodato 300 µL litičkog pufera (FG1 pufer). Nakon 5 minuta inkubacije na sobnoj temperaturi, u ependorf tube sa peletom i litičkim puferom je dodato 300 µL proteaze (Qiagen Proteaza u FG2 puferu), tube su zatvorene i inkubirane u vodenom kupatilu 10 minuta na 65°C. Po isteku inkubacije, u tube je dodato još 600 µL 100% izopropanola, zatvorene su i snažno invertovane do pojave vidljivih DNK precipitata. Tube su potom centrifugirane 3 minuta na 10000xg, supernatant dekantovan, i u pelet dodato 600 µL 70% etanola. Nakon vorteksovanja, a potom i centrifugiranja tuba 3 minuta na 10000xg, supernatant je dekantovan, a pelet dobro osušen do isparavanje sve preostale tečnosti. DNK pelet rastvoren je u FG3 puferu za rastvaranje zagrevanjem 30 minuta u vodenom kupatilu na 65°C. Rastvorena DNK čuvana je na +4°C ili -20°C do upotrebe. DNK koncentracija i čistoća izmerena je na Nano drop 100 spektrofotometru (Thermo Scientific, SAD) merenjem absorbanci na 260, 280 i 230 nm.

#### 3.7.2. Odabir regiona i konstrukcija prajmera

Imajući u vidu veličinu *FANCD2* gena, sekvenciranje celog gena kod svih pacijenata tradicionalnim metodama bilo bi vremenski zahtevno i skupo, pa je shodno tome urađeno sekvenciranje odabranih regiona u kojima je, prema literaturnim podacima, prisutno najviše mutacija u *FANCD2* genu, egzona 10, 14, 16, 26, 29 i 38, i introna 3, 4, 12, 21 i 28 (Ameziane i sar., 2012; Gille i sar., 2012; Kalb i sar., 2007; Knies i sar., 2012).

Obzirom na postojanje dva pseudogena sa visokim stepenom homologije sa *FANCD2* genom (*FANCD2-P1* i *FANCD2-P2*) konstruisana su dva velika amplikona, amplikon 1 i 2 iz kojih su *Nested* PCR-om umnoženi intron 12 i 21, redom. Ovi regioni

imaju visok stepen sličnosti sa pseudogenima i njihovo direktno umnožavanje ne bi bilo moguće. Sekvence celog gena i pseudogena, kao i pojedinačnih regiona, su prethodno poravnate korišćenjem dva softvera, NCBI BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) i ClustalW softvera (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) u cilju identifikovanja regiona bez homologije za postavljanje prajmera.

Prajmeri korišćeni za amplifikaciju ovih regiona prikazani su u Tabeli 3.2. Sekvence prajmera za egzone 10, 16, 26, 29 i 38, kao i za amplikon 1 su preuzeti iz literature (Kalb i sar., 2007), dok su za egzon 14, introne 3, 4, 12, 21 i 28, kao i za amplikon 2 dizajnirani uz pomoć Primer3Plus softvera (<https://primer3plus.com/cgi-bin/dev/primer3plus.cgi>). Zbog velike dužine, dva para prajmera korišćena su za umnožavanje introna 3 i 28. Prajmeri su dizajnirani tako da obuhvataju i delove susednih regiona radi pokrivanja egzon-intron granica. Svi prajmeri su poravnati u odnosu na ceo humani genom zbog specifičnosti.



Tabela 3.2. Prajmeri korišćeni za sekvenciranje regiona *FANCD2* gena

<i>FANCD2</i> regioni	Sekvence prajmera (5'-3') (F-“forward”, R-“reverse” prajmer)	Dužina amplikona	Temperatura topljenja	GC sadržaj
<b>Intron 3(1)</b>	F: AGGAAGCAACCACTTTCCAA	819 bp	56°C	45%
	R: GACCTGCCATAACCTTAGCAA		59°C	47.6%
<b>Intron 3(2)</b>	F: TGTTTTGGGGGAGCAGATTA	926 bp	56°C	45%
	R: GGGATAGGAAGGGTGTCTCC		63°C	60%
<b>Intron 4</b>	F: AGACACAACCCCATGACTCTG	761 bp	61°C	52.4%
	R: GCAGACGCTCACAAGACAAA		58°C	50%
<b>Egzon 10</b>	F: GCCCAGCTCTGTTCAAACCA	229 bp	60°C	55%
	R: CATTACTCCCAAGGCAATGAC		59°C	47.6%
<b>Intron 12</b>	F: CTGGACTGTGCCTACCCACT	801 bp	63°C	60%
	R: TCAGCGAAACACGTTACACC		58°C	50%
<b>Egzon 14</b>	F: GTTGCCAGATGGACACATTG	437 bp	58°C	50%
	R: GACCTGGCTTCTTTGACTGC		60°C	55%
<b>Egzon 16</b>	F: AGGGAGGAGAAGTCTGACATT	332 bp	59°C	47.6%
	R: TTCCCCTTCAGTGAGTTCCAA		59°C	47.6%
<b>Intron 21</b>	F: GCAGATTGAAAAGGGATGA	800 bp	56°C	45%
	R: CTACGAAGGCATCCTGGAAA		58°C	50%
<b>Egzon 26</b>	F: GACATCTCTCAGCTCTGGATA	324 bp	59°C	47.6%
	R: TCAGGGATATTGGCCTGAGAT		59°C	47.6%
<b>Intron 28(1)</b>	F: ATGTGACCCTACGCCATCTC	610 bp	60°C	55%
	R: AGCTTAGGGGCCAGAATGAT		58°C	50%
<b>Intron 28(2)</b>	F: TTCTGTAAGAGCCCAAGTTTCA	825 bp	58°C	40.9%
	R: ACCTCAATGTCCAGCTCTCG		60°C	55%
<b>Egzon 29</b>	F: CTTGGGCTAGAGGAAGTTGTT	384 bp	59°C	47.6%
	R: TCTCCTCAGTGTCACAGTGTT		59°C	47.6%
<b>Egzon 38</b>	F: GCACTGGTTGCTACATCTAAG	274 bp	59°C	47.6%
	R: AAGCCAGGACACTTGGTTTCT		59°C	47.6%
<b>Amplikon I</b>	F: TGCTCTTCTGTCCCCAGA	2518 bp	68°C	50%
	R: CATTGGGCGTGATTTCAGGG		64°C	45.8%
<b>Amplikon II</b>	F: GCTTCTAGTCACTGTCAGTTCACCAG	2431 bp	60°C	55%
	R: ACGTTGGCCAGAAAGTAATCTCAG		60°C	55%

### 3.7.3. Lančana reakcija polimerizacije

Za lančane reakcije polimerizacije (engl. Polymerized Chain Reaction, PCR) pojedinačnih regiona *FANCD2* gena korišćeno je 100 ng genomske DNK izolovane iz fibroblasta kože pacijenata. Reakciona smeša za zapreminu 50  $\mu$ L po uzorku pored DNK sadržala je 0,02 U/ $\mu$ L Phusion High Fidelity (HF) polimeraze, 0,2 mM smeše nukleotida, 5x Phusion High Fidelity PCR pufera (Phusion High Fidelity PCR Kit, Thermo Scientific, SAD), 0,2  $\mu$ M odgovarajućih prajmera i vodu (engl. nuclease free dH<sub>2</sub>O). HF polimeraza poseduje 3'→5' egzonukleaznu aktivnost zbog čega joj je greška pri ugrađivanju nukleotida  $4,4 \times 10^{-7}$ , čak 50 puta manja od Taq polimeraze. Intron 12 i 21 su reamplifikovani iz umnoženih amplikona 1 i 2, redom, pri čemu je u reakcionu smešu umesto genomske DNK dodato po 1  $\mu$ L prečišćenog i 1000x razblaženog PCR produkta. Svi regioni umnožavani su u pojedinačnim reakcijama, a uslovi reakcija prikazani su u Tabelama 3.3., 3.4. i 3.5.

**Tabela 3.3.** PCR uslovi za egzone 10, 14, 16, 26, 29 i 38 *FANCD2* gena.

	Temperatura (°C)	Vreme	Broj ciklusa
<b>Inicijalna denaturacija</b>	98 °C	30 s	1
<b>Denaturacija</b>	98 °C	10 s	30
<b>Aniling</b>	65 °C	20 s	
<b>Ekstenzija</b>	72 °C	15 s	1
<b>Finalna ekstenzija</b>	72 °C	10 minuta	

**Tabela 3.4.** PCR uslovi za introne 3 (1. i 2. par), 4, 12, 21 i 28 (1. i 2. par).

	Temperatura (°C)	Vreme	Broj ciklusa
<b>Inicijalna denaturacija</b>	98 °C	30 s	1
<b>Denaturacija</b>	98 °C	10 s	30
<b>Aniling</b>	65 °C	20 s	
<b>Ekstenzija</b>	72 °C	30 s	1
<b>Finalna ekstenzija</b>	72 °C	10 minuta	

Tabela 3.5. PCR uslovi za amplikone 1 i 2.

	Temperatura (°C)	Vreme	Broj ciklusa
<b>Inicijalna denaturacija</b>	98 °C	30 s	1
<b>Denaturacija</b>	98 °C	10 s	35
<b>Aniling</b>	60 °C	30 s	
<b>Ekstenzija</b>	72 °C	90 s	
<b>Finalna ekstenzija</b>	72 °C	10 minuta	1

### 3.7.4. Gel elektroforeza

Detekcija PCR produkata urađena je gel elektroforezom na agaroznom gelu za amplikone 1 i 2, a za sve ostale regione na poliakrilamidnom gelu.

2% agarozni gel je pripremljen tako što je 2% rastvor agaroze rastvoren u 1xTBE (razblaženi 10xTBE pufer u odnosu 1:10) puferu zagrejan do ključanja, potom je u gel dodat etidijum bromid u finalnoj koncentraciji od 0,5 µg/ml, naliven u horizontalnu kadicu za elektroforezu i ostavljen da polimerizuje. Na gel je nanošeno 10 µL uzorka pomešanog sa 2 µl boje bromfenol plavo (DNA Gel Loading Dye (6X), Thermo Scientific, SAD). U posebno ležište na gelu naneto je i 10 µL DNK standarda za veličinu (O'GeneRuler 1 kb DNA Ladder, Thermo Scientific, SAD). Elektroforeza se odvijala u horizontalnom polju, 1h/140V u kadici sa 10xTBE puferom. Nakon završene elektroforeze PCR produkti su vizuelizovani uz pomoć sistema za snimanje i analizu gelova GDS8000-Gel Documentation System (UVP Inc, Upland, SAD) i odgovarajućeg programa za obradu podataka.

6% poliakrilamidni gel pripremljen je tako što je u 40% PAA štok (38:2 - akrilamid : bis-akrilamid) dodat 10xTBE pufer (108 g Tris, 55 g H3BO3, 40 ml 0.5 M EDTA, pH 8.0, dH2O do 1000 ml), 10% amonijum persulfat, N, N, N', N' TEMED i ddH2O. Gel je naliven u vertikalnu kadicu za elektroforezu i ostavljen da polimerizuje. Na gel je nanošeno 10 µL uzorka pomešanog sa 2 µl boje bromfenol plavo (DNA Gel Loading Dye (6X)), Thermo Scientific, SAD). U posebno ležište na gelu naneto je i 10 µL DNK standarda za veličinu (O'GeneRuler 50 bp DNA Ladder, Thermo Scientific,

SAD). Elektroforeza se odvijala u vertikalnom polju u kadici sa 1xTBE puferom, u trajanju od 15 min/70V, a zatim 75 min/140V za PCR produkte veličine do 450 bp, odnosno 1h 50min/140V za PCR produkte duže od 600bp.

Po završenoj elektroforezi vizuelizacija razdvojenih DNK fragmenata na gelu je vršena postupkom bojenja srebro-nitratom po modifikovanoj metodi (Bassam i sar., 1991). Gelovi su fiksirani potapanjem u 10% rastvor etanola, potom su potopljeni u 1% rastvor azotne kiseline, pa dva puta isprani u ddH<sub>2</sub>O. Usledilo je potapanje gelova u 0,2% rastvor srebro-nitrata 30 minuta, a potom i tri ispiranja sa ddH<sub>2</sub>O. Vizuelizacija traka izvršena je potapanjem gelova u 3% rastvor natrijum karbonata sa 0,02% formaldehidom, do pojave traka, a bojenje je prekinuto prebacivanjem gelova u 10% rastvor glacijalne sirćetne kiseline.

### ***3.7.5. Prečišćavanje PCR produkata***

Nakon vizuelizacije svi PCR produkti su prečišćeni QIAquick PCR Purification kitom (Qiagen, SAD) radi eliminisanja nečistoća (viška nukleotida, prajmera, polimeraze i soli) pre reakcije sekvenciranja, po uputstvu proizvođača. Ukratko, jedan volumen uzorka je razblažen sa 5 volumena vezujućeg (PB) pufera, nanet na silika kolonu i centrifugiran 60 sekundi na 13000 rpm. Kolone su potom prebačene u nove tube, isprane puferom za ispiranje (PE pufer) i centrifugirane dva puta po 60 sekundi na 13000 rpm, a potom prebačene u nove tube. Dodavanjem elucionog pufera (EB pufer - 10 mM TrisHCl, pH 8,5) i centrifugiranjem 60 sekundi na 13000 rpm prečišćeni PCR produkti su eluirani sa kolona u čiste tube.

### ***3.7.6. Sekvenciranje i analiza rezultata***

Sangerovo bidirekciono sekvenciranje izvedeno je za svaki region i svaki uzorak u dve reakcije korišćenjem istih “forward” i “reverse” prajmera koji su korišćeni za amplifikaciju regiona od interesa. Sekvenciranje pripremljenih uzoraka (prečišćeni PCR produkt i forward/reverse prajmer) obavljeno je komercijalno na ABI 3730 sekvenatoru

(ABI 3730 capillary genetic analyzer, Applied Biosystems) u Holandiji (Macrogen, Holandija).

DNK sekvence su analizirane uz pomoć NCBI BLAST programa (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) za detekciju homozigotnih varijanti, poređenjem sa *wyld type* (engl. *wt*) sekvencama preuzetim iz Ensembl baze podataka ([www.ensembl.org/index.html](http://www.ensembl.org/index.html)). Za detekciju heterozigotnih varijanti korišćeni su FinchTV chromatogram viewer (Geospiza Inc., SAD), DNA Tools Xplorer (dnaTools, Inc., SAD) i CodonCode Aligner (CodonCode Corporation, SAD) softveri.

Sve detektovane promene u sekvencama regiona *FANCD2* gena označene su prema HGVS (engl. Human Genome Variation Society) i GRCh38.p2 nomenklaturi (engl. Genome Reference Consortium Human Build 38 patch release 2). Za sve pronađene varijante provereno je da li su opisane dostupnim bazama podataka, Ensembl (engl. Ensembl Variation Database, <https://www.ensembl.org/info/genome/variation/index.html>), dbSNP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP>) i Fankoni anemija bazi mutacija (engl. Fanconi anemia mutation database, <http://www2.rockefeller.edu/fanconi/>).

### 3.7.7. *In-silico* analiza

Sve pronađene varijante *FANCD2* gena su analizirane bioinformatičkim programima u cilju procena efekata pronađenih varijanti. Program Human splicing finder, HSF (<http://www.umd.be/HSF3/>) je korišćen za procenu efekta intronskih i egzonskih varijanti na mehanizam splajsovanja. Ovim programom definišu se tzv. konsenzus vrednosti (engl. Consensus Values, CV) donorskih i akceptorskih splajsnih mesta *wt* i mutirane sekvence, poredi njihova razlika ( $\Delta CV$ ) i na osnovu dobijenih vrednosti procenjuje se efekat varijante na mehanizam splajsovanja. Efekat egzonskih varijanti koje dovode do promene u aminokiselinskoj sekvenci proteina analiziran je PolyPhen2 programom (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>).

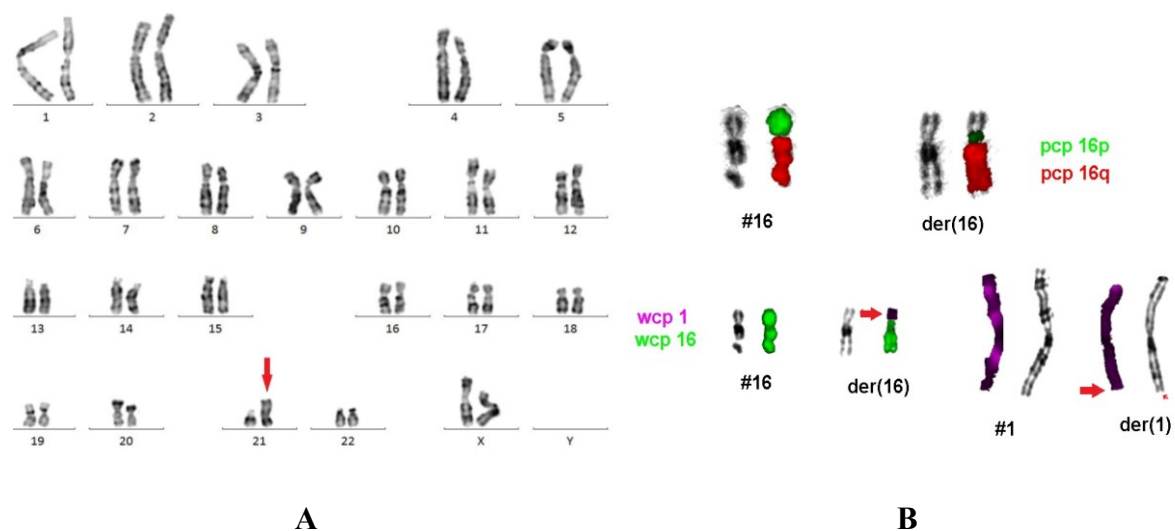
### **3.8. Statistička analiza**

Statistička analiza dobijenih rezultata urađena je u programu “Statistica 8.0“ za Windows. Razlike između grupa poređene su korišćenjem neparametrijskog Mann Whitney U testa, dok je korelacija ispitivana korišćenjem Spearman korelacionog testa. P vrednosti  $<0.05$  su smatrane značajnim.

#### 4. Rezultati

Istraživanjem je obuhvaćeno šest pacijenata uzrasta 3-13 godina, jedan muškog i pet ženskog pola. Dijagnoza je postavljena na osnovu kliničkih parametara i standardnog DEB testa, dok je pripadnost FA-D2 komplementacionoj grupi utvrđena Western blot analizom.

Na osnovu hematoloških i kliničkih parametara u trenutku uzorkovanja, pacijenti su podeljeni u dve grupe, grupu A sa izraženom pancitopenijom i teškom insuficijencijom koštane srži i grupu B sa umerenom insuficijencijom koštane srži i bez pancitopenije. U Tabeli 4.1. prikazani su kariotip i kliničke karakteristike obe grupe pacijenata uključenih u studiju. Kod pacijenata 5 i 6 iz grupe B pacijenata utvrđen je i nebalansirani kariotip u mozaiku (Tabela 4.1., Slika 4.1.).



**Slika 4.1.** Kariotip pacijenata sa nebalansiranim translokacijama. A – inverzno DAPI bojenje, crvena strelica pokazuje translokaciju hromozoma 15 i 21, 46,XX,der(21)t(15;21)(q15;p11.1) kod pacijenta 5; B – Fluorescentna *in situ* hibridizacija PCP (engl. Partial Chromosome Painting) i WCP (engl. Whole Chromosome Painting) probama za hromosome 1 i 16, crvene strelice pokazuju derivatne hromosome 1 i 16 usled translokacije 46, XY, der(16)t(1;16)(q42;p11.2) del(1)(q42) kod pacijenta 6.

**Tabela 4.1.** Kariotip, uzrast i kliničke karakteristike FA-D2 pacijenata uključenih u studiju.

Grupa	Pacijent	Kariotip	Godine	Pancitopenija	Kongenitalne anomalije
<b>A</b>	1	46, XX	8	Da	Mikrocefalija Nizak rast Prolaps mitralnog zaliska
	2	46, XX	3	Da	Nizak rast Nedostatak bubrega Vezikouretralni refluks Mikrocefalija Hipoplazija palca Mikrooftalmija
	3	46, XX	6	Da	Nizak rast Hipopigmentacija kože Hipoplazija palca
	4	46, XX	3	Ne	Hiperpigmentacija kože Sindaktilija Dupli ureter Nizak rast Mikrocefalija Mikrooftalmija
<b>B</b>	5	46,XX,der(21)t(15;21)(q15;p11.1)[5] / 46,XX[15]	13	Ne	Hiperpigmentacija kože Nizak rast
	6	46, XY, der(16)t(1;16)(q42;p11.2) del(1)(q42)[1]/46, XY[31]	12	Ne	Hipopigmentacija kože Nizak rast



#### 4.1. Analiza hromozomskih prekida u limfocitima periferne krvi

Kod pacijenata obe grupe analizirani su hromozomski prekidi u limfocitima periferne krvi netretiranih i tretiranih DEB-om. Analizirani su učestalost hromozomskih prekida, učestalost aberantnih i metafaza sa prekidima u netretiranim i tretiranim limfocitima, dok su kod DEB tretiranih limfocita posebno analizirani hromozomski regioni na kojima su prekidi locirani. Broj analiziranih ćelija, učestalost metafaza sa prekidima, aberantnih metafaza (metafaze sa prekidima, telomernim fuzijama i radijalnim strukturama) i učestalost hromozomskih prekida za svakog pacijenta prikazani su u Tabelama 4.2. i 4.3.. Mann-Whitney U statistički test korišćen je za poređenje razlika srednjih vrednosti između grupe pacijenata sa teškom (A) i umerenom (B) insuficijencijom koštane srži.

**Tabela 4.2.** Broj analiziranih metafaza, učestalost aberantnih, metafaza sa prekidima i učestalost prekida u bazalnom stanju u limfocitima obe grupe.

Grupa	Pacijent	Broj analiziranih metafaza	% aberantnih metafaza	% metafaza sa prekidima	% prekida
A	1	200	6	2	2
	2	280	5	2,86	2,86
	3	200	2	1	1
B	4	220	1,82	0,91	0,91
	5	320	1,25	0,63	0,63
	6	300	1,33	0,67	0,67

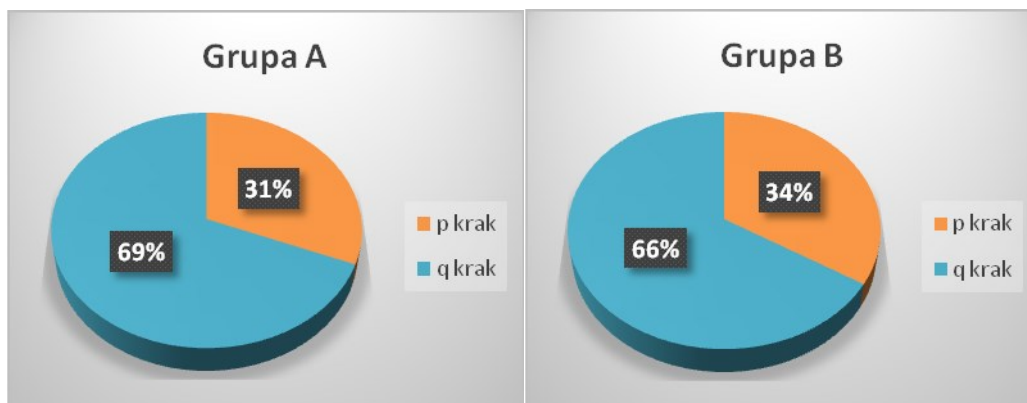
U bazalnom stanju, u limfocitima obe grupe učestalost hromozomskih prekida iznosila je do 2,86% ( $1,95 \pm 0,9$  u grupi A i  $0,74 \pm 0,15$  u grupi B). Učestalost aberantnih metafaza, metafaza sa prekidima i prekida bila je značajno viša u grupi A ( $p < 0,05$ ).

U DEB tretiranim limfocitima zabeležena je značajno viša učestalost hromozomskih prekida, aberantnih i metafaza sa prekidima u odnosu na sopstvenu kontrolu ( $p < 0,01$ ). Prosečna učestalost prekida u grupi B bila je viša nego u grupi A ( $21,78 \pm 4,6$  u grupi B naspram  $18,68 \pm 3,5$  u grupi A), ali bez statističke značajnosti ( $p = 0,275$ ). Učestalost aberantnih i metafaza sa prekidima, takođe je bila viša u grupi B ( $18,74 \pm 3,9$  i  $17,89 \pm 3,2$  u grupi B, redom, naspram  $17,95 \pm 2,2$  i  $14,98 \pm 1,99$  u grupi A, redom), ali ni za jedan od analiziranih parametara nije zabeležena statistička značajnost.

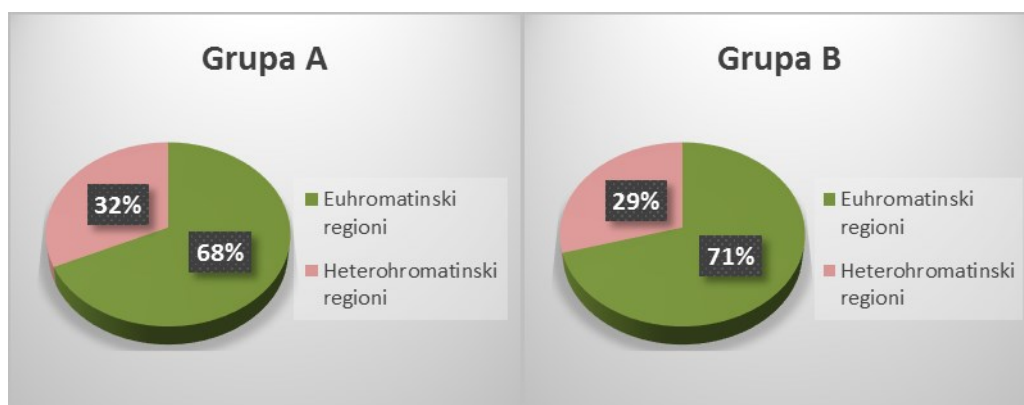
**Tabela 4.3.** Broj analiziranih metafaza, učestalost aberantnih, metafaza sa prekidima i učestalost prekida u DEB tretiranim limfocitima obe grupe.

Grupa	Pacijent	Broj analiziranih metafaza	% aberantnih metafaza	% metafaza sa prekidima	% prekida
A	1	1296	20,45	14,43	22,45
	2	1385	17,26	17,2	18,05
	3	1171	16,14	13,32	15,54
B	4	1281	16,63	16,23	19,75
	5	839	23,24	21,57	27,06
	6	863	16,34	15,87	18,54

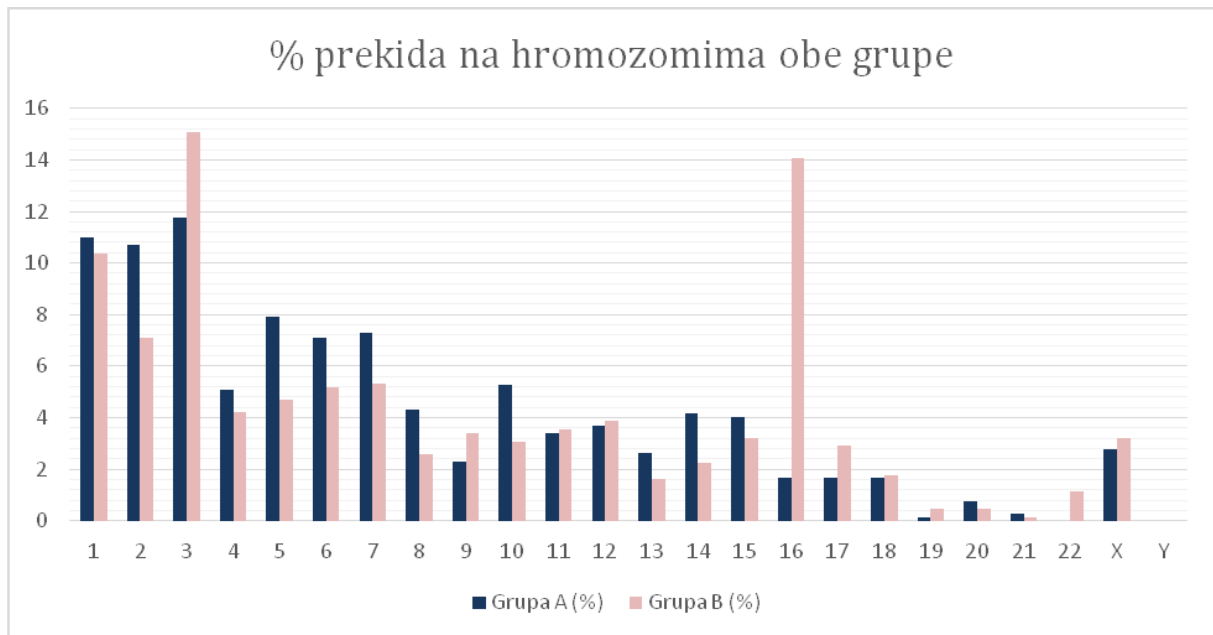
Kako je u bazalnom stanju učestalost prekida bila mala (prosečno  $1,95 \pm 0,93$  u grupi A i  $0,74 \pm 0,15$  u grupi B), detaljna analiza hromozomskih regiona u kojima su locirani prekidi izvršena je samo u DEB tretiranim limfocitima. Kod pacijenata prve grupe najviše prekida je locirano na hromozomima 1, 2, 3 i 5, a kod pacijenata druge grupe na hromozomima 1, 2, 3 i 16 (Slika 4.4.). Q krak je bio češće zahvaćen prekidima, oko dva puta češće od p kraka, kod obe grupe (Slika 4.2.). Takođe, kod obe grupe, euhromatinski regioni bili su više nego dva puta češće pogođeni prekidima (Slika 4.3.). Primer metafaze sa nekoliko hromozomskih prekida prikazan je na Slici 4.5.



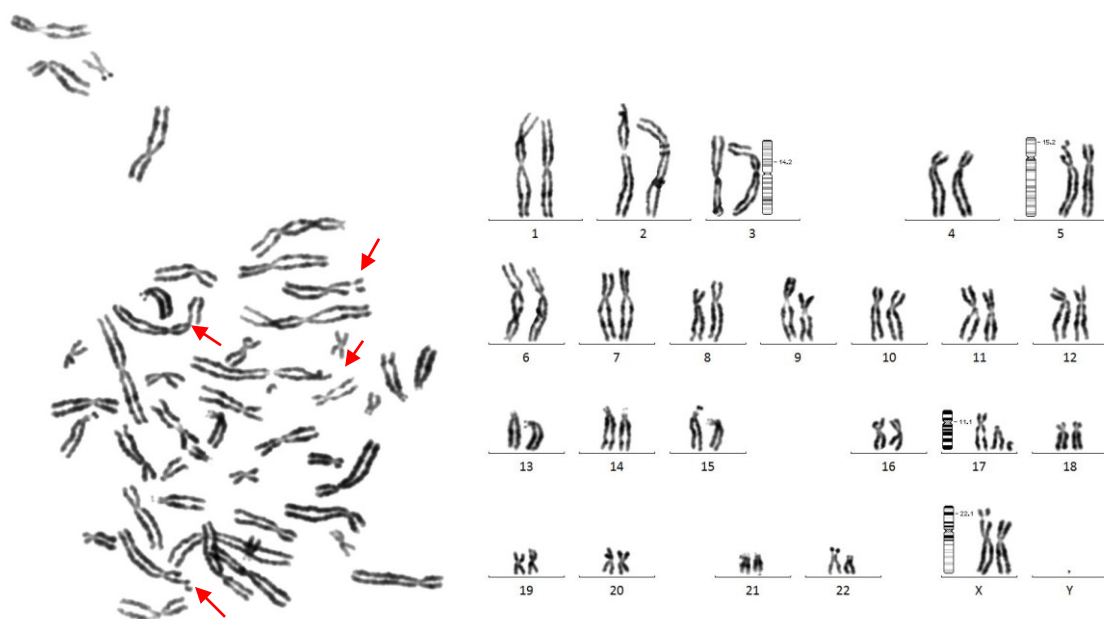
**Slika 4.2.** Procenat hromozomskih prekida na p i q kracima hromozoma kod grupe A i B.



**Slika 4.3.** Procenat hromozomskih prekida u euhromatinskim i heterohromatinskim regionima hromozoma kod grupe A i B.



**Slika 4.4.** Procenat hromozomskih prekida na pojedinačnim hromozomima obe grupe pacijenata.



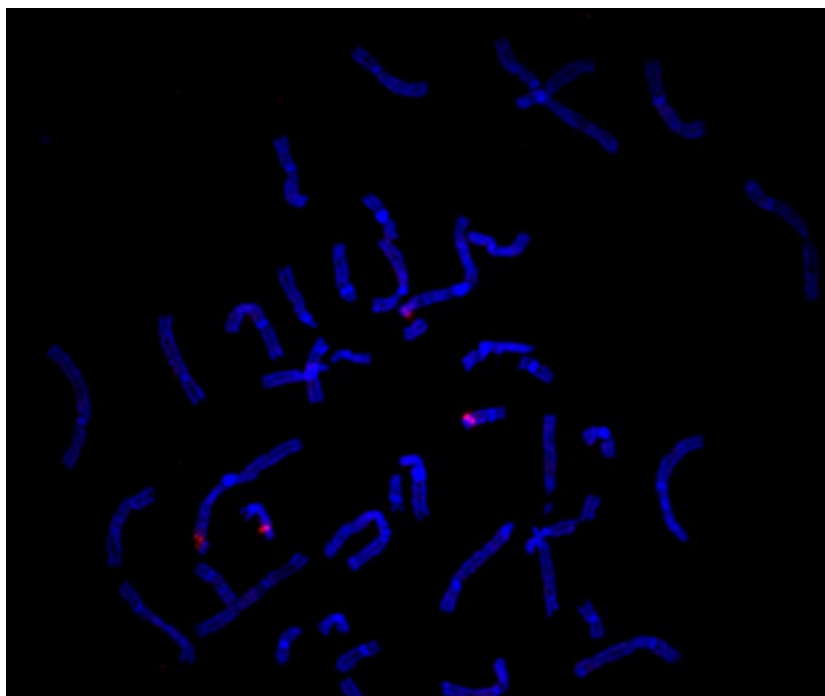
**Slika 4.5.** Fotomikrografija metafaze sa nekoliko hromozomskih prekida (crvene strelice) u DEB tretiranim limfocitima. Inverzno DAPI bojenje i IKAROS kompjuterski softver.

#### **4.2. Molekularno-citogenetička karakterizacija FA-D2 hromozomskih prekida i poređenje sa regionima fragilnih mesta**

Nakon završene citogenetičke analize, izvršena je molekularno-citogenetička karakterizacija najčešćih hromozomskih prekida kod svakog pacijenta. Na Institutu za humanu genetiku Univerzitetske klinike u Jeni (Nemačka) urađena je fluorescentna *in situ* hibridizacija panelom BAC-proba kojom je utvrđena precizna lokalizacija hromozomskih prekida.

Detaljna analiza prekida pokazala je da je lokalizacija i učestalost pojedinačnih hromozomskih prekida različita kod pacijenata u različitim stadijumima bolesti. Najčešći regioni prekida i kolokalizacija sa fragilnim mestima za svakog pacijenta obe grupe prikazani su u Tabeli 4.4., a reprezentativne fotomikrografije na Slikama 4.6., 4.7. i 4.8.

Većina hromozomskih prekida obe grupe pacijenata nalazi se u regionima čestih fragilnih mesta, osim kod pacijenta 1 iz grupe A gde je jedan od najčešćih prekida lociran na dugom kraku hromozoma 1, u regionu 1q42.2 (Tabela 4.4., Slika 4.6. i 4.7.).



**Slika 4.6.** Fotomikrografija metafaze na kojoj je urađen BAC-FISH sa probama za regione 1q42.2 (RP11-109G24) i 18q21.3 (RP11-15C15), DAPI bojenje.

**Tabela 4.4.** Citogenetička i molekularno-citogenetička lokalizacija najčešćih hromozomskih prekida, učestalost i kolokalizacija sa fragilnim mestima.

Grupa	Pacijent	Citogenetička lokalizacija prekida	Molekularno-citogenetička lokalizacija prekida	Učestalost prekida (%)	Kolokalizacija sa fragilnim mestom	Tip fragilnog mesta
A	1	1q42	1q42.2	1,718%	Distalno od FRA1H	Azacididin
		14q24	14q24.3	3,093%	FRA14G	Afidikolin
		18q21	18q21.3	1,718%	FRA18B	Afidikolin
	2	2q34-35	2q35	2,4%	FRA2U	Afidikolin
		3p14.2-14.3	3p14.2	2,4%	FRA3B	Afidikolin
		5q33	5q33.2	2%	FRA5O <sup>d</sup>	Proširena nomenklatura
		7q32	7q32.3	1,6%	FRA7H	Afidikolin
	3	3q27	3q27.2	2,747%	FRA3C	Afidikolin
		5q13	5q13.2	2,747%	FRA5K <sup>d</sup>	Proširena nomenklatura
		5q33	5q33.2	3,297%	FRA5O <sup>d</sup>	Proširena nomenklatura
B	4	3p14.2-14.3	3p14.2	11,067%	FRA3B	Afidikolin
		3p21	3p21.31	3,953%	FRA3H <sup>c</sup>	Proširena nomenklatura
		7q32	7q32.3	1,186%	FRA7H	Afidikolin
	5	1p13	1p13.3	1,762%	FRA1N <sup>b</sup>	Afidikolin
		1q21	1q21.2	1,322%	FRA1F	Afidikolin
		3p21	3p21.31	1,322%	FRA3H <sup>c</sup>	Proširena nomenklatura
		11q13	11q13.4	0,88%	FRA11H	Afidikolin
	6	3p14.2-14.3	3p14.2	1,875%	FRA3B	Afidikolin
		3p21	3p21.31	0,625%	FRA3H <sup>c</sup>	Proširena nomenklatura
		16q22	16q22.1	1,875%	FRA16C	Afidikolin
		16q23	16q23.1	6,875%	FRA16D	Afidikolin

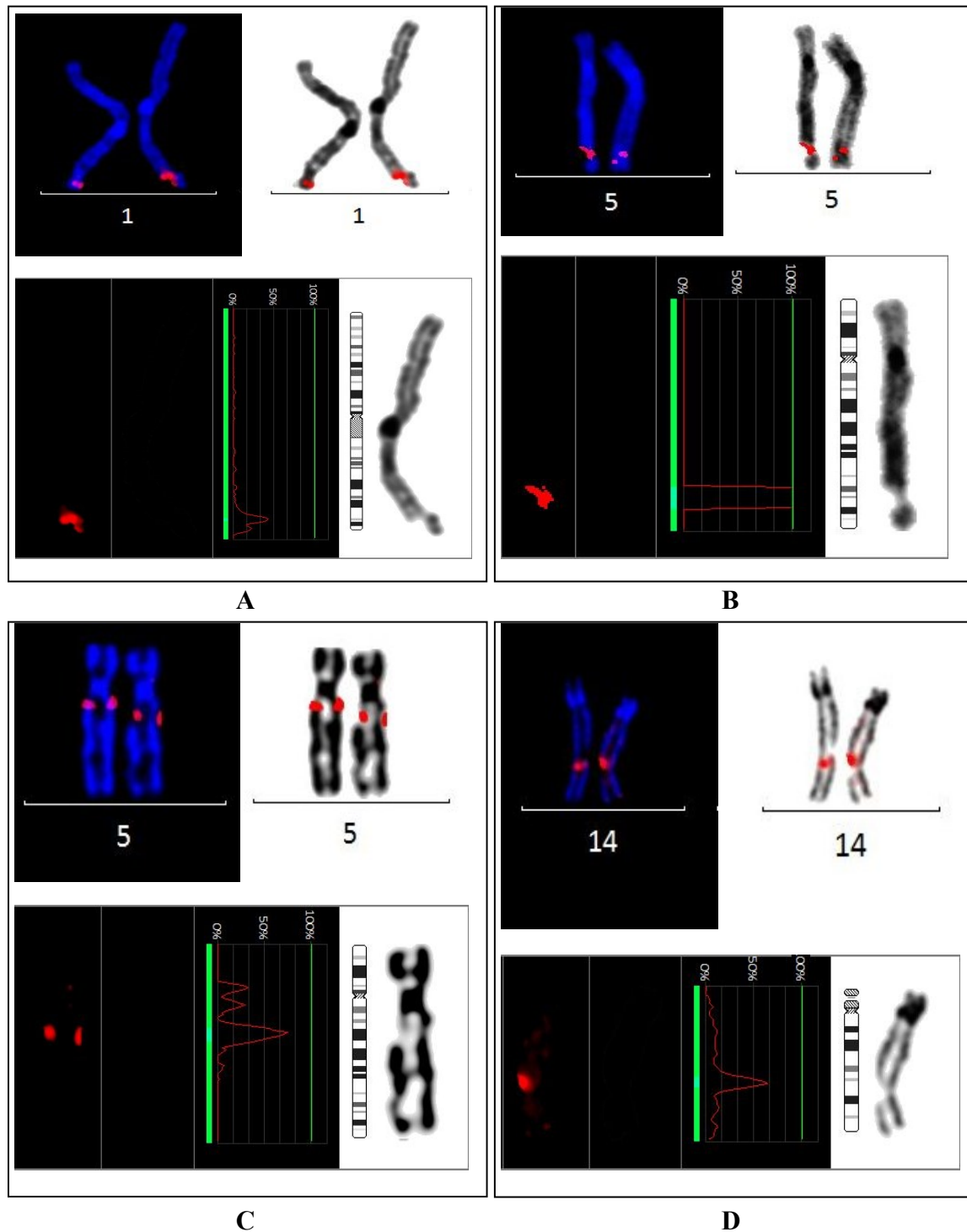
<sup>a</sup> Nomenklatura prema Lukusi i Fryns-u (Lukusa i Fryns, 2008)

<sup>b</sup> Nova proširena nomenklatura prema Mrasek i saradnicima (Mrasek i sar., 2010)

<sup>c</sup> Proširena nomenklatura prema Borgaonkaru (Borgaonkar, 1994)

<sup>d</sup> Proširena nomenklatura prema Simonic i Gerickeu (Simonic i Gericke, 1996)

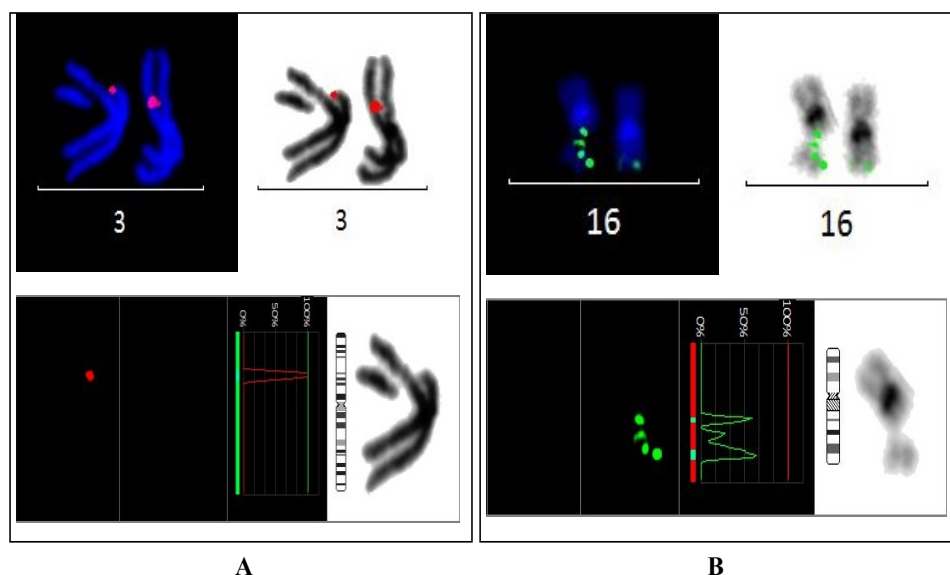
Kod pacijenata grupe A najčešći prekidi locirani su na hromozomima 1q, 2q, 3p, 5q, 7q, 14q i 18q. U ovoj grupi pacijenata prekidi na hromozomima su raspoređeni sa jednakom verovatnoćom počitavom genomu, zbog čega je učestalost prekida na pojedinačnim hromozomskim regionima mala, tako da najčešći prekidi u ovoj grupi nisu prelazili 3,297% od ukupnog broja prekida. Prekid u regionu 1q42.2 (pacijent 1) je jedini koji je često prisutan (1,72% od ukupnog broja prekida), a ne nalazi se u regionu fragilnih mesta; lociran je neposredno distalno od FRA1H. Svi ostali učestali hromozomski prekidi osim ovog smešteni su u regionima fragilnih mesta (FRA2U, FRA3B, FRA3C, FRA5O, FRA5K, FRA7H, FRA14G i FRA18B) koja pripadaju po svojim karakteristikama čestim fragilnim mestima, ali nisu najučestalija u opštoj populaciji. Osim prekida u regionu 5q33.2 (FRA5O) koji je jedan od najčešćih kod dva pacijenta ove grupe (2% kod pacijenta 2 i 3,29% kod pacijenta 3), nije primećeno da su najčešći prekidi kod različitih pacijenata locirani u istim hromozomskim regionima, odnosno prisutna je velika interindividualna varijabilnost.



**Slika 4.7.** Primeri najčešćih hromozomskih prekida kod pacijenata grupe A nakon BAC-FISH-a, DAPI, inverzno DAPI bojenje i histogram. A – prekid u regionu 1q42.2 (RP11-109G24); B – prekid u regionu 5q33.2 koji odgovara FRA5O (RP11-494C5); C – prekid u regionu 5q13.2 koji odgovara FRA5K (RP11-497H16); D – prekid u regionu 14q24.3 koji odgovara FRA14G (RP3-414A15).



U grupi B pacijenata najčešći prekidi su locirani na hromozomima 1p, 1q, 3p, 7q, 11q i 16q (Tabela 4.4.). Nasuprot grupi A, kod pacijenata grupe B svi česti hromozomski prekidi su locirani u hromozomskim regionima koji odgovaraju opisanim čestim fragilnim mestima (FRA1F, FRA1N, FRA3B, FRA3H, FRA7H, FRA16C i FRA16D) i to sa većom učestalošću nego kod grupe A pacijenata. U ovoj grupi takođe je prisutna interindividualna varijabilnost u učestalosti najčešćih prekida, međutim obrazac prekida kod dva pacijenta ove grupe je sličan – kod pacijenata 4 i 6: najveća učestalost prekida zapažena je u hromozomskim regionima koji odgovaraju čestim fragilnim mestima čija je učestalost u opštoj populaciji najveća, FRA3B (11,07%) i FRA16D (6,87%), redom (Slika 4.8.). Kod pacijenta 5 iz ove grupe nije primećen ovakav obrazac prekida, već niža učestalost prekida u CFS regionima, slična pacijentima iz grupe A, ali je kod ovog pacijenta prisutan i nebalansiran kariotip, mos 46,XX,der(21)t(15;21)(q15;p11.1)[5]/46,XX[15]. Pored toga, prekid u regionu 3p21.31 (FRA3H) bio je jedan od najučestalijih kod sva tri pacijenta ove grupe (3,95%, 1,32% i 0,63% kod pacijenata 4, 5 i 6 redom), dok je prekid u regionu 3p14.2 (FRA3B) bio jedan od najučestalijih kod pacijenata 4 i 6 (11,07% i 1,88% redom).



**Slika 4.8.** Primeri najčešćih hromozomskih prekida kod pacijenata grupe B nakon BAC-FISH-a, DAPI, inverzno DAPI bojenje i histogram. A – prekid u regionu 3p14.2 koji odgovara FRA3B (RP11-129K20); B – prekid u regionu 16q23 koji odgovara FRA16D (RP11-358L22).

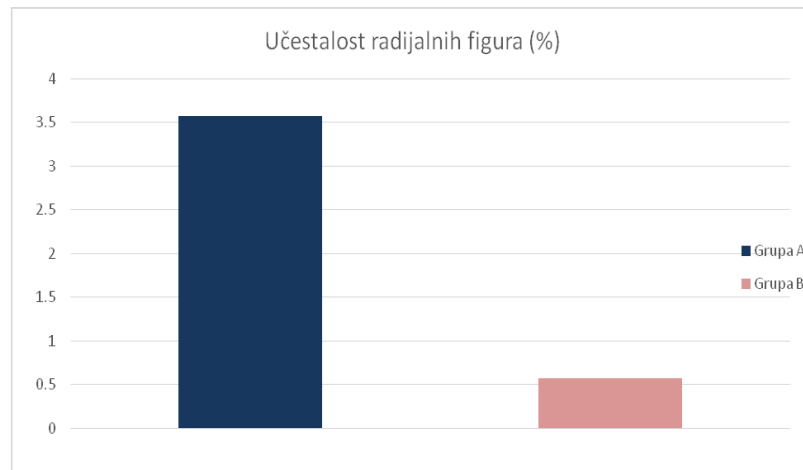
### 4.3. Analiza učestalosti i strukture radijala i učešće telomera u njihovom nastanku

Učestalost radijalnih figura (radijala) i telomernih fuzija prikazana je u Tabeli 4.5. i Slikama 4.9., 4.10 i 4.13. Posebno je analizirana struktura radijala, naročito uloga telomera u njihovom nastanku i dužina telomera pojedinačnih hromozoma.

**Tabela 4.5.** Procenat telomernih fuzija i radijalnih figura kod pacijenata obe grupe.

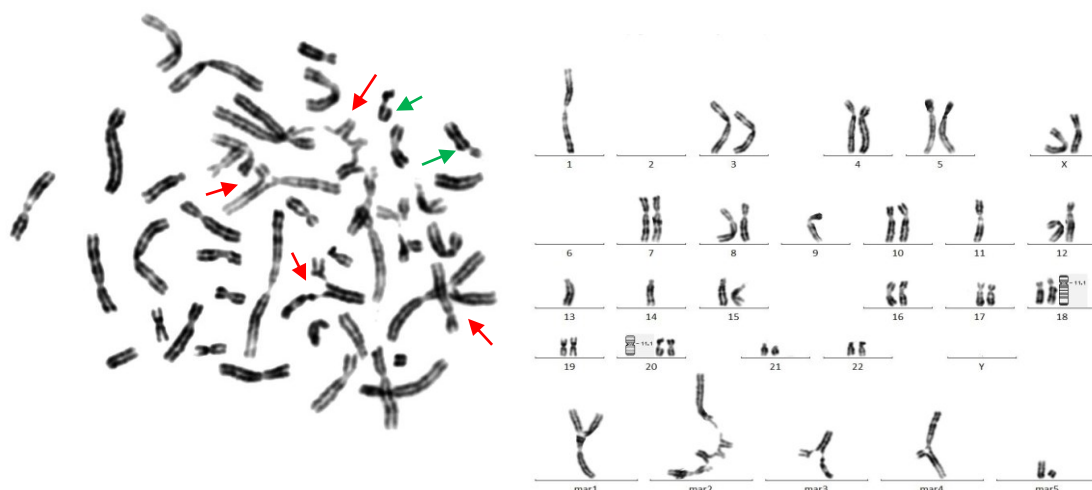
Grupa	Pacijent	Telomerne fuzije (%)	Radijalne figure (%)
A	1	1,95	7,06
	2	1,535	1,78
	3	1,62	1,878
B	4	0,078	0,78
	5	0,715	0,715
	6	0,23	0,23

U grupi B pacijenata učestalost radijala bila je niska, manja od 1% od ukupnog broja analiziranih metafaza (srednja vrednost  $0,575 \pm 0,3\%$ ), dok je u grupi A pacijenata učestalost radijala bila statistički značajno viša (srednja vrednost  $3,57 \pm 3\%$ ) ( $p < 0,05$ , Slika 4.9.).



**Slika 4.9.** Učestalost radijalnih figura kod obe grupe pacijenata.

Struktura radijala takođe je bila različita u različitim grupama pacijenata. U odnosu na strukturu i način nastanka svi analizirani radijali podeljeni su u tri grupe: jednostavni radijali (radijali nastali kao posledica jednostavne razmene intersticijalnih delova hromozoma, tri- i kvadri- radijali); radijali koji sadrže telomerne sekvence (nastali kao posledica razmene telomernih regiona jednog i ne-telomernih, intersticijalnih regiona drugog hromozoma, ili razmene u telomernim regionima) i složeni radijali koji su sastavljeni od tri ili više hromozoma (Slika 4.10.).

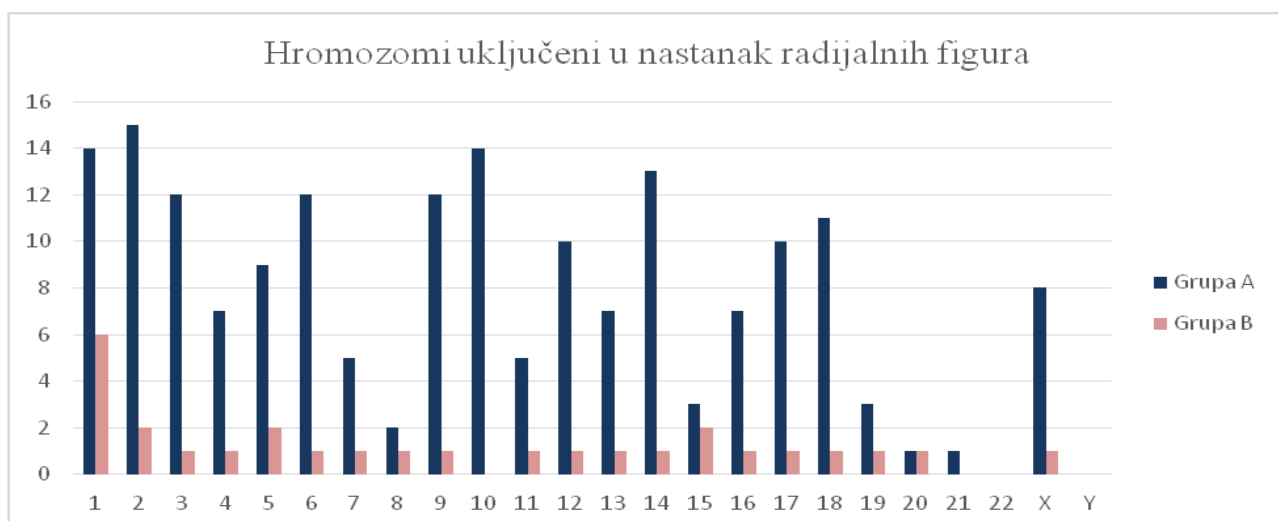


**Slika 4.10.** Fotomikrografija metafaze sa velikim brojem radijala, prostih i složenih, hromozomskim prekidima i marker hromozomima. Crvene strelice označavaju radijale, a zelene hromozomske prekide. Inverzno DAPI bojenje.

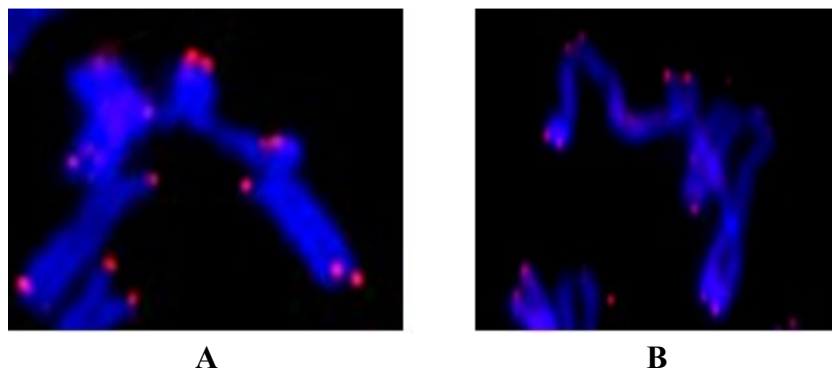
Visok procenat radijala u grupi A, 25,49%, je sadržao telomerne sekvence (50% radijala kod pacijenta 1 i po 22,7% kod pacijenata 2 i 3). Kod pacijenata B grupe bilo je manje radijala ovakve strukture, samo po dva kod pacijenata 4 i 5, dok kod pacijenta 6 nijedan radijal takve strukture nije primećen, svi radijali bili su jednostavni, tri- i kvadri-radijali.

Pacijent 1 kod kojeg je zapažena najvišaa učestalost radijala (7,06%) je šest meseci nakon uzorkovanja razvio tešku insuficijenciju koštane srži i upućen je na transplantaciju. Kod ovog pacijenta 50% radijala je sadržalo telomerne sekvence i zabeležen je visok procenat složenih radijala, 8,62%.

U obe grupe pacijenata radijali su se uvek formirali između nehomologih hromozoma, ali je distribucija hromozoma uključenih u njihov nastanak bila različita (Slika 4.11.). Hromozomi 1, 2, 9, 10 i 14 su najčešće formirali radijale u grupi A pacijenata, dok je u grupi B najčešće hromozom 1 bio u radijalima. Jedino hromozom 22 nije primećen u radijalima ni u jednoj grupi pacijenata. X hromozom je pronađen u radijalima kod svih pacijenata grupe A i kod jednog pacijenta grupe B. Prisustvo polnih hromozoma u radijalima predstavlja prvi takav podatak u naučnoj literaturi. Reprezentativne fotomikrografije telomernih fuzija i radijala prikazane su u Slikama 4.12. i 4.16.



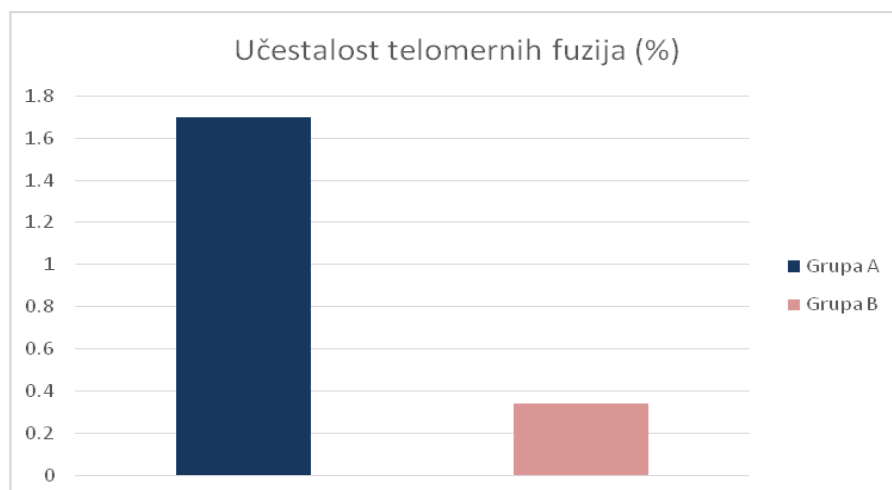
**Slika 4.11.** Broj hromozoma uključenih u nastanak radijalnih figura u obe grupe pacijenata.



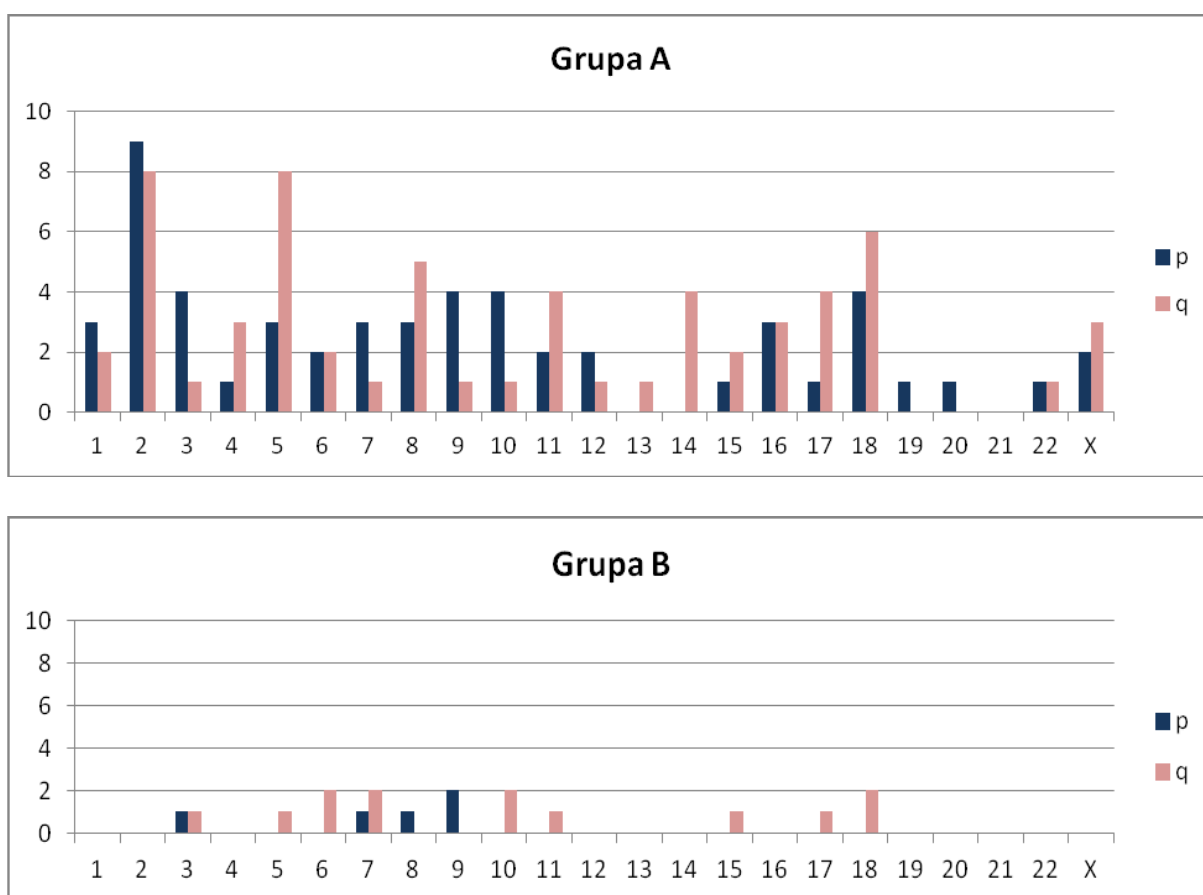
**Slika 4.12.** Složeni radijali, A – složeni radijal nastao usled razmene u telomernim regionima nekoliko hromozoma; B – složeni radijal nastao kao posledica razmene telomernih i intersticijalnih delova nekoliko hromozoma. Telomerni FISH, DAPI bojenje.

#### **4.4. Analiza telomernih fuzija**

Telomerne fuzije analizirane su u DEB tretiranim limfocitima obe grupe primenom telomernog FISH-a. Procenat telomernih fuzija je statistički značajno veći u grupi A ( $1,7 \pm 0,2\%$ ) u odnosu na grupu B pacijenata ( $0,341 \pm 0,3\%$ ) ( $p < 0,05$ , Slika 4.13.). U grupi A pacijenata telomerne fuzije su najčešće nastajale na kratkom kraku hromozoma 2, dugim krakovima hromozoma 2, 5 i 18, dok su u grupi B pacijenata hromozomi kratkog kraka hromozoma 9 i dugi krakovi hromozoma 6, 7, 10 i 18 najčešće bili uključeni u nastanak telomernih fuzija (Slika 4.14.).

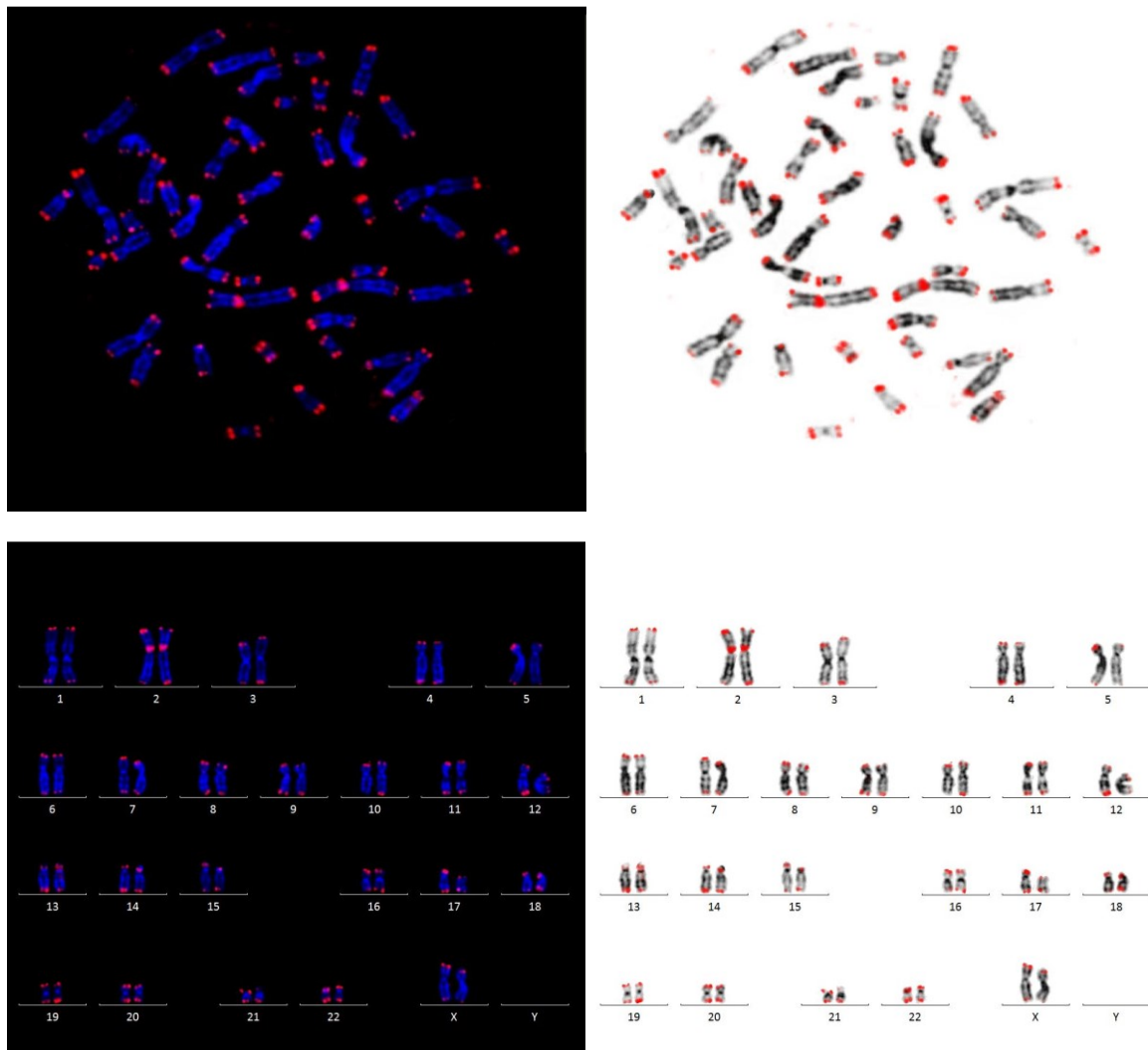


**Slika 4.13.** Učestalost telomernih fuzija kod obe grupe pacijenata.

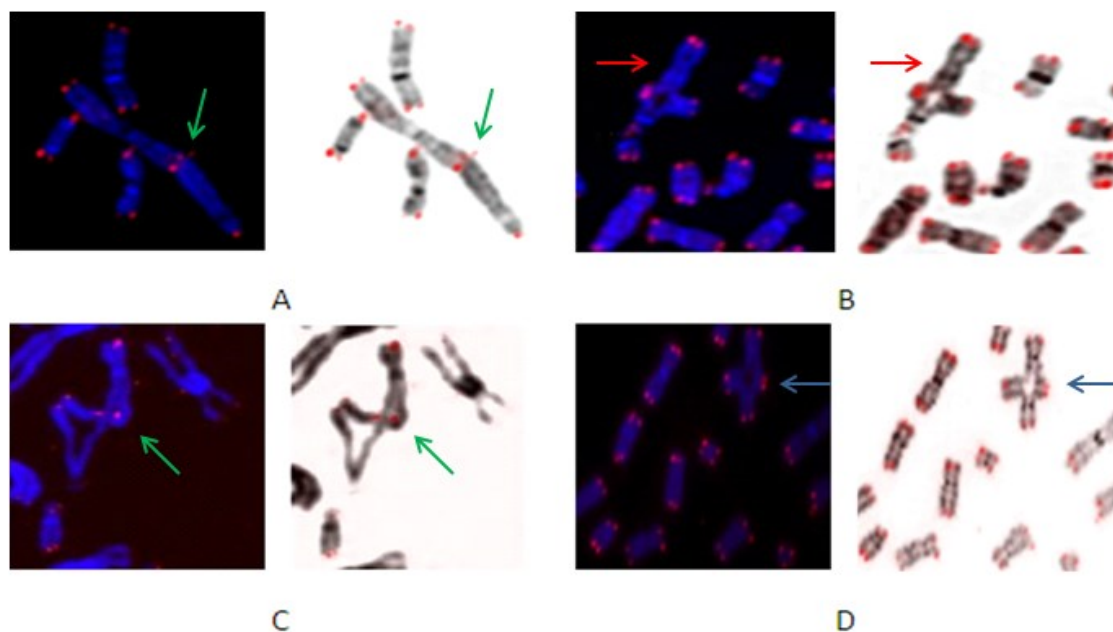


**Slika 4.14.** Broj hromozoma (p i q krak) uključeni u nastanak telomernih fuzija u obe grupe pacijenata.

Na Slici 4.15. prikazan je primer metafaze i kariograma nakon telomernog FISH-a, dok Slika 4.16. prikazuje reprezentativne fotomikrografije telomernih fuzija i radijala nakon telomernog FISH-a.



**Slika 4.15.** Reprezentativne fotomikrografije telomernog FISH-a sa PNA telomernom i centromernom probom za hromozom 2, metafaza i kariogram, DAPI i inverzno DAPI bojenje.



**Slika 4.16.** Reprezentativne fotomikrografije telomernog FISH-a na FA-D2 metafazama, DAPI i inverzno DAPI bojenje. Zelene strelice označavaju telomerne signale; A – telomerna „end-to-end“ fuzija, na mestu fuzije dva hromozoma prisutna su tri telomerna signala; B – radijalna figura između hromozoma X i 13, crvena strelica označava hromozom X u radijalu; C – radijalna figura između telomera jednog i intersticijalnog regiona drugog hromozoma; D – plava strelica označava jednostavnu radijalnu figuru.

#### 4.4.1. Relativna kvantifikacija dužine telomera

Prosečna dužina telomera u grupi A je iznosila  $24,5 \pm 10,6$  RTLU, dok je u grupi B iznosila  $21,8 \pm 1,8$  RTLU. Mann-Whitney statistički test pokazao je da ne postoji značajna razlika u dužini telomera između dve grupe pacijenata ( $p=0,442$ ). U Tabeli 4.6. prikazane su vrednosti prosečne dužine telomera za svakog pacijenta obe grupe.

Kvantifikacija dužine telomera na pojedinačnim hromozomima pokazala je širok raspon dužina među pojedinačnim hromozomima, od 2,22 do 74,62 RTLU. Analiza korelacije (Spearman koeficijent korelacije) pokazala je negativnu korelaciju između dužine telomera pojedinačnih hromozoma i telomernih fuzija za obe grupe pacijenata ( $r=-0,199$ ,  $p<0,05$ , grupa A;  $r=-0,349$ ,  $p<0,01$ , grupa B), odnosno da su hromozomi sa

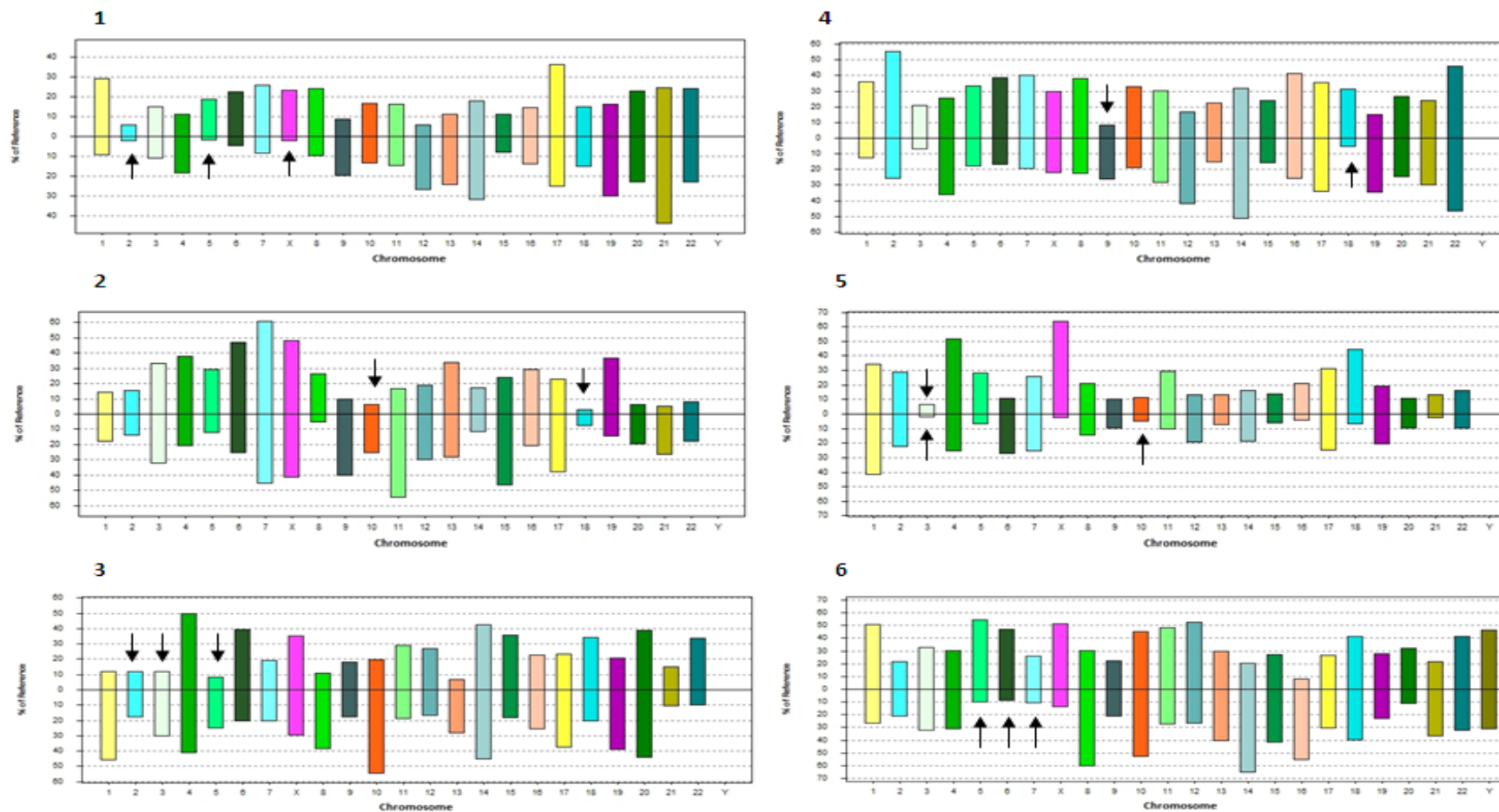


najkraćim telomerama uključeni u nastanak telomernih „end-to-end“ fuzija (Slika 4.17.). Najveća heterogenost u dužini telomera primećena je kod pacijenta 1 (grupa A) koji je ubrzo nakon uzorkovanja upućen na transplantaciju koštane srži usled teške insuficijencije i pacijenta 5 (grupa B) koji pored FA ima nebalansirani mozaični kariotip (Tabela 4.1.).

**Tabela 4.6.** Dužina telomera izražena u RTLU za svakog pacijenta obe grupe.

Grupa	Pacijent	Dužina telomera (RTLU $\pm$ SD*)
<b>A</b>	1	14,76 $\pm$ 3,23
	2	23,02 $\pm$ 12,73
	3	35,72 $\pm$ 7,00
<b>B</b>	4	20,48 $\pm$ 12,24
	5	21,01 $\pm$ 10,33
	6	23,91 $\pm$ 6,92

\*RTLU – engl. Relative Length Telomere Units, relativne jedinice dužine telomera, SD – Standardna Devijacija



**Slika 4.17.** Dužine telomera pojedinačnih hromozoma za svakog pacijenta (1-6) dobijene Q-FISH metodom. Iznad X-ose prikazane su dužine telomera p krakova, a ispod q krakova. Strelice pokazuju krakove hromozoma koji su najčešće uključeni u telomerne fuzije.

#### 4.5. Analiza mutacija u odabranim regionima gena *FANCD2*

Analizom izabranih regiona gena *FANCD2* utvrđeno je prisustvo 10 genskih varijanti. U Tabeli 4.7. su prikazane sve detektovane varijante i njihovi efekti ukoliko su poznati u trenutno dostupnim bazama podataka. Od svih detektovanih varijanti, osam je u intronskim regionima, a dve u egzonima gena *FANCD2*. Većina detektovanih nukleotidnih izmena je u heterozigotnom stanju, izuzev jedne u homozigotnom stanju u intronu 12, c.990-133 G>T, koja je prisutna kod svih pacijenata. Pretraživanjem baza podataka utvrđeno je da je ova nukleotidna izmena uobičajeno prisutna u zdravoj populaciji i nema klinički značaj. Učestalosti varijanti koje su prethodno prijavljene u svetskoj i evropskoj populaciji prikazane su u Tabeli 4.8.

*In-silico* analiza pokazala je da od svih varijanti, četiri (intron 3, c.206-246delG; intron 12, c.990-38 C>G; intron 28, c.2716-306 A>G; i egzon 14, c.1122 A>G) mogu uticati na mehanizam splajsovanja, odnosno mogu dovesti do stvaranja novih splajsnih mesta.

Heterozigotne varijante u intronu 3, c.206-246delG; egzonu 26, c.2396 C>A i intronu 28, c.2715+573 C>T nisu prethodno prijavljene u literaturi i dostupnim bazama podataka (Tabela 4.7.).

**Tabela 4.7.** Detektovane varijante *FANCD2* gena i predviđeni efekat na funkciju proteina.

Region <i>FANCD2</i> gena	Genomska pozicija (GRCh38.p2)	Human Genome Variation Society (HGVS) nomenklatura	Homozigotno/Heterozigotno stanje	Predviđeni efekat na funkciju proteina	Pacijent	Ensembl variation database (dbSNP)
<b>Intron 3</b>	g.10034223 delG	c.206-246 delG	Heterozigotno	Nije prijavljena, kreiranje novog akceptorskog splajsnog mesta	1 2 4	-
<b>Intron 12</b>	g.10043351 G>T	c.990-133 G>T	Homozigotno T/T	Intronska varijanta	1 2 3 4 5 6	rs803335
<b>Intron 12</b>	g.10043446 C>G	c.990-38 C>G	Heterozigotno C/G	Intronska varijanta, kreiranje novog akceptorskog splajsnog mesta	1 4	rs9809061
<b>Egzon 14</b>	g.10043852 A>G	c.1122 A>G	Heterozigotno A/G	Protein kodirajuća sinonimna varijanta, kreiranje novog donorskog splajsnog mesta	1 2 4 6	rs34046352
<b>Intron 14</b>	g.10043940 G>T	c.1134+76 G>T	Heterozigotno G/T	Intronska varijanta	1 2 4 6	rs35870071
<b>Intron 16</b>	g.10048089 A>C	c.1413+38 A>C	Heterozigotno A/C	Intronska varijanta	4 6	rs7615646
<b>Intron 21</b>	g.10064163 A>G	c.1948-193A>G	Heterozigotno A/G	Intronska varijanta	1 2 5	rs2347585
<b>Egzon 26</b>	g.10067219 C>A	c.2396 C>A	Heterozigotno C/A	p.A799D	2 5	-
<b>Intron 28</b>	g.10074250 C>T	c.2715+573 C>T	Heterozigotno C/T	Nepoznat, neprijavljena intronska varijanta	1 2 4 6	-
<b>Intron 28</b>	g.10074224 A>G	c.2716-306 A>G	Heterozigotno A/G	Intronska varijanta, kreiranje novog donorskog splajsnog mesta	2	rs192804303

**Tabela 4.8.** Učestalost pronađenih varijanti u svetskoj i evropskoj populaciji prema podacima iz HapMap projekta i 1000 genoma (preuzeto iz Ensembl baze, <https://www.ensembl.org/index.html>).

<b>Region <i>FANCD2</i> gena</b>	<b>Varijanta <i>FANCD2</i> gena Human Genome Variation Society (HGVS) nomenklatura</b>	<b>Učestalost alela u opštoj/evropskoj populaciji (HapMap i 1000 genoma)</b>	<b>Učestalost genotipa u opštoj/evropskoj populaciji (HapMap i 1000 genoma)</b>
<b>Intron 3</b>	c.206-246 delG	-	-
<b>Intron 12</b>	c.990-133 G>T	0,952/0,913	0,089/0,171
<b>Intron 12</b>	c.990-38 C>G	0,212/0,139	0,284/0,235
<b>Exon 14</b>	c.1122 A>G	?/0,034	?/0,067
<b>Intron 14</b>	c.1134+76 G>T	0,300, mali uzorak	0,600, mali uzorak
<b>Intron 16</b>	c.1413+38 A>C	0,179/0,139	0,272/0,235
<b>Intron 21</b>	c.1948-193A>G	0,026/0,070	0,049/0,131
<b>Exon 26</b>	c.2396 C>A	-	-
<b>Intron 28</b>	c.2715+573 C>T	-	-
<b>Intron 28</b>	c.2716-306 A>G	0,001/0,002	0,002/0,004

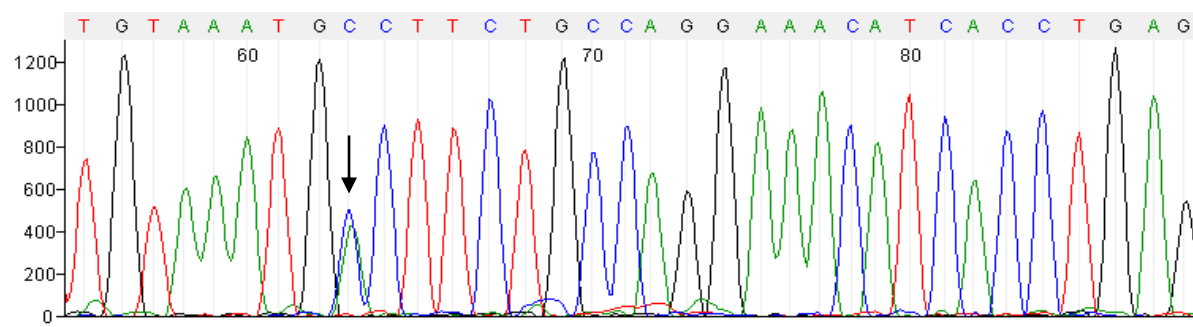
#### 4.5.1. Egzonske varijante

U 6 analiziranih egzonskih regiona gena *FANCD2* pronađene su dve nukleotidne izmene, heterozigotna u egzonu 26, c.2396 C>A i heterozigotna varijanta u egzonu 14, c.1122 A>G.

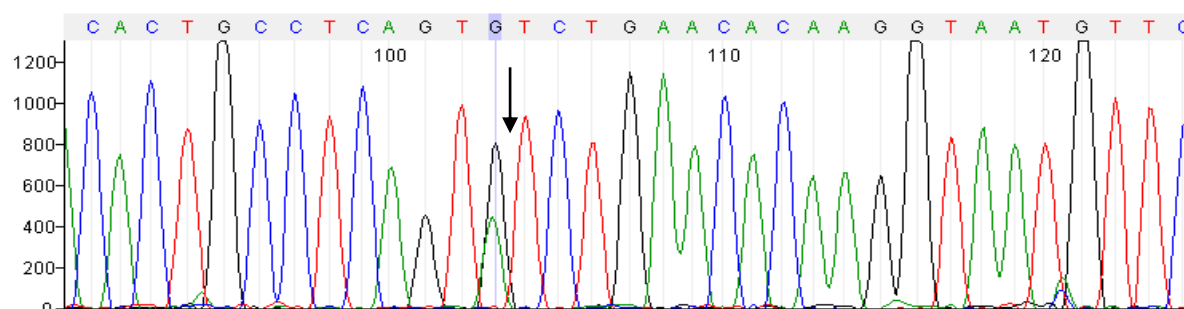
Heterozigotna varijanta u egzonu 26, c.2396 C>A (Slika 4.18.) pronađena je kod dva pacijenta (pacijent 2 i 5). Iako ova varijanta nije prethodno prijavljena u literaturi i dostupnim bazama podataka, identifikovana je ranijim sekvenciranjem *FANCD2* gena pacijenta 2 sprovedenim na Departmanu za Humanu genetiku Univerziteta u Vurzburgu, Nemačka. U ovom istraživanju potvrđeno je prisustvo te varijante kod dva

pacijenta. Bioinformatička analiza pokazala je da je u pitanju missense mutacija koja dovodi do supstitucije alanina asparaginskom kiselinom na poziciji 799 FANCD2 proteina, p.A799D (PolyPhen2 program, skor - 0,99).

Heterozigotna varijanta u egzonu 14, c.1122 A>G (Slika 4.19.), pronađena je kod četiri pacijenta (pacijenti 1, 2, 4 i 6). Ova promena prethodno je prijavljena u dbSNP - rs34046352 i opisana kao sinonimna varijanta (engl. protein coding synonymous variant), međutim, eksperimentalni podaci o efektu na funkciju proteina nisu dostupni. *In-silico* analiza ove varijante HSF programom predvidela je da ona dovodi do aktivacije kriptičnog donorskog splajsnog mesta u egzonu 14 i potencijalnog aberantnog splajsovanja (HSF vrednosti: wt – 40,32, mutant – 67,16,  $\Delta$ CV – 66,57%).



**Slika 4.18.** Hromatogram heterozigotne *FANCD2* varijante u egzonu 26, c.2396 C>A. Strelica pokazuje dva pika (C i A) na poziciji c.2396 *FANCD2* gena.



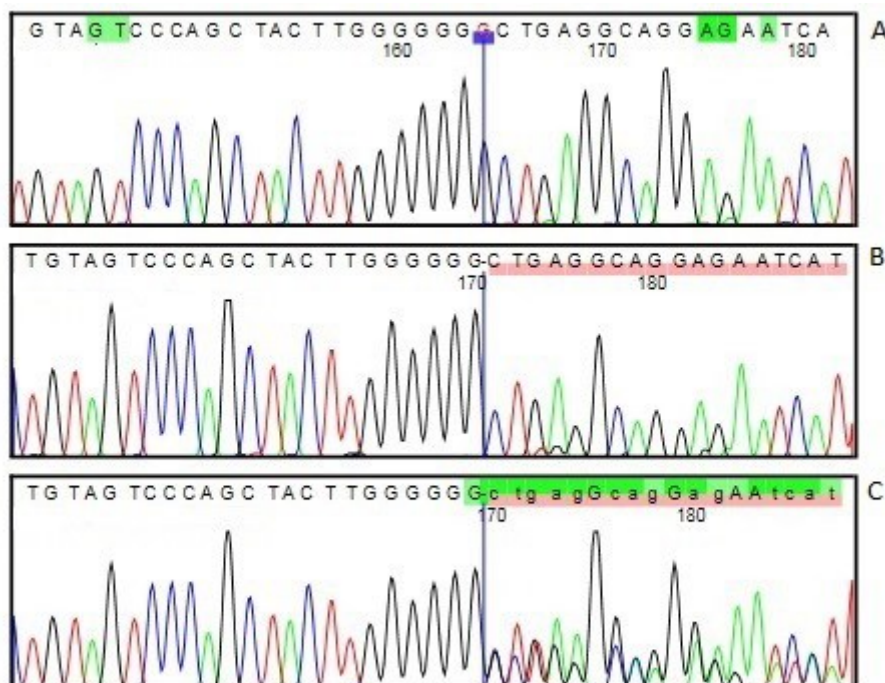
**Slika 4.19.** Hromatogram heterozigotne *FANCD2* varijante u egzonu 14, c.1122 A>G. Strelica pokazuje dva pika (A i G) na poziciji c.1122 *FANCD2* gena.

#### 4.5.2. Intronske varijante

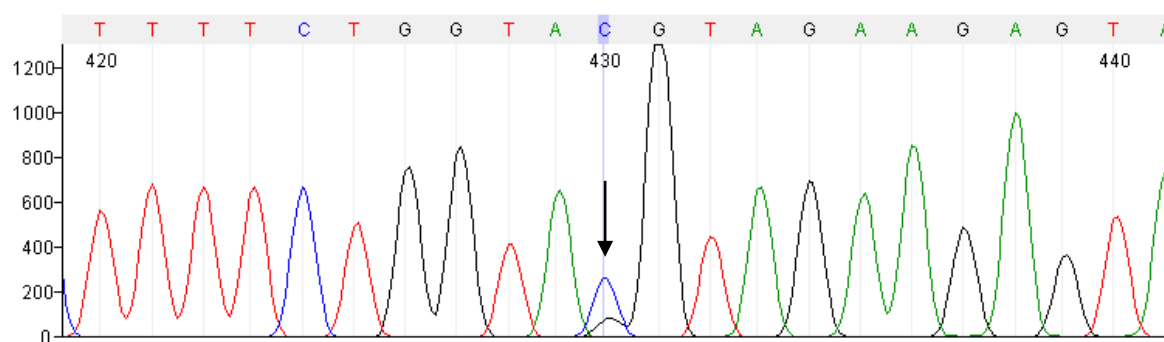
U 6 analiziranih intronskih regiona gena *FANCD2* pronađeno je 8 varijanti od kojih su mnoge prethodno prijavljene u bazama podataka, ali njihov funkcionalni značaj nije ispitivan (Tabela 4.7.). *In-silico* analiza intronskih varijanti pokazala je tri varijante mogu imati uticaj na mehanizam splajsovanja, i to varijante u intronu 3, c.206-246 delG; intronu 12, c.990-38 C>G i intronu 28, c.2716-306 A>G.

Delecija guanina u regionu introna 3, c.206-246delG nije prethodno prijavljena u literaturi i dostupnim bazama podataka (Slika 4.20.). Ova varijanta je detektovana kod tri pacijenta (pacijenti 1, 2 i 4). *In-silico* analiza pokazala je može dovesti do stvaranja novog akceptorskog splajsnog mesta ushodno od fiziološkog akceptorskog splajsnog mesta za egzon 4 (HSF vrednosti: wt – 10.13, mutant – 77.24,  $\Delta CV$  – 662.49%).

Nukleotidna izmena u regionu introna 12, c.990-38 C>G detektovana je kod dva pacijenta (pacijenti 1 i 4, Slika 4.21.). *In-silico* analiza ove varijante takođe je pokazala mogućnost nastanka novog akceptorskog splajsnog mesta ushodno od fiziološkog splajsnog mesta za egzon 13 (HSF vrednosti: wt – 56.61, mutant – 85.55,  $\Delta CV$  – 51.12%). Ova varijanta prethodno je prijavljena u bazama podataka, rs9809061 u dbSNP, ali njen funkcionalni značaj nije ispitivan.



**Slika 4.20.** Hromatogram heterozigotne *FANCD2* varijante u intronu 3, c.206-246delG. Plave vertikalne linije označavaju poziciju delecije; A – normalan hromatogram kontrolnog uzorka; B – heterozigotni indel; C – heterozigotna delecija guanina, zapažaju se dvostruki pikovi iza mesta delecije.

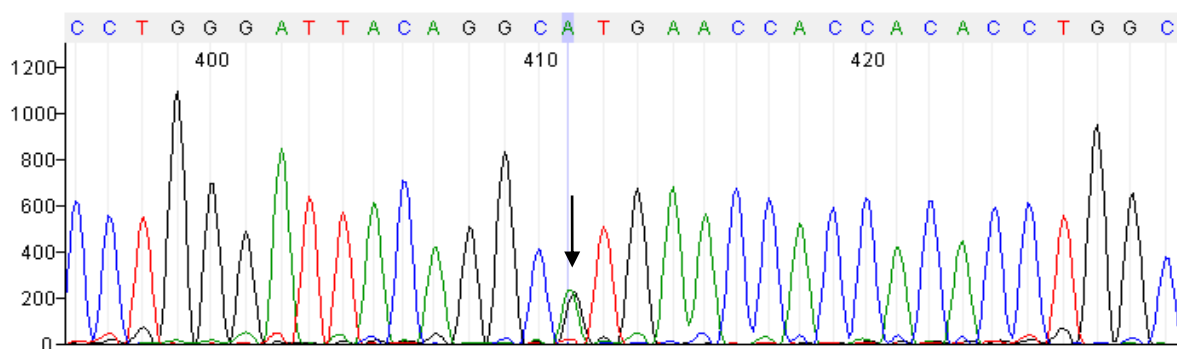


**Slika 4.21.** Hromatogram heterozigotne *FANCD2* varijante u intronu 12, c.990-38 C>G. Strelica pokazuje dva pika (C i G) na poziciji c.990 *FANCD2* gena.

Nukleotidna izmena u regionu introna 28, c.2716-306 A>G detektovana je kod jednog pacijenta (pacijent 2, Slika 4.22.). *In-silico* analizom utvrđeno je da ova varijanta



dovodi do stvaranja novog donorskog splajsnog mesta nishodno od fiziološkog splajsnog mesta za egzon 28 (HSF vrednosti: wt – 40.04, mutant – 66.87,  $\Delta CV$  – 67.01%). U dbSNP ova varijanta je prijavljena kao rs192804303, ali takođe ne postoje eksperimentalni podaci o njenim efektima na funkciju proteina.



**Slika 4.22.** Hromatogram heterozigotne *FANCD2* varijante u intronu 28, c.2716-306 A>G. Strelica pokazuje dva pika (A i G) na poziciji c.2716 *FANCD2* gena.

Ostale intronske varijante, c.990-133 G>T u intronu 12 (rs803335 u dbSNP), c.1134+76 G>T u intronu 14 (rs35870071 u dbSNP), c.1413+38 A>C u intronu 16 (rs7615646 u dbSNP), c.1948-193A>G u intronu 21 (rs2347585 u dbSNP) i c.2715+573 C>T u intronu 28 (nova varijanta) detektovane su u heterozigotnom obliku. *In-silico* analiza nije pokazala da bilo koja od ovih varijanti dovodi do poremećaja u mehanizmu splajsovanja.

#### 4.5.3. Distribucija varijanti gena *FANCD2* među pacijentima

U Tabeli 4.9. su prikazane sve detektovane varijante gena *FANCD2* kod pacijenata, kao i njihove učestalosti u populaciji. Detektovane patogene varijante na osnovu rezultata *in-silico* analiza prikazane su u Tabeli 4.10.

**Tabela 4.9.** Neprijavljene i prijavljene varijante *FANCD2* gena i njihova učestalost kod FA-D2 pacijenata.

Učestalost detektovanih <i>FANCD2</i> varijanti (prema HGVS nomenklaturi)			
Pacijent	Neprijavljene varijante	Varijante sa niskom učestalošću u populaciji (<1%)	Varijante sa učestalošću u populaciji >1%
1	c.206-246 delG c.2715+573 C>T	-	c.990-133 G>T c.990-38 C>G c.1134+76 G>T c.1948-193A>G c.1122 A>G
2	c.206-246 delG c.2715+573 C>T c.2396 C>A	c.2716-306 A>G	c.990-133 G>T c.1134+76 G>T c.1948-193A>G c.1122 A>G
3	-	-	c.990-133 G>T
4	c.2715+573 C>T c.206-246 delG	-	c.990-133 G>T c.990-38 C>G c.1134+76 G>T c.1413+38 A>C c.1122 A>G
5	c.2396 C>A	-	c.990-133 G>T c.1948-193A>G
6	c.2715+573 C>T	-	c.990-38 C>G c.1122 A>G c.1134+76 G>T c.1413+38 A>C

Kod samo jednog pacijenta (pacijent 3) detektovana je jedna varijanta i to u regionu introna 12, c.990-133 G>T; u homozigotnom stanju. Ova varijanta takođe je prisutna kod svih ostalih FA-D2 pacijenata i sa velikom učestalošću u opštoj svetskoj i evropskoj populaciji. Kod svih ostalih pacijenata, u analiziranim regionima pronađeno je najmanje tri ili više varijanti, dok je kod tri pacijenta (pacijenti 1, 2 i 4) pronađen veliki broj varijanti, čak i do 8.

Prema rezultatima *in-silico* analize HSF programom kod tri pacijenta (1, 2 i 4) pronađene su po dve patogene varijante. HSF skorovi za mutirani alel <70 su smatrani nesigurnim i takve varijante su odbačene kao patogene bez funkcionalnih analiza (egzon 14, c.1122 A>G i intron 28, c.2716-306 A>G). Kod pacijenta 5 pronađena je samo jedna patogene varijanta, dok kod pacijenata 3 i 6 ni za jednu od pronađenih varijanti nije predviđeno da mogu prouzrokovati defekte proteina i nastanak bolesti.

*In-silico* analiza svih varijanti pokazala je da od tri varijante koje nisu pronađene/prijavljene u literaturi i bazama podataka, dve (intron 3, c.206-246 delG i egzon 26, c.2396 C>A) bi mogle biti nove mutacije koje dovode do bolesti. Od prijavljenih varijanti za koje nema eksperimentalnih podataka o efektu na funkciju proteina, jedna (intron 12, c.990-38 C>G) može biti patogene.

**Tabela 4.10.** Detektovane patogene varijante kod svakog pacijenta na osnovu rezultata *in-silico* analiza.

Grupa	Pacijent	Patogene varijanta 1	Patogene varijanta 2
A	1	c.206-246 delG (Intron 3)	c.990-38 C>G (Intron 12)
	2	c.206-246 delG (Intron 3)	c.2396 C>A (Egzon 26)
	3	-	-
B	4	c.206-246 delG (Intron 3)	c.990-38 C>G (Intron 12)
	5	c.2396 C>A (Egzon 26)	-
	6	-	-

Poređenje rezultata sekvenciranja i BAC-FISH-a pokazalo je da ne postoji međusobna povezanost varijanti *FANCD2* gena i fragilnih mesta kod FA-D2 pacijenata.

## 5. Diskusija

Analiza hromozomskih prekida u bazalnom stanju limfocita periferne krvi pokazala je prosečnu učestalost prekida 2,86%, a značajno veću u grupi A pacijenata. Molekularno su okarakterisani hromozomski prekidi u DEB tretiranim ćelijama, jer ih je nakon indukcije DEB-om bilo značajno više. U DEB tretiranim limfocitima nije bilo značajne razlike u učestalosti hromozomskih prekida između dve grupe. U obe grupe najviše prekida prisutno je na hromozomima 1, 2 i 3, što je i očekivano imajući u vidu da su ovo najveći hromozomi u genomu. U A grupi pacijenata, hromozom 5 je takođe bio jedan od hromozoma sa najviše prekida, a u grupi B hromozom 16.

Analiza rasporeda prekida na p/q kraku pokazala je da je oko dva puta više prekida locirano na q kraku, što koreliše sa dužinom p/q kraka hromozoma, i dva puta češće su locirani u euhromatinskim regionima hromozoma (68% u grupi A i 71% u grupi B). Istraživanje distribucije hromozomskih prekida u limfocitima FA-A i FA-C ćelija takođe je pokazalo da se više prekida (58%) nalazi u euhromatinskim regionima, koji zbog slabije kondenzacije hromatina predstavljaju „slabe tačke“ hromozoma podložne prekidima (Schoder i sar., 2010). S druge strane, kako se fragilna mesta češće ispoljavaju u heterohromatinskim regionima, ovakav raspored prekida u FA limfocitima mogao bi biti karakteristika FA ćelijskog fenotipa. Za razliku od FA hromozomskih prekida, većina CFS se nalazi u heterohromatinskim regionima

Molekularno-citogenetička analiza najčešćih hromozomskih prekida obe grupe pokazala je da u FA-D2 primarnim limfocitima tretiranim DEB-om nisu svi hromozomi jednako skloni prekidima. Poređenjem rezultata DAPI bojenja i BAC-FISH-a utvrđeno je da najčešći hromozomski prekidi obe grupe (sa izuzetkom 1q42.2 koji je jedan od najčešćih prekida u grupi A) na molekularnom nivou kolokalizuju sa čestim fragilnim mestima, ali je učestalost i obrazac distribucije prekida drugačiji u zavisnosti od stadijuma bolesti.

Kolokalizacija hromozomskih prekida sa CFS u FA-D2 ćelijama je u saglasnosti sa istraživanjima Schoder-a i saradnika, koji su pokazali da se u FA-A i FA-C ćelijama najveći broj hromozomskih prekida (82,8%) takođe nalaze u regionima CFS, iako stadijum bolesti u ovom istraživanju nije bio poznat (Schoder i sar., 2010). Oni su

utvrdili da su kod FA-A i FA-C ćelija najčešći prekidi locirani u regionima FRA1A, FRA1D, FRA1E i FRA1J, kao i da je distribucija prekida drugačija od CFS indukovanih afidikolinom u ne-FA ćelijama. Prosečna učestalost najčešćih prekida u njihovoj studiji kretala se od 3 do 5%, pri čemu najzastupljeniji prekidi nisu bili u regionima najčešćih afidikolin-indukovanih CFS. Fundia i saradnici su takođe primetili da kod FA pacijenata nepoznate komplementacione grupe i stadijuma bolesti distribucija prekida nije nasumična, kao i da je drugačija u odnosu na kontrolu, te da najčešći prekidi odgovaraju FRA1A, FRA1D, FRA1F i FRA3B (Fundia i sar., 1994). Slična distribucija prekida primećena je i u našem istraživanju i to u grupi A FA-D2 pacijenata sa teškom insuficijencijom koštane srži. U ovoj grupi učestalost najčešćih prekida kretala se od 1,6 do 3,297%, ali su najčešći prekidi locirani u drugačijim regionima u odnosu na FA-A i FA-C ćelije – FRA2U, FRA3B, FRA3C, FRA5O, FRA5K, FRA7H, FRA14G, FRA18B i 1q42.2 koji se nalazi neposredno distalno od FRA1H (Curatolo i sar., 2007). Budući da su najčešći prekidi kod FA-D2 pacijenata locirani u drugačijim regionima u odnosu na FA-A i FA-C pacijente i da ne postoje literaturni podaci o hromozomskim prekidima FA-D2 grupe, moguće je da su oni specifični za ovu komplementacionu grupu. Zanimljivo je da sa progresijom bolesti ne dolazi do povećanja učestalosti hromozomskih prekida, ali dolazi do promene distribucije istih. Za razliku od grupe A, u grupi B pacijenata najčešći prekidi locirani su u regionima najčešćih CFS, FRA3B i FRA16D i to sa visokom učestalošću od 11,07% i 6,88%, redom. Ovakva distribucija prekida više odgovara onoj koja se može naći u ne-FA ćelijama tretiranim afidikolinom. Imajući u vidu da svi pacijenti uključeni u ovo istraživanje pripadaju istoj komplementacionoj grupi, a u zavisnosti od stadijuma bolesti pokazuju drugačiji obrazac distribucije prekida, postavlja se pitanje zbog čega je to tako?

Kao što je već prethodno spomenuto, postoji nekoliko faktora koji doprinose nestabilnosti regiona CFS – specifičnost DNK strukture (hiperfleksibilne AT sekvence), odložena replikacija, kolizija transkripcije i replikacije (R-petlje), tkivna zavisnost koja je usko povezana sa dinamikom replikacije i različitom ekspresijom gena lociranih u ovim regionima, kao i nedostatak ili smanjena funkcija nekog od proteina uključenih u održavanje stabilnosti CFS (Le Tallec i sar., 2014). FA/BRCA signalni put igra esencijalnu ulogu u održavanju stabilnosti CFS (Durkin i Glover, 2007), a u poslednje

vreme sve više značaja pridaje se ulozi FANCD2 proteina u njihovoj stabilnosti. Chan i saradnici pokazali su da replikativni stres dovodi do akumulacije FANCD2 proteina u regionima CFS, kao i da se FANCD2 locira u regionima CFS ne samo kada su oni prekinuti i u uslovima replikativnog stresa, već i u intaktnim hromozomima, učestvujući na neki način u održavanju stabilnosti ovih regiona (Chan i sar., 2009). Istraživanje koje su sprovedli García-Rubio i saradnici pokazalo je da proteini FA/BRCA puta, naročito FANCD2, utiču na stabilnosti CFS regiona tako što uklanjaju R-petlje, kao i da je većina DNK prekida u FANCD2 deficitarnim ćelijama posledica preterane akumulacije R-petlji (García-Rubio i sar., 2015). To znači da u nastanku DNK prekida i nestabilnosti CFS transkripcija određenih gena ima veliku ulogu, što su autori i dokazali. FANCD2 fokusi pronađeni su u velikoj meri na R-petljama, kako u MMC tretiranim ćelijama, tako i u netretiranim ćelijama. U primarnim ćelijama koštane srži FANCD2 deficitarnih miševa takođe je primećen znatno veći broj R-petlji, što je dovelo do zaključka da je FANCD2 neophodan za njihovo pravilno uklanjanje. Nedavno istraživanje Madireddy i saradnika potvrdilo je ulogu FANCD2 proteina u uklanjanju R-petlji, ali i pokazalo da u odsustvu FANCD2 proteina dolazi do zastoja replikativne viljuške u AT bogatim regionima CFS-a i smanjenja broja potencijalnih inicijatora replikacije. Isti autori su pokazali i da za održavanje stabilnosti CFS nije neophodna monoubikvitirana forma FANCD2, već da ovu ulogu ostvaruje nezavisno od monoubikvitinacije, koja je do skoro smatrana neophodnom za njegovu funkciju u očuvanju genomske stabilnosti (Madireddy i sar., 2016). Zastoj replikativne viljuške i smanjenje inicijatora replikacije bio je izraženiji u FANCD2 deficitarnim limfocitima u odnosu na FANCD2 deficitarne fibroblaste. U perifernoj krvi FA-D2 pacijenata su zapaženi povišeni endogeni nivoi reaktivnih kiseoničnih vrsta i izraženo prooksidativno stanje, što skraćuje životni vek krvnih ćelija iscrpljujući potencijale koštane srži za obnavljanjem (Petrovic i sar., 2011).

Zanimljivo je da nije pokazana značajna uloga „core“ proteina FA/BRCA puta u održavanju stabilnosti CFS, već samo FANCD2 i nishodnih, efektorskih proteina. Tako u odsustvu FANCA proteina nije zabeležen veći zastoj replikativne viljuške u regionu FRA16D i FRA6E, kao što je to slučaj kod FANCD2, dok su FANCD1 deficitarne ćelije pokazivale sličan zastoj kao kod nedostatka FANCD2, što je dovelo do zaključka da FA proteini na različit način, do sada nedovoljno poznat, utiču na stabilnost CFS

(Madireddy i sar., 2016). Različita uloga FA proteina u održavanju stabilnosti regiona CFS mogla bi biti uzrok ispoljavanja drugačijih fragilnih mesta u FA-D2 limfocitima u odnosu na FA-A i FA-C limfocite.

Kod FA-D2 pacijenata uključenih u naše istraživanje primećeno je da sa progresijom bolesti ne dolazi do povećanja učestalosti hromozomskih prekida, ali se distribucija prekida menja. Kao što je već spomenuto, sve je veći broj dokaza da transkripcija gena lociranih u regionima fragilnih mesta i nastanak R-petlji igraju značajnu ulogu u nastanku CFS. U skladu sa tom teorijom, Hazan i saradnici predložili su hipotezu da se specifična CFS u određenim tipovima ćelijama ponašaju kao upozoravajući senzori DNK oštećenja koji aktiviraju DDR (Hazan i sar., 2016). Drugim rečima, fragilna mesta su raspoređena na različitim hromozomima po čitavom genomu da bi u odgovoru na DNK oštećenja i replikativni stres održali integritet genoma. Iako nije sasvim jasno zbog čega u FA-D2 limfocitima dolazi do promene distribucije prekida, moguće je da se sa napredovanjem bolesti i povećanjem genomske nestabilnosti u ćelijama koštane srži eksprimiraju različiti geni kao pokušaj ćelija da kompenzuju progresivnu genomsku nestabilnost.

U grupi pacijenata sa umerenom insuficijencijom koštane srži (grupa B) primećena je daleko najveća učestalost FRA3B i FRA16D fragilnih mesta koja sadrže velike gene, veće od 1 Mbp (*FHIT* i *WWOX*). Ova fragilna mesta najčešće su prisutna u opštoj populaciji u odgovoru na replikativni stres. *FHIT* je tumor-supresor dužine oko 1.5Mbp, koji ima značajnu ulogu u održavanju stabilnosti genoma i regulisanju apoptoze (Waters i sar., 2014). *FHIT* štiti integritet genoma tako što sprečava spontani replikativni stres održavanjem nukleotidnog balansa (Saldivar i sar., 2012). U *FHIT* deficijntnim ćelijama dolazi do smanjenja pula timidin fosfata i akumulacije spontanih dvolančanih prekida, što dovodi do nastanka hromozomskih aberacija i mnogobrojnih kancera, pa se ovaj gen smatra veoma važnim za zaštitu genomske stabilnosti (Hazan i sar., 2016). Slično *FHIT*-u, *WWOX* je tumor-supresor dužine oko 1 Mbp, povezan sa mnogim kancerima (Gardenswartz i Aqeilan, 2014). Tumor-supresorsku ulogu ostvaruje kroz ulogu u DDR-u – u odgovoru na dvolančane prekide DNK dolazi do povećanja njegove ekspresije, aktivacije ATM-a i popravke oštećenja (Abu-Odeh i sar., 2014). Pored toga, *WWOX* protein indukuje i apoptozu kroz interakcije sa proapoptotskim

transkripcionim faktorima p53 familije proteina (Bednarek i sar., 2001). Sumirano, FHIT i WWOX predstavljaju prvu liniju odbrane genoma u odgovoru na replikativni stres i DNK oštećenja koji su kod FA veoma izraženi.

U grupi pacijenata sa teškom insuficijencijom koštane srži (grupa A) najčešći prekidi locirani su u drugim regionima, odnosno najčešća CFS su 1q42.2, FRA2U, FRA3B, FRA3C, FRA5K, FRA5O, FRA7H, FRA14G i FRA18B. Ovi hromozomski regioni takođe su veoma veliki, od 2 do 6 Mbp, ali za razliku od FRA3B i FRA16D u njima nisu locirani veliki geni, već veliki broj manjih gena (Tabela 5.1.). Međutim, slično *FHIT*-u i *WWOX*-u, neki od ovih gena imaju ulogu u kontroli ćelijskog ciklusa, tumorskoj supresiji i očuvanju genomske stabilnosti, a strukturne ili funkcionalne promene u njima mogu dovesti do nastanka raznih kancera.



Tabela 5.1. Geni locirani u regionima fragilnih mesta (NCBI, OMIM).

Fragilno mesto	Hromozomski region	Početak (GRCh38.p2)	Kraj (GRCh38.p2)	Gen	Dužina gena
<b>Molekularno okarakterisana fragilna mesta</b>					
<b>FRA3B</b>	3p14.2	58 600 001	63 800 000	FHIT	>1.5 Mbp
<b>FRA7H</b>	7q32.3	130 800 001	132 900 000	/	/
<b>FRA16D</b>	16q23.2	79 200 001	81 600 000	WVOX	1.1 Mbp
<b>Ne-okarakterisana fragilna mesta</b>					
<b>FRA1F</b>	1q21.2	147 500 001	150 600 000	33 gena	/
<b>FRA1N</b>	1p13.3	106 700 001	111 200 000	52 gena	/
<b>FRA2U</b>	2q35	214 500 001	220 700 000	70 gena	/
<b>FRA3C</b>	3q27.1	183 000 001	184 800 000	20 gena	/
<b>FRA3H</b>	3p21.31	44 200 001	50 600 000	78 gena	/
<b>FRA5K</b>	5q13.2	69 100 001	74 000 000	25 gena	/
<b>FRA5O</b>	5q33.2	153 300 001	156 300 000	8 gena	/
<b>FRA7F</b>	7q22.3	104 900 001	107 800 000	14 gena	/
<b>FRA11H</b>	11q13.4	70 500 001	75 500 000	48 gena	/
<b>FRA14G</b>	14q24.3	73 300 001	78 800 000	69 gena	/
<b>FRA16C</b>	16q22.1	66 600 001	70 800 000	95 gena	/
<b>FRA18B</b>	18q21.3	61 300 001	63 900 000	10 gena	/

Od svih učestalih FA prekida u obe grupe, jedino prekid u regionu 1q42.2 ne kolokalizuje sa do sada opisanim fragilnim mestima. Nalazi se neposredno distalno od FRA1H i sadrži 26 protein kodirajućih gena (NCBI; OMIM) uglavnom uključenih u

metabolizam ugljenih hidrata i proteina. Međutim, dva gena smeštena u ovom regionu imaju ulogu u očuvanju genomske stabilnosti, *TSNAX* (engl. Translin Associated Factor X) i *MAP3K21* (engl. Mitogen-Activated Protein Kinase 21). TSNAX protein formira heterodimer sa translinom, DNK vezujućim proteinom koji se vezuje za konsenzus sekvence prekinutih delova translociranih hromozoma u neoplazmama limfnog tkiva (Meng i sar., 2000). MAP3K21 protein je deo MAPK signalnog puta uključenog u veliki broj fundamentalnih ćelijskih funkcija, proliferaciju, diferencijaciju i apoptozu (Bandyopadhyay i sar., 2010).

Od 70 gena smeštenih u regionu FRA2U (2q35) (NCBI; OMIM) tri imaju značajnu ulogu u očuvanju genomske stabilnosti, *BARD1*, *NHEJ1* i *XRCC5*. *BARD1* (engl. *BRCA1*-Associated Ring Domain 1) je tumor-supresorski gen čija je interakcija sa N-terminalnim domenom *BRCA1* proteina neophodna za kontrolu hromozomske stabilnosti (Joukov i sar., 2006). Nezavisno od *BRCA1*, pokazano je *in vivo* i *in vitro* da *BARD1* ima proapoptotski efekat, naročito u odgovoru na genotoksični stres, i to najverovatnije vezivanjem za TP53 (Irminger-Finger i sar., 2001). Mutacije u *BARD1* genu mogu dovesti do karcinoma dojke i jajnika. *NHEJ1* (engl. Non-Homologous End Joining factor 1, *XLJF* – engl. *XRCC4* Like Factor) i *XRCC5* (engl. X-ray Repair Complementing defective in chinese hamster 5, Ku80) takođe su smešteni u ovom regionu i bitni za očuvanje genomske stabilnosti učesćem u putu nehomologog spajanja krajeva (engl. Non-Homologous End Joining, NHEJ) u odgovoru na dvolančane prekide DNK. Produkti oba ova gena akumuliraju se na mestu ogoljene dvolančane DNK i učestvuju u formiranju NHEJ kompleksa (Ahnesorg i sar., 2006; Guirouilh-Barbat i sar., 2007). NHEJ je put popravke DNK oštećenja kojim se oštećeni krajevi dvolančane DNK dovode u blizinu i direktno spajaju. U održavanju stabilnosti fragilnih mesta homologa rekombinacija je predominantni put popravke dvolančanih prekida nastalih u uslovima replikativnog stresa, pri čemu je uloga *FANCD2* u ovom putu i održavanju stabilnosti CFS neosporna (Durkin i Glover, 2007). Međutim, istovremeno sa HR, a naročito u uslovima kada HR ne funkcioniše, NHEJ ima ulogu u održavanju hromozomske stabilnosti u ovim regionima (Bergoglio i sar., 2013; Schwartz i sar., 2005), pa se povećana ekspresija proteina ovog puta može očekivati u FA-D2 limfocitima.

U regionu FRA3C (3q27.1) nalazi se *DVL3* gen (engl. DisheVeLled) koji kodira citoplazmatski fosfoprotein uključen u procese regulacije ćelijske proliferacije. Mutacije u ovom genu dovode do nastanka karcinoma dojke i kolona (Klingensmith i sar., 1994).

Jedan od najčešćih prekida u ovoj grupi je i FRA5O (5q33.2). U ovom regionu lociran je *CNOT8* gen (engl. *CCR4-NOT* transcription complex subunit 8, *POP2*), tumor-supresor uključen u različite ćelijske procese kao što su regulacija transkripcije, represija translacije i inhibicija proliferacije, i koji je jedan od kandidat gena odgovornih za nastanak 5q- sindroma (Fidler i sar., 1999). U osnovi 5q- sindroma nalazi se somatska delecija dugog kraka hromozoma 5 u regionu 5q31-5q33 koja dovodi do nastanka mijelodisplaznog sindroma (MDS) sa izraženom refraktornom anemijom, makrocitozom i povećanim rizikom za nastanak akutne limfoblastne leukemije (ALL) (Komrokji i sar., 2013). Zanimljivo je da je makrocitoza jedna od glavnih karakteristika FA, kao i da su MDS i ALL najčešći tumori FA pacijenata.

U regionu FRA14G (14q24.3) nalazi se čak 69 gena (NCBI; OMIM), među kojima i protoonkogen *C-FOS*, takođe važan regulator ćelijske proliferacije i diferencijacije. *C-FOS* je transkripcioni faktor uključen u aktivaciju i supresiju različitih gena, ključan je za diferencijaciju koštanog tkiva i procese angiogeneze. Povećana ekspresija ovog gena vezuje se za nastanak osteosarkoma i karcinoma endometrijuma, dok se gubitak funkcije vezuje za nastanak i progresiju karcinoma jajnika (Milde-Langosch, 2005).

U regionu FRA18B (18q21.3) lociran je *BCL2* gen (engl. B-Cell Lymphoma 2), prvi otkriveni antiapoptotski gen (sadrži približno 200 kbp), konstitutivno eksprimiran u hematopoetskom i nervnom tkivu. *BCL2* utiče na regulaciju ćelijske smrti kontrolom propustljivosti mitohondrijalne membrane preko inhibicije kaspazne aktivnosti bilo sprečavanjem oslobađanja citohroma c iz mitohondrija ili vezivanjem za APAF-1 (engl. Apoptosis-Activating Factor). Procenjuje se da prekidi, translokacije i amplifikacije u ovom regionu koje narušavaju njegovu funkciju ili povećavaju ekspresiju dovode do nastanka skoro polovine svih humanih kancera, od kojih su najčešći non-Hoćkinov limfom, sitnoćelijski karcinom pluća i hronična limfocitna leukemija (Yip i Reed, 2008).

Za razliku od svih prethodnih regiona prekida, u regionu FRA5K od 25 lociranih protein-kodirajućih gena (NCBI; OMIM) nije pronađen nijedan uključen u regulaciju ćelijske proliferacije, diferencijacije ili popravku DNK oštećenja, dok je region FRA7H siromašan genima, odnosno u njemu nema opisanih protein-kodirajućih gena (Mishmar i sar., 1998). Međutim, sve veći broj istraživanja pokazao je da se u CFS regionima ne nalaze samo protein-kodirajući geni, već i veliki broj mikro RNK (engl. miRNAs), kao i da je njihova uloga u patogenezi kancera značajna (Georgakilas i sar., 2014; Laganà i sar., 2010). Ove male nekodirajuće RNK odgovorne su za posttranskripcionu regulaciju ekspresije gena. miRNK regulišu ekspresiju target gena kroz interakciju sa velikim multiproteinskim kompleksom, tzv. RISC-om (engl. RNA Induced Silencing Complex) (Bartel, 2004). Pokazano je da su miRNK uključene u mnoge značajne biološke procese, uključujući embrionalni razvoj, diferencijaciju, proliferaciju, ćelijsku smrt i metabolizam (Bushati i Cohen, 2007; Gangaraju i Lin, 2009). Njihov onkogeni potencijal je dokazan u mnogim kancerima, a primećeno je da kod nekih hromozomskih rearanžmana dolazi do promene njihove ekspresije, pa se smatra da im je uloga uglavnom tumor-supresorska, ali se u nekim slučajevima mogu ponašati kao onkogeni (Lu i sar., 2005). Zanimljivo je da se 36.7% opisanih miRNK nalazi u regionima CFS (Georgakilas i sar., 2014), kao i da je njihova relativna gustina za 57% veća u CFS nego u ostatku genoma. Tako je, npr., tumor supresor hsa-mir-34a smeštena u regionu FRA1A, onkogen hsa-mir-21 u regionu FRA17B, dok su hsa-mir-15 i hsa-mir-16 locirani u regionu FRA13G koji je često deletiran u B-ćelijskoj hroničnoj limfocitnoj leukemiji (CLL), pri čemu su u većini CLL ove miRNAs deletirane ili smanjeno ekspimirane (engl. down-regulated) (Gangaraju i Lin, 2009; Georgakilas i sar., 2014). U regionu FRA7H (7q32.2) nalaze se dve tumor-supresorske miRNK, hsa-mir-29a i hsa-mir-29b-1 (Georgakilas i sar., 2014; miRBase). Njihova pojačana ekspresija ima značajan anti-tumorski efekat preko inhibicije proliferacije i angiogeneze u tumorskom tkivu (multipli mijelom, kancer dojke, kolona, osteosarkom, gliom) kroz supresiju NFKB i indukciju c-MYC i VEGF posredovanog zastoja u ćelijskom ciklusu (Li i sar., 2017; Xie i sar., 2016). Dve miRNK smeštene su i u regionu FRA5K (5q13.2), hsa-mir-4803 i hsa-mir-4804 (miRBase; NCBI). Prva istraživanja ovih miRNK takođe sugerišu njihovu tumor-supresorsku ulogu, ali su još uvek u začetku i ostaje da se vidi tačan mehanizam kojim one deluju (Ma i sar., 2017).

Imajući u vidu da se u regionima najčešćih fragilnih mesta grupe A pacijenata nalaze geni i miRNK koji imaju važnu ulogu u kontroli ćelijske proliferacije i diferencijacije, i očuvanju genomske stabilnosti, nije iznenađujuće da se ovi geni pojačano eksprimiraju kod pacijenata sa izraženom insuficijencijom koštane srži, naročito u uslovima genotoksičnog stresa. Prethodna istraživanja pokazala su da je kod Fankonijeve anemije genomska nestabilnost najizraženija u progenitorskom kompartmanu koštane srži, odnosno hematopoetskim stem ćelijama (engl. Hematopoietic Stem Cell, HSC) (Kelly i sar., 2007). Genomska nestabilnost FA-deficijentnih HSC ćelija dovodi ili do progresivnog smanjenja populacije vitalnih ćelija i posledično pancitopenije i insuficijencije koštane srži ili stvaranja neoplastičnog klona. Pokazano je da je u primarnim ćelijama koštane srži FA pacijenata i FANCD2 deficijentnih miševa prisutna pojačana ekspresija tumor supresorskih gena p53 i p21 (Garaycochea i Patel, 2014) čija je glavna uloga da uvedu oštećene ćelije u apoptozu i spreče nastanak tumora. Nedostatak p53 proteina kod FANCD2 deficijentnih miševa omogućava preživljavanje HCS ćelija i sprečava razvoj pancitopenije, ali pojačava genomsku nestabilnost i ubrzava razvoj tumora (Freie i sar., 2003; Houghtaling i sar., 2005). Pored toga, pokazano je da je u FA ćelijama pojačana produkcija citokina, tumor nekrozis faktora  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) i interferona  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), koji povećavaju apoptozu kod FA ćelija (Vinciguerra i sar., 2010). Budući da je u FA ćelijama povećana ekspresija gena čiji produkti imaju efekat na ćelijsko preživljavanje, kao i da su mnogi geni koji regulišu fundamentalne ćelijske procese locirani u regionima fragilnih mesta kod FANCD2 pacijenata, očekivano je da će buduća istraživanja otkriti više o njihovoj ulozi u Fankonijevoj anemiji.

Pored toga, povezanost hromozomske nestabilnosti, fragilnih mesta i kancera, naročito kod FA pacijenata, još uvek intrigira. Mnogobrojne studije na životinjskim modelima pokazale su da ekspresija CFS koreliše sa inicijacijom i progresijom različitih tipova kancera (Hazan i sar., 2016). S obzirom na to da su geni smeštenih u regionima CFS uključeni u DDR i tumor-supresorske puteve, pretpostavlja se da nestabilnost CFS regiona u prekanceroznim lezijama i kancerima može dovesti i do delecija u ovim genima i proliferacije tumorskih ćelija zbog gubitka tumor-supresorske funkcije. Potrebna su dodatna istraživanja da bi se dobio odgovor na pitanje da li ekspresija određenih fragilnih mesta kod FA pacijenata može biti pokazatelj rizika za nastanak

određenih kancera. Poznavanje profila ekspresije fragilnih mesta od velikog je značaja zbog potencijalnih terapijskih implikacija. Pre svega, ekspresija određenih CFS može poslužiti kao biomarker u ranoj molekularnoj dijagnostici kancera, dok je s druge strane poznavanje tačnih mesta dvolančanih prekida u CFS regionima značajno, jer ona mogu poslužiti kao meta za nove hemoterapeutike koje bi kancerske ćelije uvele u apoptozu (Banerjee i Soutoglou, 2016). Upotreba najnovijih metoda kao što su GUIDE-seq (engl. Genome-wide, Unbiased Identification of DSBs Enabled by sequencing) (Tsai i sar., 2015) i End-seq (“genome-wide“ identifikacija DSBs) (Canela i sar., 2016) bi trebalo da omogući bolje razumevanje posledica CFS i razvoj novih terapijskih pristupa.

Pacijenti sa teškom insuficijencijom koštane srži imali su značajno veći procenat telomernih fuzija u limfocitima periferne krvi od pacijenata sa umerenom insuficijencijom koštane srži. Imajući u vidu da telomerne fuzije nastaju kao posledica narušene „capping“ funkcije telomera, a naročito kritičnog smanjenja dužine telomera (Kong i sar., 2013), bilo bi očekivano da je kod pacijenata sa teškom insuficijencijom dužina telomera kraća. Utvrđeno je da ne postoji statistički značajna razlika u prosečnoj dužini telomera između dve grupe pacijenata. Prethodna istraživanja u kojima je merena dužina telomera kod Fankoni pacijenata pokazala su da je prosečna dužina telomera u normalnom opsegu, ali heterogena i kraća nego kod zdravih osoba (Alter i sar., 2015). S druge strane, studije u kojima je ispitivana veza između dužine telomera i stepena insuficijencije koštane srži dale su oprečne rezultate. Li i saradnici pokazali su da stepen skraćivanja telomera koreliše sa težinom insuficijencije, dok u istraživanju Callena i saradnika nije pronađena veza između prosečne dužine telomera i težine bolesti (Callén i sar., 2002; Li i sar., 2003). Brojne istraživačke grupe došle su do zaključka da prosečna dužina telomera ne može biti pouzdan pokazatelj telomerne disfunkcije, jer su najkraće telomere, a ne njihova prosečna dužina, kritične za ćelijsko preživljavanje (Hemann i sar., 2001; Maciejowski i De Lange, 2017; Marchetto i sar., 2016). Merenjem dužine telomera pojedinačnih hromozoma u ovom istraživanju kod FA-D2 pacijenata obe grupe takođe je utvrđeno da su u telomernim fuzijama najčešće prisutni hromozomi sa najkraćim telomerama. Heterogena dužina i izražena disfunkcija telomera karakteristična je za FA-D2 komplementacionu grupu (Holohan i sar., 2014; Joksic i sar., 2012). Pored toga, primećena je visoka učestalost fokusa indukovanih telomernom disfunkcijom (engl. Telomere Dysfunction Induced Foci, TIF) u FA-D2

limfocitima, što je pokazatelj velikog broja dvolančanih prekida u telomernim regionima koji dovode do nastanka fragilnih telomera (Joksic i sar., 2012). Monoubikvitirana forma FANCD2 proteina ima značajnu ulogu u održavanju stabilnosti telomernih regiona u ALT ćelijama, naročito u odgovoru na DNK oštećenja (Fan i sar., 2009). Prilikom oštećenja telomerne DNK, posredstvom Apollo proteina, FANCD2 se lokalizuje na telomerama i aktivira telomernu homologu rekombinaciju (Mason i Sekiguchi, 2011). Pored toga, FANCD2 sprečava disocijaciju TRF1, ključnog proteina za održavanje stabilnosti telomernih regiona, od telomerne DNK, što je neophodno za replikaciju ovih regiona i održavanje stabilnosti (Lyakhovich i sar., 2011). Disfunkcionalni FANCD2 protein ne može da ostvari te uloge, naročito u odgovoru na alkilirajuće agense kao što je DEB, što dovodi do povećanog broja dvolančanih prekida u telomernim regionima, posledičnog skraćivanja telomera i nastanka telomernih fuzija.

Telomerne fuzije, ujedno i najkraće telomere, u ovom istraživanju najčešće su bile prisutne su na hromozomima 2p, 2q, 5q i 18q u grupi A, odnosno na 9p, 6q, 7q, 10q i 18q u grupi B pacijenata. Neke istraživačke grupe pokušala su da objasne različitu dužinu telomera na pojedinačnim hromozomima, pa postoje pretpostavke da su telomere kraće što je kraća njihova udaljenost od centromere, odnosno da su telomere p krakova hromozoma kraće (Slijepcevic, 1998); zatim da postoji korelacija između dužine celih hromozoma i dužine telomera (Graakjaer i sar., 2003) ili da je njihova dužina uslovljena posebnim hromozom-specifičnim faktorima (Gilson i Londono-Vallejo, 2007). U ovom istraživanju nije primećena veza između dužine telomera i dužine pojedinačnih krakova hromozoma ili celih hromozoma. Najkraće telomere najčešće su bile uključene u nastanak telomernih fuzija, ali je njihova prosečna dužina unutar ćelija bila heterogena, što potvrđuje prethodna istraživanja (Joksic i sar., 2012). Postojanje telomera različitih dužina, od veoma kratkih do veoma dugih, unutar iste ćelije predstavlja poseban izazov za ćeliju. Veoma kratke telomere (engl. sentinel), mogu indukovati zastoj u ćelijskom ciklusu pre nego što ostale telomere postanu kritično kratke i nestabilne i na taj način sprečiti nastanak većih hromozomskih rearanžmana (Gilson i Londono-Vallejo, 2007). Sa smanjenjem njihove dužine, do kritične tačke kada nastaju fuzije, pored zastoja u ćelijskom ciklusu dolazi i do promene morfologije ćelija, smanjenja proliferativnog kapaciteta i povećanog umiranja ćelija apoptozom i nekrozom (Cleal i sar., 2018).

Tkiva sa visokim proliferativnim kapacitetom, kao što je hematopoetsko tkivo, naročito su osetljiva na defekte u telomernoj funkciji. U prilog tome govore mnoga istraživanja u kojima je pronađena veza između progresivnog skraćivanja telomera i aplastične anemije i insuficijencije koštane srži (Fiorini i sar., 2018). Sa povećanjem genomske nestabilnosti kod FA pacijenata dolazi do povećanja broja dvolančanih prekida u telomernim regionima i povećane proliferacije u hematopoetskom tkivu kao pokušaj da se produkuje dovoljan broj krvnih ćelija čiji je broj smanjen zbog redukovano g pulu progenitorskih ćelija koštane srži. Rezultat toga je ubrzano skraćivanje telomera, zbog čega pacijenti sa teškom insuficijencijom koštane srži imaju više telomernih fuzija i radijala koji uključuju telomerne sekvence od pacijenata sa umerenom insuficijencijom, što može biti od prediktivnog značaja za tok bolesti.

Kod FA-D2 pacijenata sa teškom insuficijencijom koštane srži prisutno je značajno više radijalnih hromozomskih struktura nego kod pacijenata sa umerenom insuficijencijom. U dosadašnjim istraživanjima nisu pronađeni podaci o učestalosti radijala kod FA pacijenata u različitim stadijumima bolesti. Kod obe grupe radijali su formirani između ne-homologih hromozoma, tzv. ne-homologi radijali. Prethodna istraživanja takođe su pokazala da se radijali kod bolesti sindroma hromozomske nestabilnosti, formiraju između ne-homologih hromozoma (Newell i sar., 2004; Owen i sar., 2014).

Iako su radijali opisani pre nekoliko decenija, broj istraživanja o njihovoj strukturi i mehanizmima nastanka je ograničen (Kuhn i Therman, 1982; Newell i sar., 2004; Owen i sar., 2014; Scully i sar., 2000). Smatra se da su kvadriradijali posledica interhromozomske rekombinacije između oštećenog lanca DNK i intaktnog lanca homologog hromozoma praćene krosing-overom, dok bi triradijali mogli biti rezultat intrahromozomske rekombinacije (Scully i sar., 2000) ili u slučaju simetričnih triradijala parcijalne endoreduplikacije (Kuhn i Therman, 1982). Spontani radijali jedinstveni su za sindrome hromozomskih nestabilnosti, pre svega Fankonijevu anemiju i Blumov sindrom, pri čemu se u odgovoru na agense koji dovode do nastanka unakrsnih DNK veza (engl. Interstrand Cross-Links, ICL), kao što su DEB i MMC, njihov broj povećava. ICL se formiraju kao kovalentne veze između nukleotida suprotnih lanaca DNK, pri čemu njihova popravka predstavlja izazov za ćelijske mehanizme popravke



jer ne postoji intaktan komplementarni lanac koji bi poslužio kao matrica za popravku oštećenja (Metzler, 1986). S obzirom na odsustvo intaktnog komplementarnog lanca, homologe hromozomi mogu poslužiti kao matrica za popravku, pa ukoliko se oni ne nalaze u blizini oštećenog, homologe regioni ne-homologih hromozoma se češće koriste kao matrice. U interfaznim ćelijama hromozomi su organizovani u prostorne domene, pri čemu homologe hromozomi ne moraju biti u neposrednoj blizini (Visser i sar., 2000). S druge strane, postoji veliki broj kratkih homologih regiona rasutih po čitavom genomu koji mogu poslužiti za popravku oštećenja (Johnson i Jasin, 2001). Pretpostavlja se da su FA proteini uključeni u proces popravke ovih oštećenja i traženje homologih sekvenci na drugim hromozomima, što je u saglasnosti sa činjenicom da je u FA ćelijama prisutna povećana učestalost homologe rekombinacije (HR) (Thyagarajan i Campbell, 1997). Iako postoje pretpostavke da je nekoliko puteva uključeno u popravku ICL-a (Newell i sar., 2004), povećana učestalost HR i razmene sestrinskih hromatida (engl. Sister Chromatid Exchange, SCE) koje nastaju usled HR-zavisne popravke dvolančanih prekida, karakteristične su za FA ćelije, naročito FA-D2 ćelijski fenotip (Joksic i sar., 2013), što sugeriše da je HR glavni put popravke ovih lezija koje leže u osnovi formiranja radijala.

U toku popravke unakrsnih veza DNK homologom rekombinacijom dolazi do stvaranja intermedijarnih Holidejevih struktura (Holidejevi intermedijeri) između oštećenog DNK lanca i lanca sa homologom sekvencom koji služi kao matrica za popravku oštećenja (Castor i sar., 2013). Za razrešenje Holidejevih intermedijera neophodan je BLM protein (Blumova DNK helikaza), koji se aktivira interakcijom sa proteinima FA puta. U odsustvu FA proteina ne dolazi do aktivacije BLM proteina, samim tim ni do razrešenja Holidejevih intermedijera, što dovodi do perzistiranja veza između homologih DNK molekula, nerazdvajanja hromatida i nastanka radijala (Owen i sar., 2014). Prisustvo ne-homologih radijala u FA-D2 ćelijama ukazuje na nemogućnost razrešenja intermedijarnih struktura u toku homologe rekombinacije između homologih sekvenci nehomologih hromozoma.

Analiza hromozoma uključenih u formiranje radijala pokazala je da je njihova zastupljenost u radijalima heterogena, nasumična i nije specifična za stadijum bolesti. Ako se pretpostavi da su svi hromozomi jednako podložni oštećenjima, kao i da je

distribucija ICL oštećenja ravnomerno i nasumično raspoređena po hromozomima, očekivano je da se radijali formiraju jednako između svih hromozoma, što je ovo istraživanje i pokazalo. Nekoliko istraživanja pokazalo je drugačije rezultate o učestalosti hromozoma u formiranju radijala. Zapaženo je da se radijali u normalnim limfocitima tretiranim MMC-om najčešće formiraju između hromozoma 1, 9 i 16; radijali kod Blumovog sindroma su najčešće formirani između hromozoma 11, 17, 19, 20 i 22; dok su u FA-A i FA-G ćelijama hromozomi 1, 7, 12 i 18 najčešće pronađeni u radijalima, iako je distribucija svih hromozoma u radijalima približna (Bourgeois, 1974; Newell i sar., 2004; Owen i sar., 2014). Postoje pretpostavke da radijali češće nastaju između hromozoma koji su bogati genima (engl. gene-rich chromosomes), pa da su hromozomi 1 i 19 koji su takvi hromozomi, daleko češće uključeni u njihovo formiranje od hromozoma 2 i 18 sa kojima su po veličini slični, ali koji su za razliku od njih siromašni u genima (Schwartz i sar., 2005). Analiza radijala u FA-D2 limfocitima u ovom istraživanju nije pokazala ovakav trend, već nespecifičnu zastupljenost hromozoma u radijalima, što je slično istraživanju radijala FA-A i FA-G grupe Newella i saradnika. Tako je npr. u ovom istraživanju u FA-D2 limfocitima hromozom 2 češće prisutan u radijalima od hromozoma 1, a hromozom 19 češće od hromozoma 18 u grupi A, dok su u grupi B hromozomi 18 i 19 bili jednako zastupljeni, a hromozom 1 češće od hromozoma 2. Zanimljivo je da je u FA-D2 limfocitima obe grupe X hromozom uključen u njihov nastanak, što je suprotno rezultatima prethodnih istraživanja koji su pokazali da u FA-A i FA-G ćelijama X hromozom ne učestvuje u formiranju radijala (Newell i sar., 2004). Y hromozom nije pronađen u radijalima, ali je u istraživanje bio uključen samo jedan pacijent muškog pola sa umerenom insuficijencijom koštane srži i malim brojem radijala. Newell i kolege (2004) su pretpostavili da je u FA ćelijama prisutan alternativni mehanizam popravke ICL-a koji zaobilazi rekombinaciju između autozoma i polnih hromozoma. Formiranje radijala u FA-D2 ćelijama između nehomologih hromozoma, kao i između autozoma i polnih hromozoma sugerise da se kratke homologe sekvence DNK koje se nalaze na različitim hromozomima mogu ponašati kao matrice za popravku DNK oštećenja u procesu homologe rekombinacije, kao i da X hromozom nije izuzet od ovakve popravke.

Primenom telomernog FISH-a (Q-FISH) pokazano je da je u grupi A naročito povećana učestalost radijala koji nastaju kao posledica razmene telomernih regiona

jednog i intersticijalnih regiona drugog hromozoma. Ovakva struktura radijala nije karakteristična za grupu B, gde je većina radijala po strukturi prosta (tri i kvadiradijali) i retko su primećeni radijali kod kojih su telomere uključene u razmenu. U dosadašnjim istraživanjima nisu pronađeni podaci o ulozi telomernih sekvenci u nastanku radijala. Imajući u vidu da telomerni regioni hromozoma predstavljaju visoko repetitivne palindromske sekvence, moguće je da služe kao matrice za popravku oštećene DNK na drugim hromozomima. Pored toga, kratke i fragilne telomere se ponašaju kao dvolančani prekidi, pa nije iznenađujuća interhromozomska rekombinacija sa drugim oštećenim regionima hromozoma.

Povećana učestalost radijala u grupi A pacijenata sa teškom insuficijencijom koštane srži, naročito radijala koji sadrže telomerne sekvence, pokazuje da formiranje radijala nije normalan, prelazni događaj u popravci unakrsnih veza DNK, već da oni predstavljaju aberantne strukture koje nastaju kao posledica neuspešnog pokušaja popravke DNK oštećenja, kao i da njihova učestalost može predvideti klinički tok bolesti.

Utvrđivanje mutacija u FA genima od velikog je značaja za potvrdu dijagnoze, prenatalnu/preimplantacionu dijagnostiku i utvrđivanje nosioca mutacija. Pokazano je da čak i kod ne-FA pacijenata pojedine varijante u FA genima mogu biti povezane sa nastankom kancera, kao na primer varijanta rs2272125 u *FANCD2* genu sa sporadičnim kancerom dojke, c.2715+1G>A sa seminomom testisa i heterozigotna missense mutacija c.458 T>C (Leu153Ser) sa T-ćelijskom ALL obe u *FANCD2* genu (Barroso i sar., 2006; Borriello i sar., 2007; Smetsers i sar., 2012). Mutacije u *FANCD2* genu pronađene su i kod ne-FA pacijenata obolelih od kancera bešike, bubrega i pluća koji su pokazivali bolji odgovor na terapiju i duže preživljavanje od pacijenata sa istim tumorima kod kojih nisu detektovane mutacije (Jung i sar., 2017). Budući da su, kao što je već spomenuto, FA pacijenti predisponirani za razvoj različitih kancera, analiza mutacija kod pacijenata bi mogla pružiti uvid u povezanost određenih mutacija i kancera i olakšati terapijski pristup. Koliki značaj ima određivanje mutacija u terapijskom pristupu govori istraživanje u kojem je pokazano da je kod FA-D2 pacijenta sa T-ćelijskom ALL homozigotna missense mutacija c.458 T>C (Leu153Ser) povezana sa jako izraženim toksičnim odgovorom na hemioterapiju (Borriello i sar., 2007). Chang

i kolege su takođe prijavili da je kod pacijenata sa različitim mutacijama (i različitim brojem mutacija u FA genima) različit odgovor na standardnu terapiju androgenima i prednizonom (Chang i sar., 2014).

U ovom istraživanju po prvi put prikazani su rezultati analiza mutacija u *FANCD2* genu kod FA pacijenata komplementacione grupe FA-D2 iz Srbije. Analizirano je jedanaest regiona gena, šest egzona i pet introna metodom Sangerovog sekvenciranja.

Analizom izabranih regiona *FANCD2* gena pronađeno je deset genskih varijanti, dve egzonske i osam intronskih. Za sve pronađene varijante izvršena je *in-silico* analiza za predikciju efekta varijanti na mehanizam splajsovanja Human Splicing Finder (HSF) programom. HSF je program baziran na novim algoritmima izvedenim iz Universal Mutation Database – UMD sa ciljem da omogući predviđanje posledica mutacija na mehanizam splajsovanja kada su funkcionalne analize neizvodljive ili teško izvodljive zbog nedostupnosti materijala, slabe ekspresije ili lošeg kvaliteta RNK. Desmet i saradnici su koristeći ovaj program sprovedi detaljnu *in-silico* analizu mutacija u različitim genima, uključujući 83 intronske i 53 egzonske mutacije, za koje su funkcionalna ispitivanja već pokazala da dovode do aberantnog splajsovanja. Njihovi rezultati su pokazali da je HSF sa velikom sigurnošću mogao da predvidi efekte i egzonskih i intronskih mutacija na mehanizam splajsovanja (Desmet i sar., 2009). Nascimbeni i saradnici su potvrdili Desmetovo istraživanje i pokazali da je od četiri korišćena programa za predikciju efekata mutacija na mehanizam splajsovanja (HSF, NNSPLICE, Splice View i NetGene2) HSF najpouzdaniji predikcioni softver za detekciju aberantnog splajsovanja (Nascimbeni i sar., 2010).

Tri varijante od svih pronađenih nisu prijavljene u dosadašnjoj literaturi i dostupnim bazama podataka, jedna egzonska, c.2396 C>A u egzonu 26 i dve intronske, c.206-246delG u intronu 3 i c.2715+573 C>T u intronu 28.

Heterozigotna varijanta u egzonu 26, c.2396 C>A koja je detektovana kod dva pacijenta, dovodi do supstitucije alanina asparagičnom kiselinom na poziciji 799 aminokiselinske sekvence *FANCD2* proteina (p.A799D) i može dovesti do parcijalne degradacije proteina (predikcija PolyPhen softverom). Missense mutacije dovode do

zamene amino kiseline u proteinu i mogu uticati na stabilnost i funkciju proteina, protein-protein interakcije, kao i ekspresiju proteina i njegovu subcelularnu lokalizaciju (Reva i sar., 2011). Prethodna istraživanja su pokazala da u *FANCD2* genu missense mutacije mogu dovesti ili do smanjene funkcije proteina promenom aminokiselinske sekvence ili do nastanka novih splajsnih mesta u egzonima i alternativnog splajsovanja (Kalb i sar., 2007). *In-silico* analiza missense mutacije u egzonu 26 kod naših pacijenata nije pokazala da ona može dovesti do poremećaja u mehanizmu splajsovanja, pa su potrebne dodatne funkcionalne analize da bi se utvrdilo na koji način ova supstitucija utiče na funkciju proteina.

Heterozigotna delecija guanina u intronu 3, c.206-246delG koja je detektovana kod tri pacijenta dovodi do stvaranja novog akceptorskog splajsnog mesta ushodno od fiziološkog splajsnog mesta i može dovesti do egzonizacije introna.

Varijanta u intronu 28, c.2715+573 C>T je detektovana u heterozigotnom obliku kod četiri pacijenta. Ova varijanta takođe nije pronađena u dostupnim bazama niti u literaturi, međutim analiza izmenjene sekvence HSF programom nije pokazala da ona utiče na mehanizam splajsovanja. Značaj ove varijante moguće je utvrditi samo dodatnim funkcionalnim analizama.

Od ostalih detektovanih genskih varijanti koje su pronađene u dbSNP, *in-silico* analiza je pokazala da tri mogu imati efekta na mehanizam splajsovanja *FANCD2* gena. Iako su ove varijante prijavljene u dbSNP kao genski polimorfizmi, njihove učestalosti u opštoj populaciji su različite i ni za jednu od njih ne postoje eksperimentalni podaci o efektu na funkciju proteina.

Stvaranje aberantnog akceptorskog splajsnog mesta je predviđeno za varijantu u intronu 12, c.990-38 C>G ushodno od fiziološkog splajsnog mesta za egzon 13. Ova varijanta prijavljena u dbSNP (rs9809061) i ima učestalost od 0,212/0,139 u svetskoj/evropskoj populaciji.

Obe genske varijante za koje je predviđeno da mogu dovesti do stvaranja novih akceptorskih splajsnih mesta (prethodno spomenuta nova varijanta u intronu 3, c.206-246delG i rs9809061 u intronu 12, c.990-38 C>G) imaju visoke konsenzus vrednosti (CV) za mutirani alel (77,24 i 85,55, redom), niske CV vrednosti za wildtype alel (10,13

i 56,61, redom) i veliku delta vrednost između wt i mutiranog alela. „Jaka“ splajnsna mesta imaju CV preko 80, nešto manje jaka između 70 i 80, dok jako mali broj aktivnih splajnsnih mesta ima CV između 65 i 70 (Desmet i sar., 2009). Niske CV vrednosti za wt alele, ispod graničnih vrednosti za aktivna splajnsna mesta (<65) je očekivana za sekvence koje su locirane daleko od egzon-intron granice. Međutim visoke CV vrednosti mutiranih alela nisu očekivane na ovim pozicijama nukleotida i ukazuju na stvaranje novih splajnsnih mesta. Ovakvi rezultati *in-silico* analize HSF programom ukazuju na to da postoji velika verovatnoća da obe varijante dovode do nastanka novih akceptorskih splajnsnih mesta u dubokim intronskim regionima gde se splajsovanje normalno ne dešava.

Za još dve detektovane varijante *FANCD2* gena *in-silico* analiza je pokazala mogućnost aberantnog splajsovanja, c.2716-306 A>G u intronu 28 i c.1122 A>G u egzonu 14, i to tako što dovode do nastanka alternativnih donorskih splajnsnih mesta. Heterozigotna varijanta u intronu 28, c.2716-306 A>G je prijavljena kao genski polimorfizam (rs192804303 u dbSNP), međutim prema podacima iz HapMap projekta i 1000 genoma učestalost ove varijanta je izuzetno niska, 0,001 u svetskoj i 0,002 u evropskoj populaciji i ne postoje eksperimentalni dokazi o njenom efektu. Ovako niske učestalosti varijante u opštoj populaciji mogle bi biti posledica detektovanja heterozigotnih nosilaca, budući da, u zavisnosti od populacije u kojoj je ispitivana, učestalost heterozigotnih nosilaca FA iznosi između 1:181 i 1:93 (Mehta i Tolar, 2002-2018).

Heterozigotna varijanta u egzonu 14, c.1122 A>G (rs34046352 u dbSNP) je druga za koju je predviđeno stvaranje alternativnog donorskog splajsnog mesta. Učestalost ove varijante u svetskoj populaciji nije procenjena, a u evropskoj iznosi 0,034. Iako je ova izmena prijavljena kao protein kodirajuća sinonimna varijanta, ne postoje eksperimentalni podaci o njenom efektu na funkciju proteina, pa njeni patogeni efekti ne mogu biti isključeni. Pokazano je da i sinonimne (engl. silent) mutacije, iako u malom broju, mogu narušiti funkciju proteina, i to tako što mogu uticati na mehanizam splajsovanja stvaranjem kriptičnih splajnsnih mesta ili efektima na kontrolne *cis* elemente – pojačivače splajsovanja u egzonima (engl. Exon Splicing Enhancers, ESEs) i prigušivače splajsovanja u egzonima (engl. Exon Splicing Silencers, ESSs) (Fairbrother

i sar., 2002; Wang i sar., 2004). Pored toga, sinonimne mutacije mogu dovesti do promene konformacije proteina i njegove funkcije, pa iako su nekada smatrane bezopasnim, njihova uloga u nastanku oboljenja je danas široko prihvaćena i ne sme se *a priori* odbaciti njihova uloga u nastanku oboljenja (Chamary i sar., 2006).

Iako je za obe varijante (intron 28, c.2716-306 A>G i egzon 14 c.1122 A>G) analiza HSF programom pokazala da dolazi do stvaranja alternativnih donorskih splajsnih mesta, konsenzus vrednosti mutiranih alela su bile neznatno iznad graničnih vrednosti (66,87 i 67,16, redom), pa je stoga njihova uloga u nastanku FA smatrana nedovoljno pouzdanom bez eksperimentalne potvrde funkcionalnim analizama.

Od svih pronađenih varijanti samo je jedna prisutna u homozigotnom, a sve ostale (devet) u heterozigotnom obliku. Nukleotidna izmena u intronu 12, c.990-133 G>T je jedina detektovana homozigotna varijanta. Podaci iz HapMap projekta i 1000 genoma pokazuju da je timin na ovoj poziciji zapravo najčešće prisutan u populaciji (0,952/0,913 u evropskoj/svetskoj), dok je guanin na ovoj poziciji ancestralna forma. U našem istraživanju ova varijanta je detektovana kod svih pacijenata, što je saglasno sa podacima o učestalosti ove varijante u opštoj populaciji, stoga je njen bilo kakav efekat na nastanak bolesti odbačen. Sve ostale pronađene varijante gena su u heterozigotnom obliku. Istraživanja fokusirana na pronalaženje patogenih mutacija u *FANCD2* genu pokazala su njihovu heterogenu prirodu. Homozigotne mutacije su jako retke, uglavnom su prisutne složene heterozigotne mutacije koje dovode do parcijalne degradacije proteina, zbog čega se kod ovih pacijenata uvek nalaze izvesne količine *FANCD2* proteina očuvane funkcije (Chandrasekharappa i sar., 2013; Kalb i sar., 2007).

Istraživanja mutacija u *FANCD2* genu koja su obuhvatala veći broj pacijenata različitih populacija su pokazala da je, kao i u našem istraživanju, najveći broj mutacija u vidu missense ili intronskih mutacija, blizu egzon-intron granice ili u dubokim intronskim regionima (Ameziane i sar., 2012; Chandrasekharappa i sar., 2013; Kalb i sar., 2007; Knies i sar., 2012; Timmers i sar., 2001). Istraživanje Kalba i saradnika jedino je u dosadašnjoj literaturi obuhvatilo veliki broj *FANCD2* pacijenata i pokazalo je da više od polovine detektovanih mutacija utiče na mehanizam splajsovanja. Chandrasekharappa i saradnici (2013) su metodom masivnog paralelnog sekvenciranja kod tri *FANCD2* pacijenta detektovali šest heterozigotnih mutacija, pri čemu su

analizom RNK pokazali da jedna missense mutacija, jedna delecija i tri mutacije blizu egzon-intron granice utiču na splajsovanje RNK. Ameziane i saradnici (2012) takođe su detektovali missense i mutacije splajsovanja u *FANCD2* genu i to obe u heterozigotnom obliku, a isto su kod jedinog FA-D2 pacijenta uključenog u istraživanje pronašli i Knies i saradnici (2012).

Splajsovanje informacione RNK (iRNK) je složeni proces tokom kojeg dolazi do obrade prekursorske informacione RNK (pre-iRNK) isecanjem introna i spajanjem egzona. U toku transkripcije cela sekvenca gena, uključujući i introne i egzone, se prepisuje u pre-iRNK. Da bi se formirala kodirajuća sekvenca koja se može prevesti u protein procesom translacije, introni se moraju ukloniti iz pre-iRNK mehanizmom splajsovanja (Gilbert, 1978). Ovaj složeni proces moguć je zahvaljujući kompleksnoj ribonukleoproteinskoj mašineriji, splajsozomu, koja na osnovu specifičnih kratkih konsenzus sekvenci, 5' donorskog i 3' akceptorskog splajsnog mesta pre-iRNK prepoznaje mesta isecanja (Papasaikas i Valcarcel, 2016). Iako se pre-iRNK u zavisnosti od tkiva i stadijuma razvoja može alternativno splajsovati, što omogućuje sintezu različitih formi proteina iz istog gena, u poslednje vreme sve je više istraživanja koja dovode u vezu poremećaje u splajsovanju pre-iRNK i nastanak monogenских bolesti (Chabot i Shkreta, 2016; Scotti i Swanson, 2016). Procenjuje se da između 15 i 50% svih mutacija koje dovode do nastanka monogenских bolesti utiču na splajsovanje, pri čemu je najveći deo u vidu missense i tačkastih mutacija u blizini egzon-intron granice (Krawczak i sar., 2007; Stenson i sar., 2012; Sterne-Weiler i sar., 2011). Pored toga, identifikovan je veliki broj intronskih varijanti lociranih u dubokim intronskim regionima, udaljenim više od 100 baznih parova od egzon-intron granica, za koje je pokazano da su patogene. Pokazano je i da izmene pojedinačnih nukleotida u dubokim intronskim regionima mogu dovesti do nastanka bolesti (Hsiao i sar., 2016). Pretpostavlja se da duboke intronske mutacije mogu aktivirati ne-kanonska splajsna mesta ili kreirati nova donorska ili, ređe, akceptorska splajsna mesta i na taj način dovesti do stvaranja novih pseudo-egzona, preskakanja ili produžavanja egzona, kao i retencije introna (Dhir i Buratti, 2010) koji mogu promeniti okvir čitanja gena. Pored toga, ove mutacije mogu uticati i na intronske kontrolne *cis* elemente, pojačivače splajsovanja u intronima (engl. Intron Splicing Enhancers, ISEs) i prigušivače (engl.



Intron Splicing Silencers, ISSs), što takođe dovodi do poremećaja mehanizma splajsovanja (Vaz-Drago i sar., 2017).

Iako su izmene pojedinačnih nukleotida najčešće uzrok defekata u mehanizmu splajsovanja, male intronske delecije takođe mogu prouzrokovati aberantno splajsovanje (Vaz-Drago i sar., 2017). Rezultati analize varijanti *FANCD2* gena kod naših pacijenata takođe su pokazali da od četiri intronske varijante za koje je *in-silico* analiza pokazala da mogu dovesti do poremećaja splajsovanja jedna je delecija baze, a tri su izmene pojedinačnih nukleotida u dubokim intronskim regionima, što je u saglasnosti sa literaturnim podacima. Pored toga, pokazano je da mutacije koje dovode do aberantnog splajsovanja u *FANCD2* genu ne ukidaju u potpunosti splajсно mesto, već interferiraju sa njim, zbog čega je uvek prisutna rezidualna aktivnost *FANCD2* proteina (Kalb i sar., 2007). Kao što je već spomenuto, potpuni nedostatak *FANCD2* kod ljudi nije opisan, tako da je prisustvo intronskih varijanti koje utiču na splajsovanje kod naših pacijenata i očekivan.

Detektovanje istih varijanti za koje je predviđeno da mogu dovesti do nastanka bolesti kod nekoliko pacijenata koji nisu u srodstvu (Tabela 4.7.), kao što su c.206-246 delG u intronu 3 koja je pronađena kod tri pacijenta, c.1122 A>G u egzonu 14 kod četiri, c.990-38 C>G u intronu 12 i c.2396 C>A u egzonu 26 kod dva pacijenta sugeriše da bi ove genske varijante mogle biti specifične za našu populaciju i posledica efekta osnivačke mutacije. Kalb i saradnici (2007) takođe su zapazili da je prisustvo nekih mutacija povezano sa etničkom pripadnošću pacijenata, kao što je splajсна mutacija u intronu 21, c.1948-16 T>G koja je pronađena samo kod pacijenata turskog porekla koji nisu u srodstvu. Povezanost pojedinih mutacija sa određenim populacijama je primećena i kod drugih FA gena, kao što je homozigotna delecija egzona 3 *FANCA* gena specifična za makedonsku populaciju, delecija egzona 12-31 u *FANCA* genu za afričku populaciju, dok su kod Aškenazi Jevreja skoro svi FA pacijenti nosioci mutacije splajsovanja u *FANCC* genu IVS4+4A>T (Madjunkova i sar., 2014; Tipping i sar., 2001). Varijante u intronu 3 c.206-246 delG i egzonu 26, c.2396 C>A kod naših pacijenata nisu prethodno prijavljene, uprkos sekvenciranju *FANCD2* gena kako kod FA pacijenata, tako i zdrave populacije različite etničke pripadnosti u okviru HapMap

projekta i 1000 genoma, što sugerise njihovu moguću povezanost sa srpskom populacijom.

U ovom istraživanju primećeno je da je kod tri pacijenta (pacijenti 1, 2 i 4) pronađen veći broj varijanti *FANCD2* gena. Sedam varijanti detektovano je kod pacijenta 1 i 4, a čak osam kod pacijenta 2 (Tabela 4.7. i 4.9.). Chang i saradnici (2014) došli su do sličnih rezultata ispitujući mutacije u svim FA i FA-povezanim genima sekvenciranjem egzoma (engl. Whole Exome Sequencing, WES) kod FA pacijenata različitih komplementacionih grupa. Oni su našli veliki broj konkomitantnih mutacija kod FA pacijenata, i to ne samo u jednom, već u više FA gena, dok u FA-povezanim genima nije bilo detektovanih mutacija, i zaključili da visoka učestalost heterozigotnih varijanti u FA genima nije nasumična i slučajna, već posledica osetljivosti FA/BRCA puta, kao i da pripadnost određenoj komplementacionoj grupi ne isključuje mutacije u drugim FA genima. Knies i saradnici (2012) su takođe istakli da nije redak slučaj da heterozigotna mutacija u jednom FA genu može biti udružena sa heterozigotnim mutacijama u drugim FA genima i tako dovesti do nastanka bolesti. Zanimljivo je da je kod naših pacijenata iz grupe A (pacijenti 1 i 2) pronađen veliki broj varijanti (7 i 8, redom) i da su u vreme uzorkovanja ovi pacijenti imali težak oblik insuficijencije koštane srži, više telomernih fuzija i radijala, kao i drugačiji obrazac hromozomskih prekida, što je u saglasnosti sa Changovim zaključkom da veliki broj varijanti odražava osetljivost FA/BRCA signalnog puta.

Upoređivanje rezultata dobijenih Sangerovim sekvenciranjem izabranih regiona *FANCD2* gena i podataka dobijenih *in-silico* analizom pokazalo je da kod dva pacijenta potencijalno patogena mutacija nije detektovana, kod jednog pacijenta je detektovana samo jedna heterozigotna, dok su kod preostala tri detektovane po dve patogene heterozigotne varijante (Tabela 4.10.). Ovakvi rezultati mogu biti posledica toga što su sekvencirani samo pojedini regioni *FANCD2* gena za koje su prethodna istraživanja pokazala da su regioni često pogođeni mutacijama. Patogene mutacije mogle bi biti locirane u regionima *FANCD2* gena koji nisu ispitivani ili bi mogle biti u formi velikih mutacija, kao što su velike delecije ili insercije, što se ne može detektovati tehnikama sekvenciranja. Shodno tome, za detekciju patogenih mutacija kod pacijenata potrebno je primeniti, pored Sangerovog sekvenciranja, i druge novije metode, kao što su

sekvenciranje nove generacije (engl. Next-Generation Sequencing, NGS) i WES za kompletnu pokrivenost gena, kao i multipleks ligaciono zavisne amplifikacije proba (engl. Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification, MLPA) i analize mikročipova (engl. microarray) za detekciju velikih mutacija (Chandrasekharappa i sar., 2013; Chang i sar., 2014; Gille i sar., 2012). Prednosti NGS i WES analiza su u boljoj pokrivenosti gena, međutim WES analizom ne mogu se detektovati intronske mutacije. Pored toga, prisustvo dva pseudogena, *FANCD2-P1* i *FANCD2-P2* otežava detekciju „pravih“ mutacija u funkcionalnom genu; zbog velike homologije često se detektuju sekvence pseudogena, što dovodi do lažno pozitivnih rezultata (Knies i sar., 2012). To ove metode čini još uvek nedovoljno pouzdanim i zahteva potvrdu dobijenih rezultata Sangerovim sekvenciranjem. Za pronalaženje intronskih mutacija i utvrđivanje njihove patogenosti, naročito kod gena koji imaju pseudogene sa visokim stepenom homologije, Sangerovo sekvenciranje ciljanih intronskih regiona u kombinaciji sa predikcionim analizama i funkcionalnim ispitivanjima, kao što je analiza iRNK RT-PCR analizom i sekvenciranje cDNK produkta, splajsing-specifični PCR (engl. splicing-specific PCR) ili direktno RNK sekvenciranje i dalje se smatra zlatnim standardom (Vaz-Drago i sar., 2017).

## 6. Zaključci

Na osnovu analize dobijenih rezultata u okviru postavljenih ciljeva istraživanja mogu se izvesti sledeći zaključci:

1. Bazalna učestalost hromozomskih prekida povećava se sa progresijom bolesti, dok se DEB-indukovana učestalost ne menja.
2. Hromozomski prekidi locirani su u euhromatinskim hromozomskim regionima; na molekularno-citogenetičkom nivou hromozomski prekidi kolokalizuju sa čestim fragilnim mestima.
3. Fragilna mesta u FA-D2 limfocitima drugačija su od drugih komplementacionih grupa i karakteristična su za FA-D2 komplementacionu grupu. Otkriveno je novo fragilno mesto u regionu 1q42.2.
4. Obrazac i distribucija fragilnih mesta nije nasumična i menja se sa progresijom bolesti.
5. Učestalost radijala značajno je viša kod pacijenata sa teškom insuficijencijom koštane srži, naročito radijala koji sadrže telomerne sekvence.
6. Radijali u FA-D2 limfocitima formiraju se između nehomologih hromozoma i u njihov nastanak su uključeni i autozomi i polni hromozomi.
7. Učestalost telomernih fuzija značajno je viša kod pacijenata sa teškom insuficijencijom koštane srži.
8. Prosečna dužina telomera nije u pozitivnoj korelaciji sa učestalošću telomernih fuzija, već su najkraće telomere pojedinačnih hromozoma faktor koji utiče na njihov nastanak.
9. Od 10 detektovanih varijanti *FANCD2* gena, tri nisu prethodno prijavljene u literaturi i dostupnim bazama podataka, c.2396 C>A u egzonu 26, c.206-246delG u intronu 3 i c.2715+573 C>T u intronu 28.

10. Skoro sve detektovane varijante (osim jedne, c.990-133 G>T u intronu 12) nalaze se u heterozigotnom obliku, osam je intronskih i dve su egzonske.
11. *In-silico* analizom identifikovane su tri patogene varijante, jedna egzonska (c.2396 C>A u egzonu 26) i dve intronske (c.206-246 delG u intronu 3 i c.990-38 C>G u intronu 12).
12. Sve tri patogene varijante *FANCD2* gena pronađene su kod pacijenata koji nisu u srodstvu, i mogle bi biti specifične za populaciju u Srbiji.
13. Kod pet pacijenata pronađeno je 5 ili više varijanti (do 8), što pokazuje da su mutacije u *FANCD2* genu konkomitantne i posledica pojačane osetljivosti FA/BRCA puta.
14. Ne postoji međusobna povezanost varijanti *FANCD2* gena i fragilnih mesta u FA-D2 limfocitima.
15. Obrazac i distribucija fragilnih mesta, učestalost radijala i telomernih fuzija u FA-D2 limfocitima menjaju se sa progresijom bolesti i mogu biti prognostički faktori u praćenju toka bolesti.

**7. Literatura**

Abu-Odeh, M., Salah, Z., Herbel, C., Hofmann, T. G. i Aqeilan, R. I., (2014) WWOX, the common fragile site FRA16D gene product, regulates ATM activation and the DNA damage response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111(44):E4716-25.

Aguilera, A. i Garcia-Muse, T., (2012) R loops: from transcription byproducts to threats to genome stability. *Molecular Cell* 46(2):115-24.

Ahnesorg, P., Smith, P. i Jackson, S. P., (2006) XLF interacts with the XRCC4-DNA ligase IV complex to promote DNA nonhomologous end-joining. *Cell* 124(2):301-13.

Alter, B. P., Giri, N., Savage, S. A. i Rosenberg, P. S., (2015) Telomere length in inherited bone marrow failure syndromes. *Haematologica* 100(1):49-54.

Ameziane, N., Sie, D., Dentre, S., Ariyurek, Y., Kerkhoven, L., Joenje, H., Dorsman, J. C., Ylstra, B., Gille, J. J., Sistermans, E. A. i De Winter, J. P., (2012) Diagnosis of fanconi anemia: mutation analysis by next-generation sequencing. *Anemia* 2012, 132856.

Ameziane, N., May, P., Haitjema, A., Van De Vrugt, H. J., Van Rossum-Fikkert, S. E., Ristic, D., Williams, G. J., Balk, J., Rockx, D., Li, H., Rooimans, M. A., Oostra, A. B., Velleuer, E., Dietrich, R., Bleijerveld, O. B., Maarten Altelaar, A. F., Meijers-Heijboer, H., Joenje, H., Glusman, G., Roach, J., Hood, L., Galas, D., Wyman, C., Balling, R., Den Dunnen, J., De Winter, J. P., Kanaar, R., Gelinas, R. i Dorsman, J. C., (2015) A novel Fanconi anaemia subtype associated with a dominant-negative mutation in RAD51. *Nature Communications* 6, 8829.

Arlt, M. F., Miller, D. E., Beer, D. G. i Glover, T. W., (2002) Molecular characterization of FRAXB and comparative common fragile site instability in cancer cells. *Genes Chromosomes & Cancer* 33(1):82-92.

Arlt, M. F., Durkin, S. G., Ragland, R. L. i Glover, T. W., (2006) Common fragile sites as targets for chromosome rearrangements. *DNA Repair* 5(9-10):1126-35.

Ashley-Koch, A. E., Robinson, H., Glicksman, A. E., Nolin, S. L., Schwartz, C. E., Brown, W. T., Turner, G. i Sherman, S. L., (1998) Examination of factors associated with instability of the FMR1 CGG repeat. *American Journal of Human Genetics* 63(3):776-85.

Auerbach, A. D., (2009) Fanconi anemia and its diagnosis. *Mutation Research* 668(1-2):4-10.

Bandyopadhyay, S., Chiang, C. Y., Srivastava, J., Gersten, M., White, S., Bell, R., Kurschner, C., Martin, C., Smoot, M., Sahasrabudhe, S., Barber, D. L., Chanda, S. K. i Ideker, T., (2010) A human MAP kinase interactome. *Nature Methods* 7(10):801-5.

Banerjee, U. i Soutoglou, E., (2016) Finding DNA Ends within a Haystack of Chromatin. *Molecular Cell* 63(5):726-8.

Barankin, B., Metelitsa, A. I., Schloss, E. H. i Wasel, N. R., (2005) Skin disorders in Ashkenazi Jews: a review. *International Journal of Dermatology* 44(8):630-5.

Barbi, G., Steinbach, P. i Vogel, W., (1984) Nonrandom distribution of methotrexate-induced aberrations on human chromosomes. Detection of further folic acid sensitive fragile sites. *Human Genetics* 68(4):290-4.

Barlow, J. H., Faryabi, R. B., Callen, E., Wong, N., Malhowski, A., Chen, H. T., Gutierrez-Cruz, G., Sun, H. W., Mckinnon, P., Wright, G., Casellas, R., Robbiani, D. F., Staudt, L., Fernandez-Capetillo, O. i Nussenzweig, A., (2013) Identification of early replicating fragile sites that contribute to genome instability. *Cell* 152(3):620-32.

Barroso, E., Milne, R. L., Fernandez, L. P., Zamora, P., Arias, J. I., Benitez, J. i Ribas, G., (2006) FANCD2 associated with sporadic breast cancer risk. *Carcinogenesis* 27(9):1930-7.

Bartel, D. P., (2004) MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116(2):281-97.

Bassam, B. J., Caetano-Anolles, G. i Gresshoff, P. M., (1991) Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Analytical Biochemistry* 196(1):80-3.

Bednarek, A. K., Keck-Waggoner, C. L., Daniel, R. L., Laflin, K. J., Bergsagel, P. L., Kiguchi, K., Brenner, A. J. i Aldaz, C. M., (2001) WWOX, the FRA16D gene, behaves as a suppressor of tumor growth. *Cancer Research* 61(22):8068-73.

Bergoglio, V., Boyer, A. S., Walsh, E., Naim, V., Legube, G., Lee, M. Y., Rey, L., Rosselli, F., Cazaux, C., Eckert, K. A. i Hoffmann, J. S., (2013) DNA synthesis by Pol eta promotes fragile site stability by preventing under-replicated DNA in mitosis. *The Journal of Cell Biology* 201(3):395-408.

Bignell, G. R., Greenman, C. D., Davies, H., Butler, A. P., Edkins, S., Andrews, J. M., Buck, G., Chen, L., Beare, D., Latimer, C., Widaa, S., Hinton, J., Fahey, C., Fu, B., Swamy, S., Dalgliesh, G. L., Teh, B. T., Deloukas, P., Yang, F., Campbell, P. J., Futreal, P. A. i Stratton, M. R., (2010) Signatures of mutation and selection in the cancer genome. *Nature* 463(7283):893-8.

Blom, E., Van De Vrugt, H. J., De Winter, J. P., Arwert, F. i Joenje, H., (2002) Evolutionary clues to the molecular function of fanconi anemia genes. *Acta Haematologica* 108(4):231-6.

Borgaonkar, D. S., (1994) Chromosomal Variation in Man: A Catalog of Chromosomal Variants and Anomalies: Online NLM Version.in Eds-Wiley-Liss, Inc.

Borriello, A., Locasciulli, A., Bianco, A. M., Criscuolo, M., Conti, V., Grammatico, P., Cappellacci, S., Zatterale, A., Morgese, F., Cucciolla, V., Delia, D., Della Ragione, F. i Savoia, A., (2007) A novel Leu153Ser mutation of the Fanconi anemia FANCD2 gene is associated with severe chemotherapy toxicity in a pediatric T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 21(1):72-8.

Bosco, N., Pelliccia, F. i Rocchi, A., (2010) Characterization of FRA7B, a human common fragile site mapped at the 7p chromosome terminal region. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 202(1):47-52.

Bourgeois, C. A., (1974) Distribution of mitomycin C-induced damage in human chromosomes with special reference to regions of repetitive DNA. *Chromosoma* 48(2):203-11.



Brueckner, L. M., Sagulenko, E., Hess, E. M., Zheglo, D., Blumrich, A., Schwab, M. i Savelyeva, L., (2012) Genomic rearrangements at the FRA2H common fragile site frequently involve non-homologous recombination events across LTR and L1(LINE) repeats. *Human Genetics* 131(8):1345-59.

Bushati, N. i Cohen, S. M., (2007) microRNA functions. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 23(175-205).

Callahan, G., Denison, S. R., Phillips, L. A., Shridhar, V. i Smith, D. I., (2003) Characterization of the common fragile site FRA9E and its potential role in ovarian cancer. *Oncogene* 22(4):590-601.

Callén, E., Samper, E., Ramírez, M. J., Creus, A., Marcos, R., Ortega, J. J., Olivé, T., Badell, I., Blasco, M. A. i Surrallés, J., (2002) Breaks at telomeres and TRF2-independent end fusions in Fanconi anemia. *Human Molecular Genetics* 11(4):439-44.

Canela, A., Sridharan, S., Sciascia, N., Tubbs, A., Meltzer, P., Sleckman, B. P. i Nussenzweig, A., (2016) DNA Breaks and End Resection Measured Genome-wide by End Sequencing. *Molecular Cell* 63(5):898-911.

Cann, K. L. i Dellaire, G., (2011) Heterochromatin and the DNA damage response: the need to relax. *Biochemistry and Cell Biology* 89(1):45-60.

Casper, A. M., Nghiem, P., Arlt, M. F. i Glover, T. W., (2002) ATR regulates fragile site stability. *Cell* 111(6):779-89.

Castor, D., Nair, N., Declais, A. C., Lachaud, C., Toth, R., Macartney, T. J., Lilley, D. M., Arthur, J. S. i Rouse, J., (2013) Cooperative control of holliday junction resolution and DNA repair by the SLX1 and MUS81-EME1 nucleases. *Molecular Cell* 52(2):221-33.

Chabot, B. i Shkreta, L., (2016) Defective control of pre-messenger RNA splicing in human disease. *The Journal of Cell Biology* 212(1):13-27.

Chamary, J. V., Parmley, J. L. i Hurst, L. D., (2006) Hearing silence: non-neutral evolution at synonymous sites in mammals. *Nature Reviews. Genetics* 7(2):98-108.

Chan, K. L., Palmai-Pallag, T., Ying, S. i Hickson, I. D., (2009) Replication stress induces sister-chromatid bridging at fragile site loci in mitosis. *Nature Cell Biology* 11(6):753-60.

Chandrasekharappa, S. C., Lach, F. P., Kimble, D. C., Kamat, A., Teer, J. K., Donovan, F. X., Flynn, E., Sen, S. K., Thongthip, S., Sanborn, E., Smogorzewska, A., Auerbach, A. D. i Ostrander, E. A., (2013) Massively parallel sequencing, aCGH, and RNA-Seq technologies provide a comprehensive molecular diagnosis of Fanconi anemia. *Blood* 121(22):e138-48.

Chang, L., Yuan, W., Zeng, H., Zhou, Q., Wei, W., Zhou, J., Li, M., Wang, X., Xu, M., Yang, F., Yang, Y., Cheng, T. i Zhu, X., (2014) Whole exome sequencing reveals concomitant mutations of multiple FA genes in individual Fanconi anemia patients. *BMC Medical Genomics* 7(24).

Ciullo, M., Debily, M. A., Rozier, L., Autiero, M., Billault, A., Mayau, V., El Marhomy, S., Guardiola, J., Bernheim, A., Coullin, P., Piatier-Tonneau, D. i Debatisse, M., (2002) Initiation of the breakage-fusion-bridge mechanism through common fragile site activation in human breast cancer cells: the model of PIP gene duplication from a break at FRA7I. *Human Molecular Genetics* 11(23):2887-94.

Cleal, K., Norris, K. i Baird, D., (2018) Telomere Length Dynamics and the Evolution of Cancer Genome Architecture. *International Journal of Molecular Sciences* 19(2):

Cooper, D. N., Chen, J. M., Ball, E. V., Howells, K., Mort, M., Phillips, A. D., Chuzhanova, N., Krawczak, M., Kehrer-Sawatzki, H. i Stenson, P. D., (2010) Genes, mutations, and human inherited disease at the dawn of the age of personalized genomics. *Human Mutation* 31(6):631-55.

Curatolo, A., Limongi, Z. M., Pelliccia, F. i Rocchi, A., (2007) Molecular characterization of the human common fragile site FRA1H. *Genes Chromosomes & Cancer* 46(5):487-93.

Debatisse, M., Le Tallec, B., Letessier, A., Dutrillaux, B. i Brison, O., (2012) Common fragile sites: mechanisms of instability revisited. *Trends in Genetics* 28(1):22-32.

Denison, S. R., Callahan, G., Becker, N. A., Phillips, L. A. i Smith, D. I., (2003) Characterization of FRA6E and its potential role in autosomal recessive juvenile parkinsonism and ovarian cancer. *Genes Chromosomes & Cancer* 38(1):40-52.

Desmet, F. O., Hamroun, D., Lalande, M., Collod-Beroud, G., Claustres, M. i Beroud, C., (2009) Human Splicing Finder: an online bioinformatics tool to predict splicing signals. *Nucleic Acids Research* 37(9):e67.

Dhir, A. i Buratti, E., (2010) Alternative splicing: role of pseudoexons in human disease and potential therapeutic strategies. *The FEBS Journal* 277(4):841-55.

Dillon, L. W., Burrow, A. A. i Wang, Y. H., (2010) DNA instability at chromosomal fragile sites in cancer. *Current Genomics* 11(5):326-37.

Dillon, L. W., Pierce, L. C., Ng, M. C. i Wang, Y. H., (2013) Role of DNA secondary structures in fragile site breakage along human chromosome 10. *Human Molecular Genetics* 22(7):1443-56.

Doksani, Y. i De Lange, T., (2014) The role of double-strand break repair pathways at functional and dysfunctional telomeres. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 6(12):a016576.

Dong, H., Nebert, D. W., Bruford, E. A., Thompson, D. C., Joenje, H. i Vasiliou, V., (2015) Update of the human and mouse Fanconi anemia genes. *Human Genomics* 9(32).

Durkin, S. G. i Glover, T. W., (2007) Chromosome fragile sites. *Annual Review of Genetics* 41(169-92).

Fairbrother, W. G., Yeh, R. F., Sharp, P. A. i Burge, C. B., (2002) Predictive identification of exonic splicing enhancers in human genes. *Science* 297(5583):1007-13.

Fan, Q., Zhang, F., Barrett, B., Ren, K. i Andreassen, P. R., (2009) A role for monoubiquitinated FANCD2 at telomeres in ALT cells. *Nucleic Acids Research* 37(6):1740-54.

Fanconi, G., (1967) Familial constitutional panmyelocytopenia, Fanconi's anemia (F.A.). I. Clinical aspects. *Seminars in Hematology* 4(3):233-40.

Ferber, M. J., Eilers, P., Schuurin, E., Fenton, J. A., Fleuren, G. J., Kenter, G., Szuhai, K., Smith, D. I., Raap, A. K. i Brink, A. A., (2004) Positioning of cervical carcinoma and Burkitt lymphoma translocation breakpoints with respect to the human papillomavirus integration cluster in FRA8C at 8q24.13. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 154(1):1-9.

Ferber, M. J., Thorland, E. C., Brink, A. A., Rapp, A. K., Phillips, L. A., McGovern, R., Gostout, B. S., Cheung, T. H., Chung, T. K., Fu, W. Y. i Smith, D. I., (2003) Preferential integration of human papillomavirus type 18 near the c-myc locus in cervical carcinoma. *Oncogene* 22(46):7233-42.

Fidler, C., Wainscoat, J. S. i Boultwood, J., (1999) The human POP2 gene: identification, sequencing, and mapping to the critical region of the 5q- syndrome. *Genomics* 56(1):134-6.

Fiorini, E., Santoni, A. i Colla, S., (2018) Dysfunctional telomeres and hematological disorders. *Differentiation* 100(1-11).

Flemming, W., (1965) CONTRIBUTIONS TO THE KNOWLEDGE OF THE CELL AND ITS VITAL PROCESSES. *The Journal of Cell Biology* 25(1):3-69.

Freie, B., Li, X., Ciccone, S. L., Nawa, K., Cooper, S., Vogelweid, C., Schantz, L., Haneline, L. S., Orazi, A., Broxmeyer, H. E., Lee, S. H. i Clapp, D. W., (2003) Fanconi anemia type C and p53 cooperate in apoptosis and tumorigenesis. *Blood* 102(12):4146-52.

Freudenreich, C. H., (2007) Chromosome fragility: molecular mechanisms and cellular consequences. *Frontiers in Bioscience* 12(4911-24).

Fundia, A., Gorla, N. i Larripa, I., (1994) Spontaneous chromosome aberrations in Fanconi's anemia patients are located at fragile sites and acute myeloid leukemia breakpoints. *Hereditas* 120(1):47-50.

Gallmeier, E. i Kern, S. E., (2007) Targeting Fanconi anemia/BRCA2 pathway defects in cancer: the significance of preclinical pharmacogenomic models. *Clinical Cancer Research* 13(1):4-10.

Gandhi, M., Medvedovic, M., Stringer, J. R. i Nikiforov, Y. E., (2006) Interphase chromosome folding determines spatial proximity of genes participating in carcinogenic RET/PTC rearrangements. *Oncogene* 25(16):2360-6.

Gandhi, M., Dillon, L. W., Pramanik, S., Nikiforov, Y. E. i Wang, Y. H., (2010) DNA breaks at fragile sites generate oncogenic RET/PTC rearrangements in human thyroid cells. *Oncogene* 29(15):2272-80.

Gangaraju, V. K. i Lin, H., (2009) MicroRNAs: key regulators of stem cells. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 10(2):116-25.

Garaycochea, J. I. i Patel, K. J., (2014) Why does the bone marrow fail in Fanconi anemia? *Blood* 123(1):26-34.

García-Rubio, M. L., Pérez-Calero, C., Barroso, S. I., Tumini, E., Herrera-Moyano, E., Rosado, I. V. i Aguilera, A., (2015) The Fanconi Anemia Pathway Protects Genome Integrity from R-loops. *PLoS Genetics* 11(11):e1005674.

Gardenswartz, A. i Aqeilan, R. I., (2014) WW domain-containing oxidoreductase's role in myriad cancers: clinical significance and future implications. *Experimental biology and medicine* (Maywood, N.J.) 239(3):253-63.

Georgakilas, A. G., Tsantoulis, P., Kotsinas, A., Michalopoulos, I., Townsend, P. i Gorgoulis, V. G., (2014) Are common fragile sites merely structural domains or highly organized “functional” units susceptible to oncogenic stress? *Cellular and Molecular Life Sciences* 71(23):4519-44.

Gilbert, W., (1978) Why genes in pieces? *Nature* 271(5645):501.

Gille, J. J. P., Floor, K., Kerkhoven, L., Ameziane, N., Joenje, H. i De Winter, J. P., (2012) Diagnosis of Fanconi Anemia: Mutation Analysis by Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification and PCR-Based Sanger Sequencing. *Anemia* 2012(13).

Gilson, E. i Londono-Vallejo, A., (2007) Telomere length profiles in humans: all ends are not equal. *Cell Cycle* 6(20):2486-94.

Glover, T. W., Wilson, T. E. i Arlt, M. F., (2017) Fragile Sites in Cancer: More Than Meets the Eye. *Nature Reviews. Cancer* 17(8):489-501.

Glover, T. W., Berger, C., Coyle, J. i Echo, B., (1984) DNA polymerase alpha inhibition by aphidicolin induces gaps and breaks at common fragile sites in human chromosomes. *Human Genetics* 67(2):136-42.

Graakjaer, J., Bischoff, C., Korsholm, L., Holstebro, S., Vach, W., Bohr, V. A., Christensen, K. i Kolvraa, S., (2003) The pattern of chromosome-specific variations in telomere length in humans is determined by inherited, telomere-near factors and is maintained throughout life. *Mechanisms of Ageing and Development* 124(5):629-40.

Griffiths, A. J., Miller, J. H., Suzuki, D. T., Lewontin, R. C. i Gelbart, W. M., (2000) Molecular basis of gene mutations, in *An Introduction to Genetic Analysis, 7th edition* W. H. Freeman and company, New York.

Guirouilh-Barbat, J., Rass, E., Plo, I., Bertrand, P. i Lopez, B. S., (2007) Defects in XRCC4 and KU80 differentially affect the joining of distal nonhomologous ends. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104(52):20902-7.

Hazan, I., Hofmann, T. G. i Aqeilan, R. I., (2016) Tumor Suppressor Genes within Common Fragile Sites Are Active Players in the DNA Damage Response. *PLoS Genetics* 12(12):e1006436.

Helmrich, A., Ballarino, M. i Tora, L., (2011) Collisions between replication and transcription complexes cause common fragile site instability at the longest human genes. *Molecular Cell* 44(6):966-77.

Helmrich, A., Stout-Weider, K., Hermann, K., Schrock, E. i Heiden, T., (2006) Common fragile sites are conserved features of human and mouse chromosomes and relate to large active genes. *Genome Research* 16(10):1222-30.

Helmrich, A., Stout-Weider, K., Matthaei, A., Hermann, K., Heiden, T. i Schrock, E., (2007) Identification of the human/mouse syntenic common fragile site FRA7K/Fra12C1--relation of FRA7K and other human common fragile sites on

chromosome 7 to evolutionary breakpoints. *International Journal of Cancer* 120(1):48-54.

Hemann, M. T., Strong, M. A., Hao, L. Y. i Greider, C. W., (2001) The shortest telomere, not average telomere length, is critical for cell viability and chromosome stability. *Cell* 107(1):67-77.

Hewett, D. R., Handt, O., Hobson, L., Mangelsdorf, M., Eyre, H. J., Baker, E., Sutherland, G. R., Schuffenhauer, S., Mao, J. I. i Richards, R. I., (1998) FRA10B structure reveals common elements in repeat expansion and chromosomal fragile site genesis. *Molecular Cell* 1(6):773-81.

Hira, A., Yoshida, K., Sato, K., Okuno, Y., Shiraishi, Y., Chiba, K., Tanaka, H., Miyano, S., Shimamoto, A., Tahara, H., Ito, E., Kojima, S., Kurumizaka, H., Ogawa, S., Takata, M., Yabe, H. i Yabe, M., (2015) Mutations in the gene encoding the E2 conjugating enzyme UBE2T cause Fanconi anemia. *American Journal of Human Genetics* 96(6):1001-7.

Holohan, B., Wright, W. E. i Shay, J. W., (2014) Telomeropathies: An emerging spectrum disorder. *The Journal of Cell Biology* 205(3):289-99.

Houghtaling, S., Timmers, C., Noll, M., Finegold, M. J., Jones, S. N., Meyn, M. S. i Grompe, M., (2003) Epithelial cancer in Fanconi anemia complementation group D2 (Fancd2) knockout mice. *Genes & Development* 17(16):2021-35.

Houghtaling, S., Granville, L., Akkari, Y., Torimaru, Y., Olson, S., Finegold, M. i Grompe, M., (2005) Heterozygosity for p53 (Trp53<sup>+/-</sup>) accelerates epithelial tumor formation in fanconi anemia complementation group D2 (Fancd2) knockout mice. *Cancer Research* 65(1):85-91.

Howlett, N. G., Taniguchi, T., Durkin, S. G., D'andrea, A. D. i Glover, T. W., (2005) The Fanconi anemia pathway is required for the DNA replication stress response and for the regulation of common fragile site stability. *Human Molecular Genetics* 14(5):693-701.

Hsiao, Y.-H. E., Bahn, J. H., Lin, X., Chan, T.-M., Wang, R. i Xiao, X., (2016) Alternative splicing modulated by genetic variants demonstrates accelerated evolution regulated by highly conserved proteins. *Genome Research* 26(4):440-50.

Huang, H., Qian, C., Jenkins, R. B. i Smith, D. I., (1998) Fish mapping of YAC clones at human chromosomal band 7q31.2: identification of YACS spanning FRA7G within the common region of LOH in breast and prostate cancer. *Genes Chromosomes & Cancer* 21(2):152-9.

Huang, H., Reed, C. P., Mordi, A., Lomberk, G., Wang, L., Shridhar, V., Hartmann, L., Jenkins, R. i Smith, D. I., (1999) Frequent deletions within FRA7G at 7q31.2 in invasive epithelial ovarian cancer. *Genes Chromosomes & Cancer* 24(1):48-55.

Iizuka, M., Matsui, T., Takisawa, H. i Smith, M. M., (2006) Regulation of replication licensing by acetyltransferase Hbo1. *Molecular and Cellular Biology* 26(3):1098-108.

Iliopoulos, D., Guler, G., Han, S. Y., Druck, T., Ottey, M., Mccorkell, K. A. i Huebner, K., (2006) Roles of FHIT and WWOX fragile genes in cancer. *Cancer Letters* 232(1):27-36.

International Human Genome Sequencing, C., (2004) Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature* 431(931).

Irminger-Finger, I., Leung, W. C., Li, J., Dubois-Dauphin, M., Harb, J., Feki, A., Jefford, C. E., Soriano, J. V., Jaconi, M., Montesano, R. i Krause, K. H., (2001) Identification of BARD1 as mediator between proapoptotic stress and p53-dependent apoptosis. *Molecular Cell* 8(6):1255-66.

Iyer, B. V., Kenward, M. i Arya, G., (2011) Hierarchies in eukaryotic genome organization: Insights from polymer theory and simulations. *BMC Biophysics* 4(8).

Jasin, M. i Rothstein, R., (2013) Repair of strand breaks by homologous recombination. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 5(11):a012740.

Jiang, Y., Lucas, I., Young, D. J., Davis, E. M., Karrison, T., Rest, J. S. i Le Beau, M. M., (2009) Common fragile sites are characterized by histone hypoacetylation. *Human Molecular Genetics* 18(23):4501-12.



Jin, P. i Warren, S. T., (2000) Understanding the molecular basis of fragile X syndrome. *Human Molecular Genetics* 9(6):901-8.

Johnson, R. D. i Jasin, M., (2001) Double-strand-break-induced homologous recombination in mammalian cells. *Biochemical Society Transactions* 29(Pt 2):196-201.

Joksic, G., Joksic, I., Filipović, J. i Liehr, T., (2017) Telomere Length Measurement by FISH, 147-52 in *Fluorescence In Situ Hybridization (FISH): Application Guide*, edited by T. Liehr. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg.

Joksic, I., Petrovic, S., Leskovac, A., Filipovic, J., Guc-Scekic, M., Vujic, D. i Joksic, G., (2013) Enhanced frequency of sister chromatid exchanges induced by diepoxybutane is specific characteristic of Fanconi anemia cellular phenotype. *Genetika* 45(2):393–403.

Joksic, I., Vujic, D., Guc-Scekic, M., Leskovac, A., Petrovic, S., Ojani, M., Trujillo, J. P., Surralles, J., Zivkovic, M., Stankovic, A., Slijepcevic, P. i Joksic, G., (2012) Dysfunctional telomeres in primary cells from Fanconi anemia FANCD2 patients. *Genome Integrity* 3(6-6).

Joukov, V., Groen, A. C., Prokhorova, T., Gerson, R., White, E., Rodriguez, A., Walter, J. C. i Livingston, D. M., (2006) The BRCA1/BARD1 heterodimer modulates ran-dependent mitotic spindle assembly. *Cell* 127(3):539-52.

Jung, K., Bilusic, M., Pei, J., Slifker, M., Zhou, Y., Flieder, D. B., Gray, P. i Plimack, E. R., (2017) Molecular profiling of cancer outliers. *Journal of Clinical Oncology* 35(15\_suppl):e13025-e25.

Kalb, R., Neveling, K., Hoehn, H., Schneider, H., Linka, Y., Batish, S. D., Hunt, C., Berwick, M., Callen, E., Surralles, J., Casado, J. A., Bueren, J., Dasi, A., Soulier, J., Gluckman, E., Zwaan, C. M., Van Spaendonk, R., Pals, G., De Winter, J. P., Joenje, H., Grompe, M., Auerbach, A. D., Hanenberg, H. i Schindler, D., (2007) Hypomorphic mutations in the gene encoding a key Fanconi anemia protein, FANCD2, sustain a significant group of FA-D2 patients with severe phenotype. *American Journal of Human Genetics* 80(5):895-910.

- Kee, Y. i D'andrea, A. D., (2010) Expanded roles of the Fanconi anemia pathway in preserving genomic stability. *Genes & Development* 24(16):1680-94.
- Kelly, P. F., Radtke, S., Von Kalle, C., Balcik, B., Bohn, K., Mueller, R., Schuesler, T., Haren, M., Reeves, L., Cancelas, J. A., Leemhuis, T., Harris, R., Auerbach, A. D., Smith, F. O., Davies, S. M. i Williams, D. A., (2007) Stem cell collection and gene transfer in Fanconi anemia. *Molecular Therapy* 15(1):211-9.
- Klingensmith, J., Nusse, R. i Perrimon, N., (1994) The *Drosophila* segment polarity gene *dishevelled* encodes a novel protein required for response to the wingless signal. *Genes & Development* 8(1):118-30.
- Knies, K., Schuster, B., Ameziane, N., Rooimans, M., Bettecken, T., De Winter, J. i Schindler, D., (2012) Genotyping of fanconi anemia patients by whole exome sequencing: advantages and challenges. *PLoS One* 7(12):e52648.
- Komrokji, R. S., Padron, E., Ebert, B. L. i List, A. F., (2013) Deletion 5q MDS: molecular and therapeutic implications. *Best Practice & Research Clinical Haematology* 26(4):365-75.
- Kong, C. M., Lee, X. W. i Wang, X., (2013) Telomere shortening in human diseases. *The FEBS Journal* 280(14):3180-93.
- Koundrioukoff, S., Carignon, S., Techer, H., Letessier, A., Brison, O. i Debatisse, M., (2013) Stepwise activation of the ATR signaling pathway upon increasing replication stress impacts fragile site integrity. *PLoS Genetics* 9(7):e1003643.
- Krawczak, M., Thomas, N. S., Hundrieser, B., Mort, M., Wittig, M., Hampe, J. i Cooper, D. N., (2007) Single base-pair substitutions in exon-intron junctions of human genes: nature, distribution, and consequences for mRNA splicing. *Human Mutation* 28(2):150-8.
- Kuhn, E. M. i Therman, E., (1982) Origin of symmetrical triradial chromosomes in human cells. *Chromosoma* 86(5):673-81.

Kuroki, T., Trapasso, F., Shiraishi, T., Alder, H., Mimori, K., Mori, M. i Croce, C. M., (2002) Genetic alterations of the tumor suppressor gene WWOX in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Research* 62(8):2258-60.

Lachaud, C., Moreno, A., Marchesi, F., Toth, R., Blow, J. J. i Rouse, J., (2016) Ubiquitinated Fancd2 recruits Fanl to stalled replication forks to prevent genome instability. *Science* 351(6275):846-9.

Laganà, A., Russo, F., Sismeiro, C., Giugno, R., Pulvirenti, A. i Ferro, A., (2010) Variability in the Incidence of miRNAs and Genes in Fragile Sites and the Role of Repeats and CpG Islands in the Distribution of Genetic Material. *PLoS One* 5(6):e11166.

Le Tallec, B., Millot, G. A., Blin, M. E., Brison, O., Dutrillaux, B. i Debatisse, M., (2013) Common fragile site profiling in epithelial and erythroid cells reveals that most recurrent cancer deletions lie in fragile sites hosting large genes. *Cell Reports* 4(3):420-8.

Le Tallec, B., Koundrioukoff, S., Wilhelm, T., Letessier, A., Brison, O. i Debatisse, M., (2014) Updating the mechanisms of common fragile site instability: how to reconcile the different views? *Cellular and Molecular Life Sciences* 71(23):4489-94.

Letessier, A., Millot, G. A., Koundrioukoff, S., Lachages, A. M., Vogt, N., Hansen, R. S., Malfoy, B., Brison, O. i Debatisse, M., (2011) Cell-type-specific replication initiation programs set fragility of the FRA3B fragile site. *Nature* 470(7332):120-3.

Levitus, M., Rooimans, M. A., Steltenpool, J., Cool, N. F., Oostra, A. B., Mathew, C. G., Hoatlin, M. E., Waisfisz, Q., Arwert, F., De Winter, J. P. i Joenje, H., (2004) Heterogeneity in Fanconi anemia: evidence for 2 new genetic subtypes. *Blood* 103(7):2498-503.

Li, X., Leteurtre, F., Rocha, V., Guardiola, P., Berger, R., Daniel, M. T., Noguera, M. H., Maarek, O., Roux, G. L., De La Salmoniere, P., Richard, P. i Gluckman, E., (2003) Abnormal telomere metabolism in Fanconi's anaemia correlates with genomic instability and the probability of developing severe aplastic anaemia. *British Journal of Haematology* 120(5):836-45.

- Li, Y., Cai, B., Shen, L., Dong, Y., Lu, Q., Sun, S., Liu, S., Ma, S., Ma, P. X. i Chen, J., (2017) MiRNA-29b suppresses tumor growth through simultaneously inhibiting angiogenesis and tumorigenesis by targeting Akt3. *Cancer Letters* 397(111-19).
- Li, Z., Zhang, Q., Mao, J. H., Weise, A., Mrasek, K., Fan, X., Zhang, X., Liehr, T., Lu, K. H., Balmain, A. i Cai, W. W., (2010) An HDAC1-binding domain within FATS bridges p21 turnover to radiation-induced tumorigenesis. *Oncogene* 29(18):2659-71.
- Limongi, M. Z., Pelliccia, F. i Rocchi, A., (2003) Characterization of the human common fragile site FRA2G. *Genomics* 81(2):93-7.
- Lo Ten Foe, J. R., Rooimans, M. A., Bosnoyan-Collins, L., Alon, N., Wijker, M., Parker, L., Lightfoot, J., Carreau, M., Callen, D. F., Savoia, A., Cheng, N. C., Van Berkel, C. G., Strunk, M. H., Gille, J. J., Pals, G., Kruyt, F. A., Pronk, J. C., Arwert, F., Buchwald, M. i Joenje, H., (1996) Expression cloning of a cDNA for the major Fanconi anaemia gene, FAA. *Nature Genetics* 14(3):320-3.
- Lu, J., Getz, G., Miska, E. A., Alvarez-Saavedra, E., Lamb, J., Peck, D., Sweet-Cordero, A., Ebert, B. L., Mak, R. H., Ferrando, A. A., Downing, J. R., Jacks, T., Horvitz, H. R. i Golub, T. R., (2005) MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* 435(7043):834-8.
- Lukusa, T. i Fryns, J. P., (2008) Human chromosome fragility. *Biochimica et Biophysica Acta* 1779(1):3-16.
- Lyakhovich, A., Ramirez, M. J., Castellanos, A., Castella, M., Simons, A. M., Parvin, J. D. i Surralles, J., (2011) Fanconi anemia protein FANCD2 inhibits TRF1 polyADP-ribosylation through tankyrase1-dependent manner. *Genome Integrity* 2(1):4.
- Ma, K., Qiu, L., Mrasek, K., Zhang, J., Liehr, T., Quintana, L. G. i Li, Z., (2012) Common fragile sites: genomic hotspots of DNA damage and carcinogenesis. *International Journal of Molecular Sciences* 13(9):11974-99.
- Ma, Y., Pan, X., Xu, P., Mi, Y., Wang, W., Wu, X., He, Q., Liu, X., Tang, W. i An, H. X., (2017) Plasma microRNA alterations between EGFR-activating mutational NSCLC patients with and without primary resistance to TKI. *Oncotarget* 8(51):88529-36.

Machida, Y. J., Machida, Y., Chen, Y., Gurtan, A. M., Kupfer, G. M., D'andrea, A. D. i Dutta, A., (2006) UBE2T is the E2 in the Fanconi anemia pathway and undergoes negative autoregulation. *Molecular Cell* 23(4):589-96.

Maciejowski, J. i De Lange, T., (2017) Telomeres in cancer: tumour suppression and genome instability. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 18(3):175-86.

Madireddy, A., Kosiyatrakul, S. T., Boisvert, R. A., Herrera-Moyano, E., Garcia-Rubio, M. L., Gerhardt, J., Vuono, E. A., Owen, N., Yan, Z., Olson, S., Aguilera, A., Howlett, N. G. i Schildkraut, C. L., (2016) FANCD2 Facilitates Replication through Common Fragile Sites. *Molecular Cell* 64(2):388-404.

Madjunkova, S., Kocheva, S. A. i Plaseska-Karanfilska, D., (2014) Fanconi anemia founder mutation in Macedonian patients. *Acta Haematologica* 132(1):15-21.

Marchetto, N. M., Glynn, R. A., Ferry, M. L., Ostojic, M., Wolff, S. M., Yao, R. i Haussmann, M. F., (2016) Prenatal stress and newborn telomere length. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 215(1):94.e1-8.

Marian, A. J., (2014) Sequencing Your Genome: What Does It Mean? *Methodist DeBakey Cardiovascular Journal* 10(1):3-6.

Mason, J. M. i Sekiguchi, J. M., (2011) Snm1B/Apollo functions in the Fanconi anemia pathway in response to DNA interstrand crosslinks. *Human Molecular Genetics* 20(13):2549-59.

Mathew, C. G., (2006) Fanconi anaemia genes and susceptibility to cancer. *Oncogene* 25(43):5875-84.

Mazouzi, A., Velimezi, G. i Loizou, J. I., (2014) DNA replication stress: Causes, resolution and disease. *Experimental Cell Research* 329(1):85-93.

Mcavoy, S., Ganapathiraju, S., Perez, D. S., James, C. D. i Smith, D. I., (2007) DMD and IL1RAPL1: two large adjacent genes localized within a common fragile site (FRAXC) have reduced expression in cultured brain tumors. *Cytogenetic and Genome Research* 119(3-4):196-203.

Mehta, P. i Tolar, J., (2002-2018) Fanconi Anemia, in *GeneReviews®*, edited by R. Pagon, M. Adam, H. Ardinger, S. Wallace, A. Amemiya, L. Bean, T. Bird, C. Dolan, C. Fong, R. Smith and K. Stephens. University of Washington, Seattle, Seattle (WA).

Meng, G., Aoki, K., Tokura, K., Nakahara, K., Inazawa, J. i Kasai, M., (2000) Genomic structure and chromosomal localization of the gene encoding TRAX, a Translin-associated factor X. *Journal of Human Genetics* 45(5):305-8.

Metzler, M., (1986) DNA adducts of medicinal drugs: some selected examples. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 112(3):210-5.

Michael, D., Beer, D. G., Wilke, C. W., Miller, D. E. i Glover, T. W., (1997) Frequent deletions of FHIT and FRA3B in Barrett's metaplasia and esophageal adenocarcinomas. *Oncogene* 15(14):1653-9.

Milde-Langosch, K., (2005) The Fos family of transcription factors and their role in tumorigenesis. *European Journal of Cancer* 41(16):2449-61.

Miller, C. T., Lin, L., Casper, A. M., Lim, J., Thomas, D. G., Orringer, M. B., Chang, A. C., Chambers, A. F., Giordano, T. J., Glover, T. W. i Beer, D. G., (2006) Genomic amplification of MET with boundaries within fragile site FRA7G and upregulation of MET pathways in esophageal adenocarcinoma. *Oncogene* 25(3):409-18.

Mimori, K., Druck, T., Inoue, H., Alder, H., Berk, L., Mori, M., Huebner, K. i Croce, C. M., (1999) Cancer-specific chromosome alterations in the constitutive fragile region FRA3B. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96(13):7456-61.

miRBase, The microRNA database. <http://www.mirbase.org>

Miron, K., Golan-Lev, T., Dvir, R., Ben-David, E. i Kerem, B., (2015) Oncogenes create a unique landscape of fragile sites. *Nature Communications* 6(7094).

Mishmar, D., Mandel-Gutfreund, Y., Margalit, H., Rahat, A. i Kerem, B., (1999) Common fragile sites: G-band characteristics within an R-band. *American Journal of Human Genetics* 64(3):908-10.

Mishmar, D., Rahat, A., Scherer, S. W., Nyakatura, G., Hinzmann, B., Kohwi, Y., Mandel-Gutfroind, Y., Lee, J. R., Drescher, B., Sas, D. E., Margalit, H., Platzer, M., Weiss, A., Tsui, L. C., Rosenthal, A. i Kerem, B., (1998) Molecular characterization of a common fragile site (FRA7H) on human chromosome 7 by the cloning of a simian virus 40 integration site. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95(14):8141-6.

Moldovan, G. L. i D'andrea, A. D., (2009) How the fanconi anemia pathway guards the genome. *Annual Review of Genetics* 43(223-49).

Morelli, C., Karayianni, E., Magnanini, C., Mungall, A. J., Thorland, E., Negrini, M., Smith, D. I. i Barbanti-Brodano, G., (2002) Cloning and characterization of the common fragile site FRA6F harboring a replicative senescence gene and frequently deleted in human tumors. *Oncogene* 21(47):7266-76.

Mortusewicz, O., Herr, P. i Helleday, T., (2013) Early replication fragile sites: where replication–transcription collisions cause genetic instability. *The EMBO Journal* 32(4):493-95.

Mrasek, K., Schoder, C., Teichmann, A. C., Behr, K., Franze, B., Wilhelm, K., Blaurock, N., Claussen, U., Liehr, T. i Weise, A., (2010) Global screening and extended nomenclature for 230 aphidicolin-inducible fragile sites, including 61 yet unreported ones. *International Journal of Oncology* 36(4):929-40.

Mrasek, K., Wilhelm, K., Quintana, L. G., Theuss, L., Liehr, T., Leskovac, A., Filipovic, J., Joksic, G., Joksic, I. i Weise, A., (2015) BAC-probes applied for characterization of fragile sites (FS). *Methods in Molecular Biology* 1227(289-98).

Nakanishi, K., Taniguchi, T., Ranganathan, V., New, H. V., Moreau, L. A., Stotsky, M., Mathew, C. G., Kastan, M. B., Weaver, D. T. i D'andrea, A. D., (2002) Interaction of FANCD2 and NBS1 in the DNA damage response. *Nature Cell Biology* 4(12):913-20.

Nascimbeni, A. C., Fanin, M., Tasca, E. i Angelini, C., (2010) Transcriptional and Translational Effects of Intronic CAPN3 Gene Mutations. *Human Mutation* 31(9):e1658-e69.

NCBI, National Center for Biotechnology Information. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>  
Newell, A. E., Akkari, Y. M., Torimaru, Y., Rosenthal, A., Reifsteck, C. A., Cox, B., Grompe, M. i Olson, S. B., (2004) Interstrand crosslink-induced radials form between non-homologous chromosomes, but are absent in sex chromosomes. *DNA Repair (Amst)* 3(5):535-42.

O'keefe, L. V. i Richards, R. I., (2006) Common chromosomal fragile sites and cancer: focus on FRA16D. *Cancer Letters* 232(1):37-47.

Oestergaard, V. H. i Lisby, M., (2017) Transcription-replication conflicts at chromosomal fragile sites—consequences in M phase and beyond. *Chromosoma* 126(2):213-22.

OMIM, Online Mendelian Inheritance in Man. <http://www.omim.org>

Owen, N., Hejna, J., Rennie, S., Mitchell, A., Newell, A. H., Ziaie, N., Moses, R. E. i Olson, S. B., (2014) Bloom syndrome radials are predominantly non-homologous and are suppressed by phosphorylated BLM. *Cytogenetic and Genome Research* 144(4):255-63.

Ozeri-Galai, E., Bester, A. C. i Kerem, B., (2012) The complex basis underlying common fragile site instability in cancer. *Trends in Genetics* 28(6):295-302.

Ozeri-Galai, E., Tur-Sinai, M., Bester, A. C. i Kerem, B., (2014) Interplay between genetic and epigenetic factors governs common fragile site instability in cancer. *Cellular and Molecular Life Sciences* 71(23):4495-506.

Ozeri-Galai, E., Lebofsky, R., Rahat, A., Bester, A. C., Bensimon, A. i Kerem, B., (2011) Failure of origin activation in response to fork stalling leads to chromosomal instability at fragile sites. *Molecular Cell* 43(1):122-31.

Palakodeti, A., Han, Y., Jiang, Y. i Le Beau, M. M., (2004) The role of late/slow replication of the FRA16D in common fragile site induction. *Genes Chromosomes & Cancer* 39(1):71-6.

Palumbo, E., Matricardi, L., Tosoni, E., Bensimon, A. i Russo, A., (2010) Replication dynamics at common fragile site FRA6E. *Chromosoma* 119(6):575-87.



- Papasaikas, P. i Valcarcel, J., (2016) The Spliceosome: The Ultimate RNA Chaperone and Sculptor. *Trends in Biochemical Sciences* 41(1):33-45.
- Park, J. Y., Virts, E. L., Jankowska, A., Wiek, C., Othman, M., Chakraborty, S. C., Vance, G. H., Alkuraya, F. S., Hanenberg, H. i Andreassen, P. R., (2016) Complementation of hypersensitivity to DNA interstrand crosslinking agents demonstrates that XRCC2 is a Fanconi anaemia gene. *Journal of Medical Genetics* 53(10):672-80.
- Park, S. N., Kim, N. H., Im, K., Lee, J. S., Choi, S. i Lee, D. S., (2015) Diagnosis of Fanconi Anemia By Chromosome Breakage Tests Using 3 Different Scoring Systems and Whole Genome Sequencing Among Patients with Aplastic Anemia in Korean. *Blood* 126(23):4792-92.
- Pekarsky, Y., Palamarchuk, A., Huebner, K. i Croce, C. M., (2002) FHIT as Tumor Suppressor: Mechanisms and Therapeutic Opportunities. *Cancer Biology and Therapy* 1(3):232-36.
- Petrovic, S., Leskovac, A., Kotur-Stevuljevic, J., Joksic, J., Guc-Scekic, M., Vujic, D. i Joksic, G., (2011) Gender-related differences in the oxidant state of cells in Fanconi anemia heterozygotes. *Biological Chemistry* 392(7):625-32.
- Petrucci, N., Daly, M. B. i Feldman, G. L., (2010) Hereditary breast and ovarian cancer due to mutations in BRCA1 and BRCA2. *Genetics in Medicine* 12(5):245-59.
- Poon, S. S. i Lansdorp, P. M., (2001) Quantitative fluorescence in situ hybridization (Q-FISH). *Current Protocols in Cell Biology* Chapter 18(Unit 18.4).
- Reva, B., Antipin, Y. i Sander, C., (2011) Predicting the functional impact of protein mutations: application to cancer genomics. *Nucleic Acids Research* 39(17):e118.
- Rickman, K. A., Lach, F. P., Abhyankar, A., Donovan, F. X., Sanborn, E. M., Kennedy, J. A., Sougnez, C., Gabriel, S. B., Elemento, O., Chandrasekharappa, S. C., Schindler, D., Auerbach, A. D. i Smogorzewska, A., (2015) Deficiency of UBE2T, the E2 Ubiquitin Ligase Necessary for FANCD2 and FANCI Ubiquitination, Causes FA-T Subtype of Fanconi Anemia. *Cell Reports* 12(1):35-41.

Ried, K., Finnis, M., Hobson, L., Mangelsdorf, M., Dayan, S., Nancarrow, J. K., Woollatt, E., Kremmidiotis, G., Gardner, A., Venter, D., Baker, E. i Richards, R. I., (2000) Common chromosomal fragile site FRA16D sequence: identification of the FOR gene spanning FRA16D and homozygous deletions and translocation breakpoints in cancer cells. *Human Molecular Genetics* 9(11):1651-63.

Root, H., Larsen, A., Komosa, M., Al-Azri, F., Li, R., Bazett-Jones, D. P. i Stephen Meyn, M., (2016) FANCD2 limits BLM-dependent telomere instability in the alternative lengthening of telomeres pathway. *Human Molecular Genetics* 25(15):3255-68.

Roy, D., Sin, S. H., Damania, B. i Dittmer, D. P., (2011) Tumor suppressor genes FHIT and WWOX are deleted in primary effusion lymphoma (PEL) cell lines. *Blood* 118(7):e32-9.

Rozier, L., El-Achkar, E., Apiou, F. i Debatisse, M., (2004) Characterization of a conserved aphidicolin-sensitive common fragile site at human 4q22 and mouse 6C1: possible association with an inherited disease and cancer. *Oncogene* 23(41):6872-80.

Ruiz-Herrera, A., Castresana, J. i Robinson, T. J., (2006) Is mammalian chromosomal evolution driven by regions of genome fragility? *Genome Biology* 7(12):R115.

Ruiz-Herrera, A., Garcia, F., Giulotto, E., Attolini, C., Egozcue, J., Ponsa, M. i Garcia, M., (2005) Evolutionary breakpoints are co-localized with fragile sites and intrachromosomal telomeric sequences in primates. *Cytogenetic and Genome Research* 108(1-3):234-47.

Saldivar, J. C., Miuma, S., Bene, J., Hosseini, S. A., Shibata, H., Sun, J., Wheeler, L. J., Mathews, C. K. i Huebner, K., (2012) Initiation of genome instability and preneoplastic processes through loss of Fhit expression. *PLoS Genetics* 8(11):e1003077.

Samadashwily, G. M., Raca, G. i Mirkin, S. M., (1997) Trinucleotide repeats affect DNA replication in vivo. *Nature Genetics* 17(3):298-304.

Sarkar, J. i Liu, Y., (2016) Fanconi anemia proteins in telomere maintenance. *DNA Repair (Amst)* 43(107-12).

Schneider, M., Chandler, K., Tischkowitz, M. i Meyer, S., (2015) Fanconi anaemia: genetics, molecular biology, and cancer - implications for clinical management in children and adults. *Clinical Genetics* 88(1):13-24.

Schoder, C., Liehr, T., Velleuer, E., Wilhelm, K., Blaurock, N., Weise, A. i Mrasek, K., (2010) New aspects on chromosomal instability: chromosomal break-points in Fanconi anemia patients co-localize on the molecular level with fragile sites. *International Journal of Oncology* 36(2):307-12.

Schwartz, M., Zlotorynski, E., Goldberg, M., Ozeri, E., Rahat, A., Le Sage, C., Chen, B. P., Chen, D. J., Agami, R. i Kerem, B., (2005) Homologous recombination and nonhomologous end-joining repair pathways regulate fragile site stability. *Genes & Development* 19(22):2715-26.

Scotti, M. M. i Swanson, M. S., (2016) RNA mis-splicing in disease. *Nature Reviews. Genetics* 17(1):19-32.

Scully, R., Puget, N. i Vlasakova, K., (2000) DNA polymerase stalling, sister chromatid recombination and the BRCA genes. *Oncogene* 19(53):6176-83.

Seyschab, H., Friedl, R., Sun, Y., Schindler, D., Hoehn, H., Hentze, S. i Schroeder-Kurth, T., (1995) Comparative evaluation of diepoxybutane sensitivity and cell cycle blockage in the diagnosis of Fanconi anemia. *Blood* 85(8):2233-7.

Sfeir, A., Kosiyatrakul, S. T., Hockemeyer, D., Macrae, S. L., Karlseder, J., Schildkraut, C. L. i De Lange, T., (2009) Mammalian telomeres resemble fragile sites and require TRF1 for efficient replication. *Cell* 138(1):90-103.

Sherman, S. L., Morton, N. E., Jacobs, P. A. i Turner, G., (1984) The marker (X) syndrome: a cytogenetic and genetic analysis. *Annals of Human Genetics* 48(Pt 1):21-37.

Shimamura, A. i D'andrea, A. D., (2003) Subtyping of Fanconi anemia patients: implications for clinical management. *Blood* 102(9):3459.

Simoncic, I. i Gericke, G. S., (1996) The enigma of common fragile sites. *Human Genetics* 97(4):524-31.

Simons, A., Shaffer, L. G. i Hastings, R. J., (2013) Cytogenetic Nomenclature: Changes in the ISCN 2013 Compared to the 2009 Edition. *Cytogenetic and Genome Research* 141(1):1-6.

Singh, T. R., Bakker, S. T., Agarwal, S., Jansen, M., Grassman, E., Godthelp, B. C., Ali, A. M., Du, C. H., Rooimans, M. A., Fan, Q., Wahengbam, K., Steltenpool, J., Andreassen, P. R., Williams, D. A., Joenje, H., De Winter, J. P. i Meetei, A. R., (2009) Impaired FANCD2 monoubiquitination and hypersensitivity to camptothecin uniquely characterize Fanconi anemia complementation group M. *Blood* 114(1):174-80.

Slijepcevic, P., (1998) Telomere length and telomere-centromere relationships? *Mutation Research* 404(1-2):215-20.

Smetsers, S., Muter, J., Bristow, C., Patel, L., Chandler, K., Bonney, D., Wynn, R. F., Whetton, A. D., Will, A. M., Rockx, D., Joenje, H., Strathdee, G., Shanks, J., Klopocki, E., Gille, J. J., Dorsman, J. i Meyer, S., (2012) Heterozygote FANCD2 mutations associated with childhood T Cell ALL and testicular seminoma. *Familial Cancer* 11(4):661-5.

Solomon, P. J., Margaret, P., Rajendran, R., Ramalingam, R., Menezes, G. A., Shirley, A. S., Lee, S. J., Seong, M. W., Park, S. S., Seol, D. i Seo, S. H., (2015) A case report and literature review of Fanconi Anemia (FA) diagnosed by genetic testing. *Italian Journal of Pediatrics* 41(38).

Soulier, J., (2011) Fanconi anemia. *Hematology. American Society of Hematology. Education Program* 2011(492-7).

Stenson, P. D., Ball, E. V., Mort, M., Phillips, A. D., Shaw, K. i Cooper, D. N., (2012) The Human Gene Mutation Database (HGMD) and its exploitation in the fields of personalized genomics and molecular evolution. *Current Protocols in Bioinformatics* Chapter 1(Unit1.13).

Sterne-Weiler, T., Howard, J., Mort, M., Cooper, D. N. i Sanford, J. R., (2011) Loss of exon identity is a common mechanism of human inherited disease. *Genome Research* 21(10):1563-71.

- Strathdee, C. A., Gavish, H., Shannon, W. R. i Buchwald, M., (1992) Cloning of cDNAs for Fanconi's anaemia by functional complementation. *Nature* 356(6372):763-7.
- Sutherland, G. R. i Richards, R. I., (1999) Fragile sites-cytogenetic similarity with molecular diversity. *American Journal of Human Genetics* 64(2):354-9.
- Sutherland, G. R. i Baker, E., (2000) The clinical significance of fragile sites on human chromosomes. *Clinical Genetics* 58(3):157-61.
- Sutherland, G. R., Parslow, M. I. i Baker, E., (1985) New classes of common fragile sites induced by 5-azacytidine and bromodeoxyuridine. *Human Genetics* 69(3):233-7.
- Thyagarajan, B. i Campbell, C., (1997) Elevated homologous recombination activity in fanconi anemia fibroblasts. *The Journal of Biological Chemistry* 272(37):23328-33.
- Thys, R. G., Lehman, C. E., Pierce, L. C. i Wang, Y. H., (2015) DNA secondary structure at chromosomal fragile sites in human disease. *Current Genomics* 16(1):60-70.
- Timmers, C., Taniguchi, T., Hejna, J., Reifsteck, C., Lucas, L., Bruun, D., Thayer, M., Cox, B., Olson, S., D'andrea, A. D., Moses, R. i Grompe, M., (2001) Positional cloning of a novel Fanconi anemia gene, FANCD2. *Molecular Cell* 7(2):241-8.
- Tipping, A. J., Pearson, T., Morgan, N. V., Gibson, R. A., Kuyt, L. P., Havenga, C., Gluckman, E., Joenje, H., De Ravel, T., Jansen, S. i Mathew, C. G., (2001) Molecular and genealogical evidence for a founder effect in Fanconi anemia families of the Afrikaner population of South Africa. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98(10):5734-9.
- Tischkowitz, M. i Dokal, I., (2004) Fanconi anaemia and leukaemia - clinical and molecular aspects. *British Journal of Haematology* 126(2):176-91.
- Tjio, J. H. i Levan, A., (1956) The chromosome number of man. *Hereditas* 42(1-6).
- Tsai, S. Q., Zheng, Z., Nguyen, N. T., Liebers, M., Topkar, V. V., Thapar, V., Wyvekens, N., Khayter, C., Iafrate, A. J., Le, L. P., Aryee, M. J. i Joung, J. K., (2015) GUIDE-seq enables genome-wide profiling of off-target cleavage by CRISPR-Cas nucleases. *Nature Biotechnology* 33(2):187-97.

Vaz-Drago, R., Custodio, N. i Carmo-Fonseca, M., (2017) Deep intronic mutations and human disease. *Human Genetics* 136(9):1093-111.

Vinciguerra, P., Godinho, S. A., Parmar, K., Pellman, D. i D'andrea, A. D., (2010) Cytokinesis failure occurs in Fanconi anemia pathway-deficient murine and human bone marrow hematopoietic cells. *The Journal of Clinical Investigation* 120(11):3834-42.

Visser, A. E., Jaunin, F., Fakan, S. i Aten, J. A., (2000) High resolution analysis of interphase chromosome domains. *Journal of Cell Science* 113 ( Pt 14)(2585-93.

Vujic, D., Petrovic, S., Lazic, E., Kuzmanovic, M., Leskovac, A., Joksic, I., Micic, D., Jovanovic, A., Zecevic, Z., Guc-Scekic, M., Cirkovic, S. i Joksic, G., (2014) Prevalence of FA-D2 rare complementation group of Fanconi anemia in Serbia. *Indian Journal of Pediatrics* 81(3):260-5.

Wang, L. C. i Gautier, J., (2010) The Fanconi anemia pathway and ICL repair: implications for cancer therapy. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 45(5):424-39.

Wang, Y. H. i Griffith, J., (1996) Methylation of expanded CCG triplet repeat DNA from fragile X syndrome patients enhances nucleosome exclusion. *The Journal of Biological Chemistry* 271(38):22937-40.

Wang, Z., Rolish, M. E., Yeo, G., Tung, V., Mawson, M. i Burge, C. B., (2004) Systematic identification and analysis of exonic splicing silencers. *Cell* 119(6):831-45.

Waters, C. E., Saldivar, J. C., Hosseini, S. A. i Huebner, K., (2014) The FHIT gene product: tumor suppressor and genome 'caretaker'. *Cellular and molecular life sciences* : CMLS 71(23):4577-87.

Wilson, T. E., Arlt, M. F., Park, S. H., Rajendran, S., Paulsen, M., Ljungman, M. i Glover, T. W., (2015) Large transcription units unify copy number variants and common fragile sites arising under replication stress. *Genome Research* 25(2):189-200.

Xie, J., Wang, J. i Zhu, B., (2016) Genistein inhibits the proliferation of human multiple myeloma cells through suppression of nuclear factor-kappaB and upregulation of microRNA-29b. *Molecular Medicine Reports* 13(2):1627-32.

Yip, K. W. i Reed, J. C., (2008) Bcl-2 family proteins and cancer. *Oncogene* 27(50):6398-406.

Yu, S., Mangelsdorf, M., Hewett, D., Hobson, L., Baker, E., Eyre, H. J., Lapsys, N., Le Paslier, D., Doggett, N. A., Sutherland, G. R. i Richards, R. I., (1997) Human chromosomal fragile site FRA16B is an amplified AT-rich minisatellite repeat. *Cell* 88(3):367-74.

Yung, S. K., Tilgner, K., Ledran, M. H., Habibollah, S., Neganova, I., Singhapol, C., Saretzki, G., Stojkovic, M., Armstrong, L., Przyborski, S. i Lako, M., (2013) Brief report: human pluripotent stem cell models of fanconi anemia deficiency reveal an important role for fanconi anemia proteins in cellular reprogramming and survival of hematopoietic progenitors. *Stem Cells* 31(5):1022-9.

Zimonjic, D. B., Druck, T., Ohta, M., Kastury, K., Croce, C. M., Popescu, N. C. i Huebner, K., (1997) Positions of chromosome 3p14.2 fragile sites (FRA3B) within the FHIT gene. *Cancer Research* 57(6):1166-70.

Zlotorynski, E., Rahat, A., Skaug, J., Ben-Porat, N., Ozeri, E., Hershberg, R., Levi, A., Scherer, S. W., Margalit, H. i Kerem, B., (2003) Molecular basis for expression of common and rare fragile sites. *Molecular and Cellular Biology* 23(20):7143-51.

## ***Biografija autora***

Jelena Filipović Tričković je rođena 26.09.1985. godine u Nišu. Osnovno i srednje obrazovanje stekla je u Kraljevu završivši Gimnaziju. Medicinski fakultet Univerziteta u Nišu upisala je školske 2004/2005. godine, gde je i diplomirala 10.11.2010. godine sa prosečnom ocenom 9,86. Diplomski rad pod naslovom „Terapija toksičnog adenoma i multinodozne toksične strume radioaktivnim jodom (RAI)” odbranjen je na katedri za Nuklearnu medicine Medicinskog fakulteta Univerziteta u Nišu. Školske 2011/2012. godine upisala je doktorske studije na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, studijska grupa Biologija, smer Genetika.

Od 01.09.2011. godine zaposlena je u Laboratoriji za fizičku hemiju Instituta za Nuklearne nauke „Vinča”, Univerziteta u Beogradu i angažovana je kao saradnik na projektu Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije „Radiosenzitivnost humanog genoma” OI173046 pod rukovodstvom dr Gordane Joksić, naučnog savetnika u Institutu za nuklearne nauke „Vinča”, Univerziteta u Beogradu. Pored nacionalnog projekta, angažovana je i na međunarodnim projektima:

1. 2016- „Risk Reduction-Inhibition by Phytochemical Products of Oral Lesions Induced by Smokeless Tobacco (Swedish snus)-Model Validation and Mechanisms”, Sweedish Match AB, Stockholm, Švedska
2. 2015-2016. „Chromosomal breakpoints in different Fanconi anemia complementation groups” (DAAD bilateralni projekat sa Institutom za humanu genetiku, Univerzitetska klinika Jena, Nemačka)
3. 2014-2015. „Preventions of oral lesions caused by smokeless tobacco“, Sweedish Match AB, Stockholm, Švedska
4. 2012-2013. „Fanconi anemia FANCD2, 1st molecular cytogenetic characterization“ (DAAD bilateralni projekat sa Institutom za humanu genetiku, Univerzitetska klinika Jena, Nemačka)



U zvanje istraživač-saradnik izabrana je 2013. godine, a reizabrana 2016. godine.

### **Stipendije i stručno usavršavanje:**

Kursevi:

1. 13-14.11.2015. Sixth international course on Fluorescence in situ hybridization (FISH + array- CGH + microdissection). Thomas Liehr, Anja Weise, Kristin Mrasek, Nadezda Kosyakova, Molecular Cytogenetics, Institut za humanu genetiku, Univerzitetska klinika Jena, Nemačka)

Stipendije:

1. 2015. DAAD stipendija, Institut za humanu genetiku, Univerzitetska klinika Jena, Nemačka)
2. 2014. DAAD stipendija, Institut za humanu genetiku, Univerzitetska klinika Jena, Nemačka)

Do sada je objavila deset radova iz uže naučne oblasti u časopisima od međunarodnog značaja i 5 kongresnih saopštenja sa iz uže naučne oblasti na skupovima od međunarodnog značaja štampanih u celosti i 5 kongresnih saopštenja sa iz uže naučne oblasti na skupovima od međunarodnog značaja štampanih u izvodu.

Прилог 1.

## Изјава о ауторству

Потписани-а \_\_\_\_\_ Јелена Филиповић Тричковић \_\_\_\_\_

број индекса \_\_\_\_\_ Б3025/2011 \_\_\_\_\_

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

**Молекуларно-цитогенетичка карактеризација хромозомских прекида у лимфоцитима периферне крви пацијената оболелих од Фанконијеве анемије у различитим фазама болести**

- 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.

**Потпис докторанда**

У Београду, \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Прилог 2.

**Изјава о истоветности штампане и електронске  
верзије докторског рада**

Име и презиме аутора \_\_\_\_\_ Јелена Филиповић Тричковић \_\_\_\_\_

Број индекса  
\_\_\_\_\_ Б3025/2011 \_\_\_\_\_

Студијски програм \_\_\_\_\_ Генетика \_\_\_\_\_

Наслов рада

**Молекуларно-цитогенетичка карактеризација хромозомских прекида у  
лимфоцитима периферне крви пацијената оболелих од Фанконијеве  
анемије у различитим фазама болести**

Ментори

др Гордана Јоксић

др Катарина Зељић

Потписани/а \_\_\_\_\_

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, \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

### Прилог 3.

## Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

**Молекуларно-цитогенетичка карактеризација хромозомских прекида у лимфоцитима периферне крви пацијената оболелих од Фанконијеве анемије у различитим фазама болести**

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 - Дозвољавање 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. Дозвољавање 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. Дозвољавање 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. Дозвољавање 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. Дозвољавање 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. Дозвољавање 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.